



ÉERICA TAINÃ MENDES DE OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM
ÓLEO DE PEIXE NA CONCENTRAÇÃO DE LIPÍDEOS
HEPÁTICOS EM MODELO DE HIPERALIMENTAÇÃO
PÓS-NATAL**

LAVRAS-MG

2019

ÉRICA TAINÃ MENDES DE OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM ÓLEO DE PEIXE NA
CONCENTRAÇÃO DE LIPÍDEOS HEPÁTICOS EM MODELO DE
HIPERALIMENTAÇÃO PÓS-NATAL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do Curso
de Nutrição, para a obtenção do título de
Bacharel.

Prof.^a Dra. Laura Cristina Jardim Pôrto

Orientadora

Mestranda: Brenda Loise Monteiro

Coorientadora

LAVRAS-MG

2019

ÉERICA TAINÃ MENDES DE OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM ÓLEO DE PEIXE NA
CONCENTRAÇÃO DE LIPÍDEOS HEPÁTICOS EM MODELO DE
HIPERALIMENTAÇÃO PÓS-NATAL**

**INFLUENCE OF MATERNAL SUPPLEMENTATION WITH FISH OIL ON THE
CONCENTRATION OF HEPATIC LIPIDS IN A POST-NATAL
OVERNUTRITION MODEL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do Curso
de Nutrição, para a obtenção do título de
Bacharel.

APROVADA em ____ de Novembro de 2019

Prof.^a Dra. Laura Cristina Jardim Pôrto UFLA

Brenda Loise Monteiro UFLA

Prof.^a Dra. Laura Cristina Jardim Pôrto

Orientadora

LAVRAS-MG

2019

Este trabalho foi elaborado de acordo com as normas da revista Arquivos Brasileiros de Cardiologia, ISSN: 1678-4170.

INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM ÓLEO DE PEIXE NA CONCENTRAÇÃO DE LIPÍDEOS HEPÁTICOS EM MODELO DE HIPERALIMENTAÇÃO PÓS-NATAL

INFLUENCE OF MATERNAL SUPPLEMENTATION WITH FISH OIL ON THE CONCENTRATION OF HEPATIC LIPIDS IN A POST-NATAL OVERNUTRITION MODEL

INFLUÊNCIA DO ÓLEO DE PEIXE NOS LIPÍDEOS HEPÁTICOS.

Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar a influência da suplementação materna com óleo de peixe na concentração de lipídeos hepáticos em modelo de hiperalimentação pós-natal. Camundongos fêmeas foram suplementadas com óleo de peixe ou água (1g/kg/dia via gavagem) desde o período de acasalamento até o desmame (21º dia após o nascimento). Após o nascimento, as ninhadas foram remanejadas para a formação dos grupos experimentais, sendo os grupos Controle (C) e Controle + óleo de Peixe (COP), ambos com 8-10 filhotes por ninhada; e Hiperalimentação Pós-natal (H) e Hiperalimentação pós natal + Óleo de Peixe (HOP), cujas ninhadas foram reduzidas para 3-4 filhotes. O peso corporal e o consumo alimentar foram aferidos semanalmente durante todo o experimento. Após 120 dias, os animais foram eutanasiados para coleta dos tecidos de interesse para o estudo. O conteúdo total de lipídeos hepáticos foi extraído pelo método de Folch et al (1957) e as concentrações hepáticas de colesterol e triglicerídeos foram dosadas através de kit comercial. O peso corporal do grupo H foi maior em relação ao grupo C aos 21 e 120 dias de vida. O grupo HOP apresentou menor ganho de peso em comparação com o grupo H, aos 21 dias de vida. Não foi observada diferença significativa no consumo alimentar entre os grupos, durante todo o período experimental. O peso do fígado foi maior nos animais hiperalimentados sem óleo de peixe H em relação ao seu grupo controle C, entretanto não foi observado diferença no conteúdo de lipídeos totais e colesterol hepático entre os grupos hiperalimentado H, hiperalimentado com óleo de peixe HOP, controle C e controle com óleo de peixe COP. Quanto ao

