



ANA PAULA BRASILEIRO BORGES ASSIS

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM ÓLEO DE
PEIXE NO PERFIL GLICÊMICO DE CAMUNDONGOS
HIPERALIMENTADOS**

LAVRAS – MG

2019

ANA PAULA BRASILEIRO BORGES ASSIS

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM ÓLEO DE
PEIXE NO PERFIL GLICÊMICO DE CAMUNDONGOS
HIPERALIMENTADOS**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Programa de Graduação em Nutrição como parte dos requisitos para obtenção do título Graduação em Nutrição.

Profa. Dra. Laura Cristina Jardim Porto Pimenta

Orientadora

Brenda Loise Monteiro

Coorientadora

LAVRAS - MG

2019

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	5
MATERIAIS E MÉTODOS	6
RESULTADOS	8
DISCUSSÃO	11
CONCLUSÃO	12
REFERÊNCIAS	12

RESUMO

Objetivo: Investigar o efeito da suplementação materna com óleo de peixe sobre o perfil glicêmico de camundongos hiperalimentados no período pós-natal.

Métodos: O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição Experimental (LNE) do Departamento de Nutrição (DNU) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), com duração de 180 dias. Foram formados grupos experimentais de acordo com o interesse do estudo, através do remanejamento de ninhadas - Hiperalimentação (H) e Hiperalimentação com Óleo de Peixe (HOP); Controle (C) e Controle com Óleo de Peixe (COP). O peso corporal e a ingestão alimentar dos animais foram monitorados ao longo do experimento. O teste de tolerância oral à glicose (TTOG) foi realizado aos 70 e 120 dias de vida dos animais. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism, versão 6.0.

Resultados: A hiperalimentação pós-natal promoveu aumento no peso corporal e na massa adiposa, bem como diminuição na tolerância à glicose aos 70 e 120 dias de vida, mesmo com a ingestão alimentar similar entre os grupos experimentais em todo o período pós-desmame. A suplementação materna com óleo de peixe foi capaz de prevenir o ganho de peso excessivo, decorrente do modelo de hiperalimentação pós-natal, e ainda, o grupo HOP apresentou melhor tolerância à glicose aos 120 dias de vida.

Conclusões: A suplementação materna com óleo de peixe foi eficaz em prevenir o excesso de peso corporal, bem como melhorar a tolerância à glicose na prole hiperalimentada.

Descritores: Hiperalimentação Pós-Natal. Ômega-3. Tolerância à Glicose. Obesidade.

INTRODUÇÃO

Atualmente um dos grandes problemas de saúde pública é a obesidade, caracterizada por um aumento no peso corporal devido ao acúmulo excessivo de gordura no organismo ¹⁷. Os hábitos alimentares, como o elevado consumo de alimentos ultraprocessados e a redução da ingestão de alimentos in natura e/ou minimamente processados influenciam no desenvolvimento da doença. Aspectos genéticos, sociais, comportamentais e culturais também possuem participação na obesidade ^{14,16}. Muitos obesos desenvolvem resistência à insulina, devido a alterações na sinalização da mesma, intolerância à glicose e hiperlipidemia associada. Somado ao exposto, é possível que indivíduos obesos com resistência ou deficiência na ação da insulina tenham prejuízos no metabolismo da glicose e um grau deprimido de termogênese ¹⁰. Em decorrência do apresentado, muitos estudos sobre a programação metabólica têm sido desenvolvidos, já que é de conhecimento que experiências nos períodos iniciais da vida impactam nos processos fisiológicos e metabólicos na vida adulta ⁵.

Durante os períodos iniciais da vida, há o desenvolvimento neurológico e imunológico e, alterações nutricionais maternas como a desnutrição e a obesidade, assim como a ingestão alimentar e exposição da prole ao ambiente durante o período de lactação, podem influenciar o desenvolvimento de órgãos diretamente ligados ao controle do metabolismo e gasto energético ^{5,8}. Assim, modulações nutricionais durante estas fases, podem favorecer ou prevenir a obesidade na vida adulta.

