



HENRIQUE MOURÃO NOGUEIRA COELHO

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM
ÓLEO DE PEIXE NO METABOLISMO LIPÍDICO DE
CAMUNDONGOS HIPERALIMENTADOS**

**LAVRAS-MG
2019**

HENRIQUE MOURÃO NOGUEIRA COELHO

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM ÓLEO DE PEIXE NO
METABOLISMO LIPÍDICO DE CAMUNDONGOS HIPERALIMENTADOS**

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.

Profa. Dra. Laura Cristina Jardim Porto
Orientadora
Mestranda Brenda Loise Monteiro
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2019**

O presente estudo foi redigido pelas normas de escrita da Revista de Nutrição.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
INTRODUÇÃO.....	2
METODOLOGIA	3
RESULTADOS.....	4
DISCUSSÃO	4
CONCLUSÃO	6
REFERÊNCIAS.....	7
FIGURAS	11

INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM ÓLEO DE PEIXE NO METABOLISMO LIPÍDICO DE CAMUNDONGOS HIPERALIMENTADOS

RESUMO

Desequilíbrios alimentares, como a hiperalimentação pós-natal, em períodos críticos de desenvolvimento tem-se associado a prejuízos metabólicos na vida adulta, entre eles, disfunções no metabolismo lipídico. Os ácidos graxos ômega-3, por sua vez, apresentam propriedade antiinflamatória e, portanto, espera-se que sejam capazes de atenuar os efeitos deletérios desse modelo. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da suplementação materna com óleo de peixe no metabolismo lipídico em camundongos hiperalimentados no período pós-natal. Camundongos fêmeas foram suplementadas com óleo de peixe ou água desde o período de acasalamento até o desmame. Os grupos modelo H e HOP tiveram as ninhadas reduzidas para 3-4 filhotes. O peso corporal e o consumo alimentar foram aferidos semanalmente. Após 120 dias, os animais foram eutanasiados. O colesterol total, HDL-c e os triglicerídeos foram determinados através de kit comercial, e o LDL-c estimado através da fórmula de Friedewald (1972). O consumo alimentar não foi diferente entre os grupos experimentais. O peso dos animais do grupo HOP foi menor comparado com o grupo H após o desmame. Em relação aos triglicerídeos séricos, não houve diferença entre os grupos, enquanto o colesterol total e a fração LDL-c do grupo H apresentaram valores elevados em comparação com o grupo C. A suplementação materna com óleo de peixe foi capaz de atenuar as alterações de colesterol total e da fração LDL-c, bem como de aumentar a concentração sérica de HDL-c. Sendo assim, a suplementação materna de óleo de peixe foi eficaz em melhorar o perfil lipidêmico da prole hiperalimentada.

Palavras-chave: ácidos graxos poliinsaturados, dislipidemia, hiperfagia

INTRODUÇÃO

A partir da segunda metade do século XX podemos observar a consolidação da transição epidemiológica da população brasileira, onde ocorreu diminuição na prevalência das doenças infectocontagiosas e aumento da incidência de doenças crônicas não transmissíveis, tornando assim crucial o controle dos fatores de risco para o desenvolvimento das mesmas [1][2]. As dislipidemias afetam grande parte da população e estão fortemente relacionadas com desenvolvimento de doenças cardiovasculares. São caracterizadas pela desregulação dos níveis séricos de lipídios, como a elevada concentração plasmática de triglicerídeos, LDL-c ou um conjunto de ambas, bem como as baixas concentrações de HDL-c [3][4].

A nutrição adequada durante as fases iniciais de vida é de suma importância, pois alterações alimentares na vida intrauterina ou no período de lactação podem influenciar diretamente o desenvolvimento e a saúde da prole [5][6]; além disso, alterações de peso corporal logo após o nascimento são associadas com o maior risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis na fase adulta [7][8][9]. Dessa forma, modelos experimentais de hiperalimentação pós-natal são viáveis para o estudo do impacto metabólico dessas alterações durante a vida adulta.

