Alweyd Tesser de Moraes

**Dinâmica da incorporação plasmática, leucocitária e hepática
de ácidos graxos poli-insaturados após infusão parenteral de
diferentes emulsões lipídicas contendo óleo de peixe**

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

Programa de Ciências em
Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Dan Linetzky
Waitzberg

**São Paulo
2018**

Alweyd Tesser de Moraes

**Dinâmica da incorporação plasmática, leucocitária e hepática
de ácidos graxos poli-insaturados após infusão parenteral de
diferentes emulsões lipídicas contendo óleo de peixe**

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

Programa de Ciências em
Gastroenterologia
Orientador: Prof. Dr. Dan Linetzky
Waitzberg

**São Paulo
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Morais, Alweyd Tesser de
Dinâmica da incorporação plasmática, leucocitária
e hepática de ácidos graxos poli-insaturados após
infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas
contendo óleo de peixe / Alweyd Tesser de Moraes. --
São Paulo, 2018.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: Dan Linetzky Waitzberg.

Descritores: 1.Ácidos graxos ômega-3 2.Óleos de
peixe 3.Nutrição parenteral 4.Leucócitos
mononucleares 5.Neutrófilos 6.Ratos

USP/FM/DBD-512/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Dedico meu mestrado ao meu pai **Alex** e à minha mãe **Andrea** por terem me dado educação, valores e por terem me ensinado a caminhar. À minha mãe, que sempre confiou em mim e é minha melhor amiga. Ao meu pai, meu exemplo de força e determinação.

Ao **Thiago**, que durante esta jornada foi meu namorado, noivo e marido, por ser tão cúmplice, companheiro e me apoiar em todas as minhas decisões. Estar aqui, só foi possível, porque tenho você ao meu lado.

Às minhas filhas de quatro patas **Pipoca**, **Amora** e **Paçoca**, por encherem minha vida de alegria e lealdade.

À **vocês** que, muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar o meu, partilho a alegria deste momento.

Agradecimento Especial

Ao Profº Dan Linetzky Waitzberg

Ao Professor Dan L. Waitzberg, para quem não há agradecimentos que cheguem. Minha gratidão pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transpira sabedoria; minha admiração pela sua dedicação em aperfeiçoar o perfil profissional de seus alunos e pelo seu dom no ensino da Ciência.

"Se vi mais longe foi por estar sobre ombros de gigantes."

Isaac Newton

Agradecimentos

Se você está lendo esta página é porque eu consegui. Não foi fácil, nem tampouco tranquilo, mas sem vocês não seria possível.

Meus sinceros votos de agradecimento,

À **Raquel Torrinhas**, agradeço a orientação para desenvolver o desenho do estudo e interpretar os resultados. Obrigada pelo acolhimento, ensinamento e ajuda. Você é um exemplo para mim.

À **Priscila Garla**, não tenho palavras para agradecer a confiança, parceria, carinho, dedicação, respeito, amizade e por você fazer parte da minha vida. Você confiou em mim quando ninguém mais o fez, me mostrou o caminho e me ensinou a voar sozinha. Tenho o maior orgulho de ser sua pupila, você é meu exemplo de dedicação e profissionalismo.

Aos amigos da equipe de Cirurgia Experimental, **Felipe, Ronaldo, e Érika**, meu apreço pela parceria no desenvolvimento deste trabalho. Vocês foram meus companheiros nesta longa jornada, até tarde da noite, aos finais de semana para executarmos experimentos científicos no laboratório, uma distinta ajuda que foi fundamental para concretização desta pesquisa. Que bom que tive a oportunidade de trabalhar com vocês. A união de nossa equipe é uma das melhores partes deste trabalho. Muito Obrigada!

À **Márcia Antunes**, o ponto de ignição deste grande projeto e grande responsável pelo nosso auxílio financeiro. Muito obrigada por tornar este trabalho possível.

Aos ilustres membros do Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo (Metanutri) pelo compartilhamento diário de conhecimentos científicos, em especial às nutricionistas **Giliane Belarmino** e **Jéssica Reis**, pela sincera amizade e paciência em meus momentos de estresse.

Ao amigo e funcionário do Metanutri, **Francisco Balbino**, que sempre trabalhou com zelo para manter adequado o ambiente de cirurgia experimental no LIM 35.

Ao **Ricardo Garib**, que me ensinou com profissionalismo e paciência a técnica de cateterização venosa central.

Ao Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório – CEMIB de Campinas, pelo fornecimento de ratos isogênicos, indispensáveis para o desenvolvimento deste projeto de estudo. Em particular, às funcionárias Érica e Regina pela dedicação e comprometimento com a parceria do LIM 35.

Aos motoristas e funcionários do Departamento de Transporte da FMUSP, que sempre estiveram disponíveis para executar com responsabilidade o transporte de ratos do CEMIB - Unicamp.

Ao departamento de farmácia do Hospital das Clínicas da FMUSP, em especial à Dra. Márcia Marin, pela ajuda na manipulação das emulsões lipídicas parenterais.

À Equipe do Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Saúde Pública da USP, em especial à Dra. Elizabeth Torres e Dra. Geni Rodrigues Sampaio, por toda a ajuda com a execução das análises de cromatografia.

Aos Laboratórios BBraun® pela doação das bombas de infusão, insumos e auxílio financeiro que foram imprescindíveis para a execução desta pesquisa.