Os ácidos graxos ômega-3 representam uma família de ácidos graxos poliinsaturados essenciais, que não podem ser sintetizados no nosso organismo, sendo eles: ácido alfa-linolênico (ALA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosa-hexaenóico (DHA) ^{7,17}. O ALA, um ômega-3 de origem vegetal, após ser ingerido e sofrer ação de enzimas elongases, permite a formação dos outros dois importantes ácidos graxos de cadeia longa: EPA e DHA ¹⁷. O EPA possui ação anti-inflamatória no nosso organismo, já que auxilia na produção de prostaglandinas E3, responsáveis por auxiliar na neutralização da atividade pró-inflamatória. Já o DHA apresenta relação direta com o desenvolvimento fetal, do cérebro e do sistema visual ². Desta forma, os alimentos ricos em ômega 3 são considerados funcionais e podem ser encontrados tanto em formas naturais (animais marinhos) quanto via suplementação ⁹.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo é investigar o efeito da suplementação materna com óleo de peixe no perfil glicêmico de camundongos hiperalimentados no período pós-natal.

MATERIAIS E 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) da mesma universidade, sob o protocolo 002/2018. A duração do período experimental foi de aproximadamente 180 dias.

Delineamento Experimental

Inicialmente foram obtidos no Biotério Central da UFLA 40 camundongos C57BL/6, com idade entre 45-55 dias, 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*. Logo após a aquisição dos animais, as fêmeas foram separadas em 10 caixas ($n=3$) e mantidas durante 15 dias para sincronização do ciclo estral. Após este período, um macho foi adicionado em cada caixa para acasalamento, sendo assim mantidos por um período de 10 dias. Após o período de 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 com óleo de peixe em dose de 1g/Kg de peso corporal, enquanto as demais receberam água em mesma dosagem. A oferta de óleo de peixe e água foi realizada pela técnica de gavagem. O óleo de peixe utilizado foi gentilmente 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 de DHA.

Formação dos Grupos Experimentais

No segundo dia após o nascimento dos filhotes, as ninhadas foram remanejadas para a formação dos modelos experimentais de interesse, conforme metodologia descrita em ⁴. 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 alvo de interesse do estudo.

Peso Corporal e Ingestão Alimentar

O peso corporal e a ingestão alimentar foram monitorados semanalmente. Para isso foi utilizada uma balança analítica.

Teste Tolerância Oral à Glicose

O teste de tolerância oral à glicose (TTOG) foi realizado aos 70 e 120 dias de vida dos animais. Após jejum de 12 horas, os animais receberam pela técnica de gavagem, solução de D-glicose em dose 2g/kg de peso corporal. A glicemia foi monitorada nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos com o auxílio de um glicosímetro Advantage® através de amostra de sangue, obtido por punção caudal.

Eutanásia

Posteriormente aos 120 dias de vida, os animais foram eutanasiados por exsanguinação, para a coleta dos tecidos de interesse para o estudo, após receberem injeção anestésica, via intraperitoneal 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. O tecido adiposo epididimal foi pesado logo na sequência, utilizando balança analítica.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão. Para análise descritiva dos dados e testes de comparação de grupos independentes utilizou-se o software GraphPadPrism®, versão 6.0. Os valores foram submetidos inicialmente ao teste de Grubbs para detecção de outliers. Para avaliação da distribuição normal das variáveis, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk. O teste de ANOVA OneWay seguido do pós teste Bonferroni foi utilizado para comparação entre os grupos. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Peso Corporal

As Figuras 1 e 2 apresentam os resultados de peso corporal (g) para os grupos experimentais (C, COP, H e HOP) aos 21 (desmame) e 120 dias de vida (eutanásia), respectivamente. Aos 21 dias, o grupo H apresentou valores significativamente maiores quando comparado ao grupo C, com $p < 0,0001$, e o OP preveniu esse aumento. Para o peso corporal aos 120 dias, os valores do grupo H novamente foram elevados em relação ao grupo C, com $p < 0,01$.

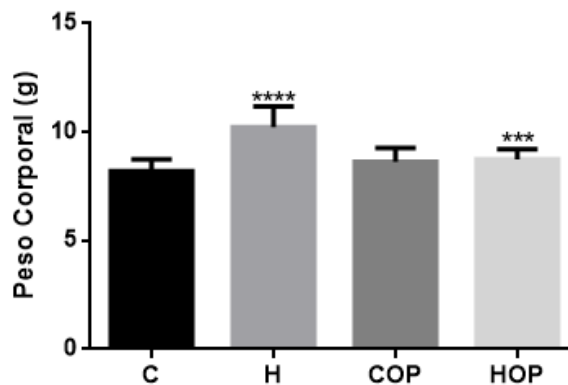


Figura 1 – Peso Corporal com 21 Dias (Desmame) ****H vs C ($p < 0,0001$) e ***HOP vs H ($p < 0,001$).