triglicerídeo hepático, o grupo H apresentou maior concentração em relação ao seu grupo controle C. A suplementação materna com óleo de peixe foi capaz de melhorar o perfil lipídico da prole hiperalimentada.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 MÉTODOS	7
2.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	8
2.2 EUTANÁSIA	9
2.3 CONTEÚDO DE LIPÍDEOS NO TECIDO HEPÁTICO	9
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	9
3 RESULTADOS	9
4 DISCUSSÃO	13
5 CONCLUSÕES	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, que cursa com prejuízos à saúde dos indivíduos, dentre elas a esteatose hepática¹. Apresenta causas multifatoriais que envolvem aspectos ambientais e genéticos. Segundo dados do VIGITEL 2019, mais da metade da população, 55,7% apresenta excesso de peso no Brasil, um aumento de 30,8% nos últimos 13 anos, fato atribuído às mudanças alimentares, estilo de vida e fator socioeconômico ao longo dos anos². A obesidade está associada com a maior deposição de gordura no fígado, o que favorece o desenvolvimento de esteatose hepática e esteato-hepatite não alcoólica (NASH)¹.

Estudos envolvendo a programação metabólica vêm despertando interesse na comunidade científica, uma vez que alterações na vida intrauterina e na fase de lactação podem repercutir processos metabólicos e fisiológicos na vida adulta. A hiperalimentação no período pós-natal vem sendo associada a uma alteração no controle da fome e saciedade e no controle do gasto energético, favorecendo o desenvolvimento da obesidade e distúrbios associados durante a fase adulta³.

Alguns nutrientes e compostos bioativos atuam modulando as vias imunometabólicas de interesse para o estudo da obesidade. O óleo de peixe, rico em ácidos graxos essenciais da série ômega-3 (n-3), em especial os ácidos eicosapentanóico (EPA) e decosahexaenóico (DHA), possui, propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes⁴, contribuindo para o manejo de prejuízos metabólicos e inflamatórios associados ao excesso de gordura corporal⁵. Esse trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da suplementação materna com óleo de peixe na concentração de lipídeos hepáticos em modelo de hiperalimentação pós-natal.

2 MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição Experimental (LNE) do Departamento de Nutrição (DNU) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), sendo aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) sob o

protocolo 002/2018. A duração do período experimental foi de aproximadamente 180 dias.

2.1 Delineamento Experimental

Inicialmente foram obtidos no Biotério Central da UFLA 40 camundongos C57BL/6, sendo 10 machos e 30 fêmeas. Durante todo o período experimental os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura controlada em $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, e consumo de ração padrão e água *ad libitum*. Após a aquisição dos animais, as fêmeas foram separadas em 10 caixas ($n=3$) e mantidas durante 15 dias para adaptação e sincronização do ciclo estral. Após este período, um macho foi adicionado junto a cada 3 fêmeas para acasalamento durante um período de 10 dias. Após o acasalamento os machos foram descartados e as fêmeas permaneceram juntas até o nascimento dos filhotes. Entre o período de acasalamento até o desmame dos filhotes, que ocorreu com 21 dias de vida, 15 fêmeas foram suplementadas diariamente, por gavagem com óleo de peixe em dose de 1g/Kg de peso corporal, enquanto as demais receberam água em mesma dosagem. O óleo de peixe utilizado foi doado pela Fundação Herbarium (Curitiba, PR, Brasil), sendo rico em ácidos graxos n-3, contendo 0,828g/cápsula, na proporção de 0,120g de EPA e 0,300g DHA.

No segundo dia após o nascimento dos filhotes, as ninhadas foram remanejadas para a formação dos modelos experimentais de interesse, seguindo modelo proposto por Habbout⁶. O modelo de hiperalimentação neonatal foi implementado com a redução da ninhada original para 3-4 filhotes e deu origem aos grupos Hiperalimentação (H) e Hiperalimentação com Óleo de Peixe (HOP), para a formação dos grupos controle (C) e controle com Óleo de Peixe (COP) as ninhadas originais de 8-10 filhotes foram mantidas. Após o período de lactação os animais desmamados foram separados por sexo, e apenas os machos foram utilizados para o estudo. O peso corporal e o consumo alimentar dos animais foram aferidos semanalmente por balança analítica.