À Fresenius-Kabi® pelo fornecimento da emulsão lipídica Omegaven® e Lipovenus®, conforme a demanda do projeto de pesquisa.

Ao estatístico Guaraci Requena pelo desempenho das análises estatísticas dos dados deste estudo.

Agradeço a cada um dos ratos que, com a vida, contribuíram para que esse trabalho acontecesse. Prometo honrar a vida de vocês até o final da minha.

"esta é
uma carta de amor
há muito devida
para cada uma
& toda
mulher
que percorreu
esses campos
antes de mim
&
fez
o caminho
suave o bastante
para que eu
o atravessasse.

por isso
devo muito
a vocês

- mas devo algumas coisas a mim mesma também"

Amanda Lovelace

Trabalho realizado no Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo – Metanutri 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: BBraun Melsugen

Bolsa Mestrado: Capes

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 Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (ω -3)	23
1.2. AGPIs ω -3 e modulação inflamatória	23
1.3. Administração de AGPIs ω -3 por via parenteral.....	25
2. RACIONAL E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	28
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. Objetivo Geral.....	31
3.2. Objetivos Específicos	31
4. MÉTODOS.....	33
4.1. Local.....	33
4.2. Aspectos éticos	33
4.3. Delineamento Experimental	33
4.4. Procedimentos Gerais.....	36
4.4.1. Animais	36
4.4.2. Ambientação.....	36
4.4.3. Cateterização do sistema venoso central	37
4.4.4. Descrição da técnica de cateterização venosa central	37
4.4.5. Infusão de emulsão lipídica	39
4.4.6. Obtenção de leucócitos do sangue.....	42
4.4.7. Avaliação do perfil de ácidos graxos de células leucocitárias	43
4.4.8. Esterificação de ácidos graxos leucocitários	43
4.4.9. Análise por cromatografia gasosa	44

4.5. Análise estatística dos dados.....	45
5. RESULTADOS	47
5.1. Considerações gerais.....	47
5.2. Dados da Amostra.....	48
5.3. Avaliação do conteúdo de AL, AA, EPA e DHA	49
5.4. Avaliação da razão AGPIs ω -3 : ω -6	61
5.5. Avaliação da razão EPA : AA.....	63
6. DISCUSSÃO.....	67
7. CONCLUSÕES.....	72
8. ANEXOS.....	74
8.1. Anexo A – Aprovação CEUA.....	74
9. REFERÊNCIAS	75
10. APÊNDICES.....	84
10.1. APÊNDICE A - Apresentação do estudo.....	84

Lista de Abreviaturas

AG	Ácido Graxo
AGCL	Ácidos Graxos de Cadeia Longa
AGCM	Ácidos Graxos de Cadeia Média
AGPIs	Ácidos Graxos Poli-Insaturados
AL	Ácido Linoleico
ALA	Ácido Alfa-Linolênico
BF3	<i>Boron Trifluoride-Methanol Solution</i>
CB	Controle Basal
CVC	Cateterização do Sistema Venoso Central
DHA	Ácido Docosahexaenoico
EL	Emulsão Lipídica
ELP	Emulsão Lipídica Parenteral
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
FO	<i>Fish Oil</i>
FOLE	<i>Fish Oil Lipid Emulsion</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IL	Interleucina
LCT	<i>Long Chain Triglycerides</i>
LE	<i>Lipid Emulsions</i>
LT	Leucotrieno
MCT	<i>Medium Chain Triglycerides</i>
NaCl	Cloreto de Sódio

NaOH	Hidróxido de sódio
OP	Óleo de Peixe
PG	Prostaglandina
PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>
SI	Sem infusão
SPM	<i>Specialized Pro Resolving Mediators</i>
TCL	Triglicérides de Cadeia Longa
TCM	Triglicérides de Cadeia Média
TNF	Fator de Necrose Tumoral – alfa
TX	Tromboxano
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

Lista de Símbolos

Δ	Delta
®	Marca registrada
g	gramas
α	Alfa
β	Beta
ω -3	Ômega-3
ω -6	Ômega-6

Lista de Siglas

AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LIM	Laboratório de Investigação Médica
UNICAMP	Universidade de Campinas

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Descrição dos grupos de animais	34
Tabela 2 - Composição das emulsões lipídicas controle (TCL/OP – Lipovenus® 10% ¹ + Omegaven® 10% ² - 8:2 v/v) e estudo (TCM/TCL/OP - Lipidem® 20% ³)	41
Tabela 3 – Variação do peso corpóreo (g) nos diferentes grupos de ratos entre o início e o final do estudo.....	48
Tabela 4 – Quantidade em gramas de ração consumida nos diferentes grupos de ratos entre o início e o final do estudo.....	49
Tabela 5 - Quantidade total de ácido linoleico em leucócitos mononucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas	49
Tabela 6 - Quantidade total de ácido araquidônico em leucócitos mononucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas.	50
Tabela 7 - Quantidade total de ácido eicosapentaenóico em leucócitos mononucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas.	51
Tabela 8 - Quantidade total de ácido docosahexaenóico em leucócitos mononucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas.	51
Tabela 9 - Quantidade total de ácido linoleico em leucócitos polimorfonucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas.	52
Tabela 10 - Quantidade total de ácido araquidônico em leucócitos polimorfonucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas.	53
Tabela 11 - Quantidade total de ácido eicosapentaenóico em leucócitos polimorfonucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas.	54
Tabela 12 - Quantidade total de ácido docosahexaenóico em leucócitos polimorfonucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas.	54