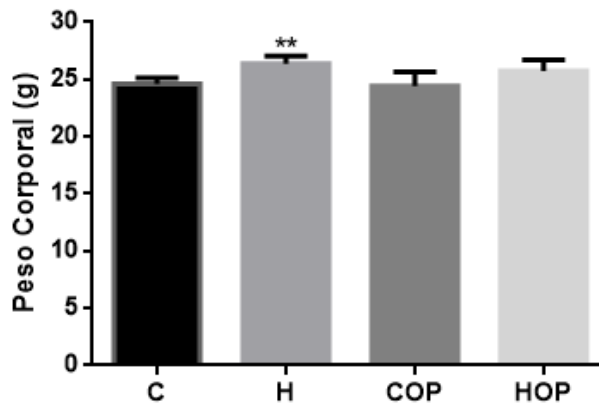


Figura 2 – Peso Corporal com 120 Dias (Eutanásia) **C vs H ($p < 0,01$).

Consumo Alimentar Semanal

A Tabela 1 ilustra o consumo alimentar dos animais durante o período experimental. Não foi observada diferença significativa em relação à ingestão alimentar dos animais.

Tabela 1 – Controle Consumo Alimentar entre os 4 Grupos Experimentais

	C	COP	H	HOP
1-3 semanas (g)	17,35 ±2,645	14,63 ±2,342	19,40 ±1,72	20,64 ±1,36
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 ±0,82	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

Tecido Adiposo Epididimal

A Figura 3 representa o peso do tecido adiposo epididimal. Os grupos H e HOP apresentaram valores maiores quando comparados ao grupo C ($p<0,05$ e $p<0,0001$, respectivamente). Por fim, a comparação entre HOP e COP indica que o grupo HOP obteve maior média na comparação com o grupo COP, com $p<0,0001$.

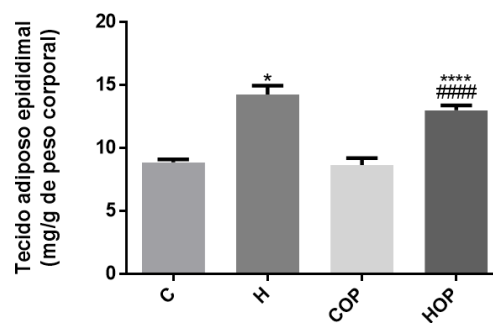


Figura 3 – Relação Entre o Tecido Adiposo Epididimal e o Peso Corporal *H vs C ($p<0,05$),
 ****HOP vs C ($p<0,0001$) e #####HOP vs COP ($p<0,0001$).

Teste de Tolerância Oral à Glicose - TTOG

Ao septuagésimo e centésimo vigésimo dias de vida dos animais, os grupos de camundongos C, COP, H e HOP, foram submetidos ao TTOG, onde se acompanhou a curva glicêmica (mg/dL) vs tempo (min). Como forma de se aprimorar e facilitar a análise, foi calculada a Área Sob a Curva (AUC) de ambos os TTOG (70 dias e 120 dias) para apresentação dos resultados.

Os resultados para o dia 70 são mostrados abaixo, na Figura 4.

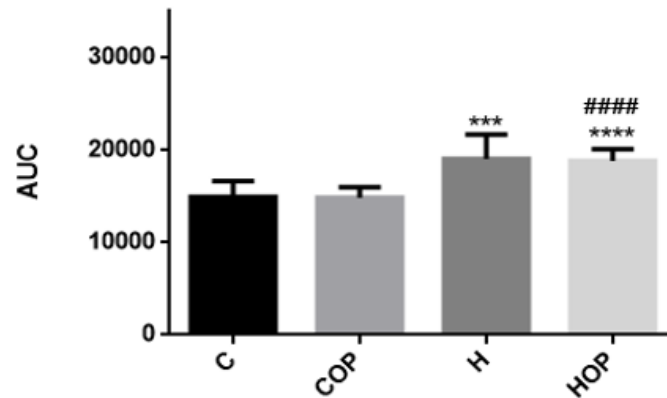


Figura 4 – AUC – Área sob a Curva a partir do teste de tolerância oral à glicose (TTOG) realizado aos 70 dias de vida dos animais dos grupos C (n=8), COP (n=11), H (n=8) e HOP (n=14).

Para a AUC aos 70 dias os resultados mostram que o grupo H apresentou valores significativamente elevados quando comparado ao grupo C, com nível de significância de $p < 0,001$, e os valores do grupo HOP também foram significativamente maiores em relação aos grupos COP e C, ambos com $p < 0,0001$, onde: *** ($p < 0,001$) H vs C. **** ($p < 0,0001$) HOP vs COP. ##### ($p < 0,0001$) HOP vs C.

