



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Luciane Pires da Costa

**Consumo de óleo de peixe na resposta inflamatória em ratos submetidos a
esplenectomia total isolada ou combinada com autoimplante esplênico e à
indução de sepse abdominal**

Rio de Janeiro

2012

Luciane Pires da Costa

Consumo de óleo de peixe na resposta inflamatória em ratos submetidos a esplenectomia total isolada ou combinada com autoimplante esplênico e à indução de sepse abdominal

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador : Prof. Dr. Ruy Garcia Marques

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C837 Costa, Luciane Pires da.
Consumo de óleo de peixe na resposta inflamatória em ratos submetidos a
esplenectomia total isolada ou combinada com autoimplante esplênico e à
indução de sepse abdominal / Luciane Pires da Costa. – 2012.

70 f.

Orientador: Ruy Garcia Marques.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de
Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Óleo de peixe – Teses. 2. Esplenectomia – Teses. 3. Sepse – Teses. 4. Baço
– Teses. 5. Síndrome de resposta inflamatória sistêmica. 6. Interleucina- 10. I.
Marques, Ruy Garcia. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade
de Ciências Médicas. III. Título.

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Luciane Pires da Costa

Consumo de óleo de peixe na resposta inflamatória em ratos submetidos a esplenectomia total isolada ou combinada com autoimplante esplênico e à indução de sepse abdominal.

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 17 de julho de 2012.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ruy Garcia Marques (Orientador)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. ^a Dra. Maria das Graças Tavares do Carmo
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Gilson Teles Boaventura
Universidade Federal Fluminense

Prof. ^a Dra. Isabela Teixeira Bonomo
Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Gustavo Casimiro Lopes
Instituto de Educação Física e Desportos- UERJ

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho e todas as conquistas da minha vida:

Aos Meus Pais, que me propiciaram uma vida digna onde eu pudesse crescer, acreditando que tudo é possível, desde que sejamos honestos, íntegros de caráter e tendo a convicção de que desistir nunca seja uma ação contínua em nossas vidas; que sonhar e concretizar os sonhos só dependerão de nossa vontade.

Ao meu irmão, Luciano Pires da Costa

Ao meu noivo, Bruno Gomes da Cruz, pela parceria, compreensão e paciência.

Amo vocês! Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Nenhum trabalho é realizado sozinho! Tive a sorte de poder contar com a colaboração de profissionais e ou amigos que estiveram ao meu lado durante essa importante etapa da minha vida profissional. Meus sinceros agradecimentos:

Ao Professor Ruy Garcia Marques, do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas – UERJ, me orgulho de ter sido sua orientanda. Obrigada pela confiança, paciência e orientação, fundamental para a realização e conclusão deste trabalho. Um exemplo de líder, pesquisador e professor.

Ao Professor Egberto Gaspar de Moura, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ, pelo incentivo fundamental para a minha inserção nesse grupo. Um referencial como pesquisador e professor.

À Professora Josely Correa Koury, do Centro de Estudos de Fatores de Estresse do Instituto de Nutrição – UERJ, pela confiança, parceria e incentivo constante durante a minha vida profissional.

À Professora Matilde Pumar, do Laboratório de Ciência e Tecnologia dos Alimentos do Instituto de Nutrição – UERJ, pelo incentivo e fundamental orientação no preparo da ração utilizada nesse trabalho.

Ao Professor Raphael Hirata Junior, da Faculdade de Ciências Médicas – UERJ, pela colaboração nas análises, ensinamento e incentivo constante durante a realização deste trabalho.

Ao Professor José Uereles Braga, da Disciplina de Fisiopatologia Clínica e Experimental (Clinex) – UERJ, pela disponibilidade para colaboração na análise estatística desse trabalho.

À Professora Patrícia Torres Bozza, do Departamento de Farmacologia da Fundação Oswaldo Cruz, pela pronta disponibilidade para a realização das análises de citocinas.

Ao Técnico Édson Fernandes de Assis, do Departamento de Farmacologia da Fundação Oswaldo Cruz, pelo apoio incondicional na realização das análises de citocinas.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, Amélia, pela atenção, carinho e pronta disponibilidade.

À mestrandia Érica Silva Lima, do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas (PG-Fisiocirurgia), pela pronta colaboração, parceria e amizade.

Ao Doutorando Carlos Eduardo Rodrigues Caetano, do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas (PG-Fisiocirurgia), pela colaboração e parceria indispensável.

À estagiária Daniele Farias, do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas – UERJ, pela amizade e colaboração indispensável para a realização desta tese.

Aos meus amigos e pesquisadores Gustavo Cassimiro e Isabela Bonomo, pelos “luxuosos” auxílios intelectuais e amizade.

Aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado nesse caminhada. Obrigada!

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

RESUMO

PIRES, Luciane da Costa. *Consumo de óleo de peixe na resposta inflamatória em ratos submetidos a esplenectomia total isolada ou combinada com autoimplante esplênico e à indução de sepse abdominal*. 2012. 70f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Em órgãos potencialmente importantes na resposta imune, como o baço, alternativas como o autoimplante de segmentos esplênicos, quando a esplenectomia total torna-se necessária, e a utilização de nutrientes com funcionalidade imunomoduladora vêm sendo estudadas, objetivando minimizar o efeito pró-inflamatório persistente da sepse abdominal. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do consumo de óleo de peixe na modulação da resposta inflamatória em animais submetidos a esplenectomia total isolada ou combinada com autoimplante esplênico e à indução de sepse abdominal, verificando a possível otimização na resposta pró-inflamatória e a regeneração funcional do autoimplante. Utilizamos 64 ratos machos da linhagem *Wistar*, com peso variando entre 140-200 g, aleatoriamente distribuídos em oito grupos: quatro grupos-controle (100% óleo de soja) e quatro grupos-intervenção (35% de óleo de peixe), cada um com oito animais. Os dos grupos-controle (animais alimentados com ração purificada, segundo AIN-93, com conteúdo lipídico constituído por 100% óleo de soja) foram: I – sem intervenção cirúrgica e, 16 semanas após, submetidos à indução de sepse abdominal; II – esplenectomia total isolada e, 16 semanas após, submetidos à indução de sepse abdominal; III – esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico e, 16 semanas após, submetidos à indução de sepse abdominal; e IV – esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico e, oito semanas após, submetidos à indução de sepse abdominal. Os dos grupos-intervenção (V a VIII) foram submetidos a procedimentos similares aos executados nos grupos I a IV, respectivamente, sendo a única modificação fundamentada na substituição de 35% do conteúdo lipídico da alimentação dos animais por óleo de peixe. Todos os animais foram submetidos a sepse induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP). Coletamos amostras sanguíneas de todos os animais antes da indução da sepse (período 1) e 2 e 4 horas (períodos 2 e 3) após a indução da sepse abdominal. Verificou-se, a cada três dias, massa corporal (MC) e ingestão alimentar (IA). Analisamos as citocinas INF- γ , IL-6 e IL-10 por meio da tecnologia *Luminex*. Utilizamos o teste T de Student para análise estatística, considerando significativo com $p \leq 0,05$. Os dos grupos V, VI e VIII apresentaram maior consumo alimentar que seus controles. Os do grupo V apresentaram menores concentrações de IFN- γ em todos os períodos e maior IL-10 nos períodos 2 e 3. Os do grupo VI apresentaram menores concentrações de todas as citocinas: IFN- γ nos períodos 2 e 3; IL-6 nos períodos 1 e 2; e maior IL-10 nos períodos 1 e 2. Os do grupo VIII apresentaram menor IFN- γ no período 3, IL-6 no período 2, e maior IL-10 no período 1. Não observou-se diferenças nos do grupo VII em nenhuma das citocinas estudadas. Este estudo demonstrou que a utilização do óleo de peixe em pequena dose, consumido cronicamente, como parte do teor lipídico total da dieta e não de forma suplementar, é capaz de manter a massa corporal adequada e reduzir a resposta inflamatória à sepse abdominal induzida por CLP, aumentando a IL-10 plasmática em ratos que não sofreram intervenção cirúrgica, e parece favorecer a regeneração funcional precoce do autoimplante esplênico.

Palavras-chave: Sepse. Óleo de peixe. Baço. Esplenectomia. Ômega -3. Autoimplante esplênico. Ácidos graxos essenciais.

ABSTRACT

In organs potentially important in the immune response, like the spleen, alternatives such as autotransplantation of splenic segments, when the total splenectomy becomes necessary, and the use of nutrients with immunomodulatory function have been studied, trying to minimize the effect of pro-inflammatory persistent abdominal sepsis. The aim of this study was to evaluate the effect of consumption of fish oil in modulating the inflammatory response in animals submitted to total splenectomy alone or combined with spleen autotransplantation and the induction of sepsis, verifying the possible optimization in the proinflammatory response and the functional regeneration of the autotransplant. We used 64 male *Wistar* rats, weighing between 140-200 g, were randomly distributed into eight groups: four control-groups (100% soybean oil) and four intervention-groups (35% fish oil), each one with ten animals. The rats in control groups (animals fed with purified according to the AIN-93 with lipid content consisting of 100% soybean oil) : I – without surgical intervention, and 16 weeks after, submitted to the induction of abdominal sepsis II – total splenectomy alone, and 16 weeks after, submitted to the induction of abdominal sepsis; III – total splenectomy combined with spleen autotransplantation, and 16 weeks after, submitted to the induction of abdominal sepsis; and IV – total splenectomy combined with spleen autotransplantation, and 8 weeks after, submitted to the induction of abdominal sepsis. The rats in intervention groups (V to VIII) were subjected to similar procedures performed in groups I to IV, respectively, being the only modification based on the substitution of 35% of the lipid content of animal feed for fish oil. All animals were subjected to sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP). We collected blood samples from all animals before the induction of sepsis (period 1) and 2 and 4 hours (periods 2 and 3) after the induction of abdominal sepsis. We checked every 3 days corporal mass (MC) and alimentary ingestion (AI). We analyzed the cytokines IFN- γ , IL-6 and IL-10 by *Luminex* technology. We used the T-test of Student for statistical analysis, considering significant with a $p \leq 0.05$. The animals in groups V, VI, and VIII showed higher food intake than their controls. The animals in group V showed lower IFN- γ in all, IL-6 in periods 1 and 2; and higher IL-10 in periods 2 e 3. The animals in group VI showed lower concentration of all cytokines: IFN- γ in periods 2 and 3; IL-6 in periods 1 and 2 and higher IL-10 in periods 1 e 2. The animals in group VIII showed lower IFN- γ in period 3, IL-6 in period 2, and higher IL-10 in period 1. No differences were observed with the concentration of cytokines in those of group VII. This study demonstrated that the use of fish oil in small doses, chronically consumed as part of total dietary fat and not as a supplement, is able to maintain the adequate corporal mass and to reduce the inflammatory response to abdominal sepsis induced by CLP, increasing IL-10 concentration in health rats and seems to promote early functional regeneration of the spleen autotransplants.

Keywords: Sepsis. Fish oil. Esplenectomy. Ômega-3. Spleen autotransplantation. Essential fatty acids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Seqüência de imagens do procedimento de punção e ligadura cecal (CLP) em ratos	29
Figura 2	Concentrações plasmáticas de IFN- γ , IL-6 e IL-10 dos animais dos Grupos I e V, submetidos a sepse, após serem alimentados por 16 semanas. Animais alimentados com ração segundo as recomendações da AIN-93M, sendo grupo controle com 100% de óleo de soja e o grupo experimental com 35% de óleo de peixe	36
Figura 3	Concentrações plasmáticas de IFN- γ , IL-6 e IL-10 dos animais dos Grupos II e VI que após esplenectomia total, foram alimentados por 16 semanas e submetidos a sepse. Os animais foram alimentados com ração segundo as recomendações da AIN-93M, sendo grupo controle com 100% de óleo de soja e o grupo experimental com 35% de óleo de peixe.....	37
Figura 4	Concentrações plasmáticas de IFN- γ , IL-6 e IL-10 dos animais dos Grupos III e VII que, após esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico, foram alimentados por 16 semanas e submetidos a sepse. Os animais foram alimentados com ração segundo as recomendações da AIN-93M, sendo grupo controle com 100% de óleo de soja e o grupo experimental com 35% de óleo de peixe	38
Figura 5	Concentrações plasmáticas de IFN- γ , IL-6 e IL-10 dos animais dos Grupos IV e VIII após esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico, foram alimentados por 8 semanas e submetidos a sepse. Os animais foram alimentados com ração segundo as recomendações da AIN-93M, sendo grupo controle com 100% de óleo de soja e o grupo experimental com 35% de óleo de peixe	39
Figura 6	Concentrações plasmáticas de IFN- γ , IL-6 e IL-10 dos animais dos Grupos I, II, III e IV alimentados com ração segundo as recomendações da AIN-93M, com 100% do conteúdo total de lipídio constituído por de óleo de soja e após serem submetidos a esplenectomia total, esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico, alimentados por oito e 16 semanas e submetidos à indução de sepse abdominal.....	42
Figura 7	Concentrações plasmáticas de IFN- γ , IL-6 e IL-10 dos animais dos Grupos V, VI, VII e VII alimentados com ração segundo as recomendações da AIN-93M, com 35% do conteúdo total de lipídio substituído por de óleo de peixe e após serem submetidos a esplenectomia total, esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico, alimentados por oito e 16 semanas e submetidos à indução de sepse abdominal.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição de macronutrientes da ração elaborada segundo as recomendações de dieta purificada da AIN-93 para manutenção de ratos adultos	27
Tabela 2	Distribuição de micronutrientes da ração elaborada segundo as recomendações de dieta purificada da AIN-93 para manutenção de ratos adultos	28
Tabela 3	Consumo alimentar de animais submetidos a diferentes intervenções cirúrgicas e a sepse abdominal, alimentados com dieta controle (100% de óleo de soja) e dieta experimental contendo 35% de óleo de peixe, segundo as recomendações da AIN-93M	32
Tabela 4	Massa corporal de animais submetidos a diferentes intervenções cirúrgicas e a sepse abdominal, alimentados com dieta controle (100% de óleo de soja) e dieta experimental contendo 35% de óleo de peixe, segundo as recomendações da AIN-93M	33
Tabela 5	Concentrações plasmáticas de IFN- γ , IL-6 e IL-10 dos animais de animais alimentados com ração segundo as recomendações da AIN-93M, sendo os grupo controle com 100% de óleo de soja e os grupo experimental com 35% de óleo de peixe (Grupos I e V), após esplenectomia total (Grupo II e VI), após esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico alimentados por dezesseis semanas (Grupo III e VII), e por oito semanas (Grupo IV e VIII), até serem submetidos à indução de sepse abdominal.....	35
Tabela 6	Concentrações plasmáticas de IFN- γ , IL-6 e IL-10 dos animais dos grupos I (sem intervenção cirúrgica), II após esplenectomia total, III e IV após esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico, alimentados por 8 e 16 semanas e submetidos a sepse. Os animais foram alimentados com ração segundo a AIN-93M	41
Tabela 7	Concentrações plasmáticas de IFN- γ , IL-6 e IL-10 nos animais dos grupos V (sem intervenção cirúrgica), VI após esplenectomia total isolada, VII e VIII após esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico, alimentados por oito e 16 semanas e submetidos a sepse. Os animais foram alimentados com ração segundo a AIN-93M com 35%do conteúdo total de óleo substituído por óleo de peixe	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-LOX	Lipoxigenase-5
AGn-3	Ácido Linolênico
AGn-6	Ácido Linoléico
AGs	Ácido Graxo
AIE	Autoimplante Esplênico
AIN-93	Instituto Americano de Nutrição -93
AMPc	Monofosfato Cíclico de Adenosina
BHI	Infusão cérebro-coração
BLPA	Bainha Linfóide Periarteriolar
CASP	Peritonite Cecal Ascendente por Stent
CD (4,8)	Grupamento de Diferenciação (4,8)
CLP	Punção e Ligadura Cecal
COX	Cicloxigenase
DAU	Duplo Açúcar Uréia
DHA	Ácido Docosahexaenóico
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ET	Esplenectomia Total
HETEs	Ácido Hidroxieicosatetraenóico
HPETEs	Ácidos Hidroperoxieicosatetraenóico
IA	Ingestão Alimentar
IDR	Ingestão Diária Recomendada
IFPE	Infecção Fulminante Pós-esplenectomia

IL-1	Interleucina-1 (2;6;8;10;12)
INF- γ	Interferon-gama
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
LTs	Leucotrienos
LXs	Lipoxinas
Mac-1	Antígeno de Macrófago – 1
MC	Massa Corporal
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade
mRNA	RNA mensageiro
NK	<i>Natural Killer</i>
PGs	Prostaglandinas
PPAR	Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomos
SMF	Sistema Mononuclear Fagocitário
SNC	Sistema Nervoso Central
T _c	T citotóxicos
TCL	Triglicerídeos de Cadeia Longa
TCM	Triglicerídeos de Cadeia Média
Th(1,2)	T <i>helper</i> (tipo 1,2)
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TXs	Tromboxanos
UCP2	Proteína Desacopladora-2
ZMB	Zona Marginal do Baço

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVO	21
1.1	Objetivo geral	21
1.2	Objetivos específicos	21
2	MÉTODOS	22
2.1	Aspectos éticos no cuidado com os animais	22
2.2	Parcerias e recursos	22
2.3	Animais e grupos experimentais	22
2.4	Procedimentos anestésicos e cirúrgicos	22
2.4.1	<u>Esplenectomia total isolada</u>	25
2.4.2	<u>Esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico</u>	25
2.4.3	<u>Controle pós-operatório</u>	25
2.5	Composição da ração, segundo AIN-93	27
2.6	Indução de sepse abdominal	27
2.7	Coleta sanguínea para exames laboratoriais	28
2.8	Análise de citocinas plasmáticas	29
2.9	Análise de líquido peritoneal	31
2.10	Análise estatística	32
3	RESULTADOS	33
3.1	Consumo alimentar e massa corporal	33
3.2	Citocinas plasmáticas	35
3.3	Análise de líquido peritoneal	46
4	DISCUSSÃO	47
5	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57
	ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais.....	70

INTRODUÇÃO

O interesse em pesquisar as interações do óleo derivado de peixe e a sepe deve-se à presença nesse alimento de derivados lipídicos, como o ácido graxo ômega 3, com função imunomoduladora comprovada [1]. Entretanto, é necessário aprofundar-se o conhecimento acerca da estrutura dos lipídios e de suas interações biomoleculares para que possamos utilizá-los na prática clínica, tanto profilática quanto terapêuticamente.

A estrutura fundamental dos lipídios é composta por ácidos graxos (AGs) ou estruturas diretamente a eles relacionadas, como os alcoóis, aldeídos ou aminas [2]. Os AGs compõem as unidades fundamentais para a síntese de lipídios e são constituídos por cadeias de átomos de carbono, ligados a átomos de hidrogênio [3]. O tamanho da cadeia carbônica determina a classificação dos AGs, em curta (dois a quatro átomos de carbono), média (seis a dez átomos de carbono) e longa (acima de 12 e/ou 18 átomos de carbono) [4].