A série Ômega-3 é composta por ácidos graxos poli-insaturados que possuem sua primeira insaturação no terceiro carbono, sendo conhecidos como ácidos graxos essenciais por não serem sintetizados pelo corpo humano e precisam ser consumidos por vias dietéticas. Dentre os efeitos observados, está seu papel cardioprotetor promovido pelos ácidos graxos de cadeia longa EPA e DHA, conhecidos por suas funções anti-inflamatória, antitrombótica e vasodilatadora [10].

Com base no cenário atual, é relevante buscar alternativas nutricionais para o manejo dessas alterações metabólicas; sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a influência da suplementação materna de óleo de peixe em marcadores lipídicos de camundongos hiperalimentados.

METODOLOGIA

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição na Universidade Federal de Lavras (UFLA). O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras (CEUA/ UFLA), Lavras, MG, sob o protocolo 002/2018.

Para o delineamento do estudo quarenta camundongos (C57Bl6) foram obtidos no Biotério Central da UFLA, sendo 30 fêmeas e 10 machos. Os animais foram submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 horas com temperatura controlada de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e consumo de ração e água à vontade. As fêmeas foram agrupadas em três animais por caixa e permaneceram juntas por quinze dias para sincronização do ciclo estral, em seguida foi adicionado um animal macho em cada caixa, para um período de acasalamento de dez dias. Após, os machos foram separados e as fêmeas permaneceram juntas até o nascimento dos filhotes. Durante o acasalamento até o desmame dos filhotes (21° dia pós-nascimento) metade das fêmeas foram suplementadas com óleo de peixe, e as demais com água, sendo a administração feita por gavagem na dosagem de 1g/kg de peso. O óleo de peixe utilizado foi obtido de uma preparação de lipídios marinhos, rico em ácidos graxos n-3, doado pela Fundação Herbarium (Curitiba, PR, Brasil), e contém em 0,828 g por cápsula, na proporção de 0,120 g de EPA e 0,300 g DHA.

Após o nascimento, os animais permaneceram nas ninhadas originais durante dois dias, e em seguida foram realocados. Os grupos Controle (C) e Controle com óleo de peixe (COP) mantiveram o número convencional de 8-10 filhotes por ninhada, enquanto os grupos Hiperalimentado (H) e Hiperalimentado com óleo de peixe (HOP) tiveram as ninhadas reduzidas a 3-4 filhotes. Ao completarem 120 dias e após jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal, com uma diluição de Ketamina (80mg/Kg) e Xilazina (10mg/Kg) e, posteriormente, foram eutanasiados por exsanguinação. Coletou-se o tecido adiposo epididimal e o sangue.

Durante todo o período experimental o peso corporal e o consumo alimentar dos animais foram aferidos semanalmente. Os parâmetros séricos

colesterol total, HDL-c e triglicerídeos foram determinados através de kit comercial, e o LDL-c estimado através da fórmula de Friedewald (1972).

Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism®, versão 6.0, e o nível de significância adotado foi de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Ao avaliar o consumo alimentar dos animais durante o período experimental (Tabela 1), não foi observada diferença entre os grupos.

O peso corporal dos animais após o desmame (Figura 1A) e também aos 120 dias de vida (Figura 1B), evidencia que o grupo H apresentou maior ganho de peso em comparação com o grupo C, enquanto o grupo HOP apresentou menor ganho de peso em relação ao grupo H aos 21 dias de vida.

Em relação ao peso do tecido adiposo epididimal (Figura 2) foi possível observar valores maiores no grupo H em relação ao grupo C, o mesmo resultado foi visto nos animais do grupo HOP em relação ao grupo COP.

Ao analisarmos o perfil lipídêmico, não houve diferença significativa entre os valores de triglicerídeos séricos dos grupos experimentais (Figura 3A).

Avaliando o colesterol total, o grupo H apresentou valores significativamente maiores desse marcador em relação ao grupo C, enquanto o grupo HOP mostrou uma concentração menor quando comparado ao H (Figura 3B). A fração LDL-c estava aumentada no grupo H em relação ao grupo C, e menor no grupo HOP em relação ao grupo H (Figura 3C). O HDL-c estava aumentado no grupo HOP em relação ao grupo H (Figura 3D).