Abaixo, na Figura 5 são mostrados os resultados para o dia 120, onde em seguida é feita também uma breve descrição dos resultados obtidos nesta etapa.

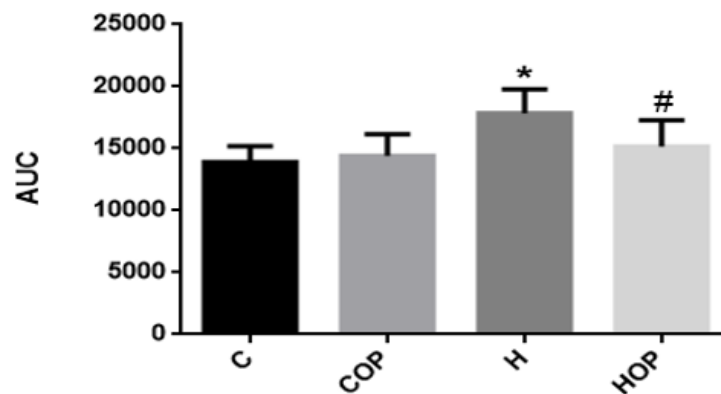


Figura 5 – AUC – Área sob a Curva a partir do teste de tolerância oral à glicose (TTOG) realizado aos 120 dias de vida dos animais dos grupos C (n=8), COP (n=11), H (n=8) e HOP (n=14).

Com a análise da área sob a curva do TTOG aos 120 dias, observou-se que o grupo H manteve valores significativamente maiores quando comparado ao grupo C, com nível de significância $p < 0,05$. Já os valores para grupo HOP foram significativamente menores em relação ao grupo H ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

A expansão do tecido adiposo visceral, característica da obesidade, se relaciona com a gênese de diversos distúrbios metabólicos e inflamatórios, dentre eles alterações no metabolismo da glicose ⁶. Conforme o esperado, a hiperalimentação pós-natal promoveu aumento no peso corporal e na massa adiposa, bem como diminuição na tolerância à glicose aos 70 e 120 dias de vida, mesmo com a ingestão alimentar tendo sido similar entre os grupos experimentais em todo o período pós-desmame. Tais resultados também foram encontrados e discutidos em ¹, onde grupos de ratos hiperalimentados foram comparados com grupos controle (ambos em dietas maternas), observando-se maior peso corporal e uma tendência a desenvolver resistência à insulina. O autor comenta que uma dieta materna rica em gorduras levou a programação adversa do balanço energético, composição corporal e metabolismo na prole masculina adulta.

O óleo de peixe surge como potencial atenuante das intercorrências metabólicas e inflamatórias associadas à obesidade, bem como na prevenção desses distúrbios. Neste trabalho, a suplementação materna com óleo de peixe foi capaz de prevenir o ganho de peso excessivo decorrente do modelo de hiperalimentação pós-natal. Ainda, o grupo HOP apresentou melhor tolerância à glicose aos 120 dias de vida. Esses resultados corroboram com dados apresentados no trabalho ⁶, onde o autor comparou 2 grupos experimentais que receberam dietas maternas ricas em gorduras, sendo um destes com ingestão de óleo de peixe, o qual apresentou melhor sensibilidade à insulina ⁶.

Os mecanismos pelos quais o ômega-3 podem reduzir a gordura corporal e melhorar a tolerância à glicose ainda estão sendo explorados ¹¹. Referente a gordura corporal, alguns estudos sugerem que esses ácidos graxos contribuem com a melhora da composição corporal pela supressão do apetite ^{12, 13}. Porém, Buckley & Howe ³ indicam que esses efeitos são mediados por alterações na expressão de genes envolvidos na regulação do metabolismo lipídico em diferentes tecidos. Para a tolerância a glicose, a hipótese mais difundida é que o ômega 3 atenua a resistência à insulina ao reduzir a inflamação ¹⁵. Outros trabalhos apontam que os efeitos do aumento da sensibilidade à insulina frente ao consumo de ômega 3 estão relacionados com a melhora da atividade mitocondrial ¹¹.

CONCLUSÃO

O óleo de peixe surge como potencial atenuante das intercorrências metabólicas e inflamatórias associadas à obesidade, bem como na prevenção desses distúrbios. A suplementação materna com óleo de peixe foi capaz de prevenir o ganho de peso excessivo, bem como promover melhor tolerância à glicose na prole hiperalimentada no período pós-natal.