2.2 Eutanásia

Após jejum de 12 horas, os animais foram eutanasiados para a coleta dos tecidos de interesse para o estudo, por técnica de exsanguinação, após receberem injeção intraperitoneal de uma diluição preparada com PBS, cetamina e xilazina, em proporção de 4:3:1, respectivamente, sendo a dose de cetamina padronizada em 80mg/Kg de peso e de xilazina padronizada em 10mg/Kg de peso. Os tecidos adiposos perididimal e hepático foram pesados logo na sequência, utilizando balança analítica.

2.3 Conteúdo de lipídeos no tecido Hepático

Para a determinação do conteúdo de total de lipídeos hepáticos, utilizou-se o método de extração proposto por Folch⁷. A dosagem de triacilglicerol e colesterol após a extração lipídica foi determinada por kit comercial, de acordo com as instruções do fabricante.

2.4 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para análise dos dados e testes de comparação de grupos foi utilizado o software GraphPad Prism®, versão 6.0. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

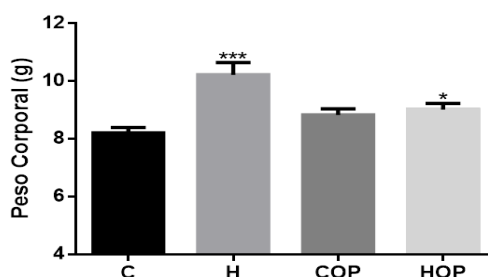
A tabela 1 representa o consumo alimentar dos grupos experimentais durante todo o período pós-desmame. Não foram observadas diferenças significativas no consumo alimentar entre os grupos experimentais.

TABELA 1: Consumo alimentar dos grupos experimentais.

	C	COP	H	HOP
1 - 3 semanas (g)	17,35±2,645	14,63±2,342	19,40±1,720	20,64±1,360
4 - 6 semanas (g)	24,58±1,315	22,62±1,287	25,08±1,747	26,46±1,189
7 - 9 semanas (g)	24,29±0,829	26,16±1,439	25,08±0,992	26,77±0,271
10 - 13 semanas (g)	23,66±0,364	25,65±0,257	24,77±1,073	25,18±0,522

Fonte: Da Autora (2019)

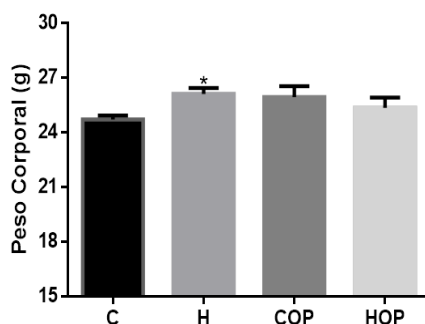
A figura 1 representa o peso corporal dos animais após 21 dias de nascimento. O grupo hiperalimentado apresentou maior peso corporal em relação ao grupo C e o OP preveniu esse aumento. Os animais do grupo HOP não apresentaram diferença significativa no peso corporal quando comparados ao grupo COP.

FIGURA 1: Peso corporal aos 21 dias de vida dos grupos experimentais.

H vs C ***($P < 0,001$); HOP vs H*($P < 0,05$).

C = Controle, H = Hiperalimentado, COP = Controle com Óleo de Peixe, HOP = Hiperalimentado com Óleo de Peixe.

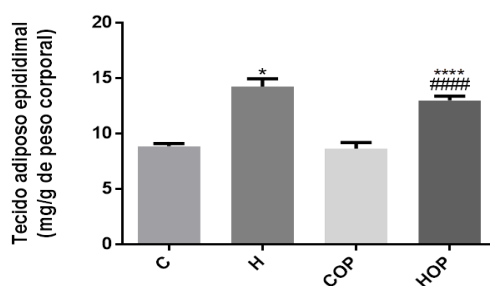
A figura 2 representa o peso corporal dos animais com 120 dias. Observa-se que não houve diferença significativa entre os grupos H e HOP, entretanto, o grupo H permanece com maior ganho de peso em comparação com o grupo C.