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema ilustrativo do protocolo experimental	35
Figura 2 – Fases da cateterização do sistema venoso central	39
Figura 3 - Distribuição dos sujeitos da pesquisa	47
Figura 4 – Conteúdo de ácidos graxos ω -3 e ω -6 em leucócitos mononucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 48 horas	Erro! Indicador não definido.
Figura 5 - Conteúdo de ácidos graxos ω -3 e ω -6 em leucócitos mononucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 72 horas	Erro! Indicador não definido.
Figura 6 - Conteúdo de ácidos graxos ω -3 e ω -6 em leucócitos polimorfonucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 48 horas	Erro! Indicador não definido.
Figura 7 - Conteúdo de ácidos graxos ω -3 e ω -6 em leucócitos polimorfonucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 72 horas	Erro! Indicador não definido.
Figura 8 - Conteúdo de ácidos graxos ω -3 e ω -6 no plasma de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 48 horas	Erro! Indicador não definido.
Figura 9 - Conteúdo de ácidos graxos ω -3 e ω -6 no plasma de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 72 horas	Erro! Indicador não definido.
Figura 10 - Conteúdo de ácidos graxos ω -3 e ω -6 no fígado de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 48 horas	Erro! Indicador não definido.
Figura 11 - Conteúdo de ácidos graxos ω -3 e ω -6 no fígado de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 72 horas	Erro! Indicador não definido.
Figura 12 - Quantidade dos ácidos graxos poli-insaturados linoleico, araquidônico, eicosapentaenóico e docosahexaenóico no plasma de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas.	57

Figura 13 - Quantidade dos ácidos graxos poli-insaturados linoleico, araquidônico, eicosapentaenóico e docosahexaenóico no fígado de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas.60

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Razão entre ácidos graxos ômega-3 : ômega-6 no plasma de ratos antes e após a infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 48 e 72 horas.62

Gráfico 2 - Razão entre ácidos graxos ômega-3 : ômega-6 no fígado de ratos antes e após a infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 48 e 72 horas.63

Gráfico 3 - Razão entre ácidos graxos eicosapentaenóico : arquidônico no plasma de ratos antes e após a infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 48 e 72 horas.64

Gráfico 4 - Razão entre ácidos graxos eicosapentaenóico : arquidônico no fígado de ratos antes e após a infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 48 e 72 horas.65

RESUMO

Morais AT. *Dinâmica da incorporação plasmática, leucocitária e hepática de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 após infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas contendo óleo de peixe* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Propriedades biológicas de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPIs ω -3), particularmente dos ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexanoico (DHA), sugerem seu benefício clínica em condições inflamatórias. A incorporação leucocitária de AGPIs ω -3 é importante para que suas propriedades anti-inflamatórias ocorram. Comparado com administração por via digestiva, a infusão parenteral de emulsões lipídicas (EL) contendo AGPIs ω -3 tem incorporação celular precoce. Experimentalmente, em ratos saudáveis, o pico de incorporação celular de AGPIs ω -3 ocorreu 72 horas após a infusão parenteral de ELs contendo óleo de peixe como fonte de EPA e DHA. Em ratos a incorporação celular de AGPIs ω -3 administrados por via parenteral foi mais rápida quando infundidos em conjunto com triglicérides de cadeia média (TCM) do que associados a AGPIs. Uma EL parenteral contendo quantidades elevadas de TCM (50%) em sua formulação tornou-se recentemente disponível para a prática clínica e poderia ser útil para facilitar a incorporação celular de AGPIs ω -3. Nosso trabalho avaliou experimentalmente as modificações de incorporação leucocitária de AGPIs ω -3 após infusão parenteral de nova EL contendo óleo de peixe e alto teor de TCM (grupo TCM / TCL / OP). Estudamos estas modificações em células mononucleares e polimorfonucleares após 48 e 72 horas de infusão e em comparação com EL experimental contendo a mesma quantidade de AGPIs ω -3 e menor de TCM (grupo TCL / OP). Os resultados demonstraram que, após 48 h de infusão, o grupo OP apresentou menos ômega-6 do que o grupo TCM, enquanto as quantidades de ômega 3 eram similares tanto em células mono, quanto em polimorfonucleares. Após 72h, todos os grupos apresentaram diminuição no conteúdo de AGPIs ω -6 e ω -3. A razão entre ω -6 / ω -3 foi similar entre os grupos no tempo 48h e melhor no grupo OP no tempo 72h. Nossos resultados indicam que a presença de TCM na EL parenteral contendo OP parece não influenciar a dinâmica de incorporação leucocitária de AGPIs.

Descritores: ácidos graxos ômega-3; óleos de peixe; nutrição parenteral; leucócitos mononucleares; neutrófilos; ratos.