DISCUSSÃO

O modelo de hiperalimentação pós-natal por redução do número de filhotes por ninhada é atualmente usado para estudar as consequências da inadequação alimentar durante os momentos iniciais de vida. A redução da competição por leite materno tem como consequência o aumento da ingestão calórica durante o período de amamentação [11] e, conseqüentemente, um maior ganho de peso, que pode persistir até a fase adulta [12].

O presente estudo mostrou que os animais do grupo H, submetidos à redução de ninhada, tiveram maior ganho de peso durante o período experimental, sendo que a diferença em relação ao seu controle foi mais acentuada durante o período da amamentação e menor após 120 dias de vida. O grupo suplementado com óleo de peixe mostrou um ganho de peso reduzido após o desmame, que não se manteve aos 120 dias. A manutenção do ganho de peso já na fase adulta, encontrada em trabalhos prévios com o referido modelo, foi interligada com o aumento da ingestão alimentar desses animais após a amamentação [13][14][15]; em contrapartida, nosso trabalho não encontrou diferença na ingestão alimentar nesse período. Trabalhos estudando a suplementação materna de óleo de peixe em modelo de hiperalimentação pós natal ainda são escassos, porém em modelo de hiperalimentação através de dieta rica em gordura, a suplementação não se mostrou eficaz em prevenir o ganho de peso [16]. Além disso, ao analisarmos o tecido adiposo epididimal, este estava maior nos animais hiperalimentados, sugerindo uma alteração da composição corporal desses animais.

Analisando o perfil lipídico, o presente estudo não encontrou diferença entre os grupos em relação à concentração de triglicerídeos. A concentração plasmática de triglicerídeos é um marcador sensível a alterações recentes no consumo alimentar [17]; sabendo disso, uma das possíveis explicações do atual estudo não ter notado diferença entre os grupos é o consumo alimentar dos animais após o desmame ter permanecido inalterado. Quanto ao colesterol total e LDL-c, a suplementação materna de óleo de peixe foi capaz de minimizar os danos causados pelo modelo de hiperalimentação, já que, em ambos, os valores do grupo HOP estavam reduzidos em relação ao grupo H. Os níveis séricos de HDL-c também foram impactados positivamente com a suplementação materna, pois as concentrações dessa fração estavam aumentadas no grupo HOP em relação ao grupo H.

Kasbi-Chadli et al. (2014) estudou a influência da suplementação materna com ácidos graxos poliinsaturados n-3 em camundongos alimentados com dieta rica em gordura após o desmame. Apesar da capacidade do modelo de induzir alterações nas concentrações plasmáticas de triglicerídeos, colesterol total, LDL-c, VLDL-c e HDL-c, a suplementação materna não se mostrou eficaz em prevenir as alterações metabólicas causadas pelo

modelo [16]. Em um segundo trabalho, Kasbi-Chadli et al. (2016), seguindo o mesmo modelo de camundongos alimentados com dieta rica em gordura após o desmame, mostrou que embora a suplementação materna não expressou efeito nos mesmos marcadores lipídicos, a suplementação direta foi eficaz em diminuir significativamente todos [18]. Uma possível explicação para diferença nos resultados encontrados em ambos os trabalhos do autor e o seguinte trabalho está no modelo estudado; modelos de hiperalimentação através da alta ingestão de gorduras ou carboidratos tendem a produzir um grande ganho de peso e alterações metabólicas intensas, diferente do modelo de hiperalimentação pós-natal por redução de ninhada, que melhor descreve as características de um leve sobrepeso [12]. Sendo assim, a suplementação indireta de óleo de peixe parece exercer sua função como regulador do metabolismo lipídico em marcadores levemente alterados.

Os mecanismos de ação da suplementação materna com óleo de peixe, ainda não são completamente elucidados, e mesmos os estudos com a suplementação direta apontam para diferentes vias de atuação[19][20]. Estudos sugerem que o ácidos graxos poliinsaturados são capazes de regular uma família de fatores de transcrição-chave no controle do metabolismo lipídico, as Proteínas de Ligação a Elemento Regulador de Esterol (SREBP)[21], responsáveis por controlar a expressão de diversas enzimas envolvidas na síntese de colesterol, ácidos graxos e triglicerídeos [22]. Um dos mecanismos mais estudados é sua ação na regulação da síntese de eicosanoides. A presença de ácido eicosapentaenóico (EPA), proveniente do consumo de omega-3, compete com o ácido linoleico pelas enzimas cicloxigenase e lipoxigenase, responsáveis pela síntese de eicosanoides. Porém, diferente do ácido linoleico, que é o principal precursor dessa via, o EPA produz séries de eicosanoides com menor caráter inflamatório [23].