A presença de duplas ligações entre as cadeias de átomos de carbono, denominadas insaturações, classificam esses AGs em saturado (nenhuma dupla ligação) monoinsaturado (uma dupla ligação) e poliinsaturados (mais de uma dupla ligação), essas conformações estruturais determinam a consistência, flexibilidade e conseqüentes interações moleculares dos lipídios [4].

Os AGs podem ser sintetizados a partir de precursores endógenos estruturalmente mais simples, mas alguns deles somente podem ser obtidos por meio da dieta, sendo por isso denominados ácidos graxos essenciais [5]. Dentre eles, encontram-se os da família AGn-6 e AGn-3, destacando-se os ácidos linoléico (AGn-6) (C18:2), linolênico (AGn-3) (C18:3) e seus derivados, eicosapentaenóico (EPA) (C20:5) e docosahexaenóico (DHA) (C22:6) [6]. Os AGn-3 parecem alterar a expressão de moléculas de superfície importantes no processo de adesão celular e a produção de mediadores envolvidos na comunicação de células do sistema imune, como os eicosanóides [7-9].

O conhecimento do mecanismo da ação dos eicosanóides na resposta inflamatória e imune ratifica a hipótese de que essa resposta possa ser regulada por ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa n-3, encontrados em óleos de peixe [7,10]. No grupo dos eicosanóides, incluem-se as prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs), leucotrienos (LTs), lipoxinas (LXs) e ácidos hidroperoxieicosatetraenóico (HPETEs) e hidroxieicosatetraenóico (HETEs) [11], que regulam a atividade celular, principalmente pela alteração dos níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) [12]. A sua liberação é estimulada por diversas substâncias, como citocinas, complexos antígeno-anticorpo, fatores de crescimento, radicais

livres, colágeno e bradicinina [13]. A disponibilidade de AGs essenciais consiste no regulador mais importante da formação de eicosanóides, que irão competir pelas vias da cicloxigenase e lipoxigenase [14].

A magnitude da resposta inflamatória está relacionada à distribuição entre AGn-3 e AGn-6, e a dimensão da cadeia de triglicerídeos [15]. A competição entre AGn-3 e AGn-6 na via 5-lipoxigenase é capaz de suprimir a formação de mediadores pró-inflamatórios, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), leucotrienos-4 (LT4) e tromboxanos-2 (TX2), favorecendo a produção de mediadores antiinflamatórios, como a interleucina-10 (IL-10) [7,15-17].

O EPA é o precursor dos eicosanóides, sendo responsável pela regulação da produção de citocinas antiinflamatórias. Essas substâncias são proteínas semelhantes a hormônios que permitem a comunicação entre a célula e o ambiente externo, podendo determinar a evolução e o desfecho do processo inflamatório [10].

A liberação de citocinas na circulação sanguínea desempenha um importante papel efetor e também modulador da resposta inflamatória sistêmica. Essas citocinas podem ser, em geral, agrupadas em função de seu efeito preponderante, como pró- ou antiinflamatórias. As citocinas tipicamente pró-inflamatórias, que estimulam a liberação de diversos tipos celulares e de outras citocinas, são: TNF- α , IL-1, IL-2, IL-12, IL-8 e interferon-gama (INF- γ); as citocinas com efeitos antiinflamatórios, que inibem o processo inflamatório, em parte pela redução da produção de diversas citocinas que regulam positivamente a resposta, minimizando o comprometimento orgânico resultante, são: IL-4, IL-10, IL-13 e IL-6 [18].

Em estudo realizado em ratos com colite induzida que receberam emulsões lipídicas (triglicerídeos de cadeia média – TCM; triglicerídeos de cadeia longa – TCL; e óleo de peixe) com diferentes razões n-3/n-6, por meio de cateter venoso central, verificou-se que a associação TCM/TCL e óleo de peixe com alta razão entre n-3/n-6 determina impacto benéfico, atenuando as conseqüências morfológicas e inflamatórias e diminuindo as concentrações teciduais de eicosanóides pró-inflamatórios [17,19-20].

Embora muitos dos efeitos dos AGn-3 estejam relacionados aos eicosanóides, outros mecanismos de ação que envolvem esse AGs devem-se à regulação da expressão de genes, que são determinantes na funcionalidade celular imune e na produção de mediadores derivados de células. Essas alterações, que independem dos subprodutos do EPA E DHA, modificam a diferenciação e desenvolvimento de adipócitos, a oxidação de AGs e de lipoproteínas, e a proliferação peroxissomal hepática, por meio dos receptores ativados por proliferador de peroxissomos (PPAR) [21].

Apesar do conhecimento da influência comprovada dos AGn-3 no metabolismo celular, desenvolvimento neuronal, proteção cardiovascular e capacidade imunoprotetora, ainda não existe uma convergência de recomendação para o seu consumo dietético. Alguns obstáculos dificultam o estabelecimento da ingestão diária recomendada (IDR), como o conhecimento exato da conversão de ácido linolênico a EPA ($\pm 5\%$) e DHA ($\pm 0,5\%$), e se estes produtos são suficientes para alcançar níveis teciduais ótimos de AGn-3 [22].

Embora os efeitos benéficos do ômega-3 na dieta estejam comprovados, a suplementação excessiva de EPA, DHA e/ou de AGn-3 pode favorecer o maior estresse oxidativo de membranas, aumento da lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein* – LDL) e do colesterol, redução da agregação plaquetária, proliferação linfocitária e potencialização de imunossupressão [9,23]. Entretanto, a maioria dos estudos comprovam, a eficácia do AGn-3, EPA e DHA na atenuação de processos inflamatórios e do estresse oxidativo [24-26].

O estresse oxidativo oriundo da perda do equilíbrio entre os processos químicos que envolvem transferência e/ou troca de elétrons de uma molécula, átomo ou íon para outro reagente (equilíbrio redox), favorece a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Em organismo sem perfeito equilíbrio redox, as EROs podem deflagrar o início de um processo inflamatório e a incapacidade de controle ou bloqueio da resposta inflamatória pelo organismo pode deflagrar um quadro de sepse [27-29].

A resposta sistêmica ao trauma ou infecção é uma tentativa do organismo em neutralizar a agressão e manter ou recuperar a homeostasia. Intervenções cirúrgicas, assim como processos inflamatórios, promovem a liberação de radicais livres, que, de acordo com a capacidade antioxidante (endógena e/ou exógena) do indivíduo afetado, podem favorecer a ocorrência do estresse oxidativo [30]. Os radicais livres são capazes de estimular citocinas, provavelmente por meio de macrófagos, determinando, assim, a formação de moléculas de adesão celular, potencializando a ocorrência de disfunção orgânica múltipla e de choque séptico [31,32].

Apesar de todos os avanços no diagnóstico e tratamento da sepse abdominal, o índice de mortalidade continua semelhante ao observado há quatro décadas. Como a diversidade das doenças, microrganismos causadores e outras variáveis nos pacientes sépticos dificultam a realização de estudos clínicos controlados, pesquisas com modelos experimentais em animais que mimetizam situações clínicas têm sido cada vez mais utilizadas [33].

Diversos modelos animais de sepse abdominal vêm sendo desenvolvidos e, na maioria deles, um foco de infecção intra-abdominal é gerado para iniciar a inflamação sistêmica. No

método por inoculação de lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina é inoculada por via intravenosa ou diretamente na cavidade abdominal. Esse método difere muito no perfil de liberação de citocinas, quando comparado à sepse humana, em que a endotoxina detectada no sangue destes pacientes encontra-se em nível baixo [33].

Outro método para indução de sepse abdominal experimental é a *colon ascendens stent peritonitis* (CASP), em que um *stent* com diâmetro variável é cirurgicamente inserido no cólon ascendente, estando a sobrevida após este procedimento diretamente correlacionada ao calibre do *stent* [34].

O modelo experimental de indução a sepse denominado *cecal ligation and puncture* (CLP) leva à formação de abscesso intra-abdominal, com sinais inflamatórios sistêmicos bem sustentados [34]. Neste método, descrito inicialmente por Wichtermann *et al.*, em 1980, a contaminação abdominal se dá com as bactérias da luz intestinal do próprio animal, assemelhando-se à ocorrência de uma peritonite secundária em humanos [33,35], justificando nossa escolha desse método para a utilização no presente estudo.

Diamond, em 1969, descreveu uma entidade clínica distinta de outras sepSES ou bacteremias presentes em indivíduos com baço preservado, a que denominou Infecção Fulminante Pós-esplenectomia (IFPE) [36]. A ausência do filtro fagocitário bacteriano e a perda da produção específica de anticorpos, ambos desempenhados pelo baço, podem ser os fatores diferenciais da IFPE [37].

O baço é o maior órgão linfóide do corpo humano. Nele, as células do sistema imune estão presentes em grande número, 25% de todos os linfócitos T e 10-15% de todos os linfócitos B, exercendo funções primordiais no processo inflamatório, como participação no início da resposta imune, fagocitose celular e produção de anticorpos [38].

Estruturalmente, o baço divide-se em dois compartimentos: a polpa vermelha e a polpa branca [38,39]. A polpa vermelha constitui a sua maior parte e nela residem macrófagos, plaquetas, hemácias, células dendríticas, linfócitos esparsos (especialmente linfócitos T), plasmócitos e uma rede de fibras reticulares que se dispõe na forma de sinusóides [40]. A polpa branca corresponde a 25% do volume total do baço e é dividida em três subcompartimentos: a bainha linfóide periarteriolar (BLPA) (rica em linfócitos T), os folículos linfóides (ricos em linfócitos B) e a zona marginal do baço (ZMB) [39,41].

A importância do baço em um estado séptico é reconhecida desde 1891, quando Bardach demonstrou aumento do índice de infecção em cães esplenectomizados. Em 1919, Morris & Bullock, em estudo experimental com ratos demonstrou que a esplenectomia poderia levar ao aumento da suscetibilidade a infecções [42].

Algumas alternativas, como o autoimplante de tecido esplênico, após a realização de esplenectomia total, e a utilização de nutrientes com potencial imunomodulador vêm sendo estudadas, objetivando minimizar o efeito pró-inflamatório persistente da sepse [43-46].

O sistema imune compreende todos os mecanismos pelos quais um organismo multicelular se defende de invasores externos, como bactérias, vírus e outros. Esse mecanismo de defesa é dividido em inato ou adaptativo, ambos dependem da ativação de leucócitos e possuem atuação conjunta [47,48].

Células fagocitárias (neutrófilos, monócitos e macrófagos), células que liberam mediadores inflamatórios (basófilos e eosinófilos) e células *Natural Killer* (NK), são as responsáveis pela imunidade inata. As células NK também atuam na imunidade adaptativa, produzindo citocinas [47].

A resposta imune mediada por linfócitos T e B é denominada adaptativa. Esses linfócitos são capazes de reconhecer antígenos e produzir anticorpos específicos contra agentes infecciosos, sendo esse sistema de reconhecimento denominado complexo de histocompatibilidade principal (*Main Histocompatibility Complex* – MHC) [49].

Os linfócitos T podem ser divididos em T *helper* (Th) e T citotóxicos (T_c). As células T_c, como os linfócitos T- CD8⁺, reconhecem antígenos ligados a MHC-classe I; já as células T_h ou linfócitos T- CD4⁺, interagem com antígenos MHC-classe II [49,50].

Os linfócitos T- CD4⁺ podem ser subdivididos em dois grupos: células T *helper* tipo 1 (T_{h1}), que secretam citocinas, como IL-2, IFN- γ e IFN- β , e células T *helper* tipo 2 (T_{h2}), que secretam citocinas, como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 [50]. As citocinas produzidas pelos linfócitos T_{h1} inibem a produção das citocinas T_{h2} e vice-versa, por um mecanismo denominado contra-regulação [51].

A intermediação entre os dois tipos de resposta do sistema imune, possui crucial participação do baço, já que, durante o processo inflamatório, a ZMB atua como um filtro seletivo para muitos patógenos sanguíneos. Os macrófagos da ZMB possuem receptores para o reconhecimento de antígenos e propiciam a sua completa eliminação da circulação, ou o seu acúmulo local. Em caso de acúmulo, ocorre ativação das células B de ZMB ou o processamento do patógeno por células dendríticas e subsequente apresentação na polpa branca. Esta cooperação entre os três mais importantes tipos celulares da ZMB demonstra a intermediação entre os sistemas inato e adaptativo da resposta imune [52].

Diante destas comprovações, quando estão indicadas intervenções cirúrgicas sobre o baço, tem-se preconizado a realização de condutas alternativas à sua excisão total, como esplenorrafias e esplenectomias parciais e subtotais [44,45,53]. Contudo, quando a

esplenectomia total é inevitável, a realização do implante esplênico autógeno parece constituir a única alternativa para a preservação de tecido esplênico [54,55].

Inúmeros estudos comprovam a ocorrência de sua regeneração morfológica, que se inicia a partir dos primeiros dias pós-implante [56-58], e funcional, um pouco mais tardiamente, iniciando-se a partir da oitava semana, acreditando-se ser completada em torno da 16.^a semana pós-implante [59-63].

É plausível supor que o autoimplante esplênico pode restabelecer a capacidade do baço de sintetizar anticorpos contra a resposta bacteriana, e que, conjugado à suplementação dietética com AGn-3, EPA e DHA, o perfil da resposta inflamatória seria favoravelmente modulado, levando a maior resistência e sobrevivência.

Desta forma, este estudo se propõe avaliar o efeito do consumo de óleo de peixe na modulação da resposta inflamatória, quantificando a concentração de citocinas pró- e antiinflamatórias no plasma de animais submetidos a esplenectomia total isolada ou combinada com autoimplante esplênico e à indução de sepse abdominal.

1 OBJETIVO

1.1 Objetivo geral

Determinar as diferenças na resposta inflamatória à sepse abdominal induzida em ratos submetidos a esplenectomia total isolada ou combinada com autoimplante esplênico e alimentados com ração purificada, com ou sem substituição lipídica parcial com óleo de peixe.

1.2 Objetivos específicos

- Analisar as concentrações das citocinas plasmáticas INF- γ , IL-6 e IL-10, em ratos alimentados com ração acrescida de óleo de peixe, submetidos a esplenectomia total isolada ou combinada com autoimplante esplênico e sepse abdominal, em diferentes períodos.
- Verificar a funcionalidade do autoimplante esplênico após oito e 16 semanas, em resposta à sepse abdominal por CLP, por meio da dosagem das concentrações plasmáticas de IFN- γ , IL-6 e IL-10, em diferentes períodos.
- Avaliar a ingestão alimentar e o ganho de massa corporal de ratos alimentados com ração purificada, com ou sem 35% do conteúdo total de lipídios substituído por óleo de peixe.

2 MÉTODO

2.1 Aspectos éticos no cuidado com os animais

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, recebendo o número de protocolo nº CEA/041/2009 (Anexo 1). Todos os procedimentos seguiram, rigorosamente, a regulamentação existente sobre experimentação com animais [61].

2.2 Parcerias e recursos

A experimentação foi realizada no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas, com a colaboração de docentes do Departamento de Anatomia Humana do IBRAG e das Disciplinas de Patologia Geral e de Anatomia Patológica, Laboratório de Lípidos (LabLip) da Faculdade de Ciências Médicas, e do Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Instituto de Nutrição – Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) – e do Laboratório de Imunofarmacologia da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Os recursos financeiros para o desenvolvimento desta pesquisa foram fornecidos pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ.

2.3 Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 64 ratos *Wistar* machos adultos jovens, com peso inicial entre 140 e 200 g, alimentados com ração purificada, de acordo com o *American Institute of Nutrition* (AIN-93M) (Reeves *et al.*, 1993), submetidos ao mesmo ambiente e manejo [64].

Os animais foram pesados três vezes por semana, momento em que era realizado o controle de ingestão alimentar por meio da pesagem da ração (resto/ingesta).

Os ratos foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos-controle (n=32) e quatro grupos-intervenção (n=32), com oito animais por grupo. Os grupos-controle (I a IV) foram alimentados com ração fundamentada na AIN-93M, com o conteúdo total de lipídios constituído por óleo de soja; os grupos-intervenção (V a VIII) também receberam ração fundamentada na AIN-93M, com 35% do conteúdo total de lipídios substituído por óleo de peixe. Segue-se a distribuição desses grupos:

I – sem intervenção cirúrgica – animais alimentados com ração purificada; 16 semanas após, submetidos à indução de sepse abdominal;

II – esplenectomia total isolada (ET) – animais alimentados com ração purificada; 16 semanas após, submetidos à indução de sepse abdominal;

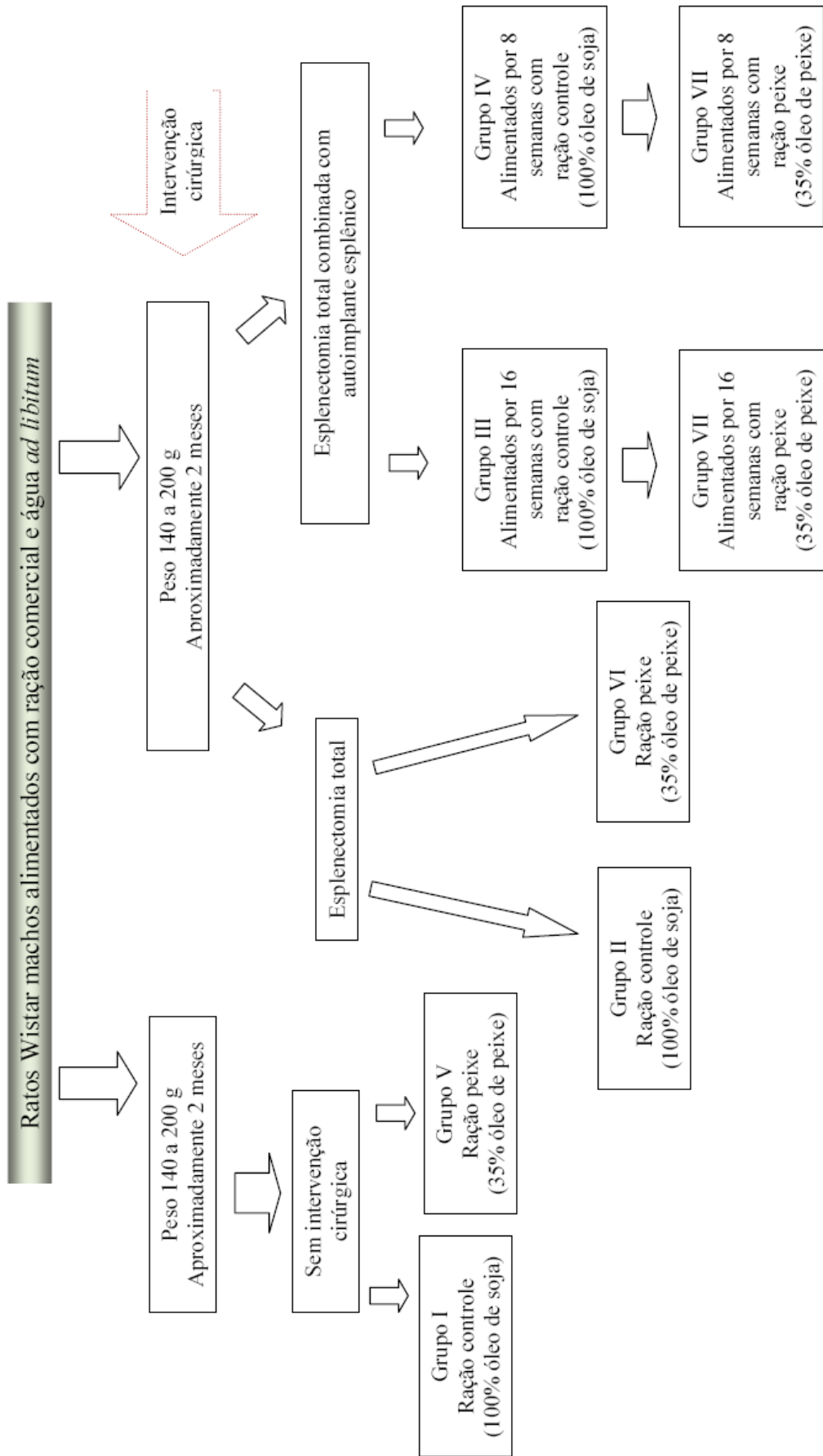
III – esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico (AIE) – animais alimentados com ração purificada; 16 semanas após, submetidos à indução de sepse abdominal;

IV – esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico (AIE) – animais alimentados com ração purificada; oito semanas após, submetidos à indução de sepse abdominal;

V a VIII – procedimentos similares aos executados nos grupos I a IV, respectivamente, sendo a única modificação fundamentada na substituição de 35% do conteúdo lipídico da alimentação dos animais por óleo de peixe.

