LETÍCIA DE NARDI CAMPOS

**Efeito de emulsão lipídica parenteral composta por
mistura de triglicérides de cadeia média e óleos de
soja, oliva e peixe sobre a migração e fagocitose de
leucócitos de ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Cirurgia do
Aparelho Digestivo

Orientador: Prof. Dr. Dan Linetzky
Waitzberg

SÃO PAULO

2007

*Trabalho realizado no Grupo METANUTRI - Metabologia e Nutrição em
Cirurgia - do Laboratório de Investigação Médica - LIM 35, da Disciplina
de Cirurgia do Aparelho Digestivo, do Departamento de Gastroenterologia
da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.*

Auxílio Pesquisa: CNPq nº 505633/2004-3

Fresenius-Kabi do Brasil

Dedicatória

*À Regina Maria De Nardi e
José Roberto Camargo Campos,
meus pais,*

*que me ensinaram os valores essenciais da vida
e sempre me incentivaram para um crescimento
intelectual.*

*À Ruth Angelini Campos e
Mário Camargo Campos,
meus avós,*

*por todo carinho e aquela “proteção” que só os avós
sabem dar.*

Agradecimento Especial

*A Rafael Aguiar Pedrosa,
meu amor,
pelo carinho, paciência, amizade e
apoio incondicional.*

*“Eu tenho tanto para lhe falar
mas com palavras não sei dizer
como é grande o meu amor
por você”*

Roberto Carlos

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Dan Linetzky Waitzberg, por compartilhar todo o seu vasto conhecimento com os pesquisadores mais jovens, por incentivar e acreditar na pesquisa e na formação do conhecimento científico. Muito obrigada pela grande oportunidade de fazer parte de sua equipe e tê-lo como orientador.

Ao Prof. Dr. Ivan Ceconello, Professor Titular da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo, pela oportunidade de me matricular no curso de Pós Graduação e garantir as condições para o desenvolvimento desta pesquisa.

À bióloga chefe do Grupo METANUTRI, Profa. Ms. Raquel Suzana Torrinhas pela enorme contribuição durante todo este projeto. De coração, obrigada pela dedicação, carinho e paciência com que se empenhou para me ajudar.

À Prof. Dra. Raquel Bellinati-Pires, pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz, por gentilmente me acolher em seu laboratório e garantir os meios para execução

deste trabalho, por sua sempre pronta ajuda e por todo auxílio na interpretação dos resultados, sempre em agradáveis conversas.

Aos patologistas, Prof. Dr. Carlos Eduardo Bacchi, Prof. Dr. Victor Arias e Prof. Dra. Ângela Logullo Waitzberg, agradeço ao imenso apoio dado durante a elaboração deste trabalho.

Aos pesquisadores do Grupo METANUTRI – Raquel Torrinhas, Graziela Ravacci, Lillian Mika Horie, Mariana Raslan, Thiago Jacintho, Cláudia Alves agradeço a amizade, as sugestões, a convivência diária, troca de experiências e conhecimento científico.

Às estagiárias Thaís Garcia, Raquel Santana e Taciana Kuroiwa obrigada pela ajuda na revisão final dos textos desta Dissertação.

Às funcionárias do Laboratório Metanutri Elaine Muniz, Patrícia Macedo e Erly Maria Paz por toda colaboração e amizade dada para o correto andamento deste trabalho.

Ao técnico de laboratório José Edson Pereira da Costa, sempre presente nas horas de aperto, com calma e um sorriso no rosto, meu sincero agradecimento pelas inúmeras ajudas prestadas.

Ao Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira, da Unesp, pelo valioso auxílio técnico dado para a realização das análises por imagens.

À biomédica Cristina Nakamura, do Instituto Adolfo Lutz, pela colaboração na metodologia e preparação dos blocos de parafina para imunohistoquímica.

Ao bioestatístico Prof. Dr. Isaac Castro, por sua orientação estatística fundamental para o início deste trabalho.

Ao pessoal do serviço de transporte da FMUSP, Waldemir A. Oliveira, Ilso R. Teixeira, Rui Rosa e Sandra R.R.S. Fermino gostaria de agradecer pela disposição e agradável companhia em todas as viagens realizadas durante esta pesquisa.

Às biólogas e doutorandas Patrícia R. A. Nagib Loyola e Jacy Gameiro, do Departamento de Imunologia do Instituto de Biologia da Unicamp, pelas valiosas sugestões que auxiliaram na discussão e conclusão deste trabalho.

Às funcionárias da Secretaria de Pós Graduação, Myrtes Freire de Lima e Vilma de Jesus Libério por toda colaboração e atendimento prestado aos alunos pós-graduandos.

Ao desenhista e web designer Marcos Retzer pela concepção gráfica da capa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq pelo apoio financeiro.

À Fresenius-Kabi do Brasil, pelo auxílio financeiro e fornecimento de emulsões lipídicas que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Abbot laboratórios por gentilmente ceder bombas de infusão peristáltica e equipos de infusão para a execução dos experimentos desta pesquisa.

À minha família, especialmente Regina, José Roberto, Rafael, Henrique, Ruth, Mário, Erenice, José Luiz e Iraí, muita obrigada pelo apoio e carinho de todos vocês!

À todos meus queridos amigos, em especial Raquel, Luciana, Ana Elisa, Eveline, Daniela, Suzana e Edmar, que não auxiliaram na execução desta Dissertação, mas sempre estiveram a meu lado nesta jornada, torcendo pelo sucesso deste Mestrado. Obrigada pela amizade, apoio e incentivo.

E por fim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização e conclusão deste Mestrado.

*“O valor das coisas não estão no tempo em que elas duram, mas
na intensidade com que acontecem.*

*Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e
pessoas incomparáveis”.*

Fernando Pessoa

Normalização Adotada

Esta Dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	2
1.1	Impacto das emulsões lipídicas sobre o sistema imune	3
1.2	Racional.....	8
2	OBJETIVO	11
3	MÉTODOS.....	13
3.1	Local de execução das atividades	13
3.2	Planejamento do experimento	13
3.3	Tamanho da amostra.....	14
3.4	Animais	14
3.5	Grupos experimentais.....	15
3.6	Procedimentos.....	17
3.6.1	Anestesia	17
3.6.2	Cateterização do sistema venoso central.....	17
3.7	Infusão de emulsões lipídicas parenterais	20
3.7.1	Grupo CO – NC.....	22
3.7.2	Grupo SF.....	22
3.7.3	Grupo TCM/TCL.....	22
3.7.4	Grupo TCM/TCL/OP.....	22
3.7.5	Grupo SMOF	23
3.8	Acompanhamento dos animais.....	28
3.8.1	Variação percentual do peso corpóreo.....	28
3.8.2	Infusão parenteral e ingestão alimentar	28
3.8.3	Estado geral dos animais	29
3.9	Marcação de macrófagos por carvão coloidal	30
3.9.1	Preparo do carvão coloidal.....	30
3.9.2	Injeção de carvão coloidal.....	30
3.9.3	Visualização do carvão coloidal	31
3.10	Sacrifício.....	35
3.11	Ensaio de migração	36
3.12	Análise da fagocitose	41
3.12.1	Recuperação antigênica.....	42
3.12.2	Imunohistoquímica	42

3.13	Análise semi-automatizada de imagens	44
3.14	Ética	47
3.15	Análise Estatística	47
4	RESULTADOS	49
4.1	Variáveis Clínicas	49
4.1.1	Peso corpóreo	49
4.1.2	Volume de infusão endovenosa e quantidade de ingestão oral	51
4.1.3	Quantidade de energia fornecida	53
4.2	Variáveis imunológicas	55
4.2.1	Função quimiotática	55
4.2.2	Quantificação de macrófagos	58
5	DISCUSSÃO	64
5.1	Do método	64
5.1.1	Dos animais	64
5.1.2	Do acesso venoso	64
5.1.3	Da infusão endovenosa de lipídeos	65
5.1.4	Dos grupos experimentais	66
5.1.5	Do ensaio de quimiotaxia	66
5.1.6	Ensaio de fagocitose; teste de carvão coloidal, análise imunohistoquímica e análise de imagens	68
5.2	Dos Resultados	70
5.2.1	Variáveis Clínicas	70
5.2.2	Variáveis imunológicas	70
6	CONCLUSÕES	79
7	PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÃO	81
8	ANEXOS	83
9	REFERÊNCIAS	95

LISTA DE ABREVIATURAS

AG	- ácidos graxos
BSA	- soro albumina bovina
CO-NC	- controle não-cirúrgico
DHA	- ácido docosaheptaenóico
DIL	- dieta isenta de lipídeos
EL	- emulsões lipídicas parenterais
EPA	- ácido eicosapentaenóico
et al	- e outros colaboradores
LPL	- lipoproteína lipase
LPS	- lipopolissacarídeo
max	- máximo
min	- mínimo
ns	- não significativo
OP	- óleo de peixe
OO	- óleo de oliva
PBS	- solução salina com fosfato
PMN	- polimorfonucleares
SF	- solução fisiológica
SMOF	- nome de um grupo experimental
TCL	- triglicérides de cadeia longa
TCM	- triglicérides de cadeia média
TNF	- fator de necrose tumoral
UTI	- unidade de terapia intensiva

LISTA DE SÍMBOLOS

%	- porcentagem
°C	- graus Celsius
CO ₂	- gás carbônico
cm	- centímetro
dp	- desvio-padrão
g	- gramas
H ₂ O ₂	- peróxido de hidrogênio
Kcal	- quilocalorias
Kg	- quilogramas
m	- média
M	- molar
med	- mediana
mg	- miligramas
mL	- mililitros
mm	- milímetros
nm	- nanômetros
pH	- potencial hidrogeniônico
rpm	- rotações por minuto
v	- volume
α	- alfa
β	- beta
ω	- ômega
μ g	- microgramas

μL	- microlitros
μm	- micrômetros
$<$	- menor que
$>$	- maior que
$\leq$	- menor ou igual a

LISTA DE SIGLAS

AIN - 93	- American Institute of Nutrition - 1993
ANOVA	- análise de variância
CAPPesq	- Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CEMIB	- Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CNPq	- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COBEA	- Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação em Animais
FMUSP	- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IAL	- Instituto Adolfo Lutz
METANUTRI-	Metabologia e Nutrição em Cirurgia
LIM	- Laboratório de Investigação Médica
UNESP	- Universidade Estadual de São Paulo
UNICAMP	- Universidade Estadual de Campinas
USP	- Universidade de São Paulo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Denominação dos grupos de acordo com o tratamento nutricional (oral e parenteral).....	16
Tabela 2 - Composição da dieta oral padrão (AIN-93M) formulada para ratos adultos. Concentração expressa em g/kg de dieta. Segundo Reeves et al, 1993	24
Tabela 3 - Composição da dieta isenta de lipídeos (adaptada de AIN-93M) formulada para ratos adultos. Concentração expressa em g/kg de dieta. Adaptado de Reeves et al, 1993	25
Tabela 4 - Composição completa das emulsões lipídicas parenterais comercialmente disponíveis	26
Tabela 5 - Composição estimada de ácidos graxos das emulsões lipídicas parenterais dos grupos da presente pesquisa	27
Tabela 6 - Média e desvio padrão ($m \pm dp$) da alteração de peso corpóreo dos animais por grupo.....	50
Tabela 7 - Média e desvio padrão ($m \pm dp$) do volume de infusão endovenosa e quantidade de ingestão oral por grupo experimental	52
Tabela 8 - Média e desvio padrão ($m \pm dp$) da energia consumida (em Kcal) pela infusão endovenosa, ingestão oral e total, por grupo experimental.....	54
Tabela 9 - Resultados de migração espontânea e quimiotaxia em média (m), desvio-padrão (dp), mediana (med), valor mínimo (min), valor máximo (max) e ANOVA com pós-teste de Tukey (valor de p) dos diferentes grupos experimentais	56
Tabela 10 – Macrófagos fagocitantes do fígado, pulmão e baço em média (m), desvio padrão (dp), mediana (med), valor mínimo (min), máximo (max) e análise estatística (valor de p) dos diferentes grupos experimentais.....	60
Tabela 11 - Peso (g) e alteração corpórea (g e porcentagem). Média de cada animal, seguido por média e desvio padrão do grupo.....	83

- Tabela 12** - Infusão endovenosa, porcentagem de adequação da infusão, ingestão dieta oral e água. Média de cada animal, seguido por média e desvio padrão do grupo..... 85
- Tabela 13** - Ingestão energética proveniente da infusão endovenosa, dieta oral e energia total (em Kcal). Média de cada animal, seguido por média e desvio padrão do grupo..... 87
- Tabela 14** - Média (m) e desvio padrão (dp) de 10 leituras de cada membrana (duas por rato) para os valores de migração estimulada (quimiotaxia) e espontânea de cada animal e média e desvio padrão de cada grupo..... 89
- Tabela 15** - Média e desvio padrão de cinco leituras de cada órgão, (fígado, pulmão e baço) para quantificação do número de macrófagos fagocitantes de cada animal seguido por média e desvio padrão de cada grupo 92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo da seqüência de procedimentos realizados na presente pesquisa	14
Figura 2 - Cateterização do sistema venoso central	19
Figura 3 - Aspecto final do animal após cateterização venosa e conexão à bomba de infusão.....	21
Figura 4 - Animal recebendo infusão endovenosa	21
Figura 5 - Injeção do carvão coloidal pela veia caudal.....	30
Figura 6 - As fotos abaixo mostram o fígado em seus aspectos macroscópicos sem carvão coloidal (A), com carvão coloidal (B) e sua visualização microscópica, em aumento de 400x (C).....	32
Figura 7 - As fotos abaixo mostram o pulmão em seus aspectos macroscópicos sem carvão coloidal (A), com carvão coloidal (B) e sua visualização microscópica, em aumento de 400x (C).....	33
Figura 8 - As fotos abaixo mostram o baço em seus aspectos macroscópicos sem carvão coloidal (A), com carvão coloidal (B) e sua visualização microscópica, em aumento de 400x (C).....	34
Figura 9 - Etapas do ensaio de quimiotaxia	39
Figura 10 - Visualização dos campos de leitura para quimiotaxia.....	40
Figura 11 - Análise de imagens de lâminas marcadas com anticorpo CD 68, clone ED-1 para quantificação de macrófagos nos tecidos	46

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Caracterização gráfica da porcentagem de variação do peso corpóreo (final – inicial) para todos os grupos experimentais e resultados da análise estatística 50
- Gráfico 2** - Caracterização gráfica da migração espontânea para todos os grupos experimentais e resultados da análise estatística 57
- Gráfico 3** - Caracterização gráfica da quimiotaxia para todos os grupos experimentais e resultados da análise estatística 57
- Gráfico 4** - Caracterização gráfica da fagocitose por macrófagos residentes no fígado (A), pulmão (B) e baço (C) expressa por número de macrófagos por campo de microscopia óptica para todos os grupos experimentais e resultados da análise estatística 61

RESUMO

De Nardi Campos, L. *Efeito de emulsão lipídica parenteral composta por mistura de triglicérides de cadeia média e óleos de soja, oliva e peixe sobre a migração e fagocitose de leucócitos de ratos*. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 108p.

INTRODUÇÃO: Emulsões lipídicas parenterais (EL) contendo óleo de peixe podem modular favoravelmente a resposta inflamatória e manter ou promover a resposta imunológica, mas há dados insuficientes sobre seu impacto em funções de células da imunidade inata. **OBJETIVO:** Verificar o efeito da administração endovenosa de EL composta por mistura de triglicérides de cadeia média e óleos de soja, oliva e peixe sobre a migração e fagocitose de leucócitos de ratos, em comparação à EL composta por mistura física de triglicérides de cadeia média e cadeia longa - TCM/TCL, suplementada ou não com óleo de peixe (OP). **MÉTODOS:** Ratos (*Lewis*) isogênicos (n=40) foram submetidos à cateterização da veia jugular externa para acesso parenteral. Os animais foram randomizados em quatro grupos, de acordo com sua infusão endovenosa: grupo SMOF: EL contendo 30% de óleo de soja (TCL), 30% de TCM, 25% de óleo de oliva e 15% de OP; grupo TCM/TCL: EL contendo TCM e TCL (1:1 v/v); grupo TCM/TCL/OP: EL composta por TCM/TCL com adição de OP (8:2 v/v); grupo SF: solução fisiológica. Um grupo de animais sem cateterismo venoso também foi desenvolvido (CO-NC). No quinto dia de experimento e após injeção de carvão coloidal pela veia caudal, amostras de sangue e tecido (fígado, pulmão e baço) foram coletadas para análise quimiotática de neutrófilos (câmara de Boyden adaptada) e quantificação do número de macrófagos fagocitantes do carvão coloidal (imunohistoquímica). Os dados foram analisados por ANOVA e pós-teste de Tukey. **RESULTADOS:** SMOF não alterou a quimiotaxia e fagocitose nos leucócitos estudados. TCM/TCL e TCM/TCL/OP aumentaram o número de macrófagos fagocitantes do fígado e pulmão e somente TCM/TCL/OP apresentou aumento no número de macrófagos fagocitantes no baço (p<0,05). **CONCLUSÕES:** 1) Emulsões lipídicas, independente de sua composição, não influenciaram a quimiotaxia

de neutrófilos; 2) Emulsão lipídica composta por mistura de triglicérides de cadeia média e óleos de soja, oliva e peixe apresentou efeito neutro sobre a quimiotaxia, migração espontânea de neutrófilos e recrutamento de monócitos no fígado, pulmão e baço; 3) Emulsão lipídica de mistura física de triglicérides de cadeia média e cadeia longa estimulou o recrutamento de monócitos, com aumento do número de macrófagos fagocitantes no fígado e pulmão; 4) Emulsão lipídica de mistura física de triglicérides de cadeia média e cadeia longa enriquecida com emulsão lipídica de óleo de peixe, estimulou o recrutamento de monócitos, com aumento do número de macrófagos fagocitantes no fígado, pulmão e baço.

Descritores: emulsões gordurosas intravenosas/uso terapêutico, óleos de peixe, nutrição parenteral, triglicerídeos, quimiotaxia, fagocitose, macrófagos.

Summary

De Nardi Campos, L. *Effect of parenteral lipid emulsion containing mixture of medium-chain triglycerides and soybean, olive and fish oils on leukocytes migration and phagocytosis in rats*. [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 108p.