CONCLUSÃO

A suplementação materna de óleo de peixe durante a gestação e lactação mostrou ser efetiva em prevenir as alterações dos marcadores lipídicos séricos causadas pelo modelo de hiperalimentação pós natal.

REFERÊNCIAS

1. Prata PR. The Epidemiologic Transition in Brazil. *Cad Saúde Públ.* 1992;8(2):168-175. <http://doi.org/10.1590/S0102-311X1992000200008>
2. Schramm JA, Oliveira AF, Leite IC, Valente JG, Gadelha AMJ, Portela MC, et al. Epidemiological transition and the study of burden of disease in Brazil. *Ciênc. saúde coletiva.* 2004;9(4):897-908. <http://doi.org/10.1590/S1413-81232004000400011>
3. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Dislipidemia: prevenção de eventos cardiovasculares e pancreatite. Brasília: Comissão nacional de incorporação de tecnologias no SUS; 2019 [acesso 2019 setembro 13]. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2019/Relatorio_PCDT_Dislipidemia_CP04_2019.pdf
4. Faludi AA, Izar MCO, Saraiva JFK, Chacra APM, Bianco HT, Afiune Neto A, et al. Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. Rio de Janeiro: Arquivos Brasileiros de Cardiologia; 2017 [acesso 2019 setembro 13]. Disponível em: http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2017/02_DIRETRIZ_DE_DISLIPIDEMIAS.pdf
5. Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet.* 1993;341(8850):938-941. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)91224-A](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)91224-A)
6. Dunger DB, Salgin B, Ong KK. Session 7: early nutrition and later health early developmental pathways of obesity and diabetes risk. *Proc Nutr Soc.* 2007; 66(3):451–457. <https://doi.org/10.1017/S0029665107005721>

7. Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia*. 1993;36(1): 62-67. <https://doi.org/10.1007/bf00399095>
8. Godfrey KM, Barker DJ. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr*. 2001;4(2):611–624. <https://doi.org/10.1079/PHN2001145>
9. Hales CN , Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ*. 1991;303(6809):1019–1022. <https://doi.org/10.1136/bmj.303.6809.1019>
10. Jain AP, Aggarwal KK, Zhang PY. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Eur Rev Med Pharmacol. Sci*. 2015;19(3):441-445
11. Fiorotto ML, Burrin DG, Perez M, Reeds PJ. Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. *Am J Physiol*. 1991;260(6):1104-1113. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1991.260.6.R1104>
12. Habbout A, Li N, Rochette L, Vergely C. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences *J Nutr*. 2013;143(5):553-562. <https://doi.org/10.3945/jn.112.172825>
13. Habbout A, Delemasure S, Goirand F, Guillard JC, Chabod F, Sediki M, *et al*. Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood. *Biochimie*. 2012;94(1):117-124. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.09.023>
14. Cunha AC, Pereira RO, Pereira MJ, Soares Vde M, Martins MR, Teixeira MT, Souza EP, Moura AS. Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion—the role of GLUT-2. *J Nutr Biochem*. 2009;20(6):435–42. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.05.002>

15. Rodrigues AL, de Moura EG, Passos MC, Trevenzoli IH, da Conceicao EP, Bonono IT, Neto JF, Lisboa PC. Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *J Nutr Biochem*. 2011;22(2):109–17.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.11.013>
16. Kasbi-Chadli F, Boquien CY, 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*. 2014;25(7):726-733. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.03.003>
17. Schiavo Marli, Lunardelli Adroaldo, Oliveira Jarbas Rodrigues de. Influência da dieta na concentração sérica de triglicerídeos. *J Bras Patol Med. Lab*. 2003;39(4): 283-288. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442003000400004>
18. Kasbi-Chadli F, Ferchaud-Roucher V, Krempf M, Ouguerram K. Direct and maternal n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation improved triglyceridemia and glycemia through the regulation of hepatic and muscle sphingolipid synthesis in offspring hamsters fed a high-fat diet. *Eur J Nutr*. 2016;55(2):589-599.
19. Mozaffarian D, Wu JH. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll. Cardiol*. 2011;58(20):2047-67. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.06.063>
20. Endo J, Arita M. Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Cardiol*. 2016;67(1):22-27.
<https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2015.08.002>