Todos os animais foram provenientes do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e receberam ração apropriada para ratos e água *ad libitum* durante todo o período do experimento. Os ratos foram alocados em caixas apropriadas, máximo de quatro animais por caixa.

Esquema experimental



2.4 Procedimentos anestésicos e cirúrgicos

Antes dos procedimentos cirúrgicos, os ratos foram submetidos a jejum de 12 horas.

Os animais foram submetidos a anestesia geral com uma associação anestésica de cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilazina (20 mg/kg), por via intramuscular [65]. Depois de anestesiados, foram realizados tricotomia da parede abdominal, antissepsia com iodopovidine a 2% e aposição de campos operatórios estéreis.

O instrumental cirúrgico foi autoclavado em *kits*-padrão individuais, compostos por porta-agulhas de Hegar, cabo de bisturi número 3, pinça anatômica de dissecação, pinça anatômica ‘dente de rato’, tesoura de Metzenbaum, pinças hemostáticas curvas tipo Hartmann-Halstead e compressas cirúrgicas.

2.4.1 Esplenectomia total isolada

Nos animais dos grupos II e VI, após a abertura da parede abdominal, o baço foi deslocado para fora da incisão cirúrgica a fim de se proceder à ligadura dos vasos esplênicos e gastroesplênicos com fio absorvível de categute simples 3-0 (Categute simples[®], Brasmédica S/A – São Paulo, SP, Brasil).

2.4.2 Esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico

Nos animais dos grupos III, IV, VII e VIII, após a excisão esplênica, o baço foi seccionado em cinco segmentos transversais similares. Estas fatias foram implantadas no omento maior, com fio absorvível de poliglactina 910 4-0 (Vicryl[®] – J&J, Ethicon), intercaladamente com tecido omental, de modo a que houvesse a presença desse tecido entre as secções esplênicas.

2.4.3 Controle pós-operatório

Os animais foram observados no período pós-operatório imediato, até a recuperação de sua movimentação habitual, quando foram recolocados nas caixas, passando a ser oferecida ração e água *ad libitum*.

2.5 Composição da ração, segundo AIN-93

A dieta de ambos os grupos, controle e óleo de peixe, foi preparada manualmente no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Instituto de Nutrição da UERJ, seguindo as recomendações do *Committee on Laboratory Animal Diets* (1979), modificadas segundo as recomendações do AIN-93 (Reeves *et al.*, 1993), respeitando-se as quantidades de macro e micronutrientes para manutenção de ratos adultos. A ração que contém óleo de peixe continha 35% do conteúdo total de óleo de soja substituído por óleo de peixe (*Fish oil Menhaden*[®] – Sigma) [64, 66].

Os ingredientes foram pesados em balança de precisão (AS5000[®], Marte) e homogeneizados manualmente. A massa obtida foi transformada em *pellets* e seca em estufa ventilada a 50° C por 24h e, após a identificação, armazenada sob refrigeração até seu uso.

2.6 Indução de sepse abdominal

Após a recuperação dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram alimentados com a ração segundo a AIN-93, por oito ou 16 semanas, na dependência do grupo, quando, então, foram submetidos à indução de sepse abdominal, com a utilização do modelo CLP [33,67,68].

Após oito e 16 semanas do início do experimento, conforme o grupo de estudo, os ratos foram novamente submetidos a anestesia geral, com a associação de cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina, por via intramuscular, tricotomia e antisepsia abdominal. Em cada um dos períodos correspondentes, os animais foram submetidos a laparotomia mediana de cerca de 3 cm de extensão, exteriorização do ceco, seguido por ligadura de sua base, logo abaixo da válvula ileocecal, com fio absorvível de ácido poliglicólico 3-0. Em seguida, o ceco foi perfurado, em suas faces anterior e posterior, com agulha 19G, e, em continuação, exerceu-se leve pressão digital para extravasamento de fezes na cavidade abdominal. O ceco foi, então, recolocado na cavidade abdominal, sendo realizado fechamento da parede em dois planos (peritônio-aponeurótico e pele), com sutura contínua com fio não absorvível de polipropileno 2-0 (Propilene[®] – Cirumédica) [69].

Tabela 1. Distribuição de macronutrientes da ração elaborada segundo as recomendações de dieta purificada da AIN-93 para manutenção de ratos adultos

INGREDIENTES	*Ração controle (%)	*Ração óleo de peixe (%)
Amido	61	61
Açúcar	10	10
Caseína ($\geq 85\%$ <i>protein</i>)	14	14
Celulose	5	5
B-Colina (41,1% colina)	0,25	0,25
L-Cistina	0,18	0,18
BHT	0,0008	0,0008
Mineral (AIN-93M MX)	3,5	3,5
Vitamina (AIN-93M VX)	1	1
Óleo de soja	4	2,6
Óleo de peixe	0	1,4

*Ração controle, segundo a AIN -93 (Reeves *et al.*, 1993);

** Ração experimental, segundo a AIN-93, substituindo-se 35% do óleo de soja por óleo de peixe.

2.7 Coleta sanguínea para exames laboratoriais

Após oito e 16 semanas do início do experimento, conforme o grupo de estudo, sob anestesia com a associação de cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina, por via intramuscular, imediatamente antes de serem submetidos a nova laparotomia para a indução de sepse abdominal, os animais foram submetidos a canulação da artéria carótida esquerda.

Realizou-se a inserção de tubo de polietileno (d.i. 0,58 mm, d.e. 0,96 mm; Intramedic[®]) na artéria carótida; o tubo foi tuneilizado no tecido subcutâneo e fixado no dorso do animal com fio de algodão (Linatrix 3.0[®] – Laboratórios Bruneau S.A.), por onde foram conectadas seringas para a retirada de alíquotas de sangue nos momentos estabelecidos.

Tabela 2. Distribuição de micronutrientes da ração elaborada segundo as recomendações de dieta purificada da AIN-93 para manutenção de ratos adultos

Mix vitaminas (AIN-93-VX)	g/kg mix	Mix minerais (AIN-93-MX)	g/kg mix
Ácido nicotínico	3,0	Carbonato de cálcio	357
Cálcio	1,6	Fosfato de potássio	250
Piridoxina	0,7	Sódio	74
Tiamina	0,6	Sulfato de potássio	46,6
Riboflavina	0,6	Citrato de potássio	28
Ácido fólico	0,2	Magnésio	24
Biotina	0,02	Ferro	6,06
Vitamina B12	2,5	Zinco	1,65
Vitamina E	15	Carbonato cúprico	0,3
Vitamina A	0,8	Iodo	0,01
Vitamina D3	0,25	Elementos-traço	-
Vitamina K	0,075		

Fonte: Reeves *et al.*, 1993

Mix vitaminas e minerais (Pragsoluções).

Foi reservado 1 ml de sangue colido em tubo com EDTA, posteriormente centrifugado, para a obtenção do plasma, no qual foi realizado a dosagem de citocinas (INF- γ , IL-6 e IL-10).

Nos animais de todos os grupos, o procedimento de coleta sanguínea ocorreu antes e duas e quatro horas após a indução da sepse abdominal.

2.8 Análise de citocinas plasmáticas

Para a dosagem de citocinas, utilizou-se o método Miliplex[®] (Millipore), que é fundamentado na tecnologia Luminex xMap[®].

O método fundamenta-se nos princípios da citometria de fluxo, utilizando microesferas de poliestireno com códigos de cor internos produzidos pela combinação de corantes fluorescentes. Por meio de concentrações precisas destes corantes, um conjunto de *beads* podem ser criadas e revestidas por um anticorpo específico.

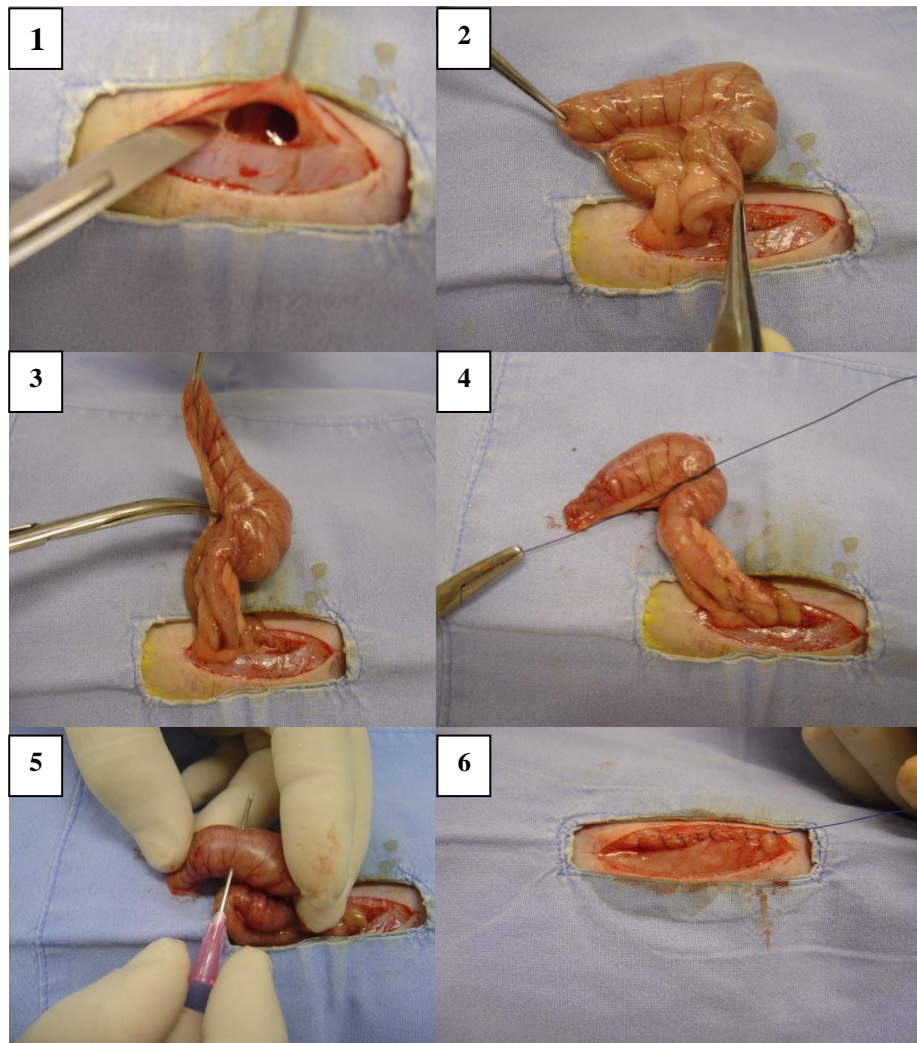


Figura 1. Sequência de imagens do procedimento de punção e ligadura cecal (CLP) em ratos. 1- incisão abdominal mediana; 2- exposição do ceco; 3- delimitação do ponto para ligadura cecal; 4- ligadura do ceco a meia-distância entre o seu pólo distal e a sua base; 5- transposição do ceco com agulha 18G, e leve pressão digital, de forma a propiciar extravasamento de conteúdo intestinal em meio abdominal; 6- fechamento da parede abdominal.

Após a colocação dos padrões para a confecção da curva na placa de Elisa específica para este método, foram acrescentados nos demais poços as amostras e as *beads* marcadas com citocinas a serem avaliadas; posteriormente aos períodos de incubação exigidos pelo método, foram acrescentados o anticorpo de detecção e a *streptavidin-PE*, substrato que completa a reação na superfície da microesfera. Após o período de reação, as microesferas passam rapidamente por um primeiro feixe de Laser, que excita os corantes internos e marca as microesferas, e posteriormente por um segundo feixe de Laser, que excita a *streptavidin-PE*, o que identificará a proteína analisada. Finalmente, um processador de sinal digital de alta velocidade identifica cada microesfera individualmente e quantifica o resultado do ensaio, com base em sinais fluorescentes. Esses sinais são interpolados à curva, pelo próprio equipamento, convertendo-os em concentrações de ng/ml.

2.9 Análise de líquido peritoneal

Após a última coleta de sangue, foi coletada amostra de líquido peritoneal, de acordo com as normas de coleta no controle microbiológico do Comitê de Ética no Uso de Animais de Experimentação/Fiocruz [70].

As amostras foram coletadas assepticamente e acondicionadas em tubos Eppendorf estéreis, sendo posteriormente transportadas em caixas isotérmicas ao Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia (UERJ), sendo imediatamente resfriadas à temperatura de 4° C, e analisadas em intervalo de uma hora.

Alíquotas de 20 µl das amostras foram transferidas para tubos contendo caldo de infusão cérebro-coração (BHI), preparado segundo o fabricante, e incubado a uma temperatura de 36° C durante 24 horas. Dos tubos onde ocorreu crescimento bacteriano, foram retirados alíquotas de 0,01 ml, pela utilização de alça bacteriológica calibrada, e transferidas para novo tubo contendo caldo BHI e incubadas sob as mesmas condições. As amostras crescidas foram semeadas por esgotamento em placas contendo o meio Agar-sangue e incubadas por 24 horas a 36° C. A partir do crescimento bacteriano evidenciado nas placas, as colônias foram identificadas quanto ao seu padrão fenotípico ou não de hemolisinas, e submetidas à coloração de Gram para diferenciá-las quanto às suas características morfotintórias.

Para as amostras Gram-positivas, foram aplicados os testes da catalase e da coagulase. As amostras Gram-negativas foram submetidas a triagem bioquímica, empregando-se os meios Duplo Açúcar Uréia (DAU), segundo Suassuna & Suassuna (1978), prova de

fermentação oxidação, segundo Hung & Leifson (1953), fermentação de carboidratos e correlatos, e provas da descarboxilação do citrato e do aminoácido arginina [71,72].

2.10 Análise estatística

Utilizou-se o teste T de Student não pareado (teste paramétrico) para a comparação das diferentes variáveis entre os grupos de animais.

Comparou-se a influência do consumo de ração com óleo de peixe ou óleo de soja em animais que sofreram a mesma intervenção cirúrgica e foram submetidos à indução de sepse abdominal. Posteriormente, comparou-se a influência de diferentes intervenções cirúrgicas nas concentrações de citocinas de animais submetidos à indução de sepse abdominal e foram alimentados com o mesmo tipo de ração.

A análise estatística foi realizada com a utilização do programa *GraphPad Prism 5*[®]. Em todas as análises, um valor de $p \leq 0,05$ foi estabelecido para a rejeição da hipótese nula de similaridade entre os grupos.

3 RESULTADOS

3.1 Consumo alimentar e massa corporal

O consumo alimentar médio dos ratos alimentados com ração contendo óleo de peixe foi significativamente maior que o dos grupos que receberam ração com óleo de soja, exceto para o dos grupos submetidos a esplenectomia total isolada (grupos II e VI), em que não existiu diferenças. (Tabela 3)

Tabela 3. Consumo alimentar de animais submetidos a diferentes intervenções cirúrgicas e a sepse abdominal, alimentados com dieta controle (100% de óleo de soja) e dieta experimental contendo 35% de óleo de peixe, segundo as recomendações da AIN-93M.

	Controle (g / dia / animal)		Tratado (g / dia / animal)
Grupos I	13,0 ± 0,7	Grupos V	39,6 ± 4,0*
Grupos II	13,3 ± 1,4	Grupos VI	12,1 ± 1,0
Grupos II	14,2 ± 1,3	Grupos VII	19,9 ± 1,7*
Grupos IV	13,3 ± 1,4	Grupos VIII	12,2 ± 1,0*

Consumo médio de ração por 100 g de massa corporal.

Dados expressos como média ± EPM, * p<0,05, n=8 animais/grupo.

Grupos: I – sem intervenção cirúrgica – animais alimentados com ração purificada; 16 semanas após, submetidos à indução de sepse abdominal; II – esplenectomia total isolada (ET) – animais alimentados com ração purificada; 16 semanas após, submetidos à indução de sepse abdominal; III – esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico (AIE) – animais alimentados com ração purificada; 16 semanas após, submetidos à indução de sepse abdominal; IV – esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico (AIE) – animais alimentados com ração purificada; oito semanas após, submetidos à indução de sepse abdominal; V a VIII – procedimentos similares aos executados nos grupos I a IV, respectivamente, sendo a única modificação fundamentada na substituição de 35% do conteúdo lipídico da alimentação dos animais por óleo de peixe.

Os animais que receberam ração experimental (35% de óleo de peixe) e foram submetidos a esplenectomia total combinada com AIE acompanhados por oito semanas

apresentaram maior consumo alimentar, quando comparados aos do grupo que sofreu a mesma intervenção cirúrgica e que recebeu ração controle (100% de óleo de soja) pelo mesmo período. O mesmo foi observado nos ratos dos grupos que foram submetidos a esplenectomia total (ET) combinada com AIE alimentados por 16 semanas e aos dos grupos que não sofreram qualquer intervenção cirúrgica e somente foram alimentados por 16 semanas.