FIGURA 2: Peso corporal aos 120 dias de vida dos grupos experimentais.

H vs C *($p < 0,05$).

C = Controle, H = Hiperalimentado, COP = Controle com Óleo de Peixe, HOP = Hiperalimentado com Óleo de Peixe.

A figura 3 representa o peso do tecido adiposo epididimal corrigido pelo peso corporal dos animais. Foi observado que os animais hiperalimentados H e hiperalimentados com óleo de peixe HOP apresentaram maior conteúdo adiposo em comparação com os seus respectivos controles, grupo C controle do grupo H, e grupo COP controle do grupo HOP.

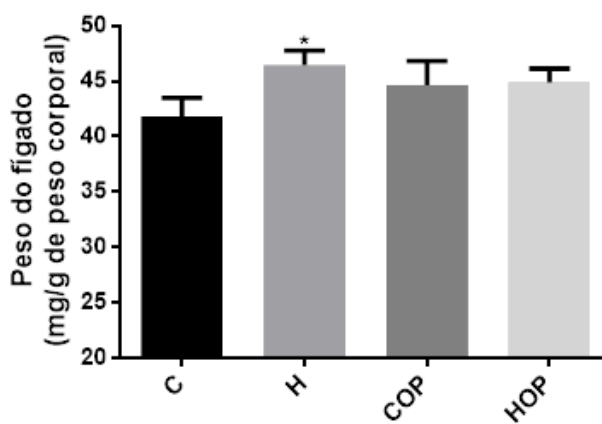
FIGURA 3: Peso Tecido Adiposo epididimal corrigido pelo peso corporal dos grupos experimentais.

H vs C *($p < 0,05$); HOP vs C ***($p < 0,001$); HOP vs COP($p < 0,0001$).

C = Controle, H = Hiperalimentado, COP = Controle com Óleo de Peixe, HOP = Hiperalimentado com Óleo de Peixe.

A figura 4 representa o peso do fígado corrigido pelo peso corporal dos animais. Nota-se que o grupo H apresentou peso do fígado aumentado em comparação com o grupo C, enquanto o mesmo não foi observado no grupo HOP.

FIGURA 4: Peso Fígado corrigido pelo peso corporal dos grupos experimentais .



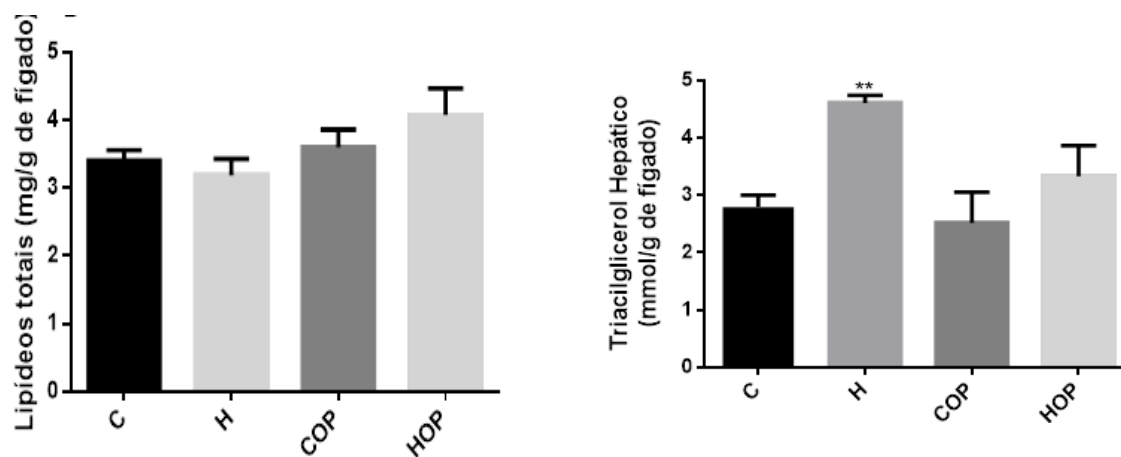
H vs C *($p < 0,05$).