21. Di Nunzio M, van Deursen D, Verhoeven AJ, Bordonni A. n-3 and n-6 Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element binding protein activity and increase flow of non-esterified cholesterol in HepG2 cells. *Br J Nutr.* 2010;103(2):161-167.

22. Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie.* 2004;86(11):839-848.

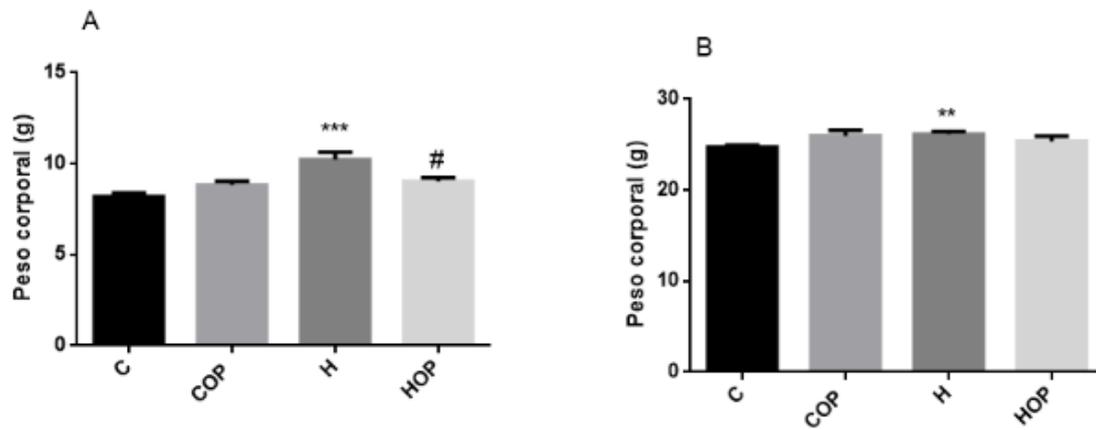
23. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother* 2002;56(8):365-79.

FIGURAS

Tabela 1. Consumo alimentar dos animais Controle (C), Controle com Óleo de Peixe (COP), Hiperalimentado (H) e Hiperalimentado com Óleo de Peixe (HOP) ao longo de treze semanas.

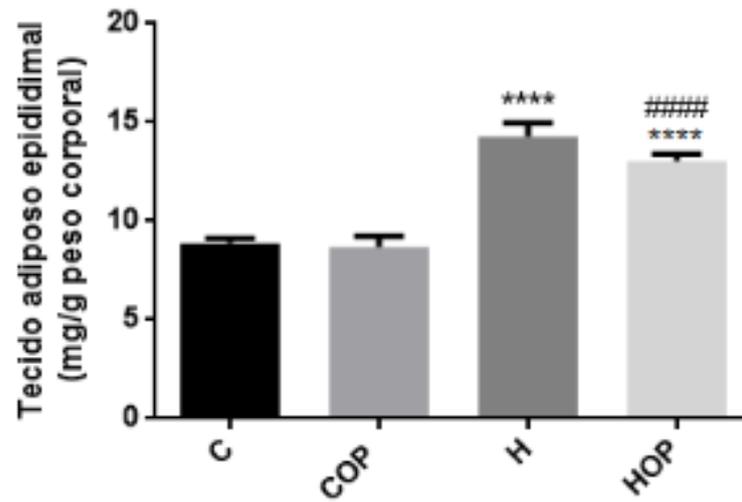
	C	COP	H	HOP
1-3 semanas (g)	17,35±2,645	14,63±2,342	19,40±1,720	20,64±1,360
4-6 semanas (g)	24,58±1,315	22,62±1,287	25,08±1,747	26,46±1,189
7-9 semanas (g)	24,29±0,829	26,16±1,439	25,08±0,992	26,77±0,271
10-13 semanas (g)	23,66±0,364	25,65±0,257	24,77±1,073	25,18±0,522

Figura 1. Peso corporal dos animais Controle (C), Controle com Óleo de Peixe (COP), Hiperalimentado (H) e Hiperalimentado com Óleo de Peixe (HOP) após o desmame (A), e após 120 dias de vida (B).