Novos estudos devem ser realizados, de encontro com os em andamento e existentes a fim de se ampliarem as investigações sobre o assunto.

REFERÊNCIAS

1. ALBERT BB, VICKERS MH, GRAY C, REYNOLDS CM, SEGOVIA SA, DERRAIK JGB, et al. Fish oil supplementation to rats fed high-fat diet during pregnancy prevents development of impaired insulin sensitivity in male adult offspring. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 17 [cited 2019 Jul 17];7(1):5595. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28717143>
2. BORNIS PA, CHUNG M, TATSIONI A, SUN Y, KUPELNICK B, LICHTENSTIEN A. Et al. Effects of omega-3 fatty acids on organ transplantation. *Agency Healthcare Res Qual*. 2005;5: E012-2.
3. BUCKLEY JD, HOWE PR. Anti-obesity effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Obes Rev*. 2009; 648-59.
4. HABBOUT, A.; LI, N.; ROCHETTE, L.; VERGELY, C. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences. *The Journal of Nutrition*. First published ahead of print February 27, 2013 as doi: 10.3945/jn.112.172825.
5. HANLEY, et. al. Metabolic imprinting, programming and epigenetics – a review of present priorities and future opportunities. *British Journal Of Nutrition*, [s.l.], v. 104, n.1, p.1-25, jul. 2010. Cambridge University Press (CUP).
<http://dx.doi.org/10.1017/s0007114510003338>.
6. KASBI-CHADLI F, BOQUIEN C-Y, SIMARD G, ULMANN L, MIMOUNI V, LERAY V, et al. Maternal supplementation with n-3 long chain polyunsaturated fatty acids during perinatal period alleviates the metabolic syndrome disturbances in adult hamster pups fed a high-fat diet after weaning. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2014 Jul [cited 2019 Jul 17];25(7):726–733.

7. KREMER JM. ω -3 fatty acid supplements in rheumatoid arthritis. *Am J Clin Nutr* 2007;71(1 Suppl):349S-51S.
8. LEVIN, B et. al. Metabolic Imprinting on Genetically Predisposed Neural Circuits Perpetuates Obesity. *Nutrition*, New Jersey, n. 16, p.909-915, maio 2000.
9. LIMA, L. P.; SAMPAIO, H. A. C. Caracterização socioeconômica, antropométrica e alimentar de obesos graves. *Ciênc. saúde coletiva*, Rio de Janeiro , v. 12, n. 4, p. 1011-1020, Ago. 2007 . Disponível em: . Acesso em: 22 Out. 2017.
10. MAHAN L.K, ESCOTT S.S; RAYMOND J.; Krause, alimentos, nutrição e dietoterapia. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.
11. MARTINS, A. R. Efeitos da Suplementação com Óleo de Peixe sobre a resistência à Insulina e a Função Mitocondrial no Músculo Esquelético de Camundongos Alimentados com Dieta Hiperlipídica. Tese de Doutorado, 2014, USP – Universidade de São Paulo .
12. PARRA D, RAMEL A, BANDARRA N, KIELY M, MARTÍNEZ JÁ, THORSODOTTIR I. A diet rich in long chain omega-3 fatty acids modulates satiety in overweight and obese volunteers during weight loss. *Appetite*. 2008; 51(3):676-80.
13. PÉREZ-MATUTE P, PÉREZ-ECHARRI N, MARTÍNEZ JÁ, MARTI A, MORENO-ALIAGA MJ. Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponection and tumour necrosis factor-alpha. *Br J Nutr*. 2007; 97(2):389-98.
14. POPKIN B.M, SLINING M.M. New dynamics in global obesity facing low- and middleincome countries. *Obesity Reviews*. v. 14, n.2p.11-20. 2013.
15. SERHAN CN, CHIANG N. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *Br J Pharmacol*. 2008; 153(Suppl 1):S200-15.
16. TERESINHA, C. C. Clonagem e Caracterização do Gene da Enzima Δ 6-dessaturase do ácido graxo e análise de parte do genoma funcional de *Thalassiosira fluviatilis*. Dissertação de Mestrado, 2004, UNB – Universidade de Brasília.
17. ZAMBOM M.A, SANTOS G.T, MODESTO E.C. Importância das gorduras poliinsaturadas da saúde humana. *Rev Soc Bras Zootec*. 2004;547:553-7.