Tabela 4. Massa corporal de animais submetidos a diferentes intervenções cirúrgicas e a sepse abdominal, alimentados com dieta controle (100% de óleo de soja) e dieta experimental contendo 35% de óleo de peixe, segundo as recomendações da AIN-93M

	Controle (g / dia / animal)		Tratado (g / dia / animal)
Grupos I	358,3 ± 11	Grupos V	344,4 ± 8,1*
Grupos II	314,5 ± 10	Grupos VI	308,7 ± 27
Grupos II	265,8 ± 12	Grupos VII	289,4 ± 11
Grupos IV	369,2 ± 11	Grupos VIII	335,3 ± 11*

Dados expressos como média ± EPM, * p<0,05, n=8 animais/grupo.

Grupos: I – sem intervenção cirúrgica – animais alimentados com ração purificada; 16 semanas após, submetidos à indução de sepse abdominal; II – esplenectomia total isolada (ET) – animais alimentados com ração purificada; 16 semanas após, submetidos à indução de sepse abdominal; III – esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico (AIE) – animais alimentados com ração purificada; 16 semanas após, submetidos à indução de sepse abdominal; IV – esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico (AIE) – animais alimentados com ração purificada; oito semanas após, submetidos à indução de sepse abdominal; V a VIII – procedimentos similares aos executados nos grupos I a IV, respectivamente, sendo a única modificação fundamentada na substituição de 35% do conteúdo lipídico da alimentação dos animais por óleo de peixe.

Não foram observadas diferenças entre a massa corporal dos animais dos grupos que receberam ração experimental quando comparados aos dos grupos de mesma intervenção cirúrgica que receberam ração controle. Entretanto, foram observadas diferenças entre os grupos de animais que receberam ração controle e não sofreram quaisquer intervenções

cirúrgicas e aos dos grupos submetido a esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico alimentado por 8 semanas (Grupo VIII). (Tabela 4)

3.2 Citocinas plasmáticas

Nos animais sem intervenção cirúrgica e submetidos à indução de sepse abdominal após 16 semanas de utilização da dieta, o tratamento com óleo de peixe (grupo V) proporcionou menor valor de IFN- γ em todos os períodos estudados quando comparados aos ratos que receberam ração com 100% óleo de soja (grupo I) (Tabela 5).

Nesses animais do grupo V, verificou-se também menores concentrações de IL-6 nos períodos 1 e 2 e maiores concentrações de IL-10 nos períodos 2 e 3. (Figura 2)

Houve menor concentração plasmática de INF- γ , IL-6 e IL-10 nos animais do grupo que receberam ração com óleo de peixe e foram submetidos a ET (Grupo VI) em diferentes períodos (Tabela 6). O IFN- γ foi menor nos períodos 2 e 3 e as citocinas IL-6 e IL-10 nos períodos 1 e 2. (Figura 3)

Nos animais submetidos a ET combinada com AIE alimentados por 16 semanas e submetidos à indução de sepse abdominal (Grupos III e VII) não foram verificadas diferenças nas concentrações de IFN- γ , IL-6 ou IL-10 em nenhum dos períodos avaliados (Figura 4); já nos animais do grupo submetido à mesma intervenção cirúrgica e a tratamento dietético (ração com óleo de peixe), com indução de sepse após oito semanas (Grupos IV e VIII), verificou-se menor concentração de IFN- γ plasmático no período 3, de IL-6 no período 2 e maior concentração de IL-10 no período 1. (Figura 5)

Na comparação intragrupos em ratos que consumiram ração segundo as recomendações da AIN-93M (100% óleo de soja), nos animais que sofreram esplenectomia total combinada ao autoimplante esplênico e alimentados por 16 semanas até serem submetidos a sepse abdominal (grupo III), verificamos menores concentrações de IFN- γ plasmático em todos os períodos quando comparados aos do grupo que não sofreu intervenção cirúrgica (grupo I) e no período 2 dos animais que sofreram esplenectomia total (grupo II) (Tabela 6)

Tabela 5 – Concentrações plasmáticas de IFN- γ , IL-6 e IL-10 dos animais alimentados com ração segundo as recomendações da AIN-93M, sendo os dos grupos-controle com 100% de óleo de soja e os dos grupos experimentais com 35% de óleo de peixe (Grupos I e V), após a esplenectomia total (Grupo II e VI), após esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico alimentados por 16 semanas (Grupo III e VII), e por oito semanas (Grupo IV e VIII), até serem submetidos à indução de sepse abdominal. Dados expressos em pg/ml, como média \pm EPM. * # $p < 0,05$.

GRUPOS	CITOCINAS	PERÍODO		
		1	2	3
I	IFN-Y	4991 \pm 1819	4915 \pm 2397	5440 \pm 3287
	IL-6	1870 \pm 865,2	3178 \pm 1237	2486 \pm 1151
	IL-10	632 \pm 60,98	609 \pm 107,7	1630 \pm 232,1
V	IFN-Y	386 \pm 75,31*	739 \pm 29,17*	404 \pm 172,3*
	IL-6	396 \pm 56,3*	353 \pm 104,0*	2197 \pm 590,7
	IL-10	1984 \pm 726,6	4378 \pm 1510*	4969 \pm 1773*
II	IFN-Y	1484 \pm 584,6	2160 \pm 1101	1951 \pm 1100
	IL-6	1704 \pm 399,6	1351 \pm 399,1	1008 \pm 253,9
	IL-10	940 \pm 157,0	658 \pm 212,0	1558 \pm 241,8
VI	IFN-Y	910 \pm 413,0	890 \pm 245,0#	645 \pm 113,2#
	IL-6	548 \pm 123,5#	155 \pm 11,6#	878 \pm 357,8
	IL-10	448 \pm 4,3#	156 \pm 3,4#	1607 \pm 544,0
III	IFN-Y	1175 \pm 304,6	1088 \pm 195,2	788,5 \pm 129,4
	IL-6	947 \pm 249,2	1208 \pm 209,1	1604 \pm 306,8
	IL-10	672 \pm 78,3	1012 \pm 157,6	2081 \pm 869,6
VII	IFN-Y	1255 \pm 334,3	1183 \pm 447,3	781,1 \pm 139,6
	IL-6	1023 \pm 260	781 \pm 268,3	1182 \pm 147,2
	IL-10	548 \pm 108,9	787 \pm 348,8	4125 \pm 1290
IV	IFN-Y	2206 \pm 975	2491 \pm 1310	4362 \pm 2193
	IL-6	1389 \pm 488	793 \pm 317,9	825 \pm 290
	IL-10	384,7 \pm 101	574 \pm 74,1	1761 \pm 348,5
VIII	IFN-Y	803 \pm 496	1008 \pm 788	180 \pm 0,03**
	IL-6	695 \pm 457	288 \pm 78,85**	840 \pm 245
	IL-10	1536 \pm 1382**	684 \pm 134	2776 \pm 1016*

† O período 1 antecede a indução da sepse; os período 2 e 3 correspondem a duas e quatro horas após a indução da sepse. *Diferença considerando grupo I ($p < 0,05$); # Diferença considerando grupo II ($p < 0,05$); **Diferença considerando grupo IV ($p < 0,05$).

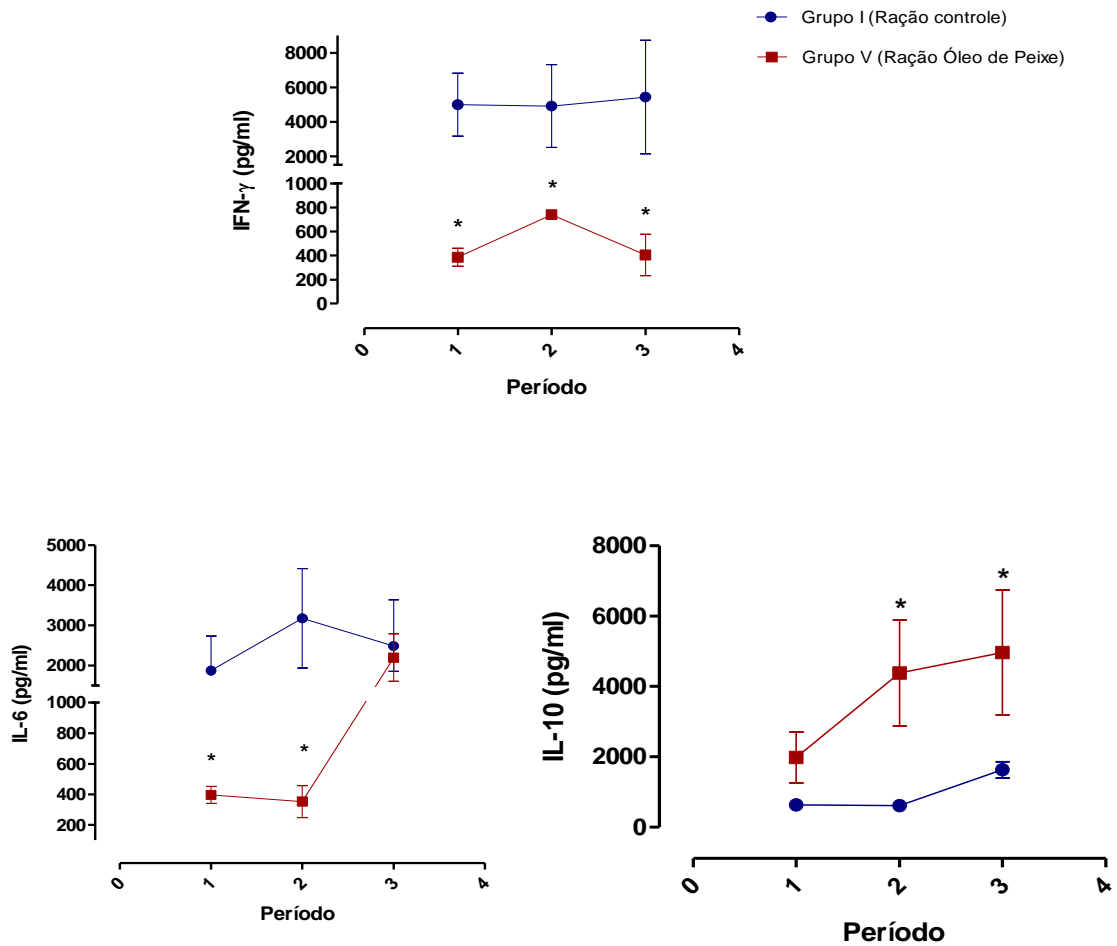


Figura 2. Concentrações plasmáticas de IFN- γ , IL-6 e IL-10 dos animais dos Grupos I e V, submetidos à indução de sepse abdominal, após serem alimentados por 16 semanas. Animais alimentados com ração segundo as recomendações da AIN-93M, sendo grupo controle com 100% de óleo de soja e o grupo experimental com 35% de óleo de peixe. Dados expressos como média \pm EPM, * $p < 0,05$. **O período 1 antecede a indução da sepse; o período 2 corresponde a duas horas e o período 3 a quatro horas após o momento de indução da sepse.

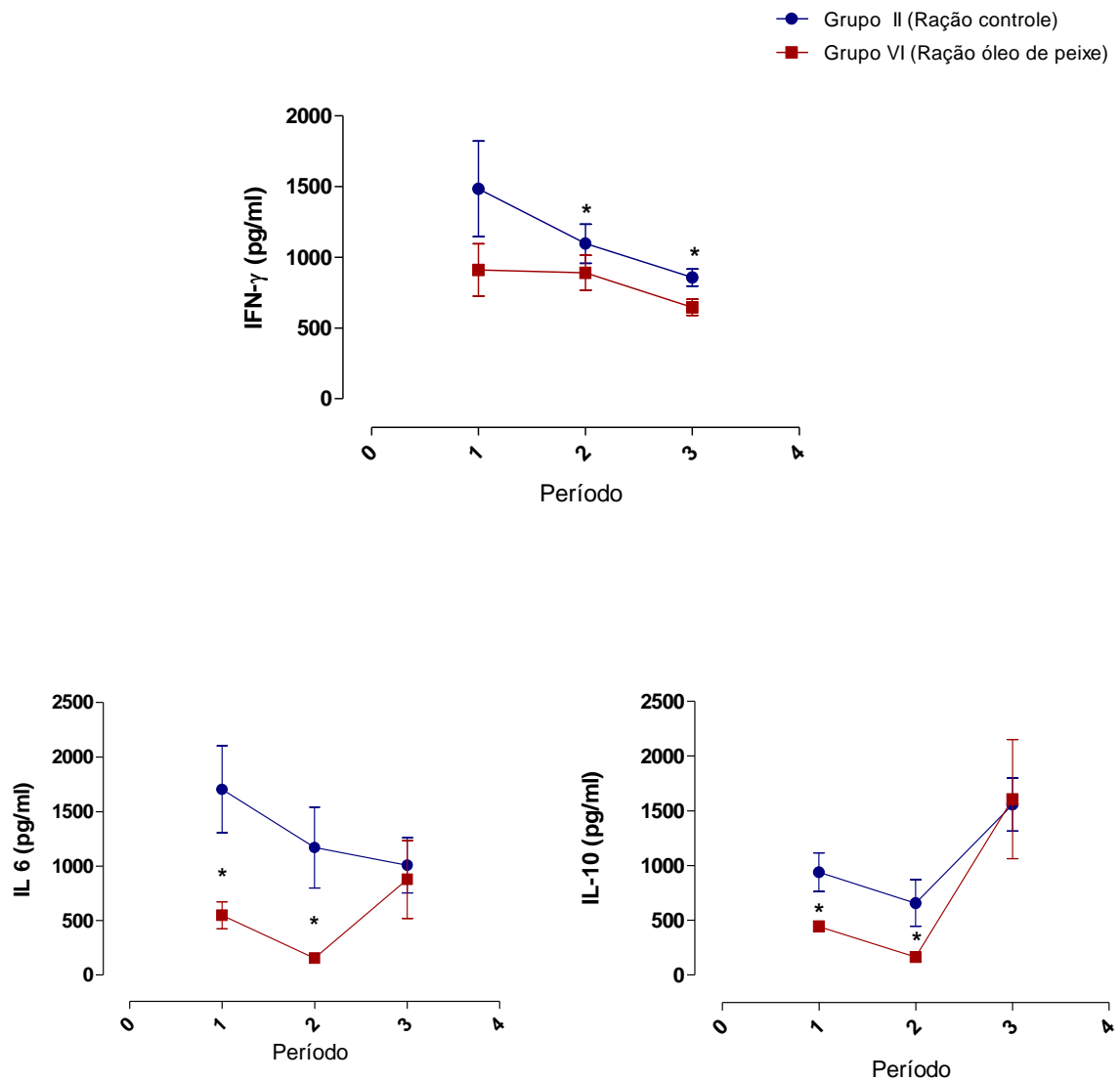


Figura 3. Concentrações plasmáticas de IFN- γ , IL-6 e IL-10 dos animais dos Grupos II e VI que após esplenectomia total, foram alimentados por 16 semanas e submetidos à indução de sepse abdominal. Os animais foram alimentados com ração segundo as recomendações da AIN-93M, sendo grupo controle com 100% de óleo de soja e o grupo experimental com 35% de óleo de peixe. Dados expressos como média \pm EPM, * $p < 0,05$. **O período 1 antecede a indução da sepse; o período 2 corresponde a duas horas e o período 3 a quatro horas após o momento de indução da sepse.

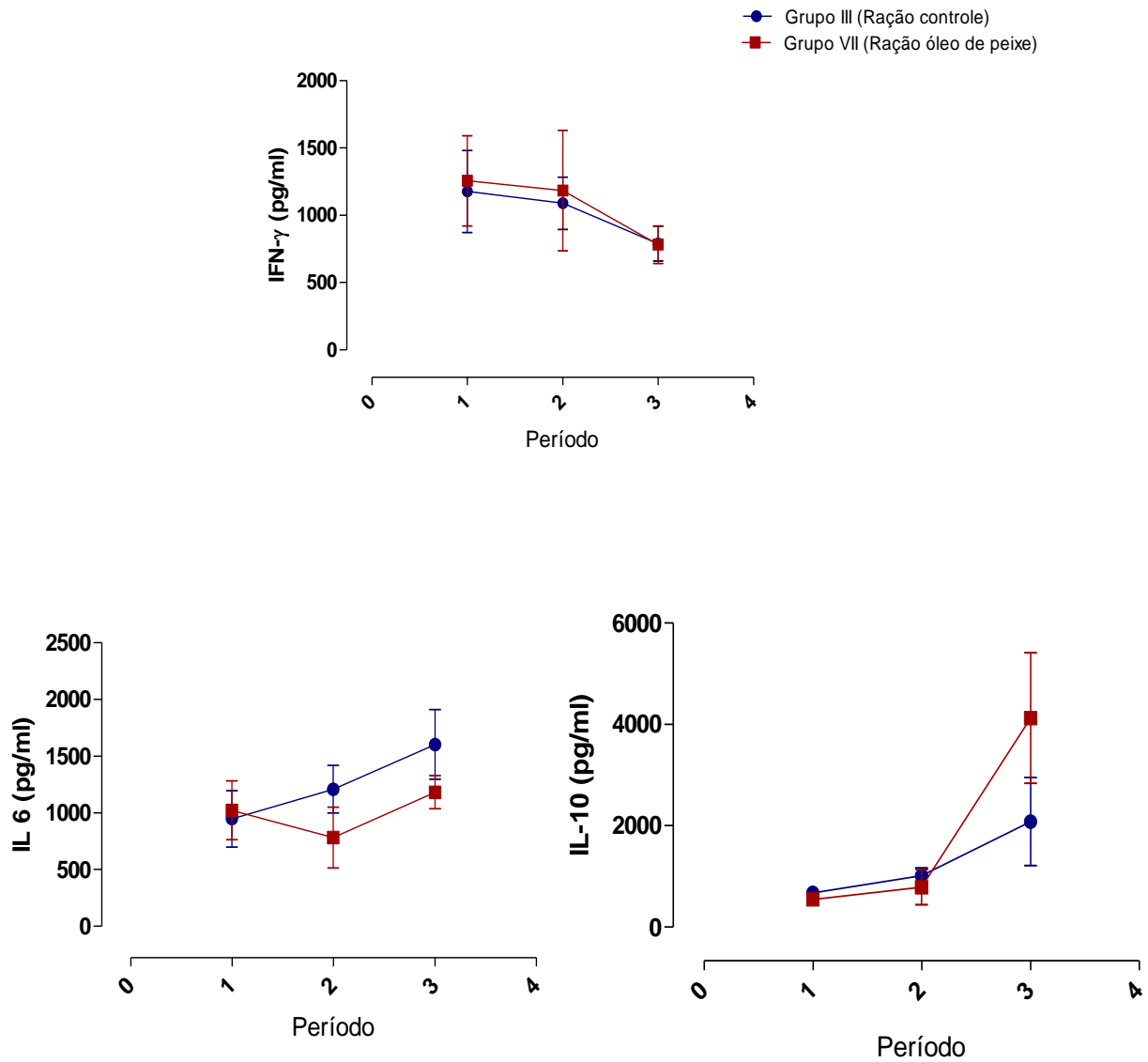


Figura 4. Concentrações plasmáticas de IFN- γ , IL-6 e IL-10 dos animais dos Grupos III e VII que, após esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico, foram alimentados por 16 semanas e submetidos à indução de sepse abdominal. Os animais foram alimentados com ração segundo as recomendações da AIN-93M, sendo grupo controle com 100% de óleo de soja e o grupo experimental com 35% de óleo de peixe. Dados expressos como média \pm EPM, * $p < 0,05$. **O período 1 antecede a indução da sepse; o período 2 corresponde a duas horas e o período 3 a quatro horas após o momento de indução da sepse.