RATIONALE: Parenteral lipid emulsions (LE) with fish oil could modulate inflammatory response and promote or maintain immunologic response, but there are insufficient data about the impact on innate immunity cells functions. **AIM:** To evaluate the effects of endovenous infusion of LE containing mixture of medium-chain triglycerides and soybean, olive and fish oils on leukocytes migration and phagocytosis in rats, compared to a physical mixture of medium and long-chain triglycerides - MCT/LCT LE supplemented or not with fish oil (FO). **METHOD:** Isogenic *Lewis* rats (n=40) were submitted to jugular vein catheterization for parenteral access. The animals were randomized in four groups, according to their infusion: group SMOF: LE containing 30% of soybean oil (LCT), 30% MCT, 25% olive oil and 15% fish oil; group MCT/LCT: LE containing MCT and LCT (1:1 v/v); group MCT/LCT/FO: MCT/LCT LE enriched with fish oil based LE (8:2 v/v); group SS: saline. A non-surgical control (CO-NS) was also performed. In the 5th experimental day and after colloidal carbon injection in tail vein, blood and tissue (liver, lung and spleen) samples were collected for chemotaxis assay (adapted Boyden chamber) and colloidal carbon phagocytosing-macrophages quantification (immunohistochemistry). ANOVA and Tukey post test were performed. **RESULTS:** SMOF LE didn't influence leukocytes chemotaxis and phagocytosis. MCT/LCT and MCT/LCT/FO LE increased liver and lung resident phagocytosing-macrophages number ($p<0.05$) and only in MCT/LCT/FO group, spleen resident phagocytosing-macrophages number was increased ($p<0.05$). **CONCLUSION:** 1) Lipid emulsion, independently of composition, has no influence on neutrophils chemotaxis; 2) Lipid emulsion with a mixture of medium-chain triglycerides, soybean, olive and fish oils has neutral effect on neutrophil chemotaxis, random migration and monocyte

recruitment to the liver, lung and spleen; 3) Lipid emulsion with a physical mixture of medium and long-chain triglycerides has stimulatory effect on monocyte recruitment, with increase of phagocytosing-macrophages number in liver and lung; 4) Lipid emulsion with a physical mixture of medium and long-chain triglycerides supplemented with fish oil, has stimulatory effect on monocyte recruitment, with increase of phagocytosing-macrophages number in liver, lung and spleen.

Descriptors: Intravenous fat emulsions/therapeutic use, fish oils, parenteral nutrition, triglycerides, chemotaxis, phagocytosis, macrophages.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Em terapia nutricional parenteral, ácidos graxos (AG) são fornecidos através de emulsões lipídicas parenterais (EL), que se diferenciam quanto à quantidade, tipo e fonte de AG. Além de constituírem fonte energética de alta densidade (cerca de 9,0 Kcal/g), atualmente se reconhece que AG, fornecidos através de EL, podem influenciar de maneira distinta o sistema imune e inflamatório, de acordo com suas características físico-químicas (Wanten e Calder, 2007).

EL podem conter em sua composição triglicérides de cadeia longa tipo ômega-3, 6 e 9 e triglicérides de cadeia média. Notadamente AG ômega-3 (ω -3) e ômega-6 (ω -6) podem influenciar a resposta imune e inflamatória por diferentes vias. Uma delas é através de sua incorporação na porção fosfolipídica da membrana de leucócitos, alterando assim sua fluidez, estrutura e a função. Outra via corresponde à capacidade dos AG ω -3 e ω -6 participarem diretamente da resposta imune e inflamatória através da produção de mediadores lipídicos inflamatórios, chamados eicosanóides (Waitzberg et al, 2006).

Diferentes combinações e proporções de EL influenciam funções de células brancas em estudos experimentais (*in vitro* e *in vivo*) e clínicos: como fagocitose (Lin et al, 2006; Garnacho-Montero et al, 2002; Wanten et al, 2001; Cukier et al, 1999; Hinton et al, 1998; Waitzberg et al, 1997), quimiotaxia (Buenestado et al, 2006; Wanten et al, 2000; Waitzberg et al, 1996; Bellinati-Pires et al, 1992), produção de citocinas (Buenestado et al,

2006; Yeh et al, 2000; Hinton et al, 1998), proliferação de linfócitos (Lanza-Jacoby et al, 2001; Moussa et al, 2000) e expressão de moléculas de adesão (Lin et al, 2006; Nohé et al, 2002).

1.1 Impacto das emulsões lipídicas sobre o sistema imune

As primeiras EL parenterais utilizadas na prática clínica, ainda muito utilizadas atualmente, foram obtidas a partir do óleo de soja, rico em triglicérides de cadeia longa ômega-6 (TCL ω -6).

Em estudos experimentais e clínicos, TCL ω -6 foram associados à deficiência de funções de linfócitos, neutrófilos e macrófagos (Waitzberg et al, 1996; Jensen et al, 1990; Sedman et al, 1990; Hamawy et al, 1985; Sobrado et al, 1985; Nordenstrom et al, 1979). TCL ω -6 podem ainda aumentar a intensidade da resposta inflamatória em determinadas condições clínicas (Wanten e Calder, 2007).

As alterações descritas parecem não prejudicar a evolução de pacientes estáveis recebendo EL parenterais ricas em TCL ω -6, entretanto, podem vir a agravar a condição clínica de pacientes com risco de infecção ou sepse (Sala-Vila et al, 2007). Dessa maneira, apesar de alguns estudos não demonstrarem efeitos prejudiciais do uso de TCL ω -6 no sistema imune (Lenssen et al, 1998; Sedman et al, 1991; Gogos et al, 1990; Dionigi et al, 1985), atualmente busca-se evitar o uso de EL rica em TCL ω -6 em pacientes imuno-comprometidos ou em risco de imunossupressão (Campos et al, 2002).

Recente meta-análise comparou os resultados do efeito de diferentes EL sobre variáveis imunológicas obtidas em estudos clínicos randomizados

e não encontrou efeito benéfico ou deletério associado à nenhuma EL, inclusive EL rica em TCL ω -6 (Wirtitsch et al, 2007). No entanto, os autores apontam como fator limitante a grande heterogenicidade dos estudos selecionados quanto à população analisada, tipo e duração da intervenção com EL e das variáveis imunológicas analisadas. Uma análise cuidadosa revela ainda que muitos estudos, apesar de bem conduzidos, foram excluídos da meta-análise por avaliarem variáveis distintas, sem outros estudos para comparação. Desta maneira, poucas variáveis imunológicas foram englobadas nesta meta-análise, dentre as quais proteína C reativa, interleucina-6, leucotrieno B4, proliferação de linfócitos, células CD 4+, CD 8+ e “natural killer” (Wirtitsch et al, 2007).

Apesar desta meta-análise concluir que “não há evidências de que EL tenham efeito sobre funções imunes”, a escassez de variáveis que medem funções imunológicas nela analisadas, limita significativamente o valor de sua conclusão e não elimina o questionamento sobre se o excesso de TCL ω -6 poderia potencializar a resposta inflamatória e suprimir a imunológica.

Esta antiga inquietude motivou o desenvolvimento de EL alternativas para nutrição parenteral durante as últimas décadas (Sala-Vila et al, 2007).

Uma alternativa criada para diminuir a oferta de TCL ω -6 foi o desenvolvimento de EL com substituição parcial de óleo de soja pela adição de 50% de triglicérides de cadeia média (EL TCM/TCL). A diluição do óleo de soja com TCM pode ser por mistura física ou de forma estruturada, através da constituição de quilomícrons artificiais contendo tanto TCL ω -6 com TCM na sua estrutura. O TCM oferece a vantagem de ser rapidamente

degradado pela lipoproteína lipase (LPL), fornecendo energia de maneira rápida, o que auxilia também na liberação dos AG essenciais para serem incorporados às membranas fosfolipídicas das células (Carpentier e Hacquebard, 2006).

EL TCM/TCL em mistura física demonstrou ser segura e bem tolerada em terapia nutricional parenteral, no entanto, em estudos *in vitro*, seu efeito sobre funções imunes ainda é controverso (Wanten et al, 2000; Bellinati-Pires et al, 1993; Bellinati-Pires et al, 1992).

Outra alternativa clínica para a diminuição da oferta de TCL ω -6, é a EL baseada em óleo de oliva, rica em AG monoinsaturado tipo ômega-9 (ω -9). Em semelhança a TCM, AG ω -9 não participam da síntese de eicosanóides e diversos estudos apontam efeito neutro de EL de óleo de oliva sobre o sistema imune (Buenestado et al, 2006; Reimund et al, 2004; Wanten et al, 2004; Granato et al, 2000).

Com avanço da imunonutrição parenteral, cujo objetivo é modular favoravelmente o sistema imunológico e atenuar a inflamação, surgiram EL com óleo de peixe (OP), rico em AG poliinsaturado ω -3, especialmente eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), associados a diversas propriedades biológicas.

Enquanto os efeitos antiinflamatórios do ω -3 estão bem estabelecidos na literatura, ainda há poucos dados sobre o impacto destes AG sobre funções imunológicas.

A incorporação de ω -3 nas membranas de células do sistema imune pode influenciar sua fluidez, estrutura e função de diversos receptores,

transportadores, enzimas e canais iônicos a ela associados (Calder e Grimble, 2002). Estas alterações podem, indiretamente, modular funções de leucócitos.

Como exemplo, verificou-se que infusão endovenosa de OP por dois dias em pacientes sépticos foi capaz de modificar a membrana de células mononucleares, com maior concentração de AG ω -3, e diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias em monócitos após estimulação com endotoxina (Mayer et al, 2003).

Em pacientes cirúrgicos, a infusão de OP associada à EL TCM/TCL, durante cinco dias no pós-operatório foi capaz de aumentar a concentração de EPA e DHA na membrana de eritrócitos e fosfolípides séricos (Senkal et al, 2007) e alterar a produção de eicosanóides, com diminuição de leucotrienos pró-inflamatórios – LTB₄ e aumento de leucotrienos com menor potencial inflamatório – LTB₅ (Wachtler et al, 1997; Morlion et al, 1996).

Além disso, infusão parenteral de OP foi associada à menor tempo de internação hospitalar em pacientes de Unidade de Terapia Intensiva (UTI), apesar de não diminuir a gravidade de complicações no pós-operatório (Weiss et al, 2002).

Por outro lado, os resultados da literatura não são totalmente concordes, pois estudo em pacientes cirúrgicos submetidos a ressecção intestinal por câncer, não encontrou efeito imunossupressor do AG ω -3, mas sim, um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral e interferon gama (Schauder et al, 2002).

De maneira geral, prefere-se infundir OP parenteral como suplementação, associado à outra EL, de forma a se obter uma razão ω -6/ ω -3 entre 4:1 e 2:1, para que os efeitos imunomoduladores sejam observados (Mayer et al, 2006).

Recentemente, uma nova EL que alia os conceitos anteriores, de redução de TCL ω -6, através da adição de TCM e óleo de oliva e que adiciona AG ω -3 (por OP) em sua composição tornou-se disponível no Brasil e Europa. Esta nova EL, denominada SMOF, é composta por mistura de óleo de soja (30%), TCM (30%), óleo de oliva (25%) e óleo de peixe (15%) e se caracteriza por conter razão ω -3/ ω -6 (1:2, 5), considerada ideal para que os efeitos imunomoduladores do óleo de peixe sejam observados.

Até o presente momento, as observações disponíveis sobre SMOF se concentraram em estudar sua segurança, tolerância e eficácia de seu uso em voluntários saudáveis (Schlotzer e Kanning, 2004), pacientes de UTI (Antébi et al, 2004) e pacientes cirúrgicos (Mertes et al, 2006) e somente um estudo verificou seu impacto sobre a produção de eicosanóides (Grimm et al, 2006). Nestes estudos, SMOF mostrou-se seguro, bem tolerado para uso clínico e com potencial de favorecer a razão de leucotrienos anti e pró-inflamatórios.

Ainda são escasso os estudos experimentais e clínicos avaliando o impacto desta EL sobre funções imunes, o que motivou o desenvolvimento do presente trabalho.

Vale ressaltar ainda, que a literatura disponível compara SMOF com EL rica em óleo de soja (TCL ω -6), descrita na literatura com potencial

imunossupressor e não com novos modelos de EL como TCM/TCL, EL rica em óleo de oliva ou mesmo de suplementação com EL de óleo de peixe. Estes fatos, aliados a observação de TCM/TCL constituir a forma de fornecimento de EL parenterais mais freqüente em terapia intensiva em nosso meio (Pontes-Arruda et al, 2007), foram considerados no desenvolvimento do presente estudo e no planejamento dos grupos experimentais.

1.2 Racional

Ácidos graxos integrantes de emulsões lipídicas parenterais (EL) estimulam ou inibem certas funções imunológicas, na dependência de suas características físico-químicas. Assim, a compreensão do impacto de diferentes EL sobre funções leucocitárias pode contribuir para o processo de seleção da melhor EL a ser prescrita, de acordo com o estado mórbido do paciente. Por exemplo, cerca de 25% dos pacientes com nutrição parenteral em UTI brasileiras são imunossuprimidos (Pontes-Arruda et al, 2007), o que deveria orientar estudos nesta área a fim de se definir a escolha da EL mais adequada para esta condição, com efeito imunologicamente neutro ou imunoestimulantes.

Os macrófagos fazem parte do Sistema Mononuclear Fagocitário (ou Sistema Reticuloendotelial) e, juntamente com os leucócitos polimorfonucleares (PMN), participam da primeira linha de defesa do organismo contra infecções. Os macrófagos deste sistema podem ser encontrados no fígado, pulmão e baço, e possuem características peculiares entre si, resultantes de sua adaptação para proteção específica do órgão em

que reside (Abbas et al, 2000). Basicamente, estas células são responsáveis pela fagocitose, apresentação de antígeno e liberação de citocinas. Por sua vez, os PMN são principalmente representados pelos neutrófilos, indispensáveis para defesa do organismo contra infecções bacterianas. A migração direta de neutrófilos em direção ao estímulo quimiotático capacita estas células à rapidamente localizarem o local de infecção e destruir os patógenos invasores (Niggli, 2003).

O Grupo METANUTRI, do LIM 35 desenvolve há 17 anos pesquisas sobre o efeito de diferentes EL parenterais em funções imunológicas. Estudo prévio de nosso laboratório apresentou resultado favorável da infusão de EL parenteral de óleo de peixe em forma de suplemento sobre funções fagocíticas em ratos (Cukier et al, 1999). Nova EL comercialmente disponível, composta por mistura de triglicérides de cadeia média e óleos de soja, oliva e peixe (SMOF), pode ser uma boa alternativa para substituir as EL de gerações anteriores. Neste sentido, o presente estudo pretende, de forma pioneira, avaliar experimentalmente a influência de EL SMOF, sobre a migração e fagocitose de leucócitos e compará-la com a EL mais utilizada na prática clínica brasileira em terapia intensiva - TCM/TCL (Pontes-Arruda et al, 2007), suplementada ou não com EL a base de óleo de peixe.

Objetivo

2 OBJETIVO

Verificar o efeito da administração endovenosa de emulsão lipídica parenteral composta por mistura de triglicérides de cadeia média e óleos de soja, oliva e peixe sobre a migração de neutrófilos e fagocitose de macrófagos residentes de ratos, em relação à emulsão lipídica TCM/TCL suplementada ou não com óleo de peixe.

Métodos

3 MÉTODOS

3.1 Local de execução das atividades

As atividades experimentais do presente trabalho foram desenvolvidas pelo Grupo de Metabologia e Nutrição em Cirurgia (METANUTRI) do Laboratório de Fisiologia e Distúrbios Esfincterianos (LIM 35) da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), em parceria com a Seção de Sorologia - Divisão de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório de Imunohistoquímica - Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) e Consultoria em Patologia.

3.2 Planejamento do experimento

Ratos *Lewis* isogênicos foram submetidos a cateterização do sistema venoso central para infusão endovenosa por quatro dias. Todos os animais, exceto o grupo controle não cirúrgico, receberam infusão endovenosa de diferentes emulsões lipídicas parenterais (EL) ou soro fisiológico, dieta via oral (sem gordura ou padrão) e água *ad libitum*.

No quinto dia de experimento, os animais foram sacrificados para retirada de amostras de sangue para análise de atividade quimiotática e de tecido do baço, pulmão e fígado para análise da atividade fagocítica dos macrófagos residentes.

A figura 1 ilustra o planejamento do experimento desde a fase de adaptação até o sacrifício.

Figura 1 - Esquema ilustrativo da seqüência de procedimentos realizados na presente pesquisa

3.3 Tamanho da amostra

Considerou-se para o cálculo de tamanho da amostra a dispersão média obtida através do coeficiente de variação igual ou inferior a 38% e a diferença entre a média esperada entre o efeito mínimo e máximo, no valor de 32%. Considerando risco $\alpha \leq 5\%$ e risco $\beta \leq 20\%$, o tamanho da amostra foi de oito (08) animais para cada grupo estudado.

3.4 Animais

Foram utilizados 40 ratos isogênicos, da cepa *Lewis*, machos, adultos, com peso entre 220 e 280 gramas, provenientes do Biotério do Centro

Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Cinco dias antes dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais à temperatura controlada (entre 20 e 25°C) sob ciclos diurnos de luz, livre acesso à água e ração (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S.A., Paraná, Brasil) na forma de “pellets”, para adaptação ao ambiente de pesquisa.

3.5 Grupos experimentais

Para compor os cinco grupos experimentais, 40 ratos foram distribuídos de forma aleatória. Os animais que foram submetidos a cateterização do sistema venoso central, receberam infusão endovenosa e dieta por via oral, além de água *ad libitum*. Um grupo de animais não sofreu cateterização, para controle da variável estresse (CO-NC), e recebeu somente dieta via oral e água. A todos os animais foi oferecida dieta de maneira a compensar as calorias administradas como lípidos na infusão de emulsão lipídica. Os grupos experimentais do presente estudo encontram-se resumidos no tabela 1.