C = Controle, H = Hiperalimentado, COP = Controle com Óleo de Peixe, HOP = Hiperalimentado com Óleo de Peixe.

A figura 5A representa o conteúdo total de lipídeos hepáticos, onde não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. A figura 5B mostra o triacilglicerol hepático dos grupos experimentais. O grupo H apresentou maior concentração em relação ao grupo C, enquanto o grupo HOP manteve a concentração hepática de triacilglicerol semelhante aos animais controle. A figura 5C representa o colesterol hepático, onde não houve diferença significativa entre os grupos analisados.

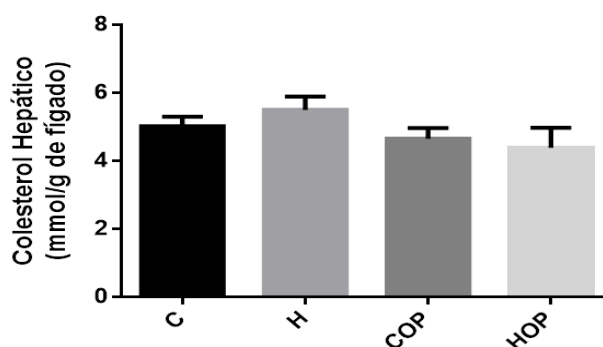
FIGURA 5A: Conteúdo total de lipídeos hepáticos dos grupos experimentais. **FIGURA 5B:** Triacilglicerol Hepático.

FIGURA 5C: Colesterol hepático.



H vs C **($p < 0,01$).

C = Controle, H = Hiperalimentado, COP = Controle com Óleo de Peixe, HOP = Hiperalimentado com Óleo de Peixe.



C = Controle, H = Hiperalimentado, COP = Controle com Óleo de Peixe, HOP = Hiperalimentado com Óleo de Peixe.

4 DISCUSSÃO

Dados da VIGITEL (2019) indicam que mais da metade da população brasileira apresenta excesso de peso. Sabe-se que a obesidade é um grande precursor para o desenvolvimento de comorbidades metabólicas, e que fatores genéticos e ambientais apresentam grande importância no controle do peso, composição corporal e na regulação da resposta metabólica⁸⁻⁹. Estudos mostram

que a obesidade e o aumento de peso materno durante a gestação têm influência no aumento de peso e obesidade da prole a curto e longo prazo; e a obesidade durante no início da vida está associada à vida intrauterina e neonatal¹⁰⁻¹¹.

A suplementação materna com óleo de peixe foi capaz de melhorar o perfil lipídico da prole hiperalimentada em comparação ao seu grupo controle no presente estudo. Estudos experimentais com roedores mostram que, mesmo com um alto consumo de lipídeos, quando incorporado ácido graxo ômega-3 na dieta, os mesmos apresentaram uma redução no acúmulo de gordura corporal¹²⁻¹⁶. Portanto, a suplementação materna com óleo de peixe durante a gestação e lactação, pode exercer efeito positivo na prevenção do ganho de peso excessivo dos animais hiperalimentados como foi possível observar no estudo presente.

O trabalho de Zivkovic et al.¹⁷, demonstrou que a suplementação diária com um grama de óleo de peixe (ômega-3) em camundongos, reduz a concentração plasmática de triglicerídeos e das enzimas marcadoras de danos hepáticos, além de reduzir o grau de esteatose hepática; com o aumento da dose diária para duas gramas, observou-se a regressão da esteatose hepática e redução dos níveis de TNF α ¹⁷. Essas informações indicam que o óleo de peixe apresenta importante papel na melhora do perfil lipídico, redução da inflamação ocasionada pela obesidade e redução de danos hepáticos decorrentes do acúmulo de gordura.