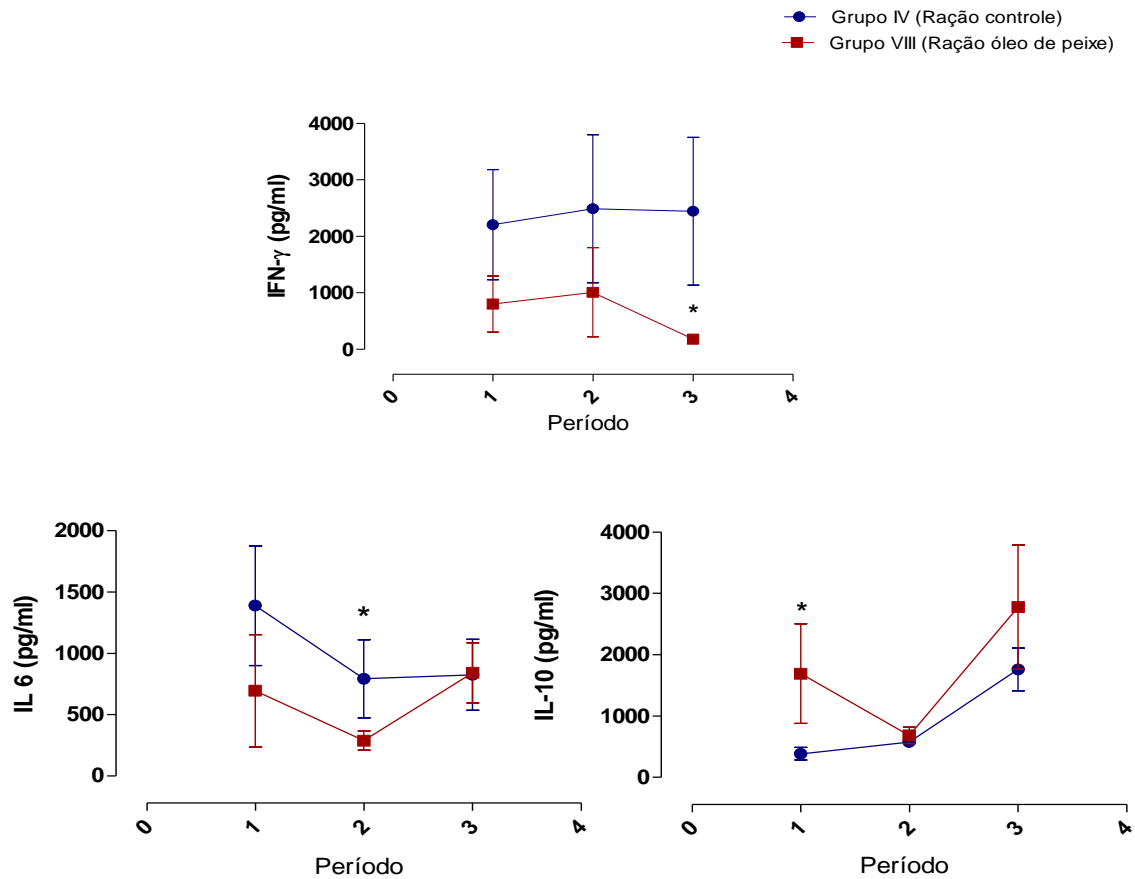


Figura 5. Concentrações plasmáticas de IFN- γ , IL-6 e IL-10 dos animais dos Grupos IV e VIII após esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico, foram alimentados por oito semanas e submetidos à indução de sepse abdominal. Os animais foram alimentados com ração segundo as recomendações da AIN-93M, sendo grupo controle com 100% de óleo de soja e o grupo experimental com 35% de óleo de peixe. Dados expressos como média \pm EPM, *p < 0,05. **O período 1 antecede a indução da sepse; o período 2 corresponde a duas horas e o período 3 a quatro horas após o momento de indução da sepse.

Os animais submetidos a esplenectomia total avaliados após 16 semanas (grupo II) apresentaram menor concentração plasmática de IL-6 no período 2, quando comparados aos animais do grupo I. Já em relação à IL-10, verificou-se a ocorrência de menores concentrações plasmáticas nos períodos 1 e 2 nos animais submetidos a esplenectomia total associada ao autoimplante esplênico e à indução de sepse abdominal após oito semanas (grupo IV), quando comparados aos animais esplenectomizados (grupo II), e maiores concentrações nos animais submetidos a esplenectomia total associada ao autoimplante esplênico e à indução de sepse abdominal após 16 semanas (grupo III) no período 2, quando comparados aos sem intervenção cirúrgica (grupo I) e esplenectomizados (grupo II), e no período 3, quando comparados somente aos animais esplenectomizados (grupo II). (Tabela 6)

Entre os animais que consumiram ração segundo as recomendações da AIN-93M, com 35% do teor total de lipídio substituído por óleo de peixe, verificou-se que as concentrações de IFN- γ foram maiores nos períodos 1 e 2 nos animais submetidos a esplenectomia total combinada ao autoimplante esplênico avaliados após oito e 16 semanas (grupo VII e VIII), quando comparados aos sem intervenção cirúrgica (grupo V). (Tabela 7)

Verificou-se a presença de menores concentrações plasmáticas de IFN- γ no período 3 nos animais do grupo VIII, quando comparados tanto com os animais sem intervenção cirúrgica (grupo V) quanto com os esplenectomizados (grupo VI). (Figura 7)

Quando analisadas as concentrações plasmáticas de IL-6, verificou-se que o grupo de animais submetidos a esplenectomia total combinada ao autoimplante esplênico avaliados após oito semanas (grupo VIII) apresentou menores concentrações de IL-6 nos períodos 1 e 2, quando comparados aos esplenectomizados (grupo VI). No período 1, os animais esplenectomizados (grupo VI) apresentaram maiores concentrações de IL-6 que os animais sem intervenção cirúrgica (grupo V); já no período 3, esses animais do grupo VI, assim como os do grupo VII, apresentaram menores concentrações do que os do grupo V. (Tabela 7)

Em relação à IL-10, todos os animais submetidos ao autoimplante esplênico (grupos VII e VIII) apresentaram maiores concentrações plasmáticas nos períodos 1 e 2 do que os esplenectomizados (grupo VI). Os animais do grupo VI apresentaram menores concentrações de IL-10 plasmática, também quando comparados aos sem intervenção cirúrgica (grupo V) nos períodos 1 e 2. (Figura 7)

Tabela 6 – Concentrações plasmáticas de IFN- γ , IL-6 e IL-10 dos animais dos grupos I (sem intervenção cirúrgica), II (esplenectomia total isolada), III e IV (esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico, alimentados por oito e 16 semanas) e submetidos à indução de sepse abdominal. Os animais foram alimentados com ração segundo a AIN-93M. Dados expressos em pg/ml, como média \pm EPM, * # $p < 0,05$.

GRUPOS	CITOCINAS	PERÍODO		
		1	2	3
I	IFN-Y	4991 \pm 1819	4915 \pm 2397	5440 \pm 3287
	IL-6	1870 \pm 865,2	3178 \pm 1237	2486 \pm 1151
	IL-10	632 \pm 60,98	609 \pm 107,7	1630 \pm 232,1
II	IFN-Y	1484 \pm 584,6	2160 \pm 1101	1951 \pm 1100
	IL-6	1704 \pm 399,6	1351 \pm 399,1*	1008 \pm 253,9
	IL-10	940 \pm 157,0	658 \pm 212,0	1558 \pm 241,8
III	IFN-Y	1175 \pm 304,6*	1088 \pm 195,2*#	788,5 \pm 129,4*#
	IL-6	947 \pm 249,2	1208 \pm 209,1	1604 \pm 306,8
	IL-10	672 \pm 78,3	1012 \pm 157,6	2081 \pm 869,6
IV	IFN-Y	2206 \pm 975	2491 \pm 1310*#	4362 \pm 2193#
	IL-6	1389 \pm 488	793 \pm 317,9	825 \pm 290
	IL-10	384,7 \pm 101#	574 \pm 74,1#	1761 \pm 348,5

* Diferença considerando o grupo I ($p < 0,05$)

Diferença considerando o grupo II ($p < 0,05$)

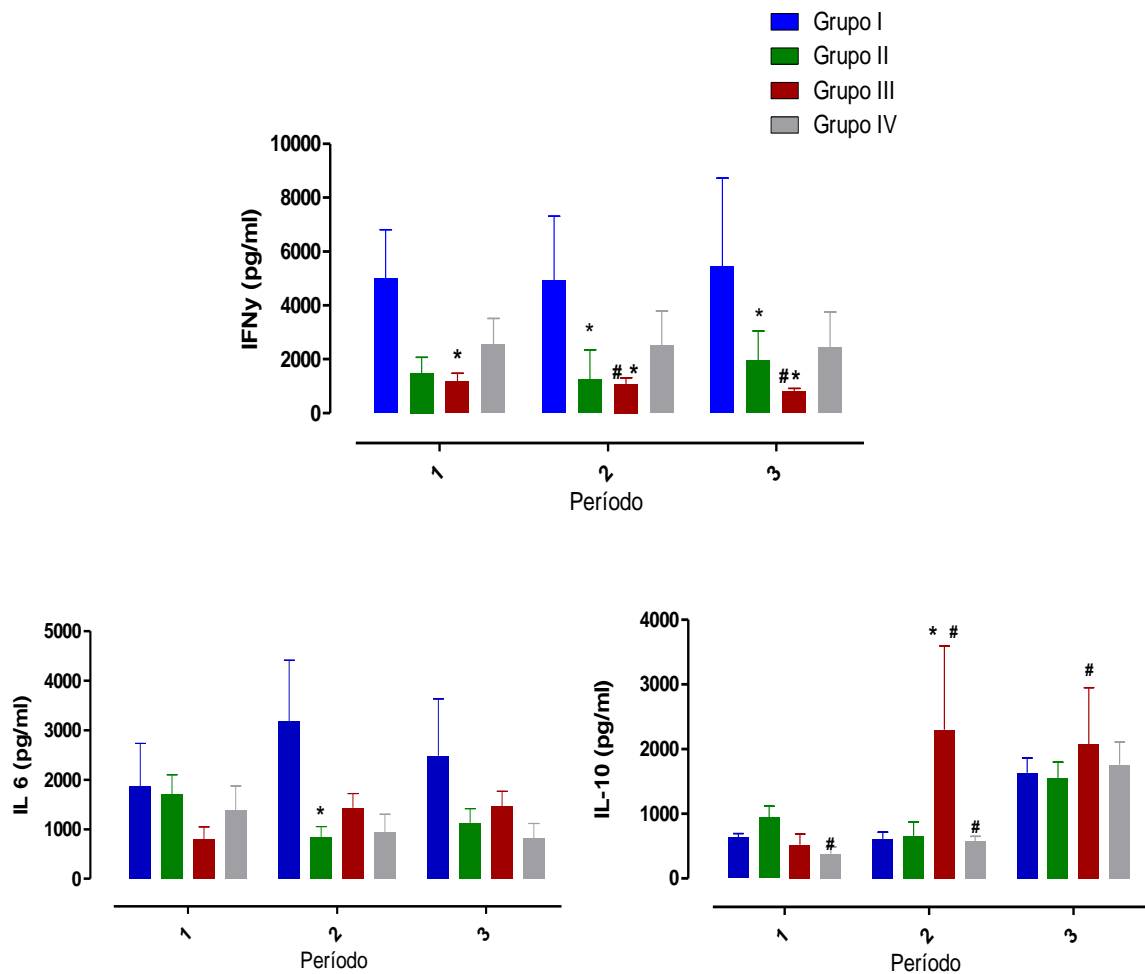


Figura 6. Concentrações plasmáticas de IFN- γ , IL-6 e IL-10 dos animais dos Grupos I, II, III e IV alimentados com ração segundo as recomendações da AIN-93M, com 100% do conteúdo total de lipídio constituído por de óleo de soja e após serem submetidos a esplenectomia total, esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico, alimentados por oito e 16 semanas e submetidos à indução de sepse abdominal. Dados expressos como média \pm EPM, * $p < 0,05$. **O período 1 antecede a indução da sepse; o período 2 corresponde a duas horas e o período 3 a quatro horas após o momento de indução da sepse.

* Diferença considerando o grupo I ($p < 0,05$)

Diferença considerando o grupo II ($p < 0,05$)

Tabela 7 – Concentrações plasmáticas de IFN- γ , IL-6 e IL-10 nos animais dos grupos V (sem intervenção cirúrgica), VI (esplenectomia total isolada), VII e VIII (esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico, alimentados por oito e 16 semanas) e submetidos à indução de sepse abdominal. Os animais foram alimentados com ração segundo a AIN-93M com 35% do conteúdo total de óleo substituído por óleo de peixe. Dados expressos em pg/ml, como média \pm EPM, * # $p < 0,05$.

GRUPOS	CITOCINAS	PERÍODO		
		1	2	3
V	IFN-Y	386 \pm 75,31	739 \pm 29,17	404 \pm 172,3
	IL-6	396 \pm 56,3	353 \pm 104,0	2197 \pm 590,7
	IL-10	1984 \pm 726,6	4378 \pm 1510	4969 \pm 1773
VI	IFN-Y	910 \pm 413,0	890 \pm 245,0	645 \pm 113,2
	IL-6	548 \pm 123,5*	155 \pm 11,6	878 \pm 357,8*
	IL-10	448 \pm 4,3*	156 \pm 3,4*	1607 \pm 544,0
VII	IFN-Y	1255 \pm 334,3*	1183 \pm 447,3*	781,1 \pm 139,6
	IL-6	1023 \pm 260	781 \pm 268,3	1182 \pm 147,2*
	IL-10	548 \pm 108,9*#	787 \pm 348,8*#	4125 \pm 1290
VIII	IFN-Y	803 \pm 496*	1008 \pm 788*	180 \pm 0,03*#
	IL-6	695 \pm 457#	288 \pm 78,85#	840 \pm 245
	IL-10	1536 \pm 1382#	684 \pm 134*#	2776 \pm 1016

* Diferença considerando o grupo I ($p < 0,05$)

Diferença considerando o grupo II ($p < 0,05$)

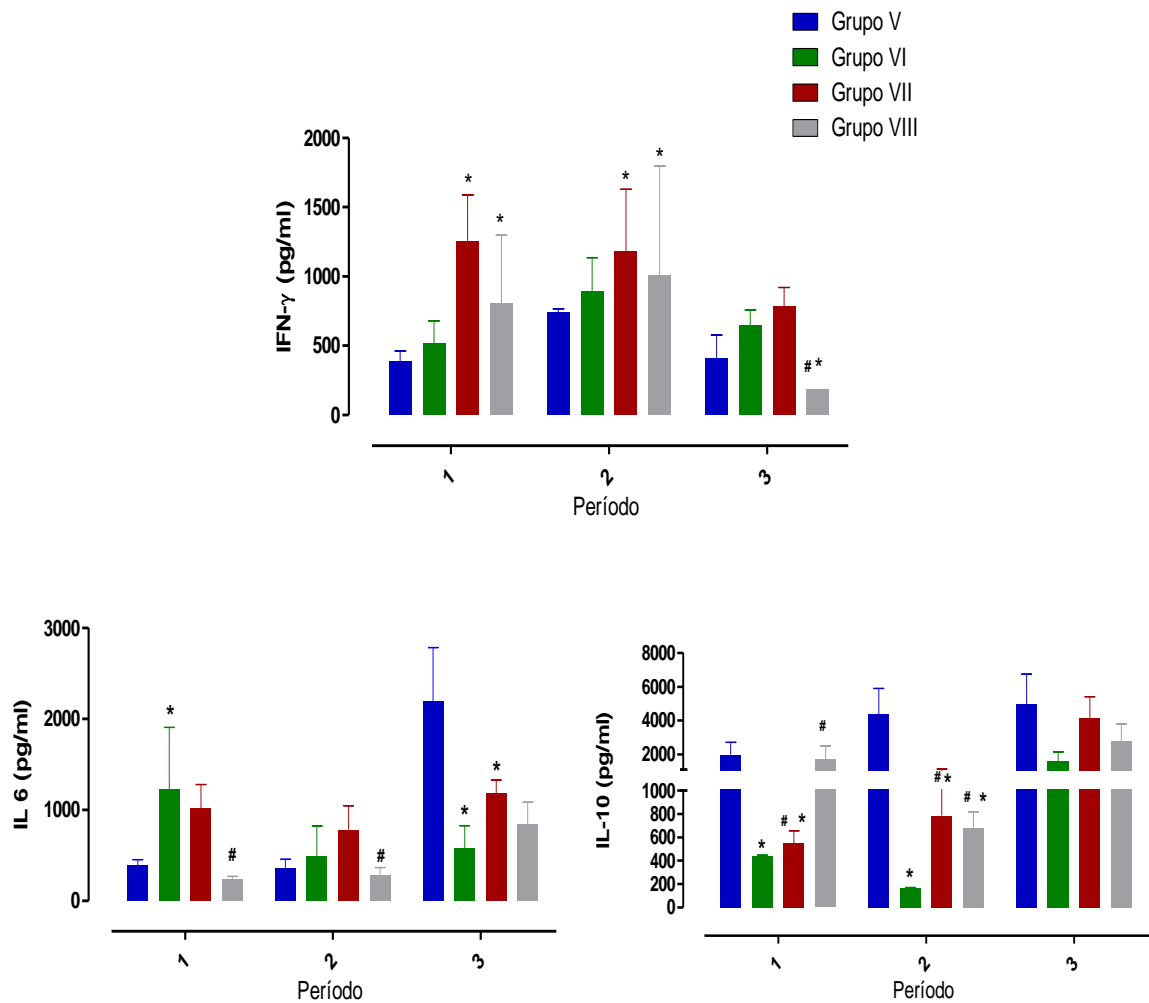


Figura 7. Concentrações plasmáticas de IFN- γ , IL-6 e IL-10 dos animais dos Grupos V, VI, VII e VII alimentados com ração segundo as recomendações da AIN-93M, com 35% do conteúdo total de lipídio substituído por de óleo de peixe e após serem submetidos a esplenectomia total, esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico, alimentados por oito e 16 semanas e submetidos à indução de sepse abdominal. Dados expressos como média \pm EPM, * $p < 0,05$. **O período 1 antecede a indução da sepse; o período 2 corresponde a duas horas e o período 3 a quatro horas após o momento de indução da sepse.