Tabela 1 - Denominação dos grupos de acordo com o tratamento nutricional (oral e parenteral)

Grupos	Infusão endovenosa	Composição da EL	Dieta oral
CO-NC	-	-	AIN-93M
SF	Soro fisiológico 0,9%	-	AIN-93M
TCM/TCL	Lipovenos [®] MCT 20%	50% TCM e 50% TCL	DIL
TCM/TCL/OP	Lipovenos [®] MCT 20% e Omegaven [®] 10%	40% TCM, 40% TCL e 20% OP	DIL
SMOF	SMOFlipid [®] 20%	30% TCM, 30% TCL, 25% OO e 15% OP	DIL

Legenda:

CO – NC = controle não cirúrgico

SF = solução fisiológica (controle cirúrgico)

TCM = triglicérides de cadeia média

TCL = triglicérides de cadeia longa

OP = óleo de peixe

OO = óleo de oliva

Lipovenos[®] MCT 20%, Omegaven[®] 10% e SMOFlipid[®] 20% são provenientes de Fresenius-Kabi[®] Bad – Homburg, Alemanha.

AIN-93M = Dieta oral padrão (fabricado no Brasil por Rhooster, São Paulo, Brasil)

DIL = Dieta oral isenta de lipídeos (Rhooster, São Paulo, Brasil)

3.6 Procedimentos

3.6.1 Anestesia

Os animais foram pesados em balança digital (Marte Balanças[®]), com o auxílio de um recipiente apropriado de peso previamente conhecido. Utilizando-se seringas de 1,0 mL, realizou-se administração intraperitoneal do anestésico cloridrato de cetamina - 80 mg/Kg (Ketamin-S(+)[®] Cristália, Brasil), e do analgésico cloridrato de xilazina - 8,0 mg/Kg (Rompun 2%[®] - Bayer, Brasil), conforme indicação do fabricante (*General Reference Book for sedation and anaesthesia*, Bayer - 2004).

3.6.2 Cateterização do sistema venoso central

Após a sedação, o animal foi tricotomizado na região ventral do pescoço, supraclavicular direita e retroauricular da região dorsal do pescoço, utilizando-se álcool iodado a 2% para assepsia.

Os animais foram submetidos a cateterização da veia jugular direita externa, conforme técnica padronizada por Lima-Gonçalves et al (1990) e ilustrada na figura 2. Com o animal em decúbito dorsal horizontal, realizou-se incisão transversa de aproximadamente 1,0 cm na região supraclavicular direita. A seguir, o animal foi posicionado em decúbito ventral e com auxílio de uma agulha Intracath (Biotecno Produtos Plásticos e Médicos Ltda, São Paulo), a partir da borda distal da incisão, tunelizou-se o tecido subcutâneo em direção à região dorsal, com exteriorização a 1,0 cm da região retroauricular. Pelo interior do Intracath, foi passado cateter de silicone

(Ciencor[®] Brasil), de aproximadamente 1,0 mm de diâmetro e 70,0 mm de comprimento, o qual foi tracionado pelo túnel em direção a incisão ventral.

Foi fixada na região dorsal do animal uma peça intermediária representada por uma agulha anatomicamente adequada para ratos e soldada a uma pequena peça metálica que possui duas asas laterais do tipo “borboleta”. Estas laterais contêm dois orifícios paralelos em cada extremidade para fixação ao dorso do animal por meio de dois pontos separados, utilizando-se para isto, fio mononylon 3-0 estéril, agulhado e não absorvível (Shalon[®] suturas, Brasil), que atravessa a pele e tecido subcutâneo.

O animal foi em seguida colocado em decúbito dorsal, procedendo-se identificação, dissecação e reparo da veia jugular direita com fio de algodão torcido 4-0, estéril, pré-cortado, não absorvível e não agulhado (Polycot[®] - Ethicon, New Jersey, EUA). A veia jugular externa foi então ligada distalmente e cateterizada na sua porção proximal pelo tubo de silicone posicionado anteriormente, contendo solução fisiológica heparinizada. Em seguida, a incisão da pele foi suturada de forma contínua com fio mononylon 3-0 e desinfetada com álcool iodado 2%.

Figura 2 - Cateterização do sistema venoso central

A. Identificação e dissecação da veia jugular externa direita

B. Introdução do cateter de silicone no interior da veia

C. Fixação da extremidade externa do cateter

D. Cateterização finalizada

E. Peça metálica denominada “borboleta” e intermediário de infusão - swível

3.7 Infusão de emulsões lipídicas parenterais

Após a colocação do cateter venoso central, os animais foram levados à gaiola metabólica individual, conectando-se a “borboleta” a um intermediário de infusão, desenvolvido por pesquisadores de nossa equipe, que gira em torno de seu eixo permitindo a livre movimentação do animal, denominado *swivel* (Galizia et al, 2005). Ao *swivel* conectou-se um cateter de polietileno (de aproximadamente 120 mm), ligado a um equipo de infusão graduado (Equipo com bureta para Bomba Lifecare[®] Micro Soluset[®] 150 x 60mm dispositivo I.V. - Abbott Laboratórios do Brasil Ltda) contendo a emulsão lipídica parenteral (EL) ou solução fisiológica (SF). A oferta de EL ou SF foi realizada com auxílio de bomba de infusão peristáltica - LifeCare[®] Micro Soluset[®] (Abbott Laboratórios do Brasil Ltda). As figuras 3 e 4 mostram os animais no pós-cirúrgico imediato.

Todos os ratos permaneceram durante quatro dias sob infusão de SF ou EL conforme o grupo experimental. As composições das diferentes dietas encontram-se nas tabelas 2 e 3 e das emulsões lipídicas nas tabelas 4 e 5.

Figura 3 - Aspecto final do animal após cateterização venosa e conexão à bomba de infusão

Figura 4 - Animal recebendo infusão endovenosa

3.7.1 Grupo CO – NC

O grupo CO-NC foi desenhado para excluir a influência do estresse cirúrgico sobre a quimiotaxia e fagocitose. Os animais que fizeram parte desse grupo não sofreram procedimentos cirúrgicos, permanecendo durante o período do experimento em gaiolas metabólicas, com livre acesso à dieta oral padrão (tabela 2) e água.

3.7.2 Grupo SF

Os animais que compõem o grupo SF foram infundidos diariamente com 12 mL (0,5 mL/hora) de solução fisiológica por via parenteral, 18 g de dieta padrão por via oral (tabela 2) e livre acesso à água.

3.7.3 Grupo TCM/TCL

Os animais que compõem o grupo TCM/TCL receberam diariamente 12 mL (0,5 mL/hora) por via parenteral, EL Lipovenos[®] MCT 20% contendo 50% de óleo de coco (rico em TCM) e 50% de óleo de soja (rico em TCL), 18 g de dieta oral isenta de lipídeos (tabelas 3, 4 e 5) e livre acesso à água.

3.7.4 Grupo TCM/TCL/OP

Os animais que compõem o grupo TCM/TCL/OP receberam diariamente 12 mL (0,5 mL/hora) por via parenteral, uma mistura preparada (8:2; v/v) de EL Lipovenos[®] MCT 20% e EL Omegaven[®] 10% a base de óleo de peixe (OP), com preparação final de 40% de TCM, 40% de TCL e 20% de OP, 18 g de dieta oral isenta de lipídeos (tabelas 3, 4 e 5) e livre acesso à água.

3.7.5 Grupo SMOF

Os animais que compõem o grupo SMOF receberam diariamente 12mL (0,5 mL/hora) por via parenteral, EL SMOFlipid[®] 20% composta por 30% de óleo de soja (TCL), 30% de TCM, 25% de óleo de oliva (OO) e 15% de OP, 18 g de dieta oral isenta de lipídeos (tabelas 3, 4 e 5) e livre acesso à água.

Tabela 2 - Composição da dieta oral padrão (AIN-93M) formulada para ratos adultos. Concentração expressa em g/kg de dieta. Segundo Reeves et al, 1993

Componentes	Quantidades (g)
Carboidratos	
Amido de Milho	465,692
Amido de Milho Dextrinizado	155,00
Sacarose	100,00
Celulose Microfibras	50,00
Proteína e Aminoácidos	
Caseína	140,00
L-Cistina	1,80
Lipídios	
Óleo de Soja	40,00
Mistura de Sais	
Mix Salina AIN-93 M	35,00
Mistura de Vitaminas	
Mix Vitamínico AIN-93 M	10,00
Bitartarato de Colina	2,50
Butil hidroquinona terciária	0,008
Total de energia em 1000g	3809,97 Kcal
% Kcal de proteínas	15,00
% Kcal carboidratos	75,5
% Kcal de lipídios	9,5

Tabela 3 - Composição da dieta isenta de lipídeos (adaptada de AIN-93M) formulada para ratos adultos. Concentração expressa em g/kg de dieta. Adaptado de Reeves et al, 1993

Componentes	Quantidades (g)
Carboidratos	
Amido de Milho	505,692
Amido de Milho Dextrinizado	155,00
Sacarose	100,00
Celulose Microfibras	50,00
Proteína e Aminoácidos	
Caseína	140,00
L-Cistina	1,80
Mistura de Sais	
Mix Salina AIN-93 M	35,00
Mistura de Vitaminas	
Mix Vitamínico AIN-93 M	10,00
Bitartarato de Colina	2,50
Butil hidroquinona terciária	0,008
Total de energia em 1000g	3609,97 Kcal
% Kcal de proteínas	15,7
% Kcal carboidratos	84,3
% Kcal de lipídios	0,0

Tabela 4 - Composição completa das emulsões lipídicas parenterais comercialmente disponíveis

Composição	Lipovenos[®] MCT 20%	Omegaven[®] 10%	SMOFlipid[®] 20%
Energia (Kcal/ mL)	1,95	1,12	2,0
Óleo	200	100	200
Fosfatídeo de ovo	12	12	12
Glicerol	25	25	25
Tocoferol (Vitamina E)	0,1	0,2	0,2
Água	1000	1000	1000
Ácidos Graxos (g)			
Capróico (C6:0)	0,3	-	0,2
Caprílico (C8:0)	60,0	-	32,3
Cáprico (C10:0)	33,8	-	22,7
Láurico (C12:0)	0,4	-	0,3
Mirístico (C14:0)	0,1	4,7	1,9
Palmítico (C16:0)	13,0	10,6	18,2
Palmitoléico (C16:1)	0,3	8,6	3,3
Estearico (C18:0)	5,2	2,1	5,5
Oléico (C18:1 ω -9)	24,9	14,3	55,3
Linoléico (C18:2 ω -6)	52,4	3,3	37,2
Araquidônico (C20:4 ω -6)	-	2,6	1,0
Estearidônico (C18:4 ω -3)	-	3,8	0,9
α -linolênico (C18:3 ω -3)	7,5	1,2	4,7
Eicosapentaenóico (C20:5 ω -3)	-	20,6	4,7
Docosapentaenóico (C22:5 ω -3)	-	2,4	0,7
Docosahexaenóico (C22:6 ω -3)	-	15,8	4,4

Valores fornecidos pelo fabricante (Fresenius-Kabi[®] Bad – Homburg, Alemanha).

Tabela 5 - Composição estimada de ácidos graxos das emulsões lipídicas parenterais dos grupos da presente pesquisa

Grupo	TCM/TCL	TCM/TCL/OP*	SMOF
Emulsão lipídica	Lipovenos [®] MCT 20%	Lipovenos [®] MCT 20% e Omegaven [®] 10%	SMOFlipid [®] 20%
Ácidos graxos (g)			
Capróico (C6:0)	0,3	0,24	0,2
Caprílico (C8:0)	60,0	48,0	32,3
Cáprico (C10:0)	33,8	27,04	22,7
Láurico (C12:0)	0,4	0,32	0,3
Mirístico (C14:0)	0,1	1,02	1,9
Palmitico (C16:0)	13,0	12,52	18,2
Palmitoléico (C16:1)	0,3	1,96	3,3
Estearico (C18:0)	5,2	4,58	5,5
Oléico (C18:1 ω-9)	24,9	22,78	55,3
Linoléico (C18:2 ω-6)	52,4	42,58	37,2
Estearidônico (C18:4 ω-3)	-	0,76	0,9
Araquidônico (C20:4 ω-6)	-	0,52	1,0
α-linolênico (C18:3 ω-3)	7,5	6,24	4,7
Eicosapentaenóico (C20:5 ω-3)	-	4,12	4,7
Docosapentaenóico (C22:5 ω-3)	-	0,48	0,7
Docosahexaenóico (C22:6 ω-3)	-	3,16	4,4

*Ácidos graxos calculados com base na porcentagem de EL utilizada: 80% de Lipovenos[®] MCT 20% e 20 % de Omegaven[®] 10%.

3.8 Acompanhamento dos animais

O acompanhamento dos animais foi feito diariamente pelo mesmo examinador, ao longo de todo o experimento. Desde o primeiro dia foram observadas e registradas, em fichas individualizadas, medidas diárias de ingestão alimentar, infusão endovenosa, dejetos (urina e fezes) e de eventuais alterações do estado geral do animal. Diariamente, as gaiolas metabólicas foram substituídas por outras previamente higienizadas.

3.8.1 Variação percentual do peso corpóreo

A variação percentual de peso corpóreo foi calculada pela fórmula abaixo, e considerada positiva se ocorreu ganho de peso e negativa se houve perda.

$$\text{Variação peso} = \frac{\text{peso final} - \text{peso inicial}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

3.8.2 Infusão parenteral e ingestão alimentar

A quantidade de EL ou SF infundida para cada rato foi determinada diariamente pela bomba de infusão após 24 horas.

A ingestão alimentar de cada rato foi obtida diariamente pela diferença entre peso da dieta ofertada (em gramas) e peso da dieta restante (não ingerida) após 24 horas.

Foram calculadas as quantidades energéticas ingeridas, infundidas e totais (ambas).

3.8.3 Estado geral dos animais

As alterações clínicas dos animais foram anotadas e classificadas diariamente quanto ao seu estado geral em:

a) adequado: ausência de alterações clínicas significativas;

b) não adequado: presença de alterações clínicas gerais como edema corpóreo, piloereção, sangramento conjuntival, diminuição de atividade motora e outras que por ventura pudessem ocorrer. Os animais considerados inadequados foram excluídos do protocolo de estudo.

3.9 Marcação de macrófagos por carvão coloidal

3.9.1 Preparo do carvão coloidal

O carvão coloidal foi obtido pela dessecação de 50 mL de tinta nanquim (Staedler, Alemanha) em estufa a 100°C. Esta desidratação resultou em uma pasta constituída de carvão em aglomerados de partículas (20nm) e goma arábica. A goma arábica desta pasta confere a característica coloidal da preparação e às partículas de carbono, cor. Ao produto da dessecação foi acrescentada solução salina, na concentração 1:3 (Cukier et al, 1999).

3.9.2 Injeção de carvão coloidal

No 4º dia pós-cirúrgico, após sedação, os animais que compõem os diferentes grupos em estudo foram submetidos à injeção pela veia caudal de carvão coloidal (1,0 mL/Kg). A figura 5 ilustra procedimento. Após a injeção do carvão coloidal, os ratos continuaram com infusão endovenosa por um período de cinco horas. Após esse período os animais foram anestesiados e sacrificados.

Figura 5 - Injeção do carvão coloidal pela veia caudal

3.9.3 Visualização do carvão coloidal

Durante o sacrifício foi possível visualizar macroscopicamente a incorporação de carvão coloidal pelos diferentes órgãos analisados na presente pesquisa. As figuras 6, 7 e 8 mostram o aspecto macroscópico do fígado, pulmão e baço, respectivamente, na presença e ausência de carvão coloidal e visualização microscópica dos macrófagos hepáticos, alveolares e esplênicos.

Figura 6 - As fotos abaixo mostram o fígado em seus aspectos macroscópicos sem carvão coloidal (A), com carvão coloidal (B) e sua visualização microscópica, em aumento de 400x (C)

A

B

C

Figura 7 - As fotos abaixo mostram o pulmão em seus aspectos macroscópicos sem carvão coloidal (A), com carvão coloidal (B) e sua visualização microscópica, em aumento de 400x (C)

A

B

C

Figura 8 - As fotos abaixo mostram o baço em seus aspectos macroscópicos sem carvão coloidal (A), com carvão coloidal (B) e sua visualização microscópica, em aumento de 400x (C)

A

B

C

3.10 Sacrifício

No quinto dia de experimento (4º P.O.), após o período de cinco horas pós-injeção do carvão coloidal, os animais foram anestesiados (conforme descrito anteriormente) e sacrificados para coleta de amostra de sangue (5,0mL), através de punção cardíaca.

Em seguida, realizou-se laparotomia mediana para inspeção da cavidade abdominal e com auxílio de pinça e tesoura de microcirurgia, amostras teciduais de fígado, pulmão e baço foram colhidas e imediatamente acondicionadas em solução de formol tamponado a 10%, onde permaneceram por até 24 horas antes do início dos procedimentos histopatológicos.

3.11 Ensaio de migração

Para avaliação da migração leucocitária, realizou-se ensaio de migração quimiotática segundo método de Boyden (1962) adaptado para placas com múltiplas câmaras de duplos compartimentos, conforme anteriormente utilizado em estudos deste laboratório (Bellinati-Pires et al, 1992; Waitzberg, 1990). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Para obtenção de células polimorfonucleares, amostra de sangue (cerca de 5,0 mL) coletada por punção cardíaca, foi colocada em tubo heparinizado (BD Vacutainer, Brasil) misturada com 1,0 mL de solução Dextran T-500 (Pharmacia Fine Chemicals, Suécia) para separação dos leucócitos, e incubada em estufa a 37°C, por 45 minutos. Após separação dos eritrócitos, o plasma rico em leucócitos foi cuidadosamente retirado e centrifugado por duas vezes (1000 rpm durante 10 minutos) com 10 mL de solução balanceada de sais de Hanks (HBSS - Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA). O botão celular foi re-suspendido em 1,0 mL de meio TC 199/HEPES (Sigma Chemical Company, St. Louis EUA) e alíquota de 20 µL foi retirada, colocada em tubo de vidro contendo 380 µL de ácido acético (lise de hemácias) para realização da contagem das células com auxílio de Câmara de Neubauer. Após contagem, a concentração de leucócitos foi ajustada para 4×10^6 células/mL com adição de meio TC 199/HEPES.