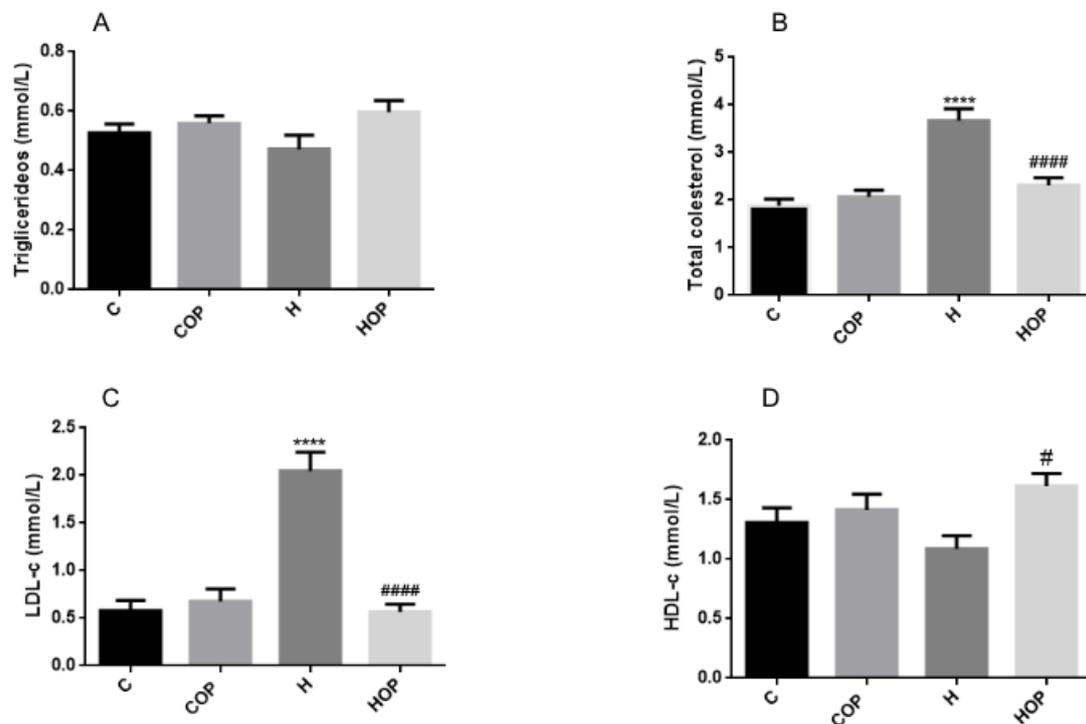
Onde: (A) *** H vs C ($p < 0,001$) # HOP vs H ($p < 0,05$). (B) ** H vs C ($p < 0,01$)

Figura 2. Peso do tecido adiposo epididimal dos animais Controle (C), Controle com Óleo de Peixe (COP), Hiperalimentado (H) e Hiperalimentado com Óleo de Peixe (HOP).



Onde: **** H vs C e HOP vs C ($p < 0,0001$). ##### HOP vs COP ($p < 0,0001$)

Figura 3. Triglicerídeos (A), Colesterol total (B), LDL-c (C) e HDL-C (D) séricos dos animais Controle (C), Controle com Óleo de Peixe (COP), Hiperalimentado (H) e Hiperalimentado com Óleo de Peixe (HOP).



Onde: (B) **** H vs C ($p < 0,0001$), #### HOP vs H ($p < 0,0001$).
(C) **** H vs C ($p < 0,0001$) #### HOP vs H ($p < 0,0001$)
(D) # HOP vs H ($p < 0,05$)