* Diferença considerando o grupo V ($p < 0,05$)

Diferença considerando o grupo VI ($p < 0,05$)

3.3 Análise de líquido peritoneal

Nas alíquotas de amostras de líquido peritoneal provenientes dos animais em estudo, tanto dos grupos que receberam ração controle quanto dos que receberam ração experimental com óleo de peixe, todos apresentaram reação positiva em meio específico para *Staphylococcus aureus* e/ou *Escherichia coli* e/ou *Proteus mirabilis* e/ou *Enterococcus*.

Não foram observadas diferenças entre os grupos controle e os grupos que receberam ração com o conteúdo total de lipídio substituído por 35% de óleo de peixe no que concerne ao número de unidades formadoras de colônia (UFC) por amostra.

Considerando-se as amostras analisadas, foi identificado *Staphylococcus aureus* em 21% delas; *Escherichia coli* estava presente em 56% das amostras e *Proteus mirabilis* em 4%. Em 17% das amostras, encontramos mais de três tipos de bactérias, concomitantemente.

4 DISCUSSÃO

Esse trabalho faz parte de uma linha de pesquisa que vem sendo desenvolvida no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Desde 2000, nosso grupo vem realizando estudos em variados modelos experimentais para a avaliação da regeneração morfológica e funcional do autoimplante esplênico e a utilização desses modelos para a testagem de inúmeras intervenções nutricionais, na tentativa de imunomodular a resposta inflamatória.

Assim, além de se verificar a regeneração funcional do autoimplante esplênico heterotópico em animais submetidos a esplenectomia total, investigou-se a influência do consumo de óleo de peixe em ratos submetidos a sepse abdominal. A escolha pelo óleo de peixe como nutriente a ser testado deveu-se às constatações de diversos estudos acerca da influência de componentes lipídicos, particularmente AGn3, EPA e DHA, na modulação de diversos eventos e mecanismos celulares durante o processo de inflamação, desde a transdução de sinal até a síntese protéica [73-75].

Investigou-se o perfil pró- e antiinflamatório dos grupos de animais em estudo, verificando a concentração plasmática das citocinas IFN- γ , IL-6 e IL-10 em três momentos diferentes, sendo dois deles na presença de sepse abdominal. Justifica-se a escolha de tal modelo pelo fato de que citocinas possuem atuação em diversas células, por meio de receptores de superfície, induzindo a produção e liberação de mediadores inflamatórios [76-78].

Nossos resultados mostram que o consumo de ração contendo óleo de peixe, em consonância com os critérios estabelecidos pela AIN-93, foi capaz de reduzir as concentrações de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e IL-6), ao menos em um período nos animais dos grupos estudados, exceto nos do grupo que foi submetido a autoimplante esplênico e alimentado por 16 semanas com ração acrescida de óleo de peixe (grupo VII), cujos animais não apresentaram diferença nas concentrações plasmáticas com nenhuma das citocinas avaliadas.

A menor concentração plasmática das citocinas pró-inflamatórias dos animais dos grupos V, VI e VIII deve-se, em parte, à composição do óleo de peixe. Ácido graxo linolênico, EPA e DHA presentes nesse óleo são incorporados às membranas celulares, favorecendo a inibição do metabolismo do ácido araquidônico por competição, pelas vias enzimáticas cicloxigenase e 5-lipoxigenase (COX e 5-LOX) [79-80].

A metabolização dos derivados do AGn-3 promove a formação de PGE3, no lugar de PGE2, e de LTB5, no lugar de LTB4, que são mediadores inflamatórios menos ativos. Estudos prévios têm demonstrado que o AGn-3 é capaz de reduzir a expressão de moléculas de adesão de monócitos [81,82], células endoteliais [81,83,84], macrófagos [84,85] e linfócitos [86].

A primeira linha de defesa a uma infecção bacteriana é não-específica, realizada por células fagocitárias (macrófagos, monócitos e granulócitos polimorfonucleares) e pela via alternativa do sistema complemento. Posteriormente, imunoglobulinas e células imunocompetentes iniciam uma resposta imune específica (resposta imune adaptativa) [76-78].

Macrófagos, leucócitos, neutrófilos, células dendríticas e outros componentes celulares são primordiais na inicialização e regulação da resposta imune, no qual sistemas hormonais e neuronais também estão envolvidos. Em muitas situações, macrófagos e monócitos são ativados, adquirem efeito antimicrobiano e secretam citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-6 e IL-8), provocando inflamação, recrutamento de células imune e conseqüente eliminação de microorganismos por fagocitose [87,88].

De acordo com Qiu *et al.* (2008), o aumento de IFN- γ , como se verificou nos animais que consumiram ração contendo exclusivamente óleo de soja, é capaz de aumentar a carga bacteriana no peritônio após CLP, e a utilização de anticorpos anti-IFN- γ aumenta as aderências intestinais, selando o ceco e reduzindo o movimento bacteriano no peritônio [89]. Yin *et al.* (1999), comprovaram que a inibição do IFN- γ em ratos que sofreram CLP pode reduzir os níveis de proteínas de alta mobilidade no fluido peritoneal, minimizando, assim, a mortalidade desses animais [90].

Todos os animais que não foram alimentados com óleo de peixe apresentaram IFN- γ aumentado, mesmo após quatro horas da indução da sepse. O aumento persistente de citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- γ , favorece a evolução da sepse para o choque séptico e morte [91]. Dessa forma, acredita-se que, o consumo de ração preparada segundo as recomendações da AIN-93, acrescida com pequeno conteúdo de óleo de peixe, pode ter exercido efeito protetor da evolução da sepse nesses animais, reduzindo os níveis de IFN- γ .

Mecanismos estimulatórios do processo inflamatório são influenciados pelo IFN- γ . Esta citocina regula o direcionamento e atração de leucócitos, maturação e diferenciação de muitos tipos celulares, aumenta a atividade das células *natural-killer* (NK) e regula a função de células B, como a produção de imunoglobulinas [92,93]. Todas essas ações favorecem o

controle de tráfego de células imunes para o sítio da inflamação, aumentando a regulação de expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas [92].

A habilidade do IFN- γ para coordenar a transição da imunidade inata para a adaptativa a distingue de outros interferons. O mecanismo pelo qual o IFN- γ coordena essa transição inclui auxílio no desenvolvimento de resposta tipo Th₁ [92,93]. Devido a essa característica, o IFN- γ é reconhecido como citocina chave na rejeição de transplantes, por inibir a expressão de citocinas Th₂ (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10), além de atrair e ativar macrófagos, células endoteliais e a expressão do complexo MCH-1 [94,95].

O balanço entre a resposta imune Th₁ e Th₂ é importante para garantir resposta adequada à lesão. A promoção de excessiva resposta Th₂ pode potencializar a supressão da PGE₂ que, conseqüentemente, promove excessiva supressão de citocinas pró-inflamatórias. Diante desses achados, torna-se necessário adotar cautela na prescrição de óleo de peixe em situações de doenças que já possuem resposta Th₂ exacerbada, devendo ser respeitada a fisiopatologia de cada doença.

Verificou-se que o óleo de peixe foi capaz de conter a exacerbação de citocinas pró-inflamatórias nos animais que não foram submetidos a intervenção cirúrgica e naqueles submetidos a esplenectomia total isolada ou combinada com autoimplante esplênico. Este achado pode sugerir que o consumo de pequenas quantidades de óleo de peixe diariamente por esses animais foi capaz de inibir a liberação de IFN- γ , favorecendo a antecipação da resposta Th₂ em estado de sepse.

Com o avançar da sepse, o aumento da resposta Th₂ é fisiológico e o óleo de peixe potencializa a expressão dessas proteínas, inibindo IFN- γ e aumentando a concentração de outras citocinas, como IL-6 e IL-10. A IL-6 é uma citocina importante na mediação de resposta de fase aguda da lesão para a adaptativa. Entretanto, excessivo e prolongado aumento de IL-6 está associado a aumento de morbidade e mortalidade [96,97].

Algumas pesquisas em humanos utilizam a IL-6 como marcador da gravidade da sepse. Os animais que não foram alimentados com óleo de peixe apresentaram aumento dessa citocina, duas horas após a indução da sepse. Após quatro horas de indução da sepse, já não se observou mais elevação dos níveis plasmáticos de IL-6, aumentando as chances de contenção e sobrevivência ao processo inflamatório induzido por CLP [98-100].

Algumas citocinas são denominadas antiinflamatórias, como IL-4 e IL-10, por serem capazes de inibir a produção de IL-1 e de TNF (citocinas pró-inflamatórias), exercendo efeito contra-regulatório. Entretanto, várias citocinas antiinflamatórias podem apresentar propriedades pró-inflamatórias na dependência da natureza da sinalização, tipo de célula-alvo

e tempo de exposição à inflamação. Este parece ser o caso da IL-6. Estudos experimentais apontam como uma citocina mediadora de fase aguda da inflamação, com ação sistêmica e indutora da produção hepática de proteína C reativa [96,100,101]. Contudo, outros estudos identificam essa citocina em condições de inflamação crônica, sendo considerado um marcador da gravidade da sepse, com atuação tanto na imunidade inata como na adaptativa [102,103].

Similarmente, algumas citocinas pró-inflamatórias podem exercer propriedades antiinflamatórias, dependendo da sua concentração. Portanto, a dicotomia existente entre citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias pode, na verdade, se dever a uma simplificação excessiva na descrição da resposta inflamatória [104-106].

Como citocina antiinflamatória, utilizou-se a IL-10, que tem sido identificada como um modulador crucial da resposta inflamatória, sendo rapidamente expressa durante as fases iniciais da sepse [107,108]. Sua deficiência é capaz de alterar a cinética de produção de citocinas pró-inflamatórias [109], como a IL-6, no modelo CLP [108]. Parece que a deficiência de IL-10 possui maior impacto no início da sepse, sugerindo que ela poderia evitar a progressão do processo inflamatório para o choque séptico irreversível neste modelo experimental de indução de sepse abdominal [107-112].

Os animais que consumiram ração com óleo de peixe apresentaram maiores concentrações plasmáticas de IL-10, ao menos em um dos períodos avaliados. Esse perfil de variação das concentrações plasmáticas de IL-10 nos animais alimentados com óleo de peixe somente não foi observado no grupo esplenectomizado (grupo VI), o que corrobora o conceito da influência do baço na produção de citocinas em processos inflamatórios.

A relação entre consumo de óleo de peixe e aumento das concentrações de IL-10 também foi observada em nível tecidual por Tsou *et al* (2008), que verificaram aumento da expressão de IL-10 mRNA em esplenócitos, assim como na concentração plasmática da relação CD4/CD8 [113].

O aumento das concentrações plasmáticas de IL-10 nos animais dos grupos V e VIII, que consumiram ração óleo de peixe, assemelha-se ao observado em outros estudos [114,115], mas os mecanismos de ação pelo qual o óleo de peixe favorece o aumento da IL-10 ainda vêm sendo investigados.

Hughes *et al* (2000) sugerem que o AGn-3 suprime a resposta imune celular por meio da redução da expressão do MHC classe II, de moléculas de adesão e de monócitos, e consequente inibição da função celular de apresentação de antígenos [116]. Fujikawa *et al*

(1992) mostraram que a utilização de dieta enriquecida com EPA inibe a habilidade de células do baço na apresentação de antígenos por células T *helper* [117].

A IL-10 endógena altera a cinética da resposta à sepse no modelo CLP, mas não o tempo de sobrevivência, já que é pequena a produção de IL-10 pelo tecido esplênico e por linfócitos peritoneais, e significativamente maior a produção dessa citocina por células mielóides, particularmente neutrófilos [111].

Esse aumento da produção de neutrófilos pelo tecido esplênico é de extrema relevância no processo inflamatório, já que, no sítio de infecção, essas células (que apresentam significativa produção de IL-10) constituem a forma mais abundante de leucócitos [112]. Ou seja, a depleção de neutrófilos em diferentes tempos modifica diretamente a produção de IL-10 [112].

No modelo de sepse por CLP, quando os neutrófilos são esgotados antes da indução da sepse, ocorre aumento da bacteremia, das enzimas hepáticas e da concentração de uréia, sugerindo aumento da lesão hepática e renal. Em contraposição, quando a depleção dos neutrófilos ocorre 12 horas após a CLP, ocorre dramática redução da bacteremia, da disfunção hepática e renal, e decréscimo da mortalidade [118]. Esses achados sugerem que a relação entre IL-10 e população de neutrófilos pode ser um fator determinante no curso da sepse.

Os neutrófilos são recrutados para o sítio de infecção, onde exercem sua atividade microbicida por meio da fagocitose, liberação de grânulos que contém proteínas líticas e produção de reativos intermediários do oxigênio. Essas células são capazes de suprimir a proliferação de linfócitos T, via produção de H_2O_2 e sinalização por antígeno de macrófago-1 (Mac-1), e de realizar com linfócitos B um evento sinergicamente recíproco, conhecido como *crossstalk*, promovendo a sobrevivência, proliferação e manutenção dessas células produtoras de anticorpos [119].

A migração de neutrófilos da corrente sanguínea para o baço ocorre após estímulos promovidos pelas células endoteliais sinusoidais, como IL-8, em resposta a produtos microbianos. Reconhecendo a participação ativa do baço em processos inflamatórios, diversos modelos experimentais de sepse pós-esplenectomia vêm mostrando que a remoção do baço aumenta a mortalidade decorrente da exposição bacteriana e que o autoimplante poderia reduzir e modificar esse desfecho [61,120,121].

A função fagocitária do baço na depuração sanguínea de bactérias, como a *E. coli*, demonstrou ser eficaz, sem interferir no funcionamento de fígado e pulmão, no que concerne à função de remoção de bactérias por esses órgãos [122]. O contrário foi observado em animais asplênicos, conferindo, a esses, menor resistência à sepse [122-125].

Além da função fagocitária, a produção de IL-10 por macrófagos esplênicos corrobora estudos que consideram alternativas para a preservação do baço, como medida preventiva do curso da sepse [126-128]. Parece que o autoimplante esplênico também é capaz de minimizar o processo inflamatório deflagrado por *Staphylococcus aureus* [44], *Escherichia coli* [120] e por outras bactérias [46,120,121].

Bactérias isoladas de pacientes com infecções abdominais ou sistêmicas são, habitualmente, as mesmas bactérias predominantemente presentes na flora intestinal [129]. Nos animais deste estudo, identificou-se a presença de bactérias no líquido peritoneal, como *Staphylococcus aureus* e/ou *Escherichia coli* e/ou *Proteus mirabilis* e/ou *Enterococcus* sp. Essas bactérias são naturais da microbiota intestinal e reproduzem a bacteremia da sepse humana. Conforme definido em outros estudos, a infecção bacteriana iniciada em região peritoneal por rompimento de vísceras libera patógenos intestinais em cavidade peritoneal, podendo evoluir para infecções severas e ou septicemia [78,130,131].

Outro achado é que, em todos os grupos de animais, independentemente da intervenção cirúrgica realizada, verificou-se aumento de consumo alimentar nos grupos cuja ração continha óleo de peixe. Além disso, apesar da maior ingestão alimentar, não se observou aumento proporcional de peso nesses animais, corroborando os resultados de inúmeras pesquisas com utilização de AGn-3 [132,133]. Sugere-se que os efeitos antiobesidade desenvolvidos pelo óleo de peixe no tecido adiposo branco podem ser atribuídos ao aumento da termogênese [134] e a modificações que esse AG promove no metabolismo lipídico, estimulando enzimas responsáveis pela degradação dos triglicerídeos [135].

O menor acúmulo de massa corporal descrito em estudos com humanos e animais que utilizam óleo de peixe é relacionado também à influência do AG-n3 na transcrição de moléculas reguladoras da oxidação de AG, como a acil-coenzima-A oxidase, acil coenzima-A desidrogenase de cadeia média, proteína desacopladora-2 (UCP2) e a via PPAR hepática. A síntese de AGs e a beta-oxidação hepática constituem fatores sugestivos de aumento do metabolismo lipídico [136-140].

Simopoulos (1996) verificou que EPA e DHA são capazes de suprimir a expressão de IL-1 β mRNA, um potente pró-inflamatório [141], enquanto Serhan *et al* (2008) mostraram o envolvimento dos ácidos graxos poliinsaturados no sistema nervoso central, favorecendo a neuromodulação, a plasticidade sináptica e o controle da inflamação [142]. Sugere-se que o ácido ômega-3 é capaz de diminuir o estímulo orexígeno, interferindo na via endocarabínóide e mesocorticolímbica, ao nível de SNC [143,144].

Parece plausível supor que os níveis plasmáticos de leptina (sinalizador da adiposidade corporal) atuem no mecanismo pelo qual o SNC é modificado com o ômega-3 [143]. Esse hormônio é secretado pelos adipócitos, que exercem efeito central na regulação do consumo de nutrientes e no dispêndio de energia [132,145,146]. O AGn-3 pode aumentar os níveis plasmáticos de leptina no hipotálamo e essa mudança correlaciona-se inversamente com os níveis de endocarbinóides [144].

As substâncias dietéticas com funcionalidade metabólica vêm alavancando pesquisas sobre os possíveis alimentos denominados imunomoduladores. Atualmente, inúmeros autores investigam a influência do óleo de peixe e de seus eicosanóides, como fatores protetores na sepse bacteriana [147-149]. Contudo, ainda existem inconsistências em relação à quantidade adequada a ser consumida, haja vista divergências entre as faixas de recomendação desses ácidos graxos para humanos e dos efeitos das doses de ingestão sugeridas para cada enfermidade [9,14,19,23,26,150-154].

O objetivo deste projeto foi verificar se o consumo dietético diário de pequena quantidade de ômega-3 seria capaz de minimizar a resposta inflamatória na sepse em animais submetidos a intervenção cirúrgica com manipulação do baço. Existem diversos estudos com diferentes modelos experimentais e propostas de quantidades de ômega 3, EPA e ou DHA na dieta de animais, com o intuito de estimar quantidades e períodos adequados de consumo dessas substâncias dietéticas que possam garantir efeitos antiinflamatórios e imunossupressores [14,23,76,79,154,155].

Os animais consumiram ração com 35% do conteúdo total de lipídios substituído por óleo de peixe, o que corresponde a 1,4 g para cada 100 g de ração, verificando-se que pequenas doses diárias foram capazes de modificar as concentrações de citocinas plasmáticas em resposta à sepse abdominal induzida.