Como fator quimiotático utilizou-se o C5a (componente do sistema complemento) obtido de um “pool” de soro fresco de rato, incubado a 10% em meio TC199/HEPES com 75 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) de

Escherichia coli 0111: B4 (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA), por 30 minutos a 37°C, em banho-maria.

Nos compartimentos inferiores da câmara de ensaio quimiotático, foram colocados 300 µL do meio preparado, contendo fator quimiotático (migração estimulada), ou apenas o meio TC199/HEPES para migração espontânea. Membranas em éster de celulose, com 13 mm de diâmetro, 150µm de espessura e poros de 3µm (Ref. SSWP01300, Millipore, Brasil), foram utilizadas para separar os compartimentos superiores dos inferiores.

As suspensões de leucócitos (4×10^6 células/mL em meio TC199/HEPES) foram colocadas nos compartimentos superiores, em volumes de 400 µL.

Após incubação das câmaras por 60 minutos em estufa a 37°C com 5% de gás carbônico (NuAire Inc., EUA), as membranas foram removidas da placa e seguiu-se procedimento para preparação da lâmina:

- 1) Fixação em etanol absoluto por 5 minutos
- 2) Lavagem em água destilada por 2 minutos
- 3) Coloração com Hematoxilina de Harris por 30 segundos
- 4) Fixação da coloração em água destilada por 2 minutos
- 5) Fixação da coloração em solução saturada de carbonato de lítio por 10 minutos
- 6) Desidratação progressiva em etanol:
 - etanol 70% por 10 minutos
 - etanol 95% por 10 minutos

- etanol butanol (álcool etílico absoluto + álcool butílico 1:1 v/v) por 10 minutos

7) Diafanização em xilol absoluto (Merck S.A., Brasil) por 10 minutos

8) Fixação das membranas entre lâmina e lamínula de vidro com auxílio de bálsamo do Canadá (Synth, Ref. B1001.08.BG, Brasil)

A figura 9 ilustra todo o procedimento do ensaio de quimiotaxia.

Para a realização da leitura, utilizou-se objetiva para aumento de 400 vezes em microscópio comum (Carl Zeiss Vision Inc., Alemanha) e o ajuste fino de micrômetro.

Pela variação observada no micrômetro, foi medida a distância percorrida pelos neutrófilos no interior da membrana de celulose, entre a camada superior da mesma (onde as células foram depositadas) e o último campo onde se visualizou pelo menos três células. A figura 10 ilustra exemplo de três diferentes campos conforme avanço no interior da membrana pelo micrômetro. O resultado, expresso em micra, foi dado pela média de 10 leituras realizadas para cada membrana.

Figura 9 - Etapas do ensaio de quimiotaxia **A.** Tubo com células do sangue já separadas **B.1** **B.2** **B.3**

B. Procedimento de montagem da placa para ensaio de quimiotaxia: B.1 – fator quimiotático e meio nas câmaras inferiores; B.2 – membranas de éster de celulose foram colocadas sob cada câmara e B.3 – colocação do compartimento superior e sob ela, as suspensões de leucócitos

C. Câmara pronta em estufa de CO₂ com temperatura controlada

D. Após período de incubação, as membranas retiradas, fixadas em etanol, coradas em Hematoxilina de Harris, desidratadas, diafanizadas e colocadas em lâminas para leitura ao microscópio

Figura 10 - Visualização dos campos de leitura para quimiotaxia

A. Primeiro campo: camada superior dos leucócitos e início da contagem da distância percorrida pelo interior da membrana

B. Campo intermediário: visualização durante a leitura, onde se podem observar muitas células

C. Último campo: pode ser observada célula deformada devido à migração (exemplos com setas). Após este campo não se observam mais células, então este foi considerado como campo final para verificação da distância percorrida no micrômetro

3.12 Análise da fagocitose

Para identificação dos macrófagos residentes totais e fagocitantes do carvão coloidal, utilizamos técnica de imunohistoquímica, descrita por Santos et al (1999), que passamos a descrever a seguir com o anticorpo específico utilizado na presente pesquisa.

Para montagem dos blocos histológicos em parafina, as amostras (fígado, pulmão e baço) coletadas durante o sacrifício e acondicionadas em formol tamponado, foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70% até absoluto), passadas em xilol (Merck S.A., Brasil), mergulhadas em parafina líquida por duas vezes e finalmente colocadas em moldes para inclusão.

Os blocos de parafina contendo os tecidos da presente pesquisa foram refrigerados em freezer a -20°C para corte (3µm) em micrótomo rotativo (Microm HM 325) com navalhas descartáveis (Tissue-Tek Feather 4980 – Sakura, A35 low profile microtome blades). As fitas de parafina obtidas pela microtomia foram postas cuidadosamente em banho com água morna (56°C), coladas nas lâminas previamente silanizadas e então armazenadas em estufa a 60°C por 6-12 horas para melhor aderência do corte histológico.

As lâminas utilizadas na reação de imunohistoquímica, foram silanizadas, através de banhos de imersão em acetona pura (Merck, Alemanha) e organosilano - APTS (3-aminopropil-trietoxisilano, Sigma A-3648) a 4% (v:v) diluído em acetona pura, secagem em estufa a 100°C e resfriamento à temperatura ambiente.

As lâminas prontas contendo os cortes histológicos passaram pelo processo de desparafinização antes da reação imunohistoquímica para retirada do excesso de parafina da lâmina, através da passagem em xilol e álcoois gradualmente hidratados.

3.12.1 Recuperação antigênica

Para evitar ligações cruzadas das moléculas de anticorpos com seu antígeno específico, procedeu-se o método de recuperação antigênica onde as amostras dos tecidos das lâminas foram desnaturadas por calor úmido (vaporizador Steamer Black & Decker, China) a cerca de 97°C com tampão citrato (0,01M / pH 6,0) durante 60 minutos. Ao término do tempo de recuperação, as lâminas permaneceram na solução por mais 20 minutos à temperatura ambiente.

3.12.2 Imunohistoquímica

Após os procedimentos de preparo dos cortes histológicos, desparafinização e recuperação antigênica, as amostras foram submetidas aos procedimentos de imunohistoquímica propriamente ditos. Os tecidos foram lavados em água destilada, solução salina tamponada com fosfato (tampão PBS - 0,01M; pH 7,4) peróxido de hidrogênio (H₂O₂ a 3%) para bloqueio da peroxidase endógena, novamente PBS e então marcados com o anticorpo primário.

O anticorpo monoclonal anti-macrófago, CD 68 clone ED-1, anti-rato (MAB 1435 - Chemicon, EUA) foi diluído a 1:200 em solução de soroalbumina bovina -BSA (Sigma Chemical Company, EUA) a 1% em PBS.

O BSA tem como objetivo evitar reações espúrias “background” através do bloqueio de possíveis ligações inespecíficas entre outras proteínas presentes na solução de anticorpos e do tecido em estudo.

O anticorpo diluído foi aplicado aos cortes histológicos e levado à incubação em câmara úmida, em ambiente refrigerado (cerca de 4°C) durante o período noturno, “overnight”. Após este procedimento, foram realizadas lavagens em PBS com Tween (Dako tween, Glostrup, Dinamarca). Em seguida, seguiu-se uma nova etapa de incubação com o anticorpo secundário anti-mouse (BA 200 – Vector Laboratories, EUA) diluído a 1:320 em BSA (60 minutos a temperatura ambiente).

Após o período de incubação para reação do marcador secundário, as amostras foram lavadas em banhos de PBS e novamente incubadas durante 45 minutos com complexo ABC (Avidina-Biotina Peroxidase conjugado, “ABC Elite” - PK 6100 – Vector Laboratories, EUA).

Terminado o período de incubação, as lâminas foram novamente lavadas em PBS com Tween e, sobre elas, aplicada a solução reveladora - diaminobenzidine - DAB, trisma para DAB (Sigma Chemical Company, EUA) e 0,2% de peróxido de hidrogênio. Após esta reação, as lâminas foram lavadas em água destilada e contracoradas (levemente) com Hematoxilina de Mayer, novamente lavagem com água destilada e água amoniacal.

Por fim, o material foi levado à desidratação em concentrações crescentes de álcoois (50, 80, 95% e absoluto), diafanização em xilol e montagem com lamínula, utilizando resina sintética (Permout, SP 15-500 Fisher Scientific, EUA) para a microscopia.

A reação foi acompanhada de controles positivo e negativo, sendo este último submetido a todas as etapas do procedimento técnico, suprimindo-se entretanto, a aplicação do anticorpo primário (anti-macrófago).

3.13 Análise semi-automatizada de imagens

A quantificação do número total de macrófagos fagocitantes do carvão coloidal foi realizada por meio da análise semi-automatizada de imagens empregando-se protocolo baseado no descrito por de Oliveira et al (2006), conforme sumarizado a seguir.

As lâminas preparadas pelo procedimento de imunohistoquímica foram analisadas em microscópio óptico Nikon Microphot-FXA ligado ao equipamento de análise de imagem composto de microcomputador IBM-PC-compatível e o software KS-300 (Carl Zeiss Vision Inc., Alemanha). Em aumento de 200x, foram definidas áreas representativas do tecido na qual se verificavam o maior número de células que fagocitaram o carvão coloidal. Toda a análise, entretanto, foi realizada em campos com aumento de 400x. Os campos visualizados ao microscópio eram apresentados pelo software KS-300 como imagens de 640x480 pixels, gravadas em arquivos no formato TIFF. No total, cinco campos distintos foram definidos para cada lâmina analisada e os respectivos arquivos TIFF foram gerados. Assim sendo, ao final desta etapa, cada órgão estudado do animal (fígado, pulmão e baço) foi representado por cinco arquivos TIFF seqüencialmente identificados pelo número do animal e número seqüencial do campo. Um exemplo da imagem gerada nesta etapa é apresentado na figura 11.A.

Em seguida procedeu-se à seleção automática dos macrófagos com carvão coloidal a serem contados. A fim de refinar a seleção automática, foram realizados ajustes matemáticos na configuração do software baseados nos canais de cores, na densidade média e densidade mínima dos objetos e área do objeto preenchido. A partir de cada arquivo TIFF original, gerou-se uma nova imagem com a seleção automatizada do número de macrófagos contendo carvão coloidal (figura 11.B).

Ao final da análise automática, o valor da contagem efetuada pelo software foi corrigido por meio de intervenção do operador para correção de imprecisões, incluindo a contagem de dois ou mais macrófagos como se fossem um único (normalmente em função de estreita proximidade entre eles), ou quando macrófagos contendo carvão coloidal não foram contados devido ao rigor do ajuste matemático empregado. A figura 11.C demonstra como o refinamento foi realizado.

Com base na metodologia descrita, foi calculado o número de macrófagos fagocitantes no fígado, pulmão e baço.

Figura 11 - Análise de imagens de lâminas marcadas com anticorpo CD 68, clone ED-1 para quantificação de macrófagos nos tecidos

Legenda: A - Campo de fígado capturado no software de análise de imagem KS-300. Os macrófagos que fagocitaram o carvão coloidal apresentam-se corados pela cor marrom escura. B – Seleção preliminar (automática) dos elementos da análise. C – Intervenção do operador ao final da análise de imagem automática. Alguns macrófagos não foram computados, pois não foram incluídos na seleção preliminar e também é possível que dois ou mais macrófagos muito próximos sejam considerados pelo software como um único elemento. As setas indicam quais macrófagos foram contados manualmente, sendo que o número total obtido é acrescido ao resultado da contagem realizada pelo software. Procedimento análogo permite eliminar elementos erroneamente computados na contagem automática.

3.14 Ética

Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão Ético-Científica do Departamento de Gastroenterologia da FMUSP em cinco de novembro de 2004 e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq, da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da FMUSP, em 13 de abril de 2005, sob Protocolo de Pesquisa número 017/05.

3.15 Análise Estatística

Utilizou-se para análise estatística dos resultados o programa GraphPad Prism 3.00 (Graph Pad Prism Software Inc. San Diego, CA, EUA).

Todos os dados apresentaram comportamento paramétrico, verificado por teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e, desta maneira, foram comparados através da análise de variância (ANOVA) para medidas não repetidas com pós-teste de Tukey. Os resultados foram representados na forma de média e desvio-padrão.

Adotou-se nível de significância $p < 0,05$.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Variáveis Clínicas

4.1.1 Peso corpóreo

O peso corpóreo de admissão não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,5458$). No entanto, a média de peso final do grupo CO-NC foi significativamente maior, em relação aos grupos que receberam emulsões lipídicas ($p<0,05$), mas não em relação ao grupo SF. A média do peso corpóreo inicial e final dos animais e sua variação percentual durante o período do estudo encontram-se na tabela 6.

Ao se avaliar a modificação percentual de peso grupo a grupo, verificou-se que somente o grupo CO-NC ganhou peso ($p=0,001$). Demais grupos apresentaram perda de peso ao longo do experimento, porém, sem diferença estatística significativa entre si ($p>0,05$). O gráfico 1 mostra a porcentagem de alteração de peso corpóreo dos diferentes grupos do experimento.

Os valores de cada animal por grupo experimental encontram-se no capítulo Anexo, tabela 11.

Tabela 6 - Média e desvio padrão ($m \pm dp$) da alteração de peso corpóreo dos animais por grupo

Grupo	Peso corpóreo ($m \pm dp$)			
	Inicial (g)	Final (g)	Alteração (g)	% alteração
CO-NC	252,46 $\pm$ 16,230	266,16 $\pm$ 20,406*	13,7 $\pm$ 5,654	+5,28 $\pm$ 2,245 [#]
SF	259,28 $\pm$ 13,140	250,06 $\pm$ 10,509	-9,21 $\pm$ 6,168	-3,49 $\pm$ 2,301
TCM/TCL	247,23 $\pm$ 16,554	237,29 $\pm$ 15,462	-9,94 $\pm$ 9,086	-3,95 $\pm$ 3,705
TCM/TCL/OP	250,61 $\pm$ 12,006	237,46 $\pm$ 16,718	-13,15 $\pm$ 6,828	-5,32 $\pm$ 2,834
SMOF	250,38 $\pm$ 13,334	240,29 $\pm$ 17,832	-10,09 $\pm$ 7,738	-4,09 $\pm$ 3,045
ANOVA e pós-teste de Tukey	p = 0,5458	p < 0,05*	-	p < 0,001 [#]

* Grupo CO-NC > TCM/TCL; TCM/TCL/OP e SMOF

[#] Grupo CO-NC > demais grupos

Gráfico 1 - Caracterização gráfica da porcentagem de variação do peso corpóreo (final – inicial) para todos os grupos experimentais e resultados da análise estatística

ANOVA $p < 0,0001$

* CO-NC > SF; TCM/TCL; TCM/TCL/OP e SMOF ($p < 0,001$)

Pós teste de Tukey

4.1.2 Volume de infusão endovenosa e quantidade de ingestão oral

Foram considerados aptos para o estudo, animais que receberam volume médio de infusão endovenosa acima de 80% da média de volume de infusão proposto. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao volume infundido ($p=0,6282$) e à porcentagem de adequação entre o volume prescrito e o infundido ($p=0,6274$).

Com relação à quantidade de dieta oral ingerida, o grupo CO-NC ingeriu quantidade significativamente maior de ração oral que demais grupos. Entre os grupos que foram submetidos a cateterização venosa, não houve diferença significativa na ingestão oral ($p>0,05$).

Os resultados referentes aos valores de infusão endovenosa, ingestão de dieta oral e água dos grupos experimentais encontram-se na tabela 7.

Os valores de cada animal por grupo experimental encontram-se no capítulo Anexo, tabela 12.

Tabela 7 - Média e desvio padrão ($m \pm dp$) do volume de infusão endovenosa e quantidade de ingestão oral por grupo experimental

Grupo	Infusão endovenosa		Ingestão	
	(mL)	% adequação	Oral (g)	Água (mL)
CO-NC	-	-	23,0 $\pm$ 2,661*	24,68 $\pm$ 4,117
SF	11,10 $\pm$ 0,654	96,46 $\pm$ 5,673	11,63 $\pm$ 4,286	20,0 $\pm$ 7,20
TCM/TCL	10,76 $\pm$ 0,865	93,55 $\pm$ 7,50	11,08 $\pm$ 2,355	19,22 $\pm$ 5,629
TCM/TCL/OP	11,17 $\pm$ 0,75	97,08 $\pm$ 6,508	9,23 $\pm$ 3,466	21,56 $\pm$ 6,223
SMOF	11,16 $\pm$ 0,555	97,06 $\pm$ 4,791	10,17 $\pm$ 2,809	19,18 $\pm$ 5,174
ANOVA e pós-teste de Tukey	p = 0,6282	p = 0,6274	p < 0,001*	p = 0,2963

* CO-NC > demais grupos

4.1.3 Quantidade de energia fornecida

Os grupos experimentais com infusão lipídica atingiram a recomendação de consumo energético para ratos adultos, cerca de 45,5 a 57 Kcal por dia (COBEA, 1996). O grupo CO-NC apresentou uma ingestão oral e total significativamente maior que demais grupos.

Apesar de haver diferença na quantidade de energia fornecida por infusão parenteral nos grupos que receberam emulsão lipídica, não houve diferença significativa no total de energia final oferecida aos animais, equivalente à soma da infusão endovenosa e oral. A tabela 8 indica a quantidade de energia, em Kcal, fornecidas pela infusão endovenosa, pela dieta oral e total.

Os valores de cada animal por grupo experimental encontram-se no capítulo Anexo, tabela 13.

Tabela 8 - Média e desvio padrão ($m \pm dp$) da energia consumida (em Kcal) pela infusão endovenosa, ingestão oral e total, por grupo experimental

Grupo	Energia (Kcal)		
	Infusão endovenosa	Ingestão oral	Total
CO-NC	-	$87,4 \pm 10,11^{\#}$	$87,4 \pm 10,11^{\#}$
SF	-	$44,21 \pm 16,286$	$44,21 \pm 16,286$
TCM/TCL	$20,98 \pm 1,687$	$39,89 \pm 8,477$	$60,88 \pm 8,318$
TCM/TCL/OP	$19,92 \pm 1,338$	$33,22 \pm 12,477$	$53,14 \pm 12,453$
SMOF	$22,33 \pm 1,109^*$	$36,62 \pm 10,114$	$58,95 \pm 10,618$
ANOVA e pós-teste de Tukey	$p < 0,01^*$	$p < 0,001^{\#}$	$p < 0,001^{\#}$

* SMOF > TCM/TCL/OP

CO-NC > demais grupos

4.2 Variáveis imunológicas

4.2.1 Função quimiotática

A função quimiotática foi avaliada pela capacidade de migração de neutrófilos na presença (quimiotaxia) ou ausência (migração espontânea) de fator quimiotático. A média e desvio padrão da migração espontânea e quimiotaxia dos animais, de acordo com seu grupo experimental, encontram-se na tabela 9.