ABSTRACT

Morais AT. *Dynamics of plasma, leukocyte and hepatic incorporation of omega-3 polyunsaturated fatty acids after parenteral infusion of different fish oil containing lipid emulsion* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Biological properties of omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω -3 PUFA), particularly eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), suggest its clinical benefit under inflammatory conditions. The leukocyte incorporation of ω -3PUFAs is important for its anti-inflammatory properties to occur. Compared with digestive administration, parenteral infusion of lipid emulsions (LE) containing ω -3 PUFAs has early cellular uptake. Experimentally, in healthy rats, the peak cellular uptake of ω -3 PUFAs occurred 72 hours after parenteral infusion of fish oil lipid emulsion (FOLE) as the source of EPA and DHA. In rats, the cellular uptake of parenterally administered ω -3 PUFAs was faster when infused together with medium chain triglycerides (MCT). A parenteral LE containing high amounts of MCT (50%) in its formulation become available for clinical practice and could be useful to facilitate the cellular uptake of ω -3 PUFAs. Our work experimentally evaluated the leukocyte incorporation modifications of ω -3 PUFAs after parenteral infusion of new FOLE and high MCT content (MCT / LCT / FO group). We studied these changes in mononuclear and polymorphonuclear leukocytes after 48 and 72 hours of infusion and compared with experimental LE containing the same amount of ω -3 and lower MCT-PUFAs (LCT / FO group). The results showed that, after 48 h of infusion, the FO group had less omega-6 than the MCT group, whereas the omega 3 amounts were similar in both mono- and polymorphonuclear cells. After 72 h, all groups had a decrease in the content of PUFAs ω -6 and ω -3. The ratio of ω -6 / ω -3 was similar between the groups at time 48h and better in the FO group at time 72h. Our results indicate that the presence of MCT in FOLE does not seem to influence the leukocyte incorporation dynamics of ω -3 PUFAs.

Descriptors: fatty acids, omega-3; fish oils; parenteral nutrition; leukocytes, mononuclear; neutrophils; rats.

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (ω -3)

Ácidos graxos (AG) ômega-3 (ω -3) constituem família de ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) de cadeia longa, cuja primeira dupla-ligação encontra-se entre o terceiro e quarto carbono, a partir do radical metil ¹. O AGPI ω -3 mais consumido na dieta humana corresponde ao ácido graxo essencial α -linolênico (ALA), não sintetizado pelo organismo humano, por ausência das enzimas delta (Δ)-12 e (Δ)-15 dessaturases. ¹.

No organismo humano, após processos enzimáticos sequenciais de alongamento e dessaturação, o ALA pode ser convertido endogenamente em outros AGPIs, como ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) ¹. Estes apresentam propriedades biológicas com especial interesse clínico, mas suas taxas de conversão pelo organismo humano são muito baixas (cerca de 0,2% e 0,05% do total de ácido α -linolênico consumido, respectivamente) ². Nesse cenário, a ingestão de óleos de peixes ricos em EPA e DHA podem suprir as necessidades desses AGPIs para o homem³.

1.2. AGPIs ω -3 e modulação inflamatória

O elo entre ingestão de AGs, inflamação e imunidade baseia-se na incorporação de AGs no perfil lipídico leucocitário. Este sofre influência da composição de AG da dieta e em particular da proporção de diferentes tipos de

AGPIs ⁴. Uma vez incorporado em células leucocitárias, EPA participa diretamente da resposta imunológica competindo pelas mesmas vias enzimáticas (lipoxigenase e da ciclooxigenase) utilizadas por ácido araquidônico (AA) da família ω -6, para a síntese de eicosanóides ¹. Os eicosanóides originados do EPA, como a prostaglandina (PG)E₃, o leucotrieno (LT)B₅ e o tromboxano (TX)₃ possuem potencial inflamatório e imunossupressor significativamente menor do que aqueles pró-inflamatórios sintetizados a partir de AA, que incluem prostaglandina PGE₂, LTB₄, TX₂ e fator de agregação plaquetária (PAF). A capacidade dos AGPIs ω -3 em competir com AGPIs ω -6 na produção de eicosanóides constitui sua mais conhecida propriedade anti-inflamatória ¹.

Atualmente sabe-se que AGPIs ω -3 também são substrato para a síntese de mediadores pró-resolução especializados (SPM) que contemplam as resolvinas e protectinas da série E, por EPA, e da série D, por DHA; bem como as maresinas ¹. Esses SPMs são liberados durante a comunicação célula-célula na fase de resolução inflamatória, via biossíntese transcelular, e participam do controle endógeno da inflamação e da regeneração tecidual ⁵⁻⁹. Além disso, AGPIs ω -3 estão associados com menor produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, e parecem modular positivamente a produção da citocina anti-inflamatória IL-10, através de mecanismos que envolvem mudança da estrutura de *rafts* lipídicos de membrana e modulação de fatores de transcrição nuclear ¹⁰⁻²⁰.

Por conta das propriedades potencialmente anti-inflamatórias acima descritas, hoje se reconhece que AGPIs ω -3, especialmente EPA e DHA, podem prevenir o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas ou

atenuar processos inflamatórios agudos, contribuindo para seu tratamento ⁴. A incorporação e biodisponibilidade desses AGs fundamental para usufruir desses benefícios.

1.3. Administração de AGPIs ω -3 por via parenteral

As taxas de AGPIs ω -3 em membranas celulares plasmáticas e sanguíneas aumentam mais rapidamente após sua administração por via parenteral (1-3 dias) do que por via digestiva (4-7 dias) ^{21,22}. Além disso, a infusão parenteral de AGPIs ω -3 evita perdas decorrentes dos processos digestivos e absorptivos que seguem sua ingestão oral ou enteral. Portanto, existe potencial vantagem em utilizar a via parenteral para disponibilizar AGPIs ω -3 a células leucocitárias ²².