Os estudos existentes relacionam o papel imunoprotetor do óleo de peixe a modificações metabólicas, como redução da proliferação de linfócitos [156-162], da citotoxicidade mediada por célula T [163,164], redução da atividade de células *natural killer* [165,166], da citotoxicidade mediada por macrófagos [167, 168], da quimiotaxia de neutrófilos e monócitos [116,117,167,169,170], da expressão do complexo de histocompatibilidade classe II, de citocinas pró-inflamatórias e da expressão de moléculas de adesão [116,117]. Em condições inflamatórias agudas ou crônicas e após transplantes, o consumo de óleo de peixe modifica a produção de neutrófilos *in vitro* [14] e aumenta a sobrevivência, tanto em humanos quanto em animais [171-173]. Todos esses efeitos estão associados à capacidade do AGn-3 de

modular a transdução de sinais e/ou expressão de genes em células do sistema imune [174-176].

Corroborando os achados existentes na literatura, nossos resultados demonstram que o consumo diário de pequenas doses de óleo de peixe por ratos, como parte do teor lipídico total da dieta, e não de forma suplementar, foi capaz de manter a massa corporal adequada dos animais em estudo.

O modelo experimental utilizado permitiu avaliar, além da influência do consumo de óleo de peixe, se animais submetidos a esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico, após oito e 16 semanas, apresentam concentrações de IFN- γ , IL-6 e IL-10 semelhantes a animais “saudáveis”, isto é com o baço intacto. Ou seja, o autoimplante esplênico também se constituiu em uma variável de investigação, já que o baço possui capacidade de regeneração morfológica e funcional, é constituinte primordial do sistema linfóide secundário, possui importância crucial na liberação de mediadores inflamatórios e participa ativamente do sistema imune. No tocante à sepse, o baço possui participação tanto no processo imune celular (fagocitose) quanto humoral (produção de anticorpos) [54,176].

Em indivíduos asplênicos, a porção não esplênica do Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF) compensa parcialmente a sua ausência na atividade fagocitária, mas não a produção de anticorpos, reduzindo a função e a quantidade de imunoglobulinas [177,179].

Nossos resultados demonstram que os animais do grupo I, que consumiram ração controle, apresentaram diferenças nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias analisadas, em comparação com o grupo de animais submetido a esplenectomia total isolada (grupo II), em pelo menos um dos períodos avaliados: redução de IFN- γ plasmático nos períodos 2 e 3, e de IL-6 nos períodos 2. Resposta semelhante nas concentrações de IFN- γ pode ser verificada com o grupo de animais submetidos a esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico e que foram avaliados após 16 semanas (grupo III), que apresentou diferenças nas concentrações de IFN- γ nos períodos 2 e 3.

Ao analisarmos as concentrações plasmáticas de IL-10, verificou-se que os animais submetidos a esplenectomia total combinada ao autoimplante esplênico e avaliados após 16 semanas foram favorecidos por essa intervenção cirúrgica, apresentando maiores concentrações dessa citocina nos períodos 2 e 3 que os animais que consumiram a mesma ração (100% óleo de soja) e foram submetidos a esplenectomia total.

Quando se realizou uma avaliação, em cada um dos grupos, nos animais que consumiram óleo de peixe, verificou-se que as concentrações de IFN- γ nos animais submetidos a esplenectomia total associada ao autoimplante esplênico avaliados após oito e

16 semanas (grupos VII e VIII) foram maiores do que nos animais que não sofreram intervenção cirúrgica (grupo V), e, no período 3, menores no grupo VIII, em comparação aos do grupo V e aos do grupo esplenectomizado (grupo VI).

As concentrações plasmáticas de IL-6 nos animais do grupo esplenectomizado (grupo VI) foram maiores no período 1 que nos grupos V e VIII. Já no período 3, as concentrações foram menores nos grupos VI e VII, quando comparados aos animais não submetidos a intervenção cirúrgica.

Diferentemente do que foi observado com as citocinas pró-inflamatórias, os animais com autoimplantes esplênicos, tanto aqueles avaliados com oito (grupo VIII) quanto com 16 semanas (grupo VII), nos grupos que receberam ração com óleo de peixe, apresentaram maiores concentrações de IL-10, quando comparados aos do grupo esplenectomizado (grupo VI), em todos os períodos estudados após a indução da sepse.

Este achado ratifica a nossa hipótese de regeneração funcional do autoimplante esplênico com 16 semanas (grupos III e VII), independentemente da ração consumida, com ou sem óleo de peixe.

Entretanto, o consumo de óleo de peixe na ração diária pareceu levar a regeneração funcional mais precoce do autoimplante esplênico, haja vista que tanto os animais do grupo VIII (autoimplantes com oito semanas) quanto os do grupo VII (autoimplantes com 16 semanas) apresentaram maiores concentrações de IL-10 que o grupo de animais esplenectomizados (grupo VI).

Considerando essa diversidade de respostas biológicas à sepse abdominal induzida, na dependência da presença ou ausência de um baço *in situ* (intacto) ou de autoimplantes esplênicos avaliados após oito e 16 semanas, consumindo ou não ração acrescida com óleo de peixe, a continuação desta linha de pesquisa se faz necessária, para que a quantidade e a periodicidade do consumo de ômega-3, EPA e DHA com alegação funcional seja estabelecida.

5 CONCLUSÃO

➤ O consumo diário de pequenas quantidades de óleo de peixe foi capaz de reduzir as concentrações plasmáticas de IFN- γ e de IL-6 em todos os grupos de animais estudados, exceto nos animais submetidos a esplenectomia combinada ao autoimplante esplênico e avaliados após 16 semanas, e aumentar as concentrações plasmáticas de IL-10 em pelo menos um dos períodos avaliados no grupo sem intervenção cirúrgica (grupo V) e no grupo avaliado após oito semanas da realização de autoimplante esplênico (grupo VIII).

➤ A associação do consumo de óleo de peixe em animais submetidos a esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico, avaliados tanto após oito quanto 16 semanas, parece ser eficiente na redução da resposta inflamatória à sepse induzida por CLP.

➤ Independentemente da ração consumida, os animais submetidos a esplenectomia total e autoimplante esplênico e avaliados após 16 semanas apresentam otimização da resposta inflamatória, quando comparados com animais esplenectomizados, com aumento das concentrações plasmáticas de IL-10 em pelo menos um dos períodos estudados .

➤ O consumo dietético de óleo de peixe contribuiu para a manutenção de massa corporal adequada em todos os grupos animais estudados.

REFERÊNCIAS

1. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:139-50.
2. Nelson DL & Cox MM Leninger. *Princípios de bioquímica: A oxidação dos ácidos graxos*. São Paulo: 3ª ed. Sarvier. 2002. p. 465-86.
3. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH Jr, Murphy RC, *et al.* A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* 2005; 46:839-61.
4. Curi R, Pompéia C, Miyakasa C K, Procópio J. Entendendo a Gordura. *Os Ácidos Graxos*. 1ª ed. São Paulo:Manole; 2001. p.508.
5. Jones PJH, Kubow S. Lipídeos, esteróis e seus metabólitos. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, editors. *Nutrição Moderna na saúde e na doença*. 2ª ed. São Paulo:Manole; 2009. p. 100-32.
6. Pompéia C, Lopes LR, Miyasaka CK, Procópio J, Sannomiya P, Curi R. Effect of fatty acids on leukocyte function. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33:1255-68.
7. Harbige LS. Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids* 2003; 38(4):323-41.
8. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006; 75:197-202.
9. Calder PC. Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31:467-90.
10. Hwang D. Essential fatty acids and the immune response. *FASEB J* 1989; 3:2052-61.
11. Sharma S, Sharma SC. An update on eicosanoids and inhibitors of cyclooxygenase enzyme systems. *Indian J Exp Biol* 1997; 35(10):1025-31.
12. Plaut M. The role of cyclic AMP in modulating cytotoxic T Lymphocytes: in vivo generated cytotoxic lymphocytes, but not in vitro generated cytotoxic lymphocytes, are inhibited by cyclic AMP-active agent. *J Immunol* 1979; 123:692-701.
13. Parker C. Leukotrienes and prostaglandins in the immune system. *Adv Prostaglandin Tromboxane Leukot Res* 1986; 16:113-34.
14. Broughton KS, Wade JW. Total fat and (n-3):(n-6) Fat ratios influence eicosanoid production in mice. *J Nutr* 2002; 32:88-94.
15. Roper RL, Philipps RP. Prostaglandin E2 regulation of the immune response. *Adv Prostaglandin Tromboxane Leukot Res* 1994; 22:101-11.

16. Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. *Lipids* 2003; 38:343-52.
17. Petursdottir DH, Hardardottir I. Dietary fish oil increases the number of splenic macrophages secreting TNF- α and IL-10 but decreases the secretion of these cytokines by splenic T cells from mice. *J Nutr* 2007; 137:665-70.
18. Bozza FA, Bozza PT, Bozza, Castro Faria Neto HC. Beyond sepsis pathophysiology with cytokines: what is their value as biomarkers for disease severity? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100(Suppl 1):217-21.
19. Campos FG, Waitzeberg DL, Logulo AF, Torrinhas RS, Teixeira WGJ, Habr-Gama A. Imunonutrição em colite experimental: efeitos benéficos do ácido graxo ômega-3. *Arq Gastroenterol* 2002; 39:48-54.
20. Vieira de Barros K, Gomes de Abreu G, Xavier RA, Real Martinez CA, Ribeiro ML, Gambero A, *et al.* Effects of a high fat or a balanced omega 3/omega 6 diet on cytokines levels and DNA damage in experimental colitis. *Nutrition* 2011; 27:221-6.
21. Rodrigues HG, Vinolo MA, Magdalon J, Fujiwara H, Cavalcanti DM, Farsky SH, *et al.* Dietary free oleic and linoleic acid enhances neutrophil function and modulates the inflammatory response in rats. *Lipids* 2010; 45:809-19.
22. Chan EJ, Cho L. What can we expect from omega-3 fatty acids? *Cleve Clin J Med* 2009; 76:245-51.
23. Jeffery NM, Sanderson P, Sherrington EJ, Newsholme EA, Calder PC. The ratio of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat diet alters serum lipid levels and lymphocyte functions. *Lipids* 1996; 31:737-45.
24. Rahman M, Halade GV, Bhattacharya A, Fernandes G. The fat-1 transgene in mice increases antioxidant potential, reduces pro-inflammatory cytokine levels, and enhances PPAR- γ and SIRT-1 expression on a calorie restricted diet. *Oxid Med Cell Longev* 2009; 2:307-16.
25. Tayyebi-Khosroshahi JH, Houshyar J, Tabrizi A, Vatankhah AM, Razzagi Zonouz N, Dehghan-Hesari R. Effect of omega-3 fatty acid on oxidative stress in patients on hemodialysis. *Iran J Kidney Dis* 2010; 4:322-6.
26. Eguchi R, Scarmagnani FR, Cunha CA, Souza GIH, Pisani LP, Ribeiro EB, *et al.* Fish oil consumption prevents glucose intolerance and hypercorticotestonemia in footshock-stressed rats. *Lipids Health Dis* 2011; 10:71.
27. Berg RM, Møller K, Bailey DM. Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011; 31:1532-44.
28. Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth* 2011; 107:57-64.

29. Latifi R. Nutritional therapy in critically ill and injured patients. *Surg Clin North Am* 2011; 91:579-93.
30. Kim Y, Chung HY. Antioxidative and anti-inflammatory actions of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in renal epithelial cells and macrophages. *J Med Food* 2007; 10:225-31.
31. Cicha I, Beronov K, Ramirez EL, Osterode K, Goppelt-Struebe M, Raaz D, *et al.* Shear stress preconditioning modulates endothelial susceptibility to circulating TNF-alpha and monocytic cell recruitment in a simplified model of arterial bifurcations. *Atherosclerosis* 2009; 207:93-102.
32. Pentón-Rol G, Cervantes-Lianos M, Martínez-Sánchez G, Cabrera-Gómez JA, Valenzuela-Silva CM, Ramírez-Nuñez O, *et al.* TNF- α and IL-10 downregulation and marked oxidative stress in Neuromyelitis Optica. *J Inflamm (Lond)* 2009; 2:18.
33. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock -- a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980; 29:189-201.
34. Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, Hüser N, *et al.* Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock* 2004; 21:505-11.
35. Cunha-Lopes MW, Aguilar-Nascimento JE, Dock-Nascimento D, Gomes da Silva MHG, Silva VAT. Associação de glutamina e probióticos no trofismo mucoso do cólon na peritonite experimental. *Rev Col Bras Cir* 2007; 34:48-53.
36. Diamond LK. Splenectomy in childhood and the overwhelming infection. *Pediatrics* 1969; 43:866-9.
37. Marques RG, Petroianu A. Infecção fulminante pós-esplenectomia. *Arq Gastroenterol* 2003; 40:47-54.
38. Chadburn A. The spleen: anatomy and anatomical function. *Semin Hematol* 2000; 111:1112-5.
39. Cesta MF. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol Pathol* 2006; 34:455-65.
40. Brendolan A, Orsado MM, Carsetti R, Selleri L, Dear TN. Development and function of the mammalian spleen. *Bioessays* 2007; 29:166-77.
41. Matsuno K, Ezaki T, Kotani M. Splenic outer periarterial lymphoid sheath (PALS): an immunoproliferative microenvironment constituted by antigen-laden marginal metallophilic and ED2-positive macrophages in the rat. *Cell Tissue Res* 1989; 257:459-70.
42. Bardach (1891) apud Morris DH, Bullock FD. The importance of the spleen in resistance to infection. *Ann Surg.* 1919, 70: 513-21.

43. Di Carlo I, Pulvirenti E, Toro A. A new technique for spleen autotransplantation. *Surg Innov* 2012; 19(2):156-61.
44. Teixeira FM, Fernandes BF, Rezende AB, Machado RR, Alves CC, Perobelli SM, *et al.* Staphylococcus aureus infection after splenectomy and splenic autotransplantation in BALB/c mice. *Clin Exp Immunol* 2008; 154:255-63.
45. Di Carlo I, Pulvirenti E, Toro A. A New technique for spleen autotransplantation. *Surg Innov* 2012; 19:156-61.
46. Toro A, Mannino M, Reale G, Di Carlo I. Splenic autotransplantation in a patient with human immunodeficiency virus infection: a case report. *J Med Case Rep* 2011; 15:379.
47. Lanier LL The origin and functions of natural killer cells. *Clin Immunol* 2000; 95(1 Pt 2):S14-8.
48. Fleisher TA, Blessing JJH. Immune function. *Pediatr Clin North Am* 2000; 47:1197-209.
49. Gangadharan D, Cheroutre H. The CD8 isoform CD8alphaalpha is not a functional homologue of the TCR co-receptor CD8alphabeta. *Curr Opin Immunol* 2004; 16:264-70.
50. Grunig G, Corry DB, Leach MW, Seymour BW, Kurup VP, Rennick DM. Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Exp Med* 1997; 185:1089-99.
51. Rose AT, Newman MI, Debelak J, Pinson CW, Morris JA Jr, Harley DD, *et al.* The incidence of splenectomy is decreasing: lessons learned from trauma experience. *Am Surg* 2000; 66:481-6.
52. Martin F, Oliver AM, Kearney JF. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 2001; 14:617-29.
53. Leemans R, Manson W, Snijder JA, Smit JW, Klasen HJ, The TH, *et al.* Immune response capacity after human splenic autotransplantation. *Ann Surg* 1999; 229:279-85.
54. Pabst R, Westermann J, Rothkttter HJ. Immunoarchitecture of regenerated splenic and lymph node transplants. *Int Rev Cytol* 1991; 128:215-60.
55. Pachter HL, Grau J. The current status of splenic preservation. *Adv Surg* 2000; 34:137-74.
56. Alves HJ, Viana G, Magalhães MM, Arantes RM, Coelho PM, Cunha-Melo JR. Kinetics of neovascularization of splenic autotransplant in mice. *J Anat* 1999; 195(Pt 3):387-92.
57. Feliciano DV, Bitondo CG, Mattox KL, Rumisek JD, Burch JM, Jordan GL Jr. A four-year experience with splenectomy versus splenorrhaphy. *Ann Surg* 1985; 201:568-75.

58. Marques RG, Petroianu A, Coelho JMCO, Portela MC. Morphology and phagocytic function of regenerated autogenous splenic implant in rats. *Acta Cir Bras* 2004; 19:642-8.
59. Güngör M, Anđ O, Inanç D, Petorak I, Koyuncuođlu H. The effect of splenectomy on the development of experimental pyelonephritis. *Experientia* 1981; 37:387-9.
60. Faria-Neto HC. Citocinas e resposta inflamatória sistêmica em cirurgia. In: Marques RG. *Técnica Operatória e Cirurgia Experimental*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan:Rio de Janeiro. 2005; p. 34-9.
61. Livingston CD, Levine BA, Sirinek KR. Preservation of splenic tissue prevents postsplenectomy pulmonary sepsis following bacterial challenge. *J Surg Res* 1982; 33:356-61.
62. Caetano CE, Marques RG. Técnicas para canulação vascular em animais de pequeno e médio porte. In: Marques RG (ed). *Técnica Operatória e Cirurgia Experimental*. Rio de Janeiro: ed. Guanabara Koogan. 2005. p. 720-5.
63. Marques RG, Morales MM, Petroianu A. Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cir Bras* 2009; 24:69-74.
64. Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr* 1997; 127(5 Suppl):838S-41S.
65. Massone F. *Anestesiologia Veterinária: Farmacologia e Técnicas*. Rio de Janeiro: ed. Guanabara Koogan. 1999. p. 225.
66. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Purified ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123:1939-51.
67. Chaudry IH, Wichterman KA, Baue AE. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels. *Surgery* 1979; 85:205-11.
68. Freise H, Brückner UB, Spiegel HU. Animal models of sepsis. *J Invest Surg* 2001; 14:195-212.
69. Holdsworth RJ. Regeneration of the spleen and splenic autotransplantation. *Br J Surg* 1991; 78:270-8.
70. Comissão de ética no uso de animais de experimentação – CEUA. *Manual de utilização de animais*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2008.54p.
71. Suassuna I, Suassuna IR. Duplo açúcar uréia (DAU). Um meio de triagem para enterobactérias. *Rev Bras Patol Clin* 1978; 14:201-3.
72. Hugh R, Leifson E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *J Bacteriol* 1953; 66:24-6.