Os grupos SF ($p < 0,01$), TCM/TCL e TCM/TCL/OP ($p < 0,001$) apresentaram maior migração espontânea quando comparados ao grupo CO-NC. O grupo SMOF não se diferenciou de CO-NC ($p > 0,05$) e, quando comparado aos grupos com infusão de emulsão lipídica, TCM/TCL e TCM/TCL/OP, apresentou menor migração espontânea ($p < 0,01$). O gráfico 2 mostra os resultados da migração espontânea.

A quimiotaxia de neutrófilos não foi influenciada por emulsões lipídicas, pois não se observou diferenças significativas entre os grupos da presente pesquisa ($p = 0,2143$), conforme ilustrado no gráfico 3.

Os valores de cada animal por grupo experimental encontram-se no capítulo Anexo, tabela 14.

Tabela 9 - Resultados de migração espontânea e quimiotaxia em média (m), desvio-padrão (dp), mediana (med), valor mínimo (min), valor máximo (max) e ANOVA com pós-teste de Tukey (valor de p) dos diferentes grupos experimentais

	Grupo	m	dp	med	min	max	p
M I G R A Ç Ã O E S P O N T Ã N E A	CO-NC	19,04	6,171	20,35	10	25,5	-
	SF	32,19	5,03	31,05	25,5	40,2	p < 0,01*
	TCM/TCL	35,05	4,528	35	27,7	42,2	p < 0,001* p < 0,05 [#]
	TCM/TCL/OP	37,19	8,792	36,7	24	50,5	p < 0,001* p < 0,01 [#]
	SMOF	24,45	6,473	22,55	17,4	34	-
Q U I M I O T A X I A	CO-NC	89,11	29,102	83,35	56,5	135	ns
	SF	113,63	35,364	108,1	70,7	172	ns
	TCM/TCL	100,18	31,428	102,1	54	150	ns
	TCM/TCL/OP	108,44	14,706	110,05	79	125,2	ns
	SMOF	83,41	30,159	77,9	48,7	138,5	ns

* SF, TCM/TCL, TCM/TCL/OP > CO-NC

[#] TCM/TCL e TCM/TCL/OP > SMOF

ns: não significativo

Gráfico 2 - Caracterização gráfica da migração espontânea para todos os grupos experimentais e resultados da análise estatística

ANOVA: $p < 0,0001$

* SF ($p < 0,01$), TCM/TCL e TCM/TCL/OP ($p < 0,001$) > CO-NC

TCM/TCL ($p < 0,05$) e TCM/TCL/OP ($p < 0,01$) > SMOF

Pós-teste de Tukey

Gráfico 3 - Caracterização gráfica da quimiotaxia para todos os grupos experimentais e resultados da análise estatística

ANOVA: $p = 0,2143$

4.2.2 Quantificação de macrófagos

A fagocitose foi avaliada pela quantificação de macrófagos fagocitantes, residentes no fígado, pulmão e baço, após incorporação de carvão coloidal, procedimento imunohistoquímico e análise semi-automatizada de imagens.

O número de macrófagos residentes que fagocitaram o carvão coloidal no fígado apresentou-se aumentado, independente do tipo de emulsão lipídica ministrada, quando comparado ao grupo que não sofreu cateterismo (CO-NC), com $p < 0,01$ em TCM/TCL e TCM/TCL/OP, e $p < 0,05$ em SMOF. Em relação à SF, a quantidade de macrófagos fagocitantes no fígado também esteve elevada nos grupos TCM/TCL ($p < 0,05$) e TCM/TCL/OP ($p < 0,01$), mas não em SMOF ($p > 0,05$). Os grupos contendo emulsões lipídicas não apresentaram diferenças entre si. Os resultados da contagem de macrófagos no fígado encontram-se descritos na tabela 10 e podem ser visualizados no gráfico 4.A.

O número de macrófagos fagocitantes residentes no pulmão apresentou-se aumentado por emulsões lipídicas quando comparado ao grupo CO-NC, com $p < 0,01$ em TCM/TCL, $p < 0,001$ em TCM/TCL/OP e $p < 0,05$ em SMOF. Os grupos TCM/TCL e TCM/TCL/OP, mas não SMOF, quando comparados ao grupo SF, apresentaram significativamente maior número de macrófagos fagocitantes ($p < 0,01$). Os resultados da contagem de macrófagos no pulmão encontram-se descritos na tabela 10 e podem ser visualizados no gráfico 4.B.

O número de macrófagos fagocitantes residentes no baço apresentou-se aumentado somente no grupo TCM/TCL/OP, quando comparado aos grupos CO-NC e SF ($p < 0,05$). Demais grupos não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Os resultados da contagem de macrófagos no baço encontram-se descritos na tabela 10 e podem ser visualizados no gráfico 4.C.

Os valores de cada animal por grupo experimental encontram-se no capítulo Anexo, tabela 15.

Tabela 10 – Macrófagos fagocitantes do fígado, pulmão e baço em média (m), desvio padrão (dp), mediana (med), valor mínimo (min), máximo (max) e análise estatística (valor de p) dos diferentes grupos experimentais

	Grupo	m	dp	med	min	max	p
FÍGADO	CO-NC	21,6	2,64	21,5	18,4	25	-
	SF	23,2	3,342	23,4	18,8	28,6	-
	TCM/TCL	34,85	11,144	37,5	18	50,8	p < 0,01* p < 0,05 [#]
	TCM/TCL/OP	35,47	9,177	33	24,6	48,6	p < 0,01* p < 0,01 [#]
	SMOF	32,27	2,904	32,3	28,6	37,6	p < 0,05*
PULMÃO	CO-NC	46,92	8,733	49,4	26,8	54,6	-
	SF	51,87	11,49	51,2	30	66,2	-
	TCM/TCL	84,375	16,522	87,5	56,2	102,2	p < 0,01* p < 0,01 [#]
	TCM/TCL/OP	88,22	24,092	87,6	59	123,4	p < 0,001* p < 0,01 [#]
	SMOF	75,07	23,448	76,4	45	152	p < 0,05*
BAÇO	CO-NC	129,75	29,795	124,5	91,2	167,4	ns
	SF	132,72	15,363	131,8	108,6	154,8	ns
	TCM/TCL	138,07	21,165	129,7	108,8	170,2	ns
	TCM/TCL/OP	170,35	31,344	173	126,6	210	p < 0,05 ^Ω
	SMOF	156,82	10,682	152	143,4	175,2	ns

* TCM/TCL, TCM/TCL/OP, SMOF > CO-NC

[#] TCM/TCL, TCM/TCL/OP > SF

^Ω - TCM/TCL/OP > CO-NC, SF

ns: não significativo

Gráfico 4 - Caracterização gráfica da fagocitose por macrófagos residentes no fígado (A), pulmão (B) e baço (C) expressa por número de macrófagos por campo de microscopia óptica para todos os grupos experimentais e resultados da análise estatística

ANOVA: $p=0,0002$

* TCM/TCL, TCM/TCL/OP ($p<0,01$) e SMOF ($p<0,05$) > CO-NC

TCM/TCL ($p<0,05$) e TCM/TCL/OP ($p<0,01$) > SF

Pós-teste de Tukey

ANOVA: $p<0,0001$

* TCM/TCL ($p<0,01$); TCM/TCL/OP ($p<0,001$) e SMOF ($p<0,05$) > CO-NC

TCM/TCL e TCM/TCL/OP ($p<0,01$) > SF

Pós-teste de Tukey

ANOVA: $p=0,0046$

* TCM/TCL/OP > CO-NC e SF ($p<0,05$)

Pós-teste de Tukey

Discussão

5 DISCUSSÃO

5.1 Do método

5.1.1 Dos animais

Ratos conferem vantagens ao serem usados em ensaios experimentais por serem animais de fácil manuseio e acompanhamento, necessitar de espaço reduzido para alojamento, ter baixo custo e fácil adaptação ao ambiente laboratorial (COBEA, 1996).

Linhagens de ratos isogênicos são obtidas a partir do cruzamento de animais consangüíneos por 20 gerações consecutivas, gerando populações estáveis e geneticamente homogêneas. A homogeneidade isogênica possibilita redução do número de animais por experimento pela maior uniformidade dos resultados encontrados (Ferreira et al, 2005; Shaw et al, 2002). No presente estudo, a escolha de animais isogênicos machos buscou ainda evitar alterações hormonais, decorrentes do ciclo menstrual de fêmeas, que pudessem interferir nos resultados das variáveis estudadas (Johnson e Besselsen, 2002).

5.1.2 Do acesso venoso

Para acesso venoso central preferimos a técnica de cateterização da jugular externa, muito utilizada em estudos envolvendo emulsões lipídicas parenterais (EL) e animais de pequeno porte (Kilian et al, 2006; Li et al, 2006; Lin et al, 2006; Garnacho-Montero et al, 2002; Lanza-Jacoby et al, 2001; Yeh et al, 2000).

A cateterização da veia jugular com cateter de silicone possibilitou a infusão de emulsões lipídicas (EL) com eficiência, reproduzindo experiências anteriores de nossa equipe (Bertevello 2002; Campos et al, 2002; Cukier et al, 1999; Waitzberg et al, 1996), e o uso de peça giratória intermediária (*Swivel*) desenvolvida artesanalmente pelo Grupo METANUTRI, em parceria com a Escola Politécnica da USP, viabilizou a livre-movimentação dos animais sem torção do equipo de infusão durante o período pós-operatório (Galizia et al, 2005).

5.1.3 Da infusão endovenosa de lipídeos

O rato tem excelente tolerância à administração endovenosa de grandes volumes de EL. O fornecimento endovenoso de EL por períodos de 17 a 96 horas, em até 2,3 mL/hora, foi tolerado por ratos, não se observando aumento da mortalidade relacionada à quantidade de emulsão injetada (Li et al, 2006; Driscoll et al, 2006; Lanza-Jacoby et al, 2001; Waitzberg et al, 1996).

No presente estudo, os lipídeos representaram em média 36,5% da energia não protéica fornecida diariamente, semelhante à utilizada em outros estudos envolvendo ratos (Lanza-Jacoby et al, 2001; Yeh et al, 2000; Cukier et al, 1999). Guardadas as devidas proporções entre estudo experimental e clínico, a oferta de lipídeos foi em conformidade com a faixa ideal de fornecimento de energia lipídica, de 25 a 40% do total das necessidades energéticas diárias, segundo a “European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition” (ESPGHAN) e a “European

Society for Clinical Nutrition and Metabolism” (ESPEN), (Koletzko et al, 2005).

5.1.4 Dos grupos experimentais

Na definição dos grupos experimentais optou-se por comparar os dados obtidos da infusão de SMOF com EL TCM/TCL, sozinha ou associada com OP, e não com outras EL ricas em triglicérides de cadeia longa (TCL), óleo de soja, por três razões distintas:

1) EL ricas em TCL estão associadas à redução de algumas funções do sistema imune e, atualmente, preconiza-se evitar seu uso em pacientes críticos não estáveis (Sala-Vila et al, 2007; Campos et al, 2002; Jensen et al, 1990; Sedman et al, 1990; Hamawy et al, 1985; Sobrado et al, 1985; Nordenstrom et al, 1979);

2) Conforme mapeamento multicêntrico, em UTI de hospitais brasileiros, a EL TCM/TCL constitui-se a EL mais utilizada na prática clínica atual (Pontes-Arruda et al, 2007) e;

3) SMOF diferencia-se da mistura TCM/TCL/OP principalmente por conter óleo de oliva, rico em ácidos graxos monoinsaturados ω -9. Os possíveis efeitos observados em SMOF poderiam ser relacionados com esses ácidos graxos.

5.1.5 Do ensaio de quimiotaxia

O ensaio de migração quimiotática foi efetuado segundo adaptação do método de Boyden (1962), anteriormente utilizado em estudos *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo* em nosso laboratório (Waitzberg et al, 1997; Waitzberg et al,

1996; Bellinati-Pires et al, 1992) e também amplamente utilizado por outros pesquisadores (Gorjão et al, 2006; Buenestado et al, 2006; Sperling et al, 1993; Turner et al, 1975).

Existem diferentes maneiras de se avaliar a quimiotaxia, como o número ou porcentagem de células que migraram para o compartimento inferior da câmara (Gorjão et al, 2006; Wanten et al, 2000), ou pela distância percorrida pelos leucócitos no interior da membrana de celulose, que foi o método adotado na presente pesquisa (Buenestado et al, 2006; Bellinati-Pires et al, 1992).

O fator quimiotático C5a, pertencente ao sistema complemento, utilizado no presente experimento, foi originado de um “pool” de soro fresco de ratos e é considerado adequado por provocar aumento da permeabilidade vascular, ativar leucócitos e conseqüentemente estimular a migração.

Outros tipos de fatores quimiotáticos também podem ser utilizados, como leucotrieno B4 sintético (Sperling et al, 1993), n-formil-metionil-leucil-fenilalanina - fMLP (Buenestado et al, 2006; Wanten et al, 2000) e zimosan (Wanten et al, 2000). Preferimos usar o C5a devido à experiência anterior com o uso deste fator quimiotático, em estudos envolvendo emulsões lipídicas (Gorjão et al, 2006; Waitzberg et al, 1997; Waitzberg et al, 1996; Bellinati-Pires et al, 1992).

5.1.6 Ensaio de fagocitose; teste de carvão coloidal, análise imunohistoquímica e análise de imagens

A fagocitose inespecífica, através da resposta imune inata, representa a primeira barreira imunológica do organismo para contenção do antígeno e pode ser estudada em macrófagos com uso de partículas marcadas ou previamente conhecidas. Carvão coloidal, enxofre coloidal marcado com Tc99 m, partículas de látex e bactérias opsonizadas (como *Escherichia coli*), são algumas das substâncias utilizadas (Alexis et al, 2006; Lyons et al, 2006; Vasconcellos et al, 2005; Petroianu, 2003; Kew et al, 2003; Vollmar et al, 2002).

A escolha do carvão coloidal no presente trabalho deu-se pela experiência prévia com o método (Cukier et al, 1999), fácil preparo do colóide, baixo custo operacional e reprodutibilidade metodológica.

O carvão coloidal é comumente utilizado em estudos envolvendo animais para marcação da fagocitose, por possibilitar a quantificação de macrófagos através da incorporação das partículas de carvão (Lyons et al, 2006; Petroianu 2003; Witmer-Pack et al, 1993; Tuwajiri e Saad, 1986).

A identificação do carvão coloidal fagocitado poderia ser feita pela observação direta do pigmento em corte histológico corado apenas com eosina. Contudo, a presença de carvão coloidal em meio extra-celular pode dificultar a interpretação correta da leitura. No presente trabalho os macrófagos, previamente identificados com marcador imunohistoquímico, foram considerados células fagocitantes ao conter partículas de carvão coloidal no interior da célula, o que conferiu maior especificidade ao método.

A identificação do carvão coloidal intracitoplasmático, por verificação simples ao microscópio óptico, ou através de metodologia mais sensível como a análise de imagens por “software” específico (utilizado na presente pesquisa), fornece dados relativos à fagocitose das partículas. O método imunohistoquímico permitiu a análise do número total de macrófagos, por campo de microscopia óptica.

A utilização de “software” para contagem de macrófagos por análise semi-automatizada, por dois diferentes observadores, a cego, permitiu uma contagem mais refinada e com menor probabilidade de erros relacionados à falha visual. Este tipo de análise permitiu ainda, possíveis correções de contagem quando necessárias, conforme descrito no capítulo de Métodos desta Dissertação, de acordo com de Oliveira et al (2006).

Durante a leitura das lâminas dos tecidos coletados, observou-se que todos os macrófagos visíveis apresentavam partículas de carvão coloidal em seu interior. Assim, a influência das distintas EL sobre a fagocitose de macrófagos residentes foi determinada de forma indireta, através da quantificação de macrófagos fagocitantes nos órgãos analisados.

5.2 Dos Resultados

5.2.1 Variáveis Clínicas

Todos os animais sob infusão endovenosa de lipídeos apresentaram perda de peso corpóreo de extensão similar, independente da composição de emulsão lipídica parenteral (EL) infundida, enquanto o grupo não operado ganhou peso. É possível que a perda de peso observada tenha sido em decorrência do estresse cirúrgico e presença do cateter venoso central.

5.2.2 Variáveis imunológicas

No presente estudo, a utilização de um modelo sem infecção e com infusão exclusiva de EL em doses clinicamente aceitáveis, permitiu estudar de maneira isolada e fisiológica o efeito de nova EL contendo mistura de TCM e óleos de soja, oliva e peixe sobre a migração espontânea e estimulada (quimiotaxia) de neutrófilos e fagocitose por macrófagos residentes e compará-lo com EL TCM/TCL acrescida ou não de óleo de peixe (OP).

A infusão parenteral da EL SMOF não estimulou a migração espontânea em relação aos grupos controles (SF e CO-NC), enquanto que animais tratados com EL TCM/TCL isolada ou associada a OP aumentaram a migração espontânea em relação ao controle não cirúrgico.

Estudos anteriores encontraram inibição da quimiotaxia e migração espontânea de leucócitos de sangue periférico, associadas à incubação *in vitro* com EL TCM/TCL e EL contendo apenas TCM (Waitzberg et al, 1996; Wanten et al, 2000; Bellinati-Pires et al, 1992). No entanto, em estudos

experimentais e clínicos *ex vivo*, com infusão de EL parenteral TCM/TCL, a quimiotaxia e migração espontânea de leucócitos periféricos não se alterou (Waitzberg et al, 1997 e 1996).

Desta maneira, com relação à quimiotaxia, os resultados do presente estudo estão em concordância com aqueles realizados *ex vivo*, pois independente de sua composição, EL não influenciaram a migração estimulada.