Na prática clínica, a suplementação parenteral de AGPIs ω -3 é feita pela infusão de emulsões lipídicas parenterais (ELP) contendo óleo de peixe, comercialmente disponíveis para uso clínico na Europa, Ásia e América do Sul e parcialmente nos Estados Unidos. As referidas ELs visam aumentar a oferta de AGPIs ω -3 e permitem infundir menores razões entre os AGPIs ω -6: ω -3, quando comparadas com ELs convencionais ricas em óleo de soja, que apresentam elevado conteúdo de AGPIs ω -6 e, portanto, relevante potencial inflamatório ¹.

A maioria dos estudos que avaliaram o efeito de ELs contendo óleo de peixe sobre funções imunológicas, contemplaram o efeito da infusão de ELP composta exclusivamente por emulsão pura de óleo de peixe (experimentais,

em sua grande maioria) ou em associação com ELs convencionais, a saber: ELs à base de óleo de soja, ELs compostas por mistura (1:1 v/v) de óleo de soja e triglicérides de cadeia média (TCM), provenientes de óleo de coco ou ELs compostas por óleo de soja e óleo de oliva (2:8 v/v) ¹.

Em estudos conduzidos no Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo do LIM-35, por nosso grupo, em diferentes modelos experimentais, a infusão de ELP de óleo de peixe se associou à melhora de marcadores de funções imunológicas e inflamatórios. Esses benefícios foram mais acentuados quando ELP de óleo de peixe foi infundida em mistura física com ELs ricas em TCMs ^{23,24}. Uma possível explicação consiste que, experimentalmente, AGPIs ω -3 infundidos por via parenteral se incorporam mais rapidamente em membranas celulares quando associados a TCMs, podendo exercer suas funções imunomoduladoras mais precocemente ^{25,26}.

Uma ELP composta por 50% de TCM, 40% de óleo de soja e 10% de óleo de peixe, na concentração final de 20% de gordura (Lipidem[®]. B. Braun, Melsungen – Alemanha) está disponível para prática clínica. A aplicação desta formulação poderia acelerar a depuração e captação extra-hepática de AGPIs ω -3, graças à sua combinação com alta quantidade de TCMs ²⁷. Além disso, AGPIs ω -3 infundidos na presença de TCMs podem ser poupados da beta-oxidação e síntese de energia (permanecendo disponíveis para outras funções celulares), já que TCMs tem rápida depuração plasmática e oxidação pois dispensam a ação de carnitina para atravessarem a membrana mitocondrial ²⁷.

2 RACIONAL E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

2. RACIONAL E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A administração parenteral de AGPIs ω -3 em associação a TCMs pode ser de grande valia em condições de estresse, para disponibilizar rapidamente esses ácidos graxos para células leucocitárias e em tecidos associados à resposta imunológica^{21,26}.

Em estudo prévio de nosso grupo, infundimos ELP composta exclusivamente por óleo de peixe puro durante três dias pré-operatórios em pacientes com câncer do aparelho digestivo. Não observamos aumento de AGPIs ω -3 em membranas leucocitárias, quando avaliadas 18 horas após o término da infusão da ELP. Observamos melhora de marcadores imunológicos leucocitários e plasmáticos, mas sem impacto significativo na evolução clínica pós-operatória dos pacientes³⁴. A ELP de óleo de peixe foi infundida pelo tempo considerado ideal pela literatura, até então disponível, para se obter os benefícios imunomoduladores de AGPIs ω -3. No entanto, uma das limitações do estudo referido pode ter sido que o tempo de infusão não fora suficiente para propiciar o aparecimento de benefícios clínicos.

Considerando-se que câncer está associado com inflamação e catabolismo orgânicos, em nosso estudo prévio³⁴, levantou-se a hipótese de que o organismo dos pacientes avaliados fez rápido uso dos AGPIs ω -3 infundidos para síntese de mediadores inflamatórios, por exemplo. Com isso, durante o período de 18 horas entre o término de infusão da ELP e o procedimento cirúrgico, poderia ter ocorrido redução desses ácidos graxos em membranas de células leucocitárias que, assim não teriam exercido suas desejadas propriedades imunomoduladoras no período pós-operatório.

Portanto, é possível que o desenho de protocolos de infusão parenteral de AGPIs ω -3 em condições de estresse orgânico deva considerar tempos mais prolongados de tratamento para se obter os benefícios clínicos desejados.

O presente estudo experimental, em ratos, pretende avaliar a dinâmica da incorporação de AGPIs ω -6 e ω -3 em leucócitos, plasma e fígado, após infusão parenteral de ELP contendo óleo de peixe e 50% de TCMs (Lipidem®). Essas observações foram feitas em diferentes períodos e em comparação com uma ELP experimental contendo óleo de peixe e óleo de soja, que difere do Lipidem® por não conter de TCMs em sua formulação. Nossa hipótese considera que sob condições estáveis, a presença de alta quantidade de TCM permite atingir o pico de incorporação de AGPIs ω -3 em período de infusão de emulsão lipídica contendo óleo de peixe menor do que 72h.