73. Grimm H, Mayer K, Mayse P, Eigenbrodt E. Regulatory potential of n3 fatty acids in immunological and inflammatory processes. *Br J Nutr* 2002; 87(Suppl 1):S59-67.
74. Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale? *Nutr Res* 2001; 21:309-41.
75. Weber C, Erl W, Pietsch A, Danesch U, Weber PC. Docosahexaenoic acid selectively attenuates induction of vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent monocytic cell adhesion to human endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:622-8.
76. Li Y, Wang X, Li N, Li J. Fish oil improves hemodynamic stabilization and inflammation after resuscitation in a rat model of hemorrhagic shock. *Lipids Health Dis* 2012; 11:5.
77. Vincent JL. Clinical sepsis and septic shock-definition, diagnosis and management principles. *Langenbecks Arch Surg* 2008; 393:817-24.
78. Badiu DC, Paunescu V, Aungurenci A, Pasarica D. Proinflammatory cytokines in peritonitis. *J Med Life* 2011; 4:158-62.
79. Calder PC, Grimble RF. Fatty acids and immunity. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56(Suppl 3):S14-9.
80. Calder PC. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. *Braz J Med Biol Res.* 2003, 36(4): 433-46.
81. De Caterina R, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone MA Jr, Libby P. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:1829-36.
82. Hughes DA, Southon S, Pinder AC. (n-3) Polyunsaturated fatty acids modulate the expression of functionally associated molecules on human monocytes in vitro. *J Nutr* 1996; 126:603-10.
83. De Caterina R, Libby P. Control of endothelial leukocyte adhesion molecules by fatty acids. *Lipids* 1996; 31(Suppl):57S-63.
84. Collie-Duguid ES, Wahle KW. Inhibitory effect of fish oil N-3 polyunsaturated fatty acids on the expression of endothelial cell adhesion molecules. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220:969-74.
85. Miles EA, Wallace FA, Calder PC. Dietary fish oil reduces intercellular adhesion molecule 1 and scavenger receptor expression on murine macrophages *Atherosclerosis* 2000; 152:43-50.
86. Sanderson P, Calder PC. Dietary fish oil diminishes lymphocyte adhesion to macrophage and endothelial cell monolayers. *Immunology* 1998; 94:79-87.

87. Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* 2005; 175:3463-8.
88. Cavaillon JM, Annane D. Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res* 2006; 12:151-70.
89. Qiu H, Fan Y, Joyee AG, Wang S, Han X, Bai H, *et al.* Type I IFNs enhance susceptibility to *Chlamydia muridarum* lung infection by enhancing apoptosis of local macrophages. *J Immunol* 2008; 181(3):2092-102.
90. Yin K, Hock CE, Lai PS, Ross JT, Yue G. Role of interferon- γ in lung inflammation following cecal ligation and puncture in rats. *Shock* 1999; 12:215-21.
91. Kohler J, Heumann D, Garotta G, LeRoy D, Bailat S, Barras C, *et al.* IFN-gamma involvement in the severity of gram-negative infections in mice. *J Immunol* 1993; 151:916-21.
92. Romero CR, Herzig DS, Etogo A, Nunez J, Mahmoudizad R, Fang G, *et al.* The role of interferon- γ in the pathogenesis of acute intra-abdominal sepsis. *J Leukoc Biol* 2010; 88:725-35.
93. Castellheim A, Brekke OL, Espevik T, Harboe M, Mollnes TE. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scand J Immunol* 2009; 66:479-91.
94. Koide S, McVay LD, Frankel WL, Betling CA, Zhou ED, Shimada T, *et al.* Increased expression of tissue cytokines in graft-versus-host disease after small bowel transplantation in the rat. *Transplantation* 1997; 64:518-24.
95. Chan SY, DeBruyne LA, Goodman RE, Eichwald EJ, Bishop DK. In vivo depletion of CD8⁺ T cells results in Th2 cytokine production and alternate mechanisms of allograft rejection. *Transplantation* 1995; 59:1155-61.
96. Antonelli M, Raponi GM, Martino P, Rosa G, Conti G, Jalouk J, *et al.* High IL-6 serum levels are associated with septic shock and mortality in septic patients with severe leukopenia due to hematological malignancies. *Scand J Infect Dis* 1995; 27:381-4.
97. Frink M, Van Griensven M, Kobbe P, Brin T, Zeckey C, Vaske B, *et al.* IL-6 predicts organ dysfunction and mortality in patients with multiple injuries. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2009; 17:49.
98. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM. Interleukin-6 in the injured patient: marker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg* 1996; 224:647-64.
99. Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, Groote DD, Franchimont P, *et al.* Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg* 1992; 215:356-62.

100. Riedemann NC, Neff TA, Guo RF, Bernacki KD, Laudes IJ, Sarma JV, *et al.* Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression. *J Immunol* 2003; 170:503-07.
101. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000; 342:836-43
102. Baumann H, Gauldie J. Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. *Mol Biol Med* 1990; 7:147-59.
103. Heinrich PC, Castell JV. Andus, T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990; 265:621-36.
104. Rittirsch D, Flierly MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:776-87.
105. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008; 453:1051-7.
106. Kolls JK, McCray PBJr, Chan YR. Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:829-35.
107. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, *et al.* Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21:331-44.
108. Song C, Zhang Q, Liu X, Shan Y. IL-12 and IL-10 production are differentially regulated by phosphatidylinositol 3-kinase in mast cells. *Scand J Immunol* 2011; 75:266-72.
109. Bazzoni F, Tamassia N, Rossato M, Cassatella MA. Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: Lessons from neutrophils. *Eur J Immunol* 2010; 40:2360-8.
110. Steinhauser ML, Hogaboam CM, Kunkel SL, Lukacs NW, Strieter RM, Standiford TJ. IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *J Immunol* 1999; 162:392-9.
111. Latifi SQ, O'Riordan MA, Levine AD. Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock. *Infect Immun* 2002; 70:4441-6.
112. Kasten KR, Muenzer JT, Caldwell CC. Neutrophils are significant producers of IL-10 during sepsis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 393:28-31.
113. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, *et al.* Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 2007; 117(4): 902-09.

114. Barros KV, Xavier RA, Abreu GG, Martinez CA, Ribeiro ML, Gambero A, *et al.* Soybean and fish oil mixture increases IL-10, protects against DNA damage and decreases colonic inflammation in rats with dextran sulfate sodium (DSS) colitis. *Lipids Health Dis* 2010; 9:68.
115. Ruth MR, Proctor SD, Field CJ. Feeding long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids to obese leptin receptor-deficient JCR:LA-cp rats modifies immune function and lipid-raft fatty acid composition. *Br J Nutr* 2009; 101(9):1341-50.
116. Hughes DA, Pinder AC. n3 polyunsaturated fatty acids inhibit the antigen-presenting function of human monocytes. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(1 Suppl): 357S-60.
117. Fujikawa M, Yamashita N, Yamazaki K, Sugiyama E, Suzuki H, Hamazaki T. Eicosapentaenoic acid inhibits antigen-presenting cell function of murine splenocytes. *Immunology* 1992; 75:330-5.
118. Hoesel LM, Neff TA, Neff SB, Younge JG, Olle EW, Gao H, *et al.* Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis. *Shock* 2005; 24:40-7.
119. Pillay J, Kamp VM, Els van Hoffen, Visser T, Tak T, Jan-Willem L, *et al.* A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest* 2012; 122:327-36.
120. Marques RG, Petroianu A. O papel do baço na resistência à infecção. *Rev Bras Med* 2003; 60:271-3.
121. Marques RG, Petroianu A, Oliveira MBN, Bernardo-Filho M. Importância do tecido esplênico para a fagocitose bacteriana. *Acta Cir Bras* 2002; 17:388-93.
122. Swails WS, Kenler AS, Driscoll DF, DeMichele SJ, Babineau TJ, Utsunamiya T. Effect of a fish oil structured lipid-based diet on prostaglandin release from mononuclear cells in cancer patients after surgery. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1997; 21:266-74.
123. Downey EC, Shackford SR, Fridlund PH, Ninnemann JL. Long-term depressed immune function in patients splenectomized for trauma. *J Trauma* 1987; 27:661-3.
124. Aavitsland P, Froholm LO, Hoiby EA, Lystad A. Risk of pneumococcal disease in individuals without a spleen. *Lancet* 1994; 344:1504.
125. Waghorn DJ. Overwhelming infection in asplenic patients: current best practice preventive measures are not being followed. *J Clin Pathol* 2001; 54:214-8.
126. Deng J, Muthu K, Gamell R, Shankar R, Jones SB. Adrenergic modulation of splenic macrophage cytokine release in polymicrobial sepsis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287:C730-6.
127. Noel G, Wang Q, Schwemberger S, Hanson C, Giacalone N, Haar L, *et al.* Neutrophils, not monocyte/macrophages, are the major splenic source of postburn IL-10. *Shock* 2011; 36:149-55.

128. Klinker MW, Lundy SK. Multiple mechanisms of immune suppression by B lymphocytes. *Mol Med* 2011; 18:123-37.
129. Wells CL, Van de Westerlo EM, Jechorek RP, Erlandsen SL. Exposure of the lateral enterocyte membrane by dissociation of calcium-dependent junctional complex augments endocytosis of enteric bacteria. *Shock* 1995; 4:204-10.
130. Van Till, Olivier JW, Van Veen, Suzanne Q, Van Ruler O, Lamme B, *et al.* The innate immune response to secondary peritonitis. *Shock* 2007; 28:504-17.
131. Lai KN, Lai KB, Lam CW, Chan TM, Li FK, Leung JC. Changes of cytokine profiles during peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* 2000; 35:644-52.
132. Silva FM, de Almeida JC, Feoli AM. Effect of diet on adiponectin levels in blood. *Nutr Rev* 2011; 69:599-612.
133. Costa CA, Carlos AS, Gonzalez GD, Reis RP, Ribeiro MD, Dos Santos AD, *et al.* Diet containing low n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids ratio, provided by canola oil, alters body composition and bone quality in young rats. *Eur J Nutr* 2012; 51:191-8.
134. Sato A, Kuzuya H, Notsu T, Ohta M, Nakakuki M, Mizuguchi K, *et al.* Antiobesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity importance of hepatic lipogenesis. *Diabetes* 2010; 59:2495-504.
135. Shearer GC, Savinova O, Harris WS. Fish oil – how does it reduce plasma triglycerides? *Biochim Biophys Acta* 2011; 1821:843-51.
136. Wakutsu M, Tsunoda M, Shiba S, Muraki E, Kasono K. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)-independent functions of fish oil on glucose and lipid metabolism in diet-induced obese mice. *Lipids Health Dis* 2010; 9:101.
137. Mori T, Kondo H, Hase T, Tokimitsu I, Murase T. Dietary fish oil upregulates intestinal lipid metabolism and reduces body weight gain in C57BL/6J mice. *J Nutr* 2007; 137:2629-34.
138. Kawashima A, Sugawara S, Okita M, Akahane T, Fukui K, Hashiuchi M, *et al.* Plasma fatty acid composition estimated desaturase activities, and intakes of energy and nutrient in Japanese men with abdominal obesity or metabolic syndrome. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2009; 55:400-6.
139. Belalcazar LM, Reboussin DM, Haffner SM, Reeves RS, Schwenke DC, Hoogeveen RC, *et al.* Marine w-3 fatty acid intake: associations with cardiometabolic risk and response to weight loss intervention in the Look AHEAD (Action for Health in Diabetes) study. *Diabetes Care* 2010; 33(1):197-9.
140. Neschen S, Morino K, Rossbacher JC, Pongratz RL, Cline GW, Sono S, *et al.* Fish oil regulates adiponectin secretion by a peroxisome proliferator-activated receptor- γ -dependent mechanism in mice. *Diabetes* 2006; 55:924-8.

141. Simopoulos AP. The role of fatty acids in gene expression: health implications. *Ann Nutr Metab* 1996; 40:303-11.
142. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:349-61.
143. Golub N, Geba D, Mousa SA, Williams G, Block RC. Greasing the wheels of managing overweight and obesity with omega-3 fatty acids. *Med Hypotheses* 2011; 77:1114-20.
144. Francischetti EA, Abreu VG. O sistema endocanabinóide: nova perspectiva no controle de fatores de risco cardiometabólico. *Arq Bras Cardiol* 2006; 87:548-58.
145. López-Alarcón M, Martínez-Coronado A, Velarde-Castro O, Rendón-Macías E, Fernández J. Supplementation of n3 long-chain polyunsaturated fatty acid synergistically decreases insulin resistance with weight loss of obese prepubertal and pubertal children. *Arch Med Res* 2011; 42:502-8.
146. Puglisi MJ, Hasty AH, Saraswathi V. The role of adipose tissue in mediating the beneficial effects of dietary fish oil. *J Nutr Biochem* 2011; 22:101-8.
147. Ott J, Hiesgen C, Mayer K. Lipids in critical care medicine. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2011; 85:267-73.
148. Anderson M, Fritsche KL. (n-3) Fatty acids and infectious disease resistance. *J Nutr* 2002; 133:535-8.
149. Montero D, Mathlouthi F, Tort L, Afonso JM, Torrecillas S, Fernández-Vaquero A, *et al.* Replacement of dietary fish oil by vegetable oils affects humoral immunity and expression of pro-inflammatory cytokines genes in gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Fish Shellfish Immunol* 2010; 29:1073-81.
150. Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 2006; 83(Suppl 6):1505S-19.
151. Chiu WC, Yeh W, Chien YW, Hou YC, Hu YM, Yeh SL. Effects of dietary fish oil supplementation on cellular adhesion molecule expression and tissue myeloperoxidase activity in hypercholesterolemic mice with sepsis. *J Nutr Biochem* 2009; 20:254-60.
152. Kennedy ET, Ausman LM. Cost implications of alternative sources of (n-3) fatty acid consumption in the United States. *J Nutr* 2012; 142(3):605S-9.
153. M-Shirazi M, Taleban FA, Abadi AR, Sabetkasaei M. Fish oil increases atherosclerosis and hepatic steatosis, although decreases serum cholesterol in Wistar rat. *J Res Med Sci* 2011; 16:583-90.
154. Calder PC. Rationale and use of n-3 fatty acids in artificial nutrition. *Proc Nutr Soc* 2011; 69:565-73.

155. Vilaseca J, Salas A, Guarner F, Rodriguez R, Martinez M, Malagelad J-R. Dietary fish oil reduces progression of chronic inflammatory lesions in a rat model of granulomatous colitis. *Gut* 1990; 31:539-44.
156. Alexander NJ, Smythe NL. Dietary modulation of in vitro lymphocyte function. *Ann Nutr Metab* 1988; 32:192-9.
157. Kelley DS, Nelson GJ, Serrato CM, Schmidt PC, Branch LB. Effects of type of dietary fat on indices of immune status of rabbits. *J Nutr* 1988; 118:1376-84.
158. Fritsche KL, Cassity NA, Huang SC. Effect of dietary fat source on antibody production and lymphocyte proliferation in chickens. *Poult Sci* 1991; 70:611-17.
159. Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. The effect of dietary lipid manipulation on rat lymphocyte subsets and proliferation. *Immunology* 1994; 82:603-10.
160. Yaqoob P, Calder PC. The effects of dietary lipid manipulation on the production of murine T-cell-derived cytokines. *Cytokine* 1995; 7:548-53.
161. Sanderson P, Yaqoob P, Calder PC. Effects of dietary lipid manipulation upon rat spleen lymphocyte functions and the expression of lymphocyte surface molecules. *J Nutr Environmental Med* 1995; 5:119-32.
162. Jolly CA, Jiang YH, Chapkin RS, McMurray DN. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids suppress murine lymphoproliferation, interleukin-2 secretion and the formation of diacylglycerol and ceramide. *J Nutr* 1997; 127:37-43.
163. Fritsche KL, Johnston PV. Effect of dietary omega-3 fatty acids on cell mediated cytotoxic activity in BALB/c mice. *Nutr Res* 1990; 10:577-88.
164. Fritsche KL, Cassity NA. Dietary n-3 fatty acids reduce antibody-dependent cell cytotoxicity and alter eicosanoid release by chicken immune cells. *Poult Sci* 1992; 71:1646-57.
165. Berger A, German JB, Chiang BL, Ansari AA, Keen CL, Fletcher MP, *et al.* Influence of feeding unsaturated fats on growth and immune status of mice. *J Nutr* 1993; 123:225-33.
166. Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids. *Immunol Lett* 1994; 41:241-7.
167. Hubbard NE, Chapkin RS, Erickson KL. Effect of dietary linseed oil on tumoricidal activity and eicosanoid production in murine macrophages. *Lipids* 1994; 29:651-5.
168. Somers SD, Chapkin RS, Erickson KL. Alteration of in vitro murine peritoneal macrophage function by dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in menhaden fish oil. *Cell Immunol* 1989; 123:201-11.

169. Sperling RI, Benincaso AI, Knoell CT, Larkin JK, Austen KF, Robinson DR. Dietary w-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils. *J Clin Invest* 1993; 91:651-60.
170. Lee TH, Hoover RL, Williams JD, Sperling RI, Ravalese J, Spur BW, *et al.* Effects of dietary enrichment with EPA and DHA on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. *N Engl J Med* 1985; 312:1217-24.
171. Grimminger F, Grimm H, Fuhrer D, Papavassilis C, Lindemann G, Blecher C, *et al.* Omega 3 lipid infusion in a heart allotransplant model: shift in fatty acid and lipid mediator profiles and prolongation of transplant survival. *Circulation* 1996; 93:365-71.
172. Berthoux FC, Guerin C, Berthoux P, Burgard G, Alamartine E. Oneyear randomized controlled trial with omega-3 fatty acid-rich fish oil in clinical renal transplant. *Transplant Proc* 1992; 24:2578-82.
173. Maachi K, Berthoux P, Burgard G, Alamartine E, Berthoux F. Results of a 1-year randomized controlled trial with omega-3 fatty acid fish oil in renal transplantation under triple immunosuppressive therapy. *Transplant Proc* 1995; 27:846-9.
174. Richieri GV, Kleinfeld AM. Free fatty acid perturbation of transmembrane signalling in cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1989; 143:2302-10.
175. Van Meter AR, Ehringer WD, Stillwell W, Blumenthal EJ, Jencki LJ. Aged lymphocyte proliferation following incorporation and retention of dietary omega-3 fatty acids. *Mech Ageing Dev* 1994; 75:95-114.
176. Sumida C, Graber R, Nunez E. Role of fatty acids in signal transduction: modulators and messengers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1993; 48:117-22.
177. Marques RG, Petroianu A, Coelho JM. Bacterial phagocytosis by macrophage of autogenous splenic implant. *Braz J Biol* 2003; 63:491-5.
178. Cooney DR, Dearth JC, Swanson SE, Dewanjee MK, Telander RL. Relative merits of partial splenectomy, splenic reimplantation, and immunization in preventing postsplenectomy infection. *Surgery* 1979; 86:561-9.
179. Cunha BA. Infection in nonleukopenic compromised hosts (diabetes mellitus, SLE, steroids, and asplenia) in critical care. *Crit Care Clin* 1998; 14:263-82.

ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEA/041/2009** sobre "**Efeito do consumo de óleo de peixe na resposta inflamatória em ratos submetidos a esplenectomia total isolada ou combinada com auto-implante esplênico e à indução de sepse abdominal**", sob a responsabilidade de **Ruy Garcia Marques**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **21/07/2009**. Este certificado expira em **21/07/2013**.

Rio de Janeiro, 21 de Julho de 2009.

Prof. Israel Felzenszwalb
CEA/IBRAG/UERJ

Israel Felzenszwalb
Diretor
IBRAG - UERJ
Mat. 2887-8

Profa. Patricia Cristina Lisboa
CEA/IBRAG/UERJ

Prof^ª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Prof^ª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matricula 34765-8

/ass