As diferenças da migração espontânea e estimulada de neutrófilos na presença de EL TCM/TCL ou TCM encontradas entre estudos *in vitro* e *ex vivo* podem estar relacionadas com produção de radicais livres. A presença de TCM/TCL em culturas de leucócitos polimorfonucleares aumentou o *burst* respiratório e a produção de radicais livres de oxigênio (Buenestado et al, 2006; Kruimel et al, 2000; Wanten et al, 1999; Belinatti-Pires et al, 1993). Ainda *in vitro*, neutrófilos humanos incubados com TCM/TCL e submetidos à ativação com zimosan (fator quimiotático) aumentaram a concentração citoplasmática de cálcio 2^{+} , um indicador de estresse oxidativo (Wanten et al, 2004; Orrenius et al, 1992).

O aumento da concentração de radicais livres em culturas celulares pode induzir à morte e alteração estrutural do citoesqueleto da célula (Bellomo e Mirabelli, 1987) e nos permite especular que diferenças na migração leucocitária na presença de TCM/TCL encontradas em estudos *in vitro* e *in vivo* podem estar relacionadas com dano oxidativo celular. Esta hipótese toma importância pois neutrófilos incubados com TCM/TCL e também com antioxidante alfa-tocoferol, tiveram menor inibição da

capacidade quimiotática do que na ausência desse antioxidante (Wanten et al, 2000).

Existem poucas informações do efeito de óleo de peixe parenteral sobre funções do sistema imune e até a presente data não se encontraram estudos de sua influência sobre migração leucocitária, o que torna os dados desta pesquisa originais. Com base nos resultados obtidos na presente pesquisa, podemos sugerir que a presença de óleo de peixe não constitui fator de influência sobre a quimiotaxia e migração espontânea de neutrófilos de ratos, associada a TCM/TCL e na composição da EL SMOF.

Na ausência de estudos sobre o efeito de EL parenteral de óleo de peixe, ampliamos nossa discussão para estudos que avaliaram o efeito da sua suplementação oral em voluntários saudáveis, guardadas as devidas proporções entre estudos experimentais e humanos.

Existem apenas dois estudos que avaliaram o efeito de óleo de peixe sobre a migração espontânea e estimulada de neutrófilos e estes utilizaram o mesmo método (Boyden) adotado pela presente pesquisa. Sperling et al (1993) ofereceram suplementação diária de EPA (ácido eicosapentaenóico) e DHA (ácido docosahexaenóico), na proporção 1,8:1 e encontraram inibição da atividade quimiotática, enquanto que Gorjão et al (2006), que ofereceram suplementação diária de 1:2 de EPA:DHA, encontraram estímulo dessa variável imunológica. O aumento da capacidade migratória de neutrófilos encontrada por Gorjão foi associado à maior proporção de DHA sobre EPA.

É possível que os tipos de ácidos graxos da família ômega-3 possam ter efeitos distintos sobre a migração de neutrófilos, com efeito inibitório para

EPA e estimulatório para DHA. Na presente pesquisa a oferta de EPA e DHA nos grupos com óleo de peixe foram respectivamente 1,2:1 no grupo TCM/TCL/OP e 1:1 no grupo SMOF. Assim, podemos sugerir que a oferta de EPA e DHA em proporções similares resultou em efeito nulo sobre a migração de neutrófilos.

Com relação à fagocitose, na presente pesquisa houve aumento do número de macrófagos fagocitantes no fígado e pulmão de ratos sob infusão de EL contendo TCM/TCL e OP. Este resultado está de acordo com achados reportados em estudo anterior desenvolvido em nosso laboratório em ratos *Wistar*, apesar das diferenças na metodologia (Cukier et al, 1999). Ainda no presente estudo encontramos aumento do número de macrófagos no baço e aumento do número de macrófagos fagocitantes no fígado e pulmão por TCM/TCL sem adição de EL a base de óleo de peixe, agora diferentemente do observado nesse estudo anterior (Cukier et al, 1999).

Os diferentes resultados encontrados entre os estudos podem estar associados ao emprego de distinto tratamento nutricional parenteral (nutrição parenteral total *versus* EL exclusiva), cepa de ratos (*Wistar* não isogênicos *versus* *Lewis* isogênicos), tempo de incorporação do carvão coloidal (3 horas *versus* 5 horas) e marcadores imunohistoquímicos (HAM-56 *versus* CD-68).

Em concordância com nossos resultados, Hirschberg et al (1990) também encontraram estímulo da fagocitose de partículas de enxofre coloidal marcado com tecnécio em macrófagos residentes nos pulmões de cobaias, após infusão por 2,5 dias de EL TCM/TCL.

De maneira distinta à presente pesquisa, ratos sob infusão de TCM/TCL sem adição de OP, aumentaram o número de macrófagos no baço. No entanto, não houve diferença na fagocitose de partículas (microesferas fluorescentes) dos macrófagos residentes no fígado, pulmão e baço (Hinton et al, 1998), com relação à EL TCL.

Analizando os dados da presente pesquisa em conjunto podemos observar que, se a infusão de EL TCM/TCL associada ou não à OP, não alterou de maneira fisiológica a migração espontânea e estimulada, por outro o aumento da quantidade de macrófagos fagocitantes por ela desencadeado pode ter um papel protetor contra infecções. Essa suposição encontra suporte no fato que a presença de maior número de macrófagos indica um maior recrutamento dessas células sem perda de sua capacidade fagocitária, considerando-se a presença de partículas de carvão no interior de todos os macrófagos da amostra tecidual.

O recrutamento de leucócitos pode ser regulado por citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (Gregory et al, 2006). AG ômega-3 são reconhecidos por suas propriedades antiinflamatórias, e estão associados à diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias que, por sua vez, podem inibir indiretamente a expressão de moléculas de adesão em monócitos e linfócitos (De Caterina et al, 1994).

No entanto, especificamente na população de macrófagos, após suplementação oral com óleo de peixe, observou-se aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias induzido por LPS, principalmente fator de necrose tumoral alfa - TNF- α (Petursdottir e Hardardottir, 2007; Barber et al,

2005; Albers et al, 2002; Petursdottir et al, 2002; Blok et al, 1996; Hardardottir e Kinsella, 1992).

O aumento de TNF- α circulante, por sua vez, está associado ao aumento do número de macrófagos no baço (Petursdottir e Hardardottir, 2007; Hinton et al, 1998; Blok et al, 1996) e da expressão de TNF- α por essas células (Petursdottir e Hardardottir, 2007). O baço é o órgão mais ávido por AG ω -3, conforme observado experimentalmente em camundongos (Ton et al, 2005). Nesse mesmo modelo experimental, a ingestão oral de OP ocasionou aumento do peso e tamanho do baço, atribuído ao acúmulo de macrófagos residentes.

Considerando-se que na presente pesquisa o número de macrófagos fagocitantes no baço aumentou apenas nos animais sob infusão de EL TCM/TCL suplementada com OP, podemos sugerir que o maior recrutamento desses leucócitos possa estar associado a um possível aumento da produção sistêmica e local de TNF- α , induzida pela presença de OP.

A composição de TCM/TCL com OP se distingue de SMOF porque o último contém óleo de oliva (25%), rico em ácidos graxos monoinsaturados ω -9.

Ao se comparar EL rica em óleo de oliva com EL TCM/TCL ou somente TCL sobre funções de neutrófilos humanos verificou-se que EL com AG ω -9 não influenciou a migração leucocitária, expressão de moléculas de adesão e produção de citocinas estimuladas por LPS (Buenestado et al,

2006), demonstrando assim um efeito potencialmente neutro da EL rica em óleo de oliva sobre as variáveis imunológicas avaliadas.

Os AG ω -3, ω -6 e ω -9 incorporam-se nas membranas celulares com afinidades decrescentes na ordem apresentada (Chan et al, 1998). Enquanto AG ω -9 não participam da síntese de mediadores lipídicos inflamatórios, os eicosanóides, AG ω -6 e ω -3 competem pelas mesmas vias metabólicas para a produção e síntese dos eicosanóides (Mayer et al, 2006; Simopoulos, 2006). Os eicosanóides oriundos do metabolismo de AG ω -6 têm potencial inflamatório maior que os do metabolismo do AG ω -3 (Wanten e Calder, 2007; Yaqoob, 2003), e o equilíbrio da produção destes mediadores sofre influência da razão ω -6/ ω -3 da membrana. A razão de oferta de AG ω -6: ω -3 ideal varia entre 1:1 a 4:1, mas depende diretamente da doença de base a ser considerada (Simopoulos, 2002).

Apesar de SMOF possuir razão ω -6/ ω -3 ideal para oferta, semelhante ao grupo TCM/TCL/OP (2,5:1 e 3:1 respectivamente), pode-se sugerir que a maior disponibilidade de ω -9 pode ter influenciado na incorporação de ω -6 e ω -3, alterando a razão ω -6/ ω -3 de membrana celular ideal para que a modulação de funções imunes ocorra.

Considerando-se que AG ω -9 são associados com efeito neutro sobre funções imunes (Sala-Vila et al, 2007; El Seweid et al, 2005; Garnacho-Montero et al, 2002; Moussa et al, 2000; Baumann et al, 1999), pode-se sugerir que o efeito neutro observado por SMOF esteja relacionado com seu conteúdo deste AG.

Finalmente, independente do mecanismo utilizado, o fato de EL de óleo de peixe associada à EL TCM/TCL ter exercido efeitos diferentes de EL SMOF sobre as funções leucocitárias estudadas, aponta a necessidade de se compreender melhor o impacto das duas EL sobre variáveis imunes e inflamatórias e sua futura aplicação clínica. Além disso, as evidências crescentes, de que AG da família ômega-3 podem influenciar de maneiras distintas o sistema imune, na dependência de quantidade de EPA e DHA (Gorjão et al, 2006), abrem novas fronteiras para a compreensão do efeito desses nutrientes sobre funções imunológicas. O efeito esperado e desejado, de aumento, diminuição ou sem interferência na resposta imunológica e inflamatória, deve ser visto como principal indicação para a escolha clínica mais adequada de cada emulsão lipídica parenteral, de acordo com o estado mórbido do paciente.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Dadas as condições da presente pesquisa, onde ratos isogênicos foram submetidos a cateterismo venoso para infusão de diferentes emulsões lipídicas parenterais para avaliação da quimiotaxia, migração espontânea de neutrófilos e número de macrófagos fagocitantes de partículas de carvão no fígado, pulmão e baço, podemos concluir que:

1) Emulsões lipídicas, independente de sua composição, não influenciaram a quimiotaxia de neutrófilos;

2) Emulsão lipídica composta por mistura de triglicérides de cadeia média e óleos de soja, oliva e peixe apresentou efeito neutro sobre a quimiotaxia, migração espontânea e recrutamento de monócitos no fígado, pulmão e baço.

3) Emulsão lipídica de mistura física de triglicérides de cadeia média e cadeia longa estimulou o recrutamento de monócitos, com aumento do número de macrófagos fagocitantes no fígado e pulmão;

4) Emulsão lipídica de mistura física de triglicérides de cadeia média e cadeia longa enriquecida com emulsão lipídica de óleo de peixe, estimulou o recrutamento de monócitos, com aumento do número de macrófagos fagocitantes no fígado, pulmão e baço.

Perspectivas

7 PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÃO

1) Para explorar mecanismos pelos quais EL modulam o número de macrófagos fagocitantes, dentro das condições do presente estudo pretende-se em breve:

Avaliar níveis de citocinas envolvidas no processo de recrutamento de macrófagos (com ênfase em TNF- α) do plasma e do tecido do fígado, pulmão e baço.

2) A fim de compreender porque óleo de peixe associado a TCM/TCL alterou número de macrófagos fagocitantes e sua presença na EL SMOF não teve o mesmo efeito, dentro das condições do presente estudo pretende-se em breve:

Avaliar perfil de AG ω -3 e ω -9 na membrana de monócitos plasmáticos.

3) A fim de verificar a hipótese de que a presença de AG ω -9 na EL SMOF determinou resultados neutros dessa EL sobre o número de macrófagos fagocitantes, pretende-se:

Desenvolver, dentro das mesmas condições metodológicas, um grupo exclusivo de EL contendo aproximadamente 80% de óleo de oliva.

4) A fim de verificar o efeito das EL estudadas sobre a quimiotaxia, migração espontânea e fagocitose de leucócitos em modelo animal que represente uma condição clínica cuja resposta imune esteja envolvida na sua fisiopatologia, pretende-se:

Reproduzir a metodologia desta pesquisa em modelo animal com agressão infecciosa.

Anexos

8 ANEXOS

Resultados gerais de todos os animais para cada grupo experimental.

Tabela 11 - Peso (g) e alteração corpórea (g e porcentagem). Média de cada animal, seguido por média e desvio padrão do grupo

Grupo	Nº animal	Peso			
		Inicial	Final	Alteração (g)	% alteração
CO-NC	5	255	270,5	15,5	6,07
	12	263,1	275,7	12,6	4,78
	19	234,8	243,7	8,9	3,79
	28	246,2	260,3	14,1	5,72
	31	274,8	291,3	16,5	5,79
	36	228,7	231,7	3	0,91
	42	269,4	287,1	17,7	6,57
	46	247,7	269	21,3	8,59
	<i>Média</i>	<i>252,46</i>	<i>266,16</i>	<i>13,70</i>	<i>5,28</i>
	<i>Desvio pad</i>	<i>16,230</i>	<i>20,406</i>	<i>5,654</i>	<i>2,245</i>
SF	4	248,6	251,4	2,8	1,12
	10	241,8	232,9	-8,9	-3,7
	16	257	250,2	-6,8	-2,6
	21	265,9	248,8	-17,1	-6,4
	29	276,5	264,2	-12,3	-4,45
	34	272,7	262,2	-10,5	-3,85
	43	266,8	251,9	-14,9	-5,58
	48	244,9	238,9	-6	-2,45
	<i>Média</i>	<i>259,28</i>	<i>250,06</i>	<i>-9,21</i>	<i>-3,49</i>
	<i>Desvio pad</i>	<i>13,140</i>	<i>10,509</i>	<i>6,168</i>	<i>2,301</i>
TCM/TCL	1	222,4	226,4	4	1,8
	6	236,8	235,1	-1,7	-0,71
	15	258,7	258,5	-0,2	-0,08
	17	256,4	240,8	-15,6	-6,08
	24	242,8	224,3	-18,5	-7,62
	37	230	213	-17	-7,4
	44	266,8	249,4	-17,4	-6,52
	47	263,9	250,8	-13,1	-4,96
	<i>Média</i>	<i>247,23</i>	<i>237,29</i>	<i>-9,94</i>	<i>-3,95</i>
	<i>Desvio pad</i>	<i>16,554</i>	<i>15,462</i>	<i>9,086</i>	<i>3,705</i>

continua

Tabela 11 - Peso (g) e alteração corpórea (g e porcentagem). Média de cada animal, seguido por média e desvio padrão do grupo

Grupo	Nº animal	Peso			
		Inicial	Final	Alteração (g)	% alteração
TCM/TCL/OP	7	258,7	248	-10,7	-4,13
	14	240,7	225,6	-15,1	-6,27
	20	253,1	238,1	-15	-5,92
	23	269,2	263,7	-5,5	-2,04
	35	256,5	253,8	-2,7	-1,05
	38	235,7	214,7	-21	-8,9
	41	255,1	232,8	-22,3	-8,74
	52	235,9	223	-12,9	-5,47
	<i>Média</i>	<i>250,61</i>	<i>237,46</i>	<i>-13,15</i>	<i>-5,32</i>
	<i>Desvio pad</i>	<i>12,006</i>	<i>16,718</i>	<i>6,828</i>	<i>2,834</i>
	3	249,6	231,5	-18,1	-7,25
SMOF	11	243,5	227,2	-16,3	-6,7
	18	269,4	275,5	6,1	2,26
	26	245,2	232,4	-12,8	-5,22
	32	264,7	252	-12,7	-4,79
	39	226	217,9	-8,1	-3,58
	45	251,5	246,3	-5,2	-2,06
	50	253,1	239,5	-13,6	-5,37
	<i>Média</i>	<i>250,38</i>	<i>240,29</i>	<i>-10,09</i>	<i>-4,09</i>
	<i>Desvio pad</i>	<i>13,334</i>	<i>17,832</i>	<i>7,738</i>	<i>3,045</i>

conclusão

Tabela 12 - Infusão endovenosa, porcentagem de adequação da infusão, ingestão de dieta oral e água. Média de cada animal, seguido por média e desvio padrão do grupo

Grupo	Nº animal				
		Inf. endov. (mL)	% adequação	Ração (g)	Água (mL)
CO-NC	5	-	-	25,9	32,5
	12	-	-	24,7	26,35
	19	-	-	20,6	20,75
	28	-	-	24,3	25,25
	31	-	-	25	26,2
	36	-	-	17,9	18,675
	42	-	-	22,2	25,025
	46	-	-	23,4	22,7
	<i>Média</i>	-	-	23	24,68
	<i>Desvio Pad</i>	-	-	2,661	4,177
SF	4	11,1	96,5	12,575	12,925
	10	9,925	86,3	11,3	32,275
	16	11,325	98,5	11,825	12,425
	21	10,425	90,6	7,4	26,6
	29	11,85	103	19,5	15,47
	34	11	95,6	15,125	19,025
	43	11,775	102,3	9,125	16,225
	48	11,375	98,9	6,225	25,05
	<i>Média</i>	11,1	96,46	11,63	20
	<i>Desvio Pad</i>	0,654	5,673	4,286	7,2
TCM/TCL	1	11,167	97,1	13,8	15,1
	6	11,75	102	7,35	30,375
	15	11,075	96,3	12,425	17,95
	17	10,5	91,3	7,9	14,05
	24	9,8	85,2	12,1	21,125
	37	11,5	100	12,8	15,475
	44	9,225	80,2	12,025	23,95
	47	11,075	96,3	10,25	15,75
	<i>Média</i>	10,76	93,55	11,08	19,22
	<i>Desvio Pad</i>	0,865	7,500	2,355	5,629

continua

Tabela 12 - Infusão endovenosa, porcentagem de adequação da infusão, ingestão de dieta oral e água. Média de cada animal, seguido por média e desvio padrão do grupo