As observações feitas no estudo presente e nos estudos citados se deve a forma em que o óleo de peixe ômega-3 age no organismo competindo com o ácido araquidônico na formação de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos; produzindo uma inibição da agregação plaquetária (efeito anti-trombótico) e estimulando a vasodilatação; produzi efeitos antiinflamatórios e reduzi a quimiotaxia dos leucócitos; inibi a síntese de triglicerídios em nível hepático e inibi a secreção de VLDL; favorece a secreção hepática de VLDL de menor tamanho, que se transforma em LDL de maior tamanho, consideradas não aterogênicas; estimula o transporte reverso de colesterol, favorecer sua captação pelo fígado e sua eliminação pela via biliar.

O estudo presente indica que o óleo de peixe se apresenta como potencial terapêutica adjuvante na prevenção e tratamento dos distúrbios metabólicos associados à obesidade. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos pelos quais a suplementação indireta pode exercer esses efeitos.

5 CONCLUSÕES

A suplementação materna com óleo de peixe se apresenta como alternativa para a prevenção do excesso de peso corporal e das alterações no perfil lipídico hepático. Entretanto, são necessários mais estudos para melhor elucidar os mecanismos pelos quais a suplementação indireta age através da programação metabólica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Zamin Jr I et al. Modelo experimental de esteatohepatite não-alcoólica com dieta deficiente em metionina e colina. *Arquivos de Gastroenterologia*. 2009 03;46(1):69 – 74.
- [2] de Oliveira Pinheiro AR, de Freitas SFT, Corso ACT. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. *Revista de Nutrição*. 2004 12;17(4):523 – 533.
- [3] HANLEY, et. al. Metabolic imprinting, programming and epigenetics – a review of present priorities and future opportunities. *British Journal Of Nutrition*, [s.l.]. 2010; 104(1):1-25.
- [4] Martin CA et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição*. 2006 12;19(6):761 – 770.
- [5] Dias PC, Henriques P, Anjos LAD, Burlandy L. Obesidade e políticas públicas: concepções e estratégias adotadas pelo governo brasileiro. *Cad Saúde Pública*. 2017; 33(7): e00006016
- [6] Habbout, A et. al. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences. *The Journal Of Nutrition*, [s.l.]. 2013; 143(5): 553-562.

- [7] Folch J, Lees M. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 1957; 226(1): 497-509.
- [8] Cai GJ, Sun XX, Zhang L, Hong Q. Association between maternal body mass index and congenital heart defects in offspring: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol*. 2014;211(2):91-117.
- [9] Aune D, Saugstad OD, Henriksen T, Tonstad S. Maternal body mass index and the risk of fetal death, stillbirth, and infant death: a systematic review and meta. 2014; 311(15):1536-46.
- [10] Mamun AA, Mannan M, Doi SA. Gestational weight gain in relation to offspring obesity over the life course: a systematic review and bias-adjusted meta-analysis. *Obs Rev*. 2014;15(4):338-47.
- [11] Tie HT et al. Risk of childhood overweight or obesity associated with excessive weight gain during pregnancy: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2014; 289(2):247-57.
- [12] Cunnane S, Mcadoo K, Horrobin D. n-3 essential fatty acids decrease weight gain in genetically obese mice. *Br. J. Nutr*, 1986; 56(1):87-95.
- [13] Belzung F, Raclot, T, Groscolas, R. Fish oil n-3 fatty acids selectively limit the hypertrophy of abdominal fat depots in growing rats fed high-fat diets. *Am J Physiol*. 1993; 264(6):R1111-18.
- [14] Hainault I, Carlotti M, Hajduch E, Guichard C., Lavau, M. Fish oil in a high lard diet prevents obesity, hyperlipidemia, and adipocyte insulin resistance in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1993; 683(14):98-101.
- [15] Baillie R, Takada R, Nakamura M, Clarke S. Coordinate induction of peroxisomal acyl-CoA oxidase and UCP-3 by dietary fishoil: a mechanism for decreased body fat deposition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1999; 60(5-6):351-56.
- [16] Ruzickova J et al. Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids*. 2004; 39(12):1177-1185.

[17] Zivkovic AM, German JB, Sanyal AJ. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr.* 2009; 86(2): 285-300.