O custo de ELPs contendo óleo de peixe é superior ao custo de ELPs convencionais, mas seus comprovados benefícios clínicos incluem menor gasto com antibióticos e menor tempo de internação na UTI e hospitalar que podem gerar economia de recursos financeiros destinados à saúde ³⁵. A possibilidade de infundir AGPIs ω -3 por via parenteral por período reduzido poderia implicar ainda em maior economia. Portanto, nossos dados poderão oferecer evidências que norteiem futuramente o planejamento de protocolos de infusão de AGPIs ω -3 por via parenteral em diferentes situações clínicas, a fim de usufruir rapidamente de suas propriedades imunomoduladoras e com melhor custo-benefício.

3 OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a dinâmica de circulação plasmática e incorporação leucocitária e hepática de ácidos graxos poli-insaturados após infusão de emulsão lipídica parenteral contendo óleo de peixe e rica em triglicérides de cadeia média em ratos.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar se a presença de triglicérides de cadeia média na emulsão lipídica parenteral contendo óleo de peixe possibilita a incorporação de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 em maior quantidade;
- Avaliar se a presença de triglicérides de cadeia média na emulsão lipídica parenteral contendo óleo de peixe possibilita a incorporação de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 em menor tempo de infusão.

4 MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1. Local

O estudo experimental foi realizado no Laboratório de Investigação Médica 35 (LIM 35) do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) em parceria com Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP).

4.2. Aspectos éticos

O presente estudo e todos os procedimentos envolvidos em seu protocolo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA – FMUSP; protocolo nº 063/15, Anexo A).

O estudo contou com o apoio financeiro de auxílio pesquisa, doação de bombas de infusão e fornecimento de insumos para infusão dos laboratórios BBraun Brasil e fornecimento de frascos de emulsão lipídica de óleo de peixe (Omegaven® 10%) pelo laboratório Fresenius Kabi;

4.3. Delineamento Experimental

O presente estudo contemplou a avaliação em células leucocitárias (mononucleares e polimorfonucleares), plasma e fígado provenientes de ratos Lewis isogênicos machos adultos

Os animais foram classificados em distintos grupos experimentais de acordo com o tipo de infusão parenteral a que foram submetidos, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Descrição dos grupos de animais

Grupo	Descrição
CB	Controle Basal (0h)
SI 48	Sem infusão por 48 ou 72 horas após CVC
TCL/OP 48	Infusão de TCL/OP por 48 horas
TCM/TCL/OP 48	Infusão de TCM/TCL/OP por 48 horas
SI 72	Sem infusão por 72 horas após CVC
TCL/OP 72	Infusão de TCL/OP por 72 horas
TCM/TCL/OP 72	Infusão de TCM/TCL/OP por 72 horas

Legenda – CB: controle basal; SI: sem infusão; CVC: cateterização do sistema venoso central; TCL/OP: emulsão lipídica (EL) composta por mistura de EL à base de óleo de soja e EL à base de óleo de peixe (8:2 v/v); TCM/TCL/OP: emulsão lipídica composta e por óleo de peixe associado a óleo de soja e triglicérides de cadeia média

Os períodos de infusão das distintas ELs foram de 48 h e 72 h, selecionados a partir do estudo de Hagi e cols., que encontrou pico de incorporação de AGPIs ω -3 72 h após infusão de diferentes ELs contendo óleo de peixe, sem TCM, em ratos saudáveis ³². Nosso planejamento metodológico permite observar se a presença de alta quantidade de TCM viabiliza atingir pico de incorporação de AGPIs ω -3 em período menor de infusão, e em maior quantidade conforme dados mensurados, em diferentes tecidos, por cromatografia gasosa. A inclusão do grupo CB visou obter dados de

comparação dos animais em seu estado natural, sem adaptação ou intervenção. Já o grupo SI é um controle puro do procedimento cirúrgico de cateterização da veia jugular, portanto sem nenhum tipo de infusão parenteral.

A Figura 1 ilustra o fluxo das diferentes etapas envolvidas no protocolo experimental.

Figura 1 - Esquema ilustrativo do protocolo experimental

Legenda - CVC: cateterização do sistema venoso central

A pequena quantidade de leucócitos sanguíneos disponível, após punção cardíaca no rato adulto, não é suficiente para um exame individual para avaliação do perfil celular de AGPIs ω -3 por cromatografia gasosa. Em estudo piloto padronizamos a quantidade de ratos necessária para obter amostras de leucócitos mono e polimorfonucleares suficientes para boa leitura cromatográfica e verificamos que a amostra contendo *pool* de células leucocitárias, divididas em mononucleares e polimorfonucleares, de três ratos apresentou boas condições de leitura e melhor separação de picos de ácidos graxos no cromatógrafo gasoso (apêndice A).

Dessa forma, para o desenvolvimento das análises de células leucocitárias apresentadas no presente estudo, foram avaliadas duplicatas de *pools*, cada uma contendo amostras provenientes de três animais de cada grupo.

4.4. Procedimentos Gerais

4.4.1. Animais

Foram utilizados ratos isogênicos *Lewis*, machos, adultos, com peso médio de 350 gramas, provenientes do Biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). As normas de proteção e cuidados aos animais de experimentação foram seguidas no início do projeto de pesquisa, segundo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), de acordo com Resolução nº 032/2006, seguido de normas do CEUA – FMUSP.

4.4.2. Ambientação

Previamente aos procedimentos experimentais, os animais foram mantidos durante o período de cinco dias em gaiolas individuais, sob temperatura controlada (20 e 25°C), com dieta padrão AIN-93 M controlada (20 g por dia), água *ad libitum* e ciclos diurnos (12h) de luz para adaptação ao ambiente de pesquisa.

4.4.3. Cateterização do sistema venoso central

Para acesso parenteral, os animais foram submetidos à cateterização do sistema venoso central. Previamente ao procedimento cirúrgico, os animais foram pesados em balança digital com auxílio de recipiente próprio. Após obtenção do peso, foi calculado dose de anestésico cloridrato de Cetamina 80 mg/Kg (Ketamin-S®, do Laboratório Cristália, Brasil) e cloridrato de Xilazina 8,0 mg/Kg (Rompun 2%® do Laboratório Bayer, Brasil). A administração do preparado anestésico foi realizada com utilização de seringa de 1,0 mL na região intraperitoneal dos animais. Após anestesia os animais foram tricotomizados na região ventral do pescoço, supraclavicular direita e retroauricular da região dorsal do pescoço. Após assepsia local com iodopovidona a 10% os animais foram então submetidos à cateterização da veia jugular direita externa, conforme técnica padronizada por Yamaguchi e cols. (1990)³⁶.

4.4.4. Descrição da técnica de cateterização venosa central

Com o animal em decúbito dorsal horizontal em campos estéreis realizou-se incisão transversa com aproximadamente 1,0 cm de extensão na região supraventricular direita. Posicionou-se o animal em decúbito ventral e com auxílio de agulha Intracath (Biotecno Produtos Plásticos e Médicos Ltda, São Paulo), a partir da borda distal da incisão, tunelizou-se o tecido subcutâneo em direção a região dorsal, com exteriorização a 1,0 cm da região

retroauricular. Pelo interior do Intracath, passou-se cateter de silicone (Ciencor® Brasil), de aproximadamente 1,0 mm de diâmetro e 70,0 mm de comprimento, que foi tracionado pelo túnel em direção incisão central. Fixou-se na região dorsal do animal uma peça metálica intermediária, composta por agulha anatomicamente adequada para ratos pela soldagem de duas asas laterais do tipo “borboleta”. Estas laterais continham dois orifícios paralelos em cada extremidade que possibilitaram a fixação da peça intermediária no dorso do animal por meio de dois pontos separados com fio mononylon 3-0 estéril, agulhado e não absorvível (Shalon® suturas, Brasil) que, por sua vez, atravessaram pele e tecido subcutâneo. Em seguida, o animal foi colocado em decúbito dorsal para identificação, dissecação e reparo da veia jugular direita com uso de fio de algodão torcido 4-0, estéril, pré cortado, não absorvível e não agulhado (Polycot® - Ethicon, New Jersey, EUA). A veia jugular externa foi ligada diretamente e cateterizada na sua porção distal com cateter de silicone que foi posicionado anteriormente, contendo solução fisiológica heparinizada a 5% (Figura 2). A incisão da pele foi suturada de forma contínua com fio mononylon 4-0 e desinfetada com álcool iodado 2%.

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

Figura 2 – Fases da cateterização do sistema venoso central

4.4.5. Infusão de emulsão lipídica

Após cateterização do sistema venoso central, os animais foram alocados em gaiolas metabólicas individuais, conectando-se o dispositivo de acesso venoso preso ao animal (“borboleta”) ao intermediário de infusão, denominado *swível*, que gira em torno de seu eixo e permite a livre movimentação do animal ³⁷. Ao *swível* foi conectado um perfusor (Perfusor Space®, BBRAUN) de 150 cm, para infusão gravitacional, específico para a bomba de infusão modelo de seringa, o Perfusor Space® (BBraun Melsugen).

Por meio desses artefatos, os animais receberam infusão parenteral contínua de 6 mL de solução salina 0,9%, na velocidade de 0,25mL/h, durante as primeiras 24 horas após a cateterização, para adaptação após o estresse cirúrgico. Em seguida, poderiam ter a infusão de solução salina interrompida e permanecer por mais 48 ou 72 horas sem receber nenhum insumo por via parenteral (controle do estresse cirúrgico - grupo SI), ou passar a receber infusão parenteral de emulsão lipídica, de acordo com o grupo a que foram destinados. Assim, grupo TCL / OP - ELP controle, composta por mistura de 80% de EL de óleo de soja (Lipovenos® 10%, Fresenius-Kabi) e 20% de EL de óleo de peixe (Omegaven® 10%, Fresenius-Kabi), grupo TCM/TCL/OP -- ELP estudo contendo 50% de TCM, 40% de óleo de soja, e 10% de óleo de peixe (LIPIDEM® 20%, BBraun) por mais 48 ou 72 horas, na velocidade de 0,25 mL/h (as composições de ácidos graxos de ambas ELs encontram-se na Tabela 2). Durante o tempo de infusão parenteral, os animais dos diferentes grupos permaneceram recebendo 20g / dia da dieta oral padrão AIN-93 M.

No período pós-operatório os animais foram acompanhados diariamente, ao longo de todo experimento, para registro do volume de infusão intravenosa, peso corpóreo, ingestão alimentar e eventuais alterações do estado geral do animal e os dados foram registrados em fichas individualizadas. Animais com prejuízo da infusão parenteral pela retirada e/ou perda do *swível* ou do equipo de infusão, foram excluídos do estudo.

Tabela 2 - Composição das emulsões lipídicas controle (TCL/OP – Lipovenus® 10%¹ + Omegaven® 10%² - 8:2 v/v) e estudo (TCM/TCL/OP - Lipidem® 20%³)

Ácidos graxos (g/L)	TCL/OP	TCM/TCL/OP
Caprílico (C8:0)	-	46,8
Cáprico (C10:0)	-	35,3
Mirístico (C14:0)	1,8	-
Palmítico (C16:0)	9,6	10,9
Palmitoleico (C16:1)	1,5	-
Estearico (C18:0)	0,4	4,6
Oleico (C18:1)	21,5	20,4
Linoleico (C18:2)	43,0	39,2
Estearidônico (C18:4)	-	0,3
Araquidônico (C20:4)	0,4	-
Alfa-linolênico (C18:3)	6,8	5,1
Eicosatetraenoico (C:20:4)	-	0,3
Dihomo-gama-linolênico (20:3)	-	0,8
Eicosapentaenoico (C20:5)	4,2	5,9
Docosanoico (22:0)	-	0,3
Docosapentaenoico (C22:5)	0,6	1,0
Docosahexaenoico (C22:6)	4,3	4,4
Total de TCM	0	82,1
Total de ω-9	21,5	20,4
Total de ω-6	43,4	40,0
Total de ω-3	15,9	17,0
Razão ω-6/ω-3	2,7:1	2,3:1

Legenda - dados em vermelho: principais diferenças entre os conteúdos totais de ácidos graxos das emulsões lipídicas; dados em verde: principais semelhanças entre os conteúdos totais de ácidos graxos das emulsões lipídicas. TCM = triglicérides de cadeia média; ω =ômega.

Fonte – ¹ Versleijen M e cols. Clin Nutr. 2005³⁸; ² Dados fornecidos pelo fabricante (Fresenius Kabi, Bad Homburg - Alemanha); 24: 822–9; ³ Dados fornecidos pelo fabricante (B. Braun Sharing Expertise, Melsungen - Alemanha)

Para tornar os grupos tratados com ELs comparáveis em termos de conteúdos de AGPIs ω -6 e ω -3, o volume de EL administrado nos animais do grupo TCL/OP foi o mesmo que o administrado nos animais do grupo TCM/TCL/OP, que receberam 4,3g de gordura/kg de peso corpóreo ($\cong$ 6 mL). Como a EL infundida no grupo TCL/OP tem a metade de concentração de gordura que a administrada no grupo TCM/TCL/OP (10% vs 20%, respectivamente), os animais desse grupo receberam metade da quantidade total de gordura por via parenteral. A quantidade de 4,3 g de gordura/kg de peso corpóreo foi a mesma utilizada pelo Hagi e seus colaboradores³² e nos permitiu administrar o aporte de ácidos graxos essenciais recomendado pela AIN-93³⁹ em quantidades similares entre esses dois grupos, já que o excedente de gordura parenteral do grupo TCM/TCL/OP é proveniente de seu conteúdo de AGs não essenciais, ou seja de TCM.

4.4.6. Obtenção de leucócitos do sangue

Para obtenção de amostras de leucócitos do sangue, os animais foram previamente anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de Cetamina 80 mg/Kg (Ketamin-S®, do Laboratório Cristália, Brasil) e cloridrato de Xilazina 8,0 mg/Kg (Rompun 2%® do Laboratório Bayer, Brasil) e eutanasiados por punção cardíaca para a coleta de sangue total, com uso de tubos secos de coleta à vácuo contendo 0,2mL de heparina.

As amostras de sangue foram submetidas à centrifugação na velocidade de 1800 rpm, à temperatura de 20°C, por 10 min. O plasma foi separado e armazenado em freezer (- 80°C) e o restante da amostra foi diluída em solução

fisiológica (1;1 v/v), acrescida cuidadosamente a tubos contendo Ficoll Hypaque com diferentes densidades (Histopaque® 1077 (1:1) e Histopaque® 1119, Sigma Aldrich) e centrifugada por 30 minutos, na velocidade de 1800 rpm, à 21°C, para isolar leucócitos mononucleares e polimorfonucleares, respectivamente. As nuvens de leucócitos formadas na interface com elementos figurativos do sangue foram coletadas com pipeta Pasteur, ressuspensas em tampão fosfato-salino (PBS), adicionadas a tubos Eppendorf® e armazenadas em freezer (- 80°C) para futura análise.

O fígado coletado foi fatiado, com o auxílio de lâmina de aço, na porção posterior direita e o fragmento obtido foi inserido em tubos criogênicos e armazenado em nitrogênio líquido até o momento de suas análises.

4.4.7. Avaliação do perfil de ácidos graxos de células leucocitárias

Avaliou-se o perfil de AGs de células leucocitárias, plasma e fígado, por cromatografia gasosa em aparelho cromatógrafo (cromatógrafo Agilent 7890 A GC System, equipado com coluna capilar J&W DB-23 60m x 250µm x 0,15 µm Agilent 122-2361) de alta resolução com detector de ionização em chama (FID), alocado no Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP). A avaliação do perfil de AGPIs foi conduzida de acordo com as seguintes abordagens: 1. Avaliação do conteúdo de alfa linoleico (AL), EPA, DHA e AA (%); 2. Avaliação da razão AGPIs ω -3: ω -6; 3. Avaliação da razão EPA : AA.

4.4.8. Esterificação de ácidos graxos leucocitários

Para obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos, as amostras de células foram submetidas ao protocolo proposto por