Grupo	Nº animal				
		Inf. endov. (mL)	% adequação	Ração (g)	Água (mL)
TCM/TCL/OP	7	11,525	100,2	12,94	28,5
	14	11,1	96,5	7,85	20,55
	20	10,4	90,4	5,325	20,625
	23	9,975	86,7	13,825	12,275
	35	11,55	100,4	12,725	24,775
	38	12,25	106,5	6,75	24,075
	41	11,75	102	8,85	28,475
	52	10,8	93,9	5,55	13,175
	<i>Média</i>	<i>11,17</i>	<i>97,08</i>	<i>9,23</i>	<i>21,56</i>
	<i>Desvio Pad</i>	<i>0,750</i>	<i>6,508</i>	<i>3,466</i>	<i>6,223</i>
SMOF	3	10,767	93,6	8,325	22,25
	11	11,725	102	7,325	14,925
	18	11,125	96,7	13,65	14,35
	26	10,575	92	7,1	28,325
	32	11,85	103	12,9	18,175
	39	11,75	102	13,4	22,65
	45	10,45	90,87	10,55	12,9
	50	11,075	96,3	8,125	19,85
	<i>Média</i>	<i>11,16</i>	<i>97,06</i>	<i>10,17</i>	<i>19,18</i>
	<i>Desvio Pad</i>	<i>0,555</i>	<i>4,791</i>	<i>2,809</i>	<i>5,174</i>

conclusão

Tabela 13 - Ingestão energética proveniente da infusão endovenosa, dieta oral e energia total (em Kcal). Média de cada animal, seguido por média e desvio padrão do grupo

Grupo	Nº animal	Energia (Kcal)		
		Inf. endovenosa	Dieta oral	TOTAL
CO-NC	5	-	98,42	98,42
	12	-	93,86	93,86
	19	-	78,28	78,28
	28	-	92,34	92,34
	31	-	95	95
	36	-	68,02	68,02
	42	-	84,36	84,36
	46	-	88,92	88,92
	<i>Média</i>	-	87,4	87,4
	<i>Desvio Pad</i>	-	10,11	10,11
SF	4	-	47,79	47,79
	10	-	42,94	42,94
	16	-	44,94	44,94
	21	-	28,12	28,12
	29	-	74,10	74,10
	34	-	57,48	57,48
	43	-	34,68	34,68
	48	-	23,66	23,66
	<i>Média</i>	-	44,21	44,21
	<i>Desvio Pad</i>	-	16,286	16,286
TCM/TCL	1	21,78	49,68	71,46
	6	22,91	26,46	49,37
	15	21,60	44,73	66,33
	17	20,48	28,44	48,92
	24	19,11	43,56	62,67
	37	22,43	46,08	68,51
	44	17,99	43,29	61,28
	47	21,60	36,9	58,50
	<i>Média</i>	20,98	39,89	60,88
	<i>Desvio Pad</i>	1,686	8,477	8,318

continua

Tabela 13 – Ingestão energética proveniente da infusão endovenosa, dieta oral e energia total (em Kcal). Média de cada animal, seguido por média e desvio padrão do grupo

Grupo	Nº animal	Energia (Kcal)		
		Inf. endovenosa	Dieta oral	TOTAL
TCM/TCL/OP	7	20,56	46,58	67,14
	14	19,8	28,26	48,06
	20	18,55	19,17	37,72
	23	17,79	49,77	67,56
	35	20,6	45,81	66,41
	38	21,85	24,3	46,15
	41	20,96	31,86	52,82
	52	19,27	19,98	39,25
	<i>Média</i>	19,92	33,22	53,14
	<i>Desvio Pad</i>	1,3379	12,477	12,453
SMOF	3	21,53	29,97	51,50
	11	23,45	26,37	49,82
	18	22,25	49,14	71,39
	26	21,15	25,56	46,71
	32	23,7	46,44	70,14
	39	23,5	48,24	71,74
	45	20,9	37,98	58,88
	50	22,15	29,25	51,40
	<i>Média</i>	22,33	36,62	58,95
	<i>Desvio Pad</i>	1,109	10,114	10,618

conclusão

Tabela 14 - Média (m) e desvio padrão (dp) de 10 leituras de cada membrana (duas por rato) para os valores de migração estimulada (quimiotaxia) e espontânea de cada animal e média e desvio padrão de cada grupo

Grupo	Nº animal	Migração (μm) em m $\pm$ dp	
		Estimulada	Espontânea
CO-NC	5	67,6 $\pm$ 7,412	17,6 $\pm$ 2,797
		65,6 $\pm$ 9,082	17,6 $\pm$ 3,864
	12	63,5 $\pm$ 8,515	19,5 $\pm$ 3,689
		49,5 $\pm$ 16,575	ND
	19	ND	ND
		108,5 $\pm$ 24,043	10 $\pm$ 0,0
	28	116,6 $\pm$ 27,391	10 $\pm$ 0,0
		ND	ND
	31	73 $\pm$ 12,953	22 $\pm$ 5,869
		66,5 $\pm$ 8,835	26 $\pm$ 5,676
	36	133 $\pm$ 19,032	26 $\pm$ 4,595
		137 $\pm$ 23,118	25 $\pm$ 6,667
	42	97 $\pm$ 28,79	23 $\pm$ 5,869
		ND	19,5 $\pm$ 2,838
	46	68,5 $\pm$ 16,675	24,5 $\pm$ 4,972
SF		57,5 $\pm$ 10,341	24,5 $\pm$ 4,378
	Média	84,91	20,4
	Desvio pad	29,748	5,481
	4	ND	37,5 $\pm$ 9,204
		172 $\pm$ 28,79	ND
	10	109,6 $\pm$ 6,022	36,4 $\pm$ 8,934
		101,6 $\pm$ 10,532	34 $\pm$ 3,399
	16	111,2 $\pm$ 21,648	37 $\pm$ 7,888
		110 $\pm$ 31,340	43,5 $\pm$ 8,515
	21	92 $\pm$ 11,353	27,5 $\pm$ 3,536
		92 $\pm$ 10,853	28,5 $\pm$ 8,182
	29	126,8 $\pm$ 8,443	ND
		126 $\pm$ 6,6	ND
	34	153,2 $\pm$ 18,955	33,6 $\pm$ 3,864
		ND	29,6 $\pm$ 3,373
	43	ND	25 $\pm$ 12,472
		78,5 $\pm$ 13,134	26 $\pm$ 5,164
	48	77,5 $\pm$ 7,546	32 $\pm$ 6,325
		64 $\pm$ 9,944	26 $\pm$ 4,595
	Média	108,8	32,05
	Desvio pad	30,434	5,573

ND = não disponível

continua

Tabela 14 - Média (m) e desvio padrão (dp) de 10 leituras de cada membrana (duas por rato) para os valores de migração estimulada (quimiotaxia) e espontânea de cada animal e média e desvio padrão de cada grupo

Grupo	Nº animal	Migração (μm) em m $\pm$ dp	
		Estimulada	Espontânea
TCM/TCL	1	80,5 $\pm$ 20,062	ND
		137,5 $\pm$ 15,855	ND
	6	143 $\pm$ 12,293	35,6 $\pm$ 5,797
		111,6 $\pm$ 8,934	ND
	15	120,5 $\pm$ 22,907	38,5 $\pm$ 3,375
		70 $\pm$ 7,817	32,5 $\pm$ 4,249
	17	ND	42,5 $\pm$ 7,169
		54 $\pm$ 10,488	37 $\pm$ 5,375
	24	150 $\pm$ 14,142	46,5 $\pm$ 17,488
		ND	38 $\pm$ 6,749
	37	119,5 $\pm$ 21,402	30 $\pm$ 9,129
		110 $\pm$ 15,635	32,5 $\pm$ 21,89
	44	69 $\pm$ 11,738	28,5 $\pm$ 4,116
		73 $\pm$ 5,375	27 $\pm$ 3,496
	47	81 $\pm$ 13,499	33,5 $\pm$ 4,116
TCM/TCL/OP		79,5 $\pm$ 5,986	34,5 $\pm$ 4,972
	<i>Média</i>	99,94	35,12
	<i>Desvio pad</i>	31,204	5,478
	7	ND	27,5 $\pm$ 3,536
		114,5 $\pm$ 21,009	33 $\pm$ 4,83
	14	122,8 $\pm$ 20,725	24 $\pm$ 3,771
		101,4 $\pm$ 32,112	ND
	20	102 $\pm$ 16,364	ND
		114 $\pm$ 11,255	48,5 $\pm$ 12,03
	23	132 $\pm$ 27,508	46 $\pm$ 10,75
		118,5 $\pm$ 18,864	55 $\pm$ 15,811
	35	126,5 $\pm$ 18,268	36,5 $\pm$ 3,375
		121 $\pm$ 18,827	38 $\pm$ 6,325
	38	ND	33,5 $\pm$ 5,798
		79 $\pm$ 11,005	34 $\pm$ 5,676
	41	104 $\pm$ 12,649	34,5 $\pm$ 5,503
		106 $\pm$ 8,756	40 $\pm$ 6,236
	52	101,5 $\pm$ 10,014	39 $\pm$ 6,146
		98,5 $\pm$ 5,798	33,5 $\pm$ 8,317
	<i>Média</i>	110,12	37,36
	<i>Desvio pad</i>	13,881	8,156

ND = não disponível

continua

Tabela 14 - Média (m) e desvio padrão (dp) de 10 leituras de cada membrana (duas por rato) para os valores de migração estimulada (quimiotaxia) e espontânea de cada animal e média e desvio padrão de cada grupo

Grupo	Nº animal	Migração (μm) em m $\pm$ dp	
		<i>Estimulada</i>	<i>Espontânea</i>
SMOF	3	149 $\pm$ 39,707	33 $\pm$ 6,325
		128 $\pm$ 25,188	20 $\pm$ 4,714
	11	65,6 $\pm$ 27,273	22,4 $\pm$ 2,797
		80 $\pm$ 5,27	19,4 $\pm$ 5,168
	18	45 $\pm$ 3,333	19,5 $\pm$ 5,986
		52,5 $\pm$ 13,994	ND
	26	77 $\pm$ 12,065	37,5 $\pm$ 10,341
		89 $\pm$ 19,408	30,5 $\pm$ 3,689
	32	71,4 $\pm$ 23,401	20,4 $\pm$ 2,951
		ND	18,4 $\pm$ 5,4
	39	ND	17,6 $\pm$ 2,797
		49,2 $\pm$ 8,23	17,2 $\pm$ 1,932
	45	104 $\pm$ 14,298	24,5 $\pm$ 2,838
		106 $\pm$ 17,448	24 $\pm$ 4,595
	50	100,5 $\pm$ 9,846	35 $\pm$ 6,236
		97 $\pm$ 8,882	32,5 $\pm$ 2,635
	<i>Média</i>	86,73	24,79
	<i>Desvio pad</i>	29,992	6,975

ND = não disponível

conclusão

Tabela 15 - Média e desvio padrão de cinco leituras de cada órgão, (fígado, pulmão e baço) para quantificação do número de macrófagos fagocitantes de cada animal seguido por média e desvio padrão de cada grupo

Grupo	Nº animal	Número de macrófagos		
		<i>Fígado</i>	<i>Pulmão</i>	<i>Baço</i>
CO-NC	5	18,6 ± 1,817	44,2 ± 17,484	167,4 ± 14,029
	12	22 ± 5,292	53,4 ± 14,977	108,8 ± 9,68
	19	18,4 ± 3,286	54,6 ± 7,197	91,2 ± 13,682
	28	23,4 ± 5,683	49,6 ± 10,9	110,4 ± 14,588
	31	25 ± 3,464	48 ± 7,874	138,6 ± 25,036
	36	19,6 ± 4,561	26,8 ± 3,033	163 ± 21,909
	42	21 ± 4,301	49,4 ± 6,731	103,8 ± 12,617
	46	24,8 ± 3,033	82,2 ± 23,36	154,8 ± 14,636
	<i>Média</i>	21,6	51,03	129,75
	<i>Desvio pad</i>	2,64	15,295	29,765
SF	4	26 ± 3,742	49,8 ± 8,815	120,6 ± 13,939
	10	24 ± 4,848	30 ± 13	134,2 ± 6,221
	16	22,8 ± 3,768	53,6 ± 12,482	108,6 ± 9,915
	21	21,2 ± 1,789	66,2 ± 18,185	136,4 ± 13,088
	29	19,4 ± 2,881	66,2 ± 8,758	126 ± 8,456
	34	18,8 ± 6,458	49,2 ± 6,419	129,4 ± 10,479
	43	24,8 ± 2,168	52,6 ± 7,829	151,8 ± 10,378
	48	28,6 ± 7,503	47,4 ± 10,31	154,8 ± 11,798
	<i>Média</i>	23,2	51,88	132,73
	<i>Desvio pad</i>	3,342	11,489	15,363
TCM/TCL	1	22,8 ± 5,215	66 ± 6,671	129,8 ± 7,662
	6	50,8 ± 10,208	79,2 ± 24,035	150,8 ± 10,849
	15	36,4 ± 3,05	90 ± 15,748	163,4 ± 12,876
	17	44,6 ± 5,683	101,4 ± 27,135	129,6 ± 10,526
	24	18 ± 1,225	56,2 ± 13,953	123,6 ± 17,953
	37	39,8 ± 5,215	95 ± 23,854	128,4 ± 14,328
	44	38,6 ± 4,561	102,2 ± 10,872	170,2 ± 13,59
	47	27,8 ± 2,683	85 ± 14,612	108,8 ± 17,341
	<i>Média</i>	34,85	84,38	138,08
	<i>Desvio pad</i>	11,144	16,522	21,165

continua

Tabela 15 – Média e desvio padrão de cinco leituras de cada órgão, (fígado, pulmão e baço) para quantificação do número de macrófagos fagocitantes de cada animal seguido por média e desvio padrão de cada grupo

Grupo	Nº animal	Número de macrófagos		
		<i>Fígado</i>	<i>Pulmão</i>	<i>Baço</i>
TCM/TCL/OP	7	48,6 ± 6,148	93,6 ± 28,387	189,8 ± 19,11
	14	40 ± 7,874	123,4 ± 35,458	157,2 ± 16,754
	20	33,6 ± 7,956	81,6 ± 23,126	130,4 ± 19,243
	23	47,8 ± 3,564	118,4 ± 18,078	202,8 ± 20,204
	35	25,8 ± 3,033	65 ± 9,247	210 ± 27,704
	38	32,4 ± 7,829	96,2 ± 8,585	182,4 ± 16,456
	41	31 ± 1,414	59 ± 13,874	163,6 ± 14,876
	52	24,6 ± 3,912	68,6 ± 17,141	126,6 ± 18,783
	<i>Média</i>	35,48	88,23	170,35
	<i>Desvio pad</i>	9,177	24,092	31,344
SMOF	3	37,6 ± 4,219	88 ± 7,81	150,4 ± 23,48
	11	29,4 ± 2,702	61,2 ± 20,462	143,4 ± 21,303
	18	33,2 ± 5,167	72,4 ± 12,973	175,2 ± 22,565
	26	30,4 ± 4,393	45 ± 6,633	161 ± 22,55
	32	32,2 ± 1,304	100 ± 16,882	152 ± 23,548
	39	28,6 ± 2,191	45,8 ± 11,904	151,6 ± 8,532
	45	34,4 ± 4,393	107,8 ± 41,349	152 ± 23,033
	50	32,4 ± 5,177	80,4 ± 14,206	169 ± 11,158
	<i>Média</i>	32,28	75,075	156,83
	<i>Desvio pad</i>	2,904	23,448	10,682

conclusão

Referências

9 REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman A, Pober JS. *Imunologia celular e molecular*. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. Cap.2, p.16-32: Células e tecidos do sistema imune.

Albers R, Bol M, Bleumink R, Willems A, Blonk C, Pieters R. Effects of dietary lipids on immune function in a murine sensitisation model. *Br J Nutr*. 2002;88(3):291-9.

Alexis NE, Lay JC, Zeman KL, Geiser M, Kapp N, Bennett WD. *In vivo* particle uptake by airway macrophages in healthy volunteers. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;34(3):305-13.

Antébi H, Mansoor O, Ferrier C, Tetegan M, Morvan C, Rangaraj J, Alcindor LG. Liver function and plasma antioxidant status in intensive care unit patients requiring total parenteral nutrition: comparison of 2 fat emulsions. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2004;28(3):142-8.

Barber MD, Fearon KC, Ross JA. Eicosapentaenoic acid modulates the immune response but has no effect on a mimic of antigen-specific responses. *Nutrition*. 2005;21(5):588-93.

Baumann KH, Hessel F, Larass I, Muller T, Angerer P, Kiefl R, von Schacky C. Dietary omega-3, omega-6, and omega-9 unsaturated fatty acids and growth factor and cytokine gene expression in unstimulated and stimulated monocytes. A randomized volunteer study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(1):59-66.

Bellinati-Pires R, Waitzberg DL, Salgado MM, Carneiro-Sampaio MM. Effect of medium- and long-chain triglycerides on human neutrophil migration. *Braz J Med Biol Res*. 1992;25(4):369-73.

Bellinati-Pires R, Waitzberg DL, Salgado MM, Carneiro-Sampaio MM. Functional alterations of human neutrophils by medium-chain triglyceride emulsions: evaluation of phagocytosis, bacterial killing, and oxidative activity. *J Leukoc Biol*. 1993;53(4):404-10.

Bellomo G, Mirabelli F. Oxidative stress injury studied in isolated intact cells. *Mol Toxicol*. 1987-1988;1(4):281-93.

Bertevello PL. *Modulação da resposta inflamatória e citocínica na colite experimental em ratos: efeito de diferentes emulsões lipídicas parenterais* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002.

Blok WL, de Bruijn MF, Leenen PJ, Eling WM, van Rooijen N, Stanley ER, Buurman WA, van der Meer JW. Dietary n-3 fatty acids increase spleen size and postendotoxin circulating TNF in mice; role of macrophages, macrophage precursors, and colony-stimulating factor-1. *J Immunol*. 1996;157(12):5569-73.

Boyden S. The chemotactic effects of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med*. 1962;115:453-66.

Buenestado A, Cortijo J, Sanz MJ, Naim-Abu-Nabah Y, Martinez-Losa M, Mata M, Issekutz AC, Marti-Bonmati E, Morcillo EJ. Olive oil-based lipid emulsion's neutral effects on neutrophil functions and leukocyte-endothelial cell interactions. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2006;30(4):286-96.

Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56(suppl 3):S14-9.

Campos FG, Waitzberg DL, Habr-Gama A, Logullo AF, Noronha IL, Jancar S, Torrinhas RS, Fürst P. Impact of parenteral n-3 fatty acids on experimental acute colitis. *Br J Nutr*. 2002;87(S1):S83-8.

Carpentier YA, Hacquebard M. Intravenous lipid emulsions to deliver omega 3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2006;75(3):145-8.

Chan S, McCowen KC, Bistrian B. Medium-chain triglyceride and n-3 polyunsaturated fatty acid-containing emulsions in intravenous nutrition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 1998;1(2):163-9.

COBEA - Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação em Animais. *Manual para Técnicos em Bioterismo*. 2ª edição, São Paulo; 1996.

Cukier C, Waitzberg DL, Logullo AF, Bacchi CE, Travassos VH, Torrinhas RS, Soares SR, Saldiva PH, Oliveira TS, Heymsfield S. Lipid and lipid-free total parenteral nutrition: differential effects on macrophages phagocytosis in rats. *Nutrition*. 1999;15(11-12):885-9.

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(11):1829-36.

de Oliveira DE, Bacchi MM, Macarenco RS, Tagliarini JV, Cordeiro RC, Bacchi CE. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infection, p53

expression, and cellular proliferation in laryngeal carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2006;126(2):284-93.

Dionigi P, Dionigi R, Prati U, Pavesi F, Jemos V, Nazari S. Effect of intralipid on some immunological parameters and leukocyte functions in patients with esophageal and gastric cancer. *Clin Nutr.* 1985;4(4):229-34.

Driscoll DF, Ling PR, Bistran BR. Pathological consequences to reticuloendothelial system organs following infusion of unstable all-in-one mixtures in rats. *Clin Nutr.* 2006;25(5):842-50.

El Seweid MM, El-Swefy SE, Abdallah FR, Hashem RM. Dietary fatty acid unsaturation levels, lipoprotein oxidation and circulating chemokine in experimentally induced atherosclerotic rat. *J Pharm Pharmacol.* 2005;57(11):1467-74.

Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MVJ. Experimental models in research. *Acta Cir Bras.* 2005;20(S2):28-34. [citado 09 maio 2007]. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/acb/v20s2/v20s2a08.pdf>.

Galizia MS, Alves CC, Tamanaha RB, Torrinhas RS, Leite FC, Neto AH, Gama-Rodrigues J, Waitzberg DL. A new swivel model for parenteral and enteral infusion in rats. *J Surg Res.* 2005;128(1):3-8.

Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero MC, Garcia-Garmendia JL, Pérez-Paredes C, Moyano-Del Estad MR, Barrero-Almodóvar A, Jiménez-Jiménez FJ. Effects of three intravenous lipid emulsions on the survival and mononuclear phagocyte function of septic rats. *Nutrition.* 2002;18(9):751-4.

Gogos CA, Kalfarentzos FE, Zoumbos NC. Effect of different types of total parenteral nutrition on T-lymphocyte subpopulations and NK cells. *Am J Clin Nutr.* 1990;51(1):119-22.

Gorjão R, Verlengia R, Martins de Lima T, Soriano FG, Cury-Boaventura MF, Kanunfre CC, Peres CM, Sampaio SC, Otton R, Folador A, Martins EF, Pithon-Curi TC, Portioli EP, Newsholme P, Curi R. Effect of docosahexaenoic acid-rich fish oil supplementation on human leukocyte function. *Clin Nutr.* 2006;25(6):923-38.

Granato D, Blum S, Rossle C, Le Boucher J, Malnoe A, Dutot G. Effects of parenteral lipid emulsions with different fatty acid composition on immune cell functions in vitro. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2000;24(2):113-8.

Gregory JL, Morand EF, McKeown SJ, Ralph JA, Hall P, Yang YH, McColl SR, Hickey MJ. Macrophage migration inhibitory factor induces macrophage recruitment via CC chemokine ligand 2. *J Immunol.* 2006;177(11):8072-9.

Grimm H, Mertes N, Goeters C, Schlotzer E, Mayer K, Grimminger F, Fürst P. Improved fatty acid and leukotriene pattern with a novel lipid emulsion in surgical patients. *Eur J Nutr.* 2006;45(1):55-60.

Hamawy KJ, Moldawer LL, Georgieff M, Valicenti AJ, Babayan VK, Bistrian BR, Blackburn GL. The Henry M. Vars Award. The effect of lipid emulsions on reticuloendothelial system function in the injured animal. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1985;9(5):559-65.

Hardardottir I, Kinsella JE. Increasing the dietary (n-3) to (n-6) polyunsaturated fatty acid ratio increases tumor necrosis factor production by

murine resident peritoneal macrophages without an effect on elicited peritoneal macrophages. *J Nutr.* 1992;122(10):1942–51.

Hinton PS, Peterson CA, McCarthy DO, Ney DM. Medium-chain compared with long-chain triacylglycerol emulsions enhance macrophage response and increase mucosal mass in parenterally fed rats. *Am J Clin Nutr.* 1998;67(6):1265-72.

Hirschberg Y, Pomposelli JJ, Mascioli EA, Bistran BR, Blackburn GL. Effect of tracer and intravenous fat emulsion on the measurement of reticuloendothelial system function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1990;14(5):463-6.

Jensen GL, Mascioli EA, Seidner DL, Istfan NW, Domnitch AM, Babayan VK, Blackburn GL, Bistran BR. Parenteral infusion of long - and medium-chain triglycerides and reticuloendothelial system function in man. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1990;14(5):467-71.

Johnson PD, Besselsen DG. Practical aspects of experimental design in animal research. *ILAR J.* 2002;43(4):202-6.

Kew S, Gibbons ES, Thies F, McNeill GP, Quinlan PT, Calder PC. The effect of feeding structured triacylglycerols enriched in eicosapentaenoic or docosahexaenoic acids on murine splenocyte fatty acid composition and leucocyte phagocytosis. *Br J Nutr.* 2003;90(6):1071-80.

Kilian M, Heukamp I, Gregor JI, Bretthauer C, Walz MK, Jacobi CA, Lochs H, Schimke I, Guski H, Wenger FA. N-3, n-6, and n-9 polyunsaturated fatty acids - which composition in parenteral nutrition decreases severity of acute

hemorrhagic necrotizing pancreatitis in rats? *Int J Colorectal Dis.* 2006;21(1):57-63.

Koletzko B, Goulet O, Hunt J, Krohn K, Shamir R and the Parenteral Nutrition Guidelines Working Group. Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR) – Section 4: Lipids. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005;41(S2):S19-27.

Kruimel JW, Naber AH, Curfs JH, Wenker MA, Jansen JB. With medium-chain triglycerides, higher and faster oxygen radical production by stimulated polymorphonuclear leukocytes occurs. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2000;24(2):107-12.

Lanza-Jacoby S, Flynn JT, Miller S. Parenteral supplementation with a fish-oil emulsion prolongs survival and improves rat lymphocyte function during sepsis. *Nutrition.* 2001;17(2):112-6.

Lenssen P, Bruemmer BA, Bowden RA, Gooley T, Aker SN, Mattson D. Intravenous lipid dose and incidence of bacteremia and fungemia in patients undergoing bone marrow transplantation. *Am J Clin Nutr.* 1998;67(5):927-33.

Li L, Yang G, Li Q, Tang Y, Li K. High-fat- and lipid-induced insulin resistance in rats: the comparison of glucose metabolism, plasma resistin and adiponectin levels. *Ann Nutr Metab.* 2006;50(6):499-505.

Lima-Gonçalves E, Yamagushi N, Waitzberg DL, Mello Filho GB. Nutrição parenteral em ratos: aspectos técnicos. *Acta Cir Bras*. 1990;5:17-22.

Lin MT, Yeh SL, Yeh CL, Lai YN, Chang KJ, Lee PH, Chen WJ. Parenteral n-3 fatty acids modulate inflammatory and immune response in rats undergoing total gastrectomy. *Shock*. 2006;25(1):56-60.

Lyons BA, Watkins M, Simpson CC, Konrad Muller H. Modulation of lymphocyte migration to the murine spleen after marginal zone macrophage phagocytosis of blood-borne particulate material. *Immunol Invest*. 2006;35(1):75-92.

Mayer K, Gokorsch S, Fegbeutel C, Hattar K, Rosseau S, Walmrath D, Seeger W, Grimminger F. Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(10):1321-8.

Mayer K, Schaefer MB, Seeger W. Fish oil in the critically ill: from experimental to clinical data. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2006;9(2):140-8.

Mertes N, Grimm H, Fürst P, Stehle P. Safety and efficacy of a new parenteral lipid emulsion (SMOFlipid) in surgical patients: a randomized, double-blind, multicenter study. *Ann Nutr Metab*. 2006;50(3):253-9.

Morlion BJ, Torwesten E, Lessire H, Sturm G, Peskar BM, Fürst P, Puchstein C. The effect of parenteral fish oil on leukocyte membrane fatty acid composition and leukotriene-synthesizing capacity in patients with postoperative trauma. *Metabolism*. 1996;45(10):1208-13.

- Moussa M, Le Boucher J, Garcia J, Tkaczuk J, Ragab J, Dutot G, Ohayon E, Ghisolfi J, Thouvenot JP. In vivo effects of olive oil-based lipid emulsion on lymphocyte activation in rats. *Clin Nutr.* 2000;19(1):49-54.
- Nohé B, Ruoff H, Johannes T, Zanke C, Unertl K, Dieterich HJ. A fish oil emulsion used for parenteral nutrition attenuates monocyte-endothelial interactions under flow. *Shock.* 2002;18(3):217-22.
- Nordenstrom J, Jarstrand C, Wiernik A. Decreased chemotactic and random migration of leukocytes during Intralipid infusion. *Am J Clin Nutr.* 1979;32(12):2416-22.
- Niggli V. Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(12):1619-38.
- Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GE, Dypbukt JM, Nicotera P. Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol.* 1992;32 Suppl:S33-42.
- Petroianu A. Avaliação da função fagocitária em remanescentes de esplenectomia subtotal e auto-implante esplênico autógeno. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2003;25(1):25-31.
- Petursdottir DH, Olafsdottir I, Hardardottir I. Dietary fish oil increases tumor necrosis factor secretion but decreases interleukin-10 secretion by murine peritoneal macrophages. *J Nutr.* 2002;132(12):3740-3.
- Petursdottir DH, Hardardottir I. Dietary fish oil increases the number of splenic macrophages secreting TNF-alpha and IL-10 but decreases the secretion of these cytokines by splenic T cells from mice. *J Nutr.* 2007;137(3):665-70.

Pontes-Arruda A, Teles J, Silva E, Machado F, Baptista Filho M, Rocha E, Silva C. Parenteral nutrition in the intensive care unit: can we deliver better care to our patients? Preliminary results from a multicenter, prospective, cohort study [abstract]. *Crit Care*. 2007;11(S2):P157.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993; 123(11):1939-51.

Reimund JM, Scheer O, Muller CD, Pinna G, Duclos B, Baumann R. *In vitro* modulation of inflammatory cytokine production by three lipid emulsions with different fatty acid compositions. *Clin Nutr*. 2004;23(6):1324-32.

Sala-Vila A, Barbosa VM, Calder PC. Olive oil in parenteral nutrition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10(2):165-74.

Santos RTM, Wakamatsu A, Kanamura CT, Nonogaki S, Pinto GA. Procedimentos histológicos para exames imunohistoquímicos. In: Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J. *Manual de Imunohistoquímica*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999. p. 237-59.

Schauder P, Rohn U, Schafer G, Korff G, Schenk HD. Impact of fish oil enriched total parenteral nutrition on DNA synthesis, cytokine release and receptor expression by lymphocytes in the postoperative period. *Br J Nutr*. 2002;87 Suppl 1:S103-10.

Schlotzer E and Kanning U. Elimination and tolerance of a new parenteral lipid emulsion (SMOF) - a double-blind cross-over study in healthy male volunteers. *Ann Nutr Metab.* 2004; 48(4):263-8.

Sedman PC, Ramsden CW, Brennan TG, Guillou PJ. Pharmacological concentrations of lipid emulsions inhibit interleukin-2-dependent lymphocyte responses in vitro. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1990;14(1):12-7.

Sedman PC, Somers SS, Ramsden CW, Brennan TG, Guillou PJ. Effects of different lipid emulsions on lymphocyte function during total parenteral nutrition. *Br J Surg.* 1991;78(11):1396-9.

Senkal M, Geier B, Hannemann M, Deska T, Linseisen J, Wolfram G, Adolph M. Supplementation of omega-3 fatty acids in parenteral nutrition beneficially alters phospholipid fatty acid pattern. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2007;31(1):12-7.

Shaw R, Festing MF, Peers I, Furlong L. Use of factorial designs to optimize animal experiments and reduce animal use. *ILAR J.* 2002;43(4):223-32.

Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother.* 2002;56(8):365-79.

Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharmacother.* 2006;60(9):502-7.

Sobrado J, Moldawer LL, Pomposelli JJ, Mascioli EA, Babayan VK, Bistran BR, Blackburn GL. Lipid emulsions and reticuloendothelial system function in healthy and burned guinea pigs. *Am J Clin Nutr.* 1985;42(5):855-63.

- Sperling R, Benincaso A, Knoell CT, Larkin JK, Austen KF, Robinson DR. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils. *J Clin Invest*. 1993;91(2):651-60.
- Ton MN, Chang C, Carpentier YA, Deckelbaum RJ. *In vivo* and *in vitro* properties of an intravenous lipid emulsion containing only medium chain and fish oil triglycerides. *Clin Nutr*. 2005;24(4):492-501.
- Turner SR, Campbell JA, Lynn WS. Polymorphonuclear leukocyte chemotaxis toward oxidized lipid components of cell membranes. *J Exp Med*. 1975;141(6):1437-41.
- Tuwaijri A, Saad AH. Reevaluation of some of the kinetics of carbon colloid clearance by the mononuclear phagocyte system in vivo. *Br J Exp Pathol*. 1986;67(2):251-8.
- Vasconcellos LS, Sabino KR, Petroianu A. Influência da ooforectomia e da gravidez na função fagocitária do sistema mononuclear fagocitário em modelo experimental. *J Bras Patol Med Lab*. 2005;41(3):153-8.
- Vollmar B, Bauer C, Menger MD. N-3 polyunsaturated fatty acid-enriched diet does not protect from liver injury but attenuates mortality rate in a rat model of systemic endotoxemia. *Crit Care Med*. 2002;30(5):1091-8.
- Wachtler P, König W, Senkal M, Kemen M, Koller M. Influence of a total parenteral nutrition enriched with omega-3 fatty acids on leukotriene synthesis of peripheral leukocytes and systemic cytokine levels in patients with major surgery. *J Trauma*. 1997;42(2):191-8.

Waitzberg DL. *Efeito de emulsões lipídicas sobre mecanismos de defesa orgânica na agressão infecciosa: estudo experimental do comportamento dos leucócitos polimorfonucleares*. [tese livre docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1990.

Waitzberg DL, Bellinati-Pires R, Yamaguchi N, Massali-Oku S, Salgado MM, Hypolito IP, Soares SC, Lima-Gonçalves E, Fürst P. Influence of medium-chain triglyceride-based lipid emulsion on rat polymorphonuclear cell functions. *Nutrition*. 1996;12(2):93-9.

Waitzberg DL, Bellinati-Pires R, Salgado MM, Hypolito IP, Colleto GMDD, Yagi O, Yamamuro EM, Gama-Rodrigues J, Pinotti HW. Effect of total parenteral nutrition with different lipid emulsions on human monocyte and neutrophil functions. *Nutrition*. 1997;13(2):128-32.

Waitzberg DL, Torrinhas RS, Jacintho TM. New parenteral lipid emulsions for clinical use. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2006;30(4):351-67.

Wanten GJ, Naber AH, Kruimel JW, Tool A, Roos D, Jansen JB. Influence of structurally different lipid emulsions on human neutrophil oxygen radical production. *Eur J Clin Invest*. 1999;29(4):357-63.

Wanten GJ, Roos D, Naber AH. Effects of structurally different lipid emulsions on human neutrophil migration. *Clin Nutr*. 2000;19(5):327-31.

Wanten GJ, van Emst-de Vries S, Naber T, Willems P. Nutritional lipid emulsions modulate cellular signaling and activation of human neutrophils. *J Lipid Res*. 2001;42(3):428-36.

Wanten GJ, Kusters A, van Emst-de Vries S, Tool A, Roos D, Naber T, Willems P. Lipid effects on neutrophil calcium signaling induced by opsonized particles: platelet activating factor is only part of the story. *Clin Nutr.* 2004;23(4):623-30.

Wanten GJ, Calder PC. Immune modulation by parenteral lipid emulsions. *Am J Clin Nutr.* 2007;85(5):1171-84.

Weiss G, Meyer F, Matthies B, Pross M, Koenig W, Lippert H. Immunomodulation by perioperative administration of n-3 fatty acids. *Br J Nutr.* 2002;87 Suppl 1:S89-94.

Wirtitsch M, Wessner B, Spittler A, Roth E, Volk T, Bachmann L, Hiesmayr M. Effect of different lipid emulsions on the immunological function in humans: a systematic review with meta-analysis. *Clin Nutr.* 2007;26(3):302-13.

Witmer-Pack MD, Crowley MT, Inaba K, Steinman RM. Macrophages, but not dendritic cells, accumulate colloidal carbon following administration in situ. *J Cell Sci.* 1993;105:965-73.

Yeh SL, Chao CY, Lin MT, Chen WJ. Effects of parenteral infusion with medium-chain triglycerides and safflower oil emulsions on hepatic lipids, plasma amino acids and inflammatory mediators in septic rats. *Clin Nutr.* 2000;19(2):115-20.

Yaqoob P. Lipids and the immune response: from molecular mechanisms to clinical applications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2003;6(2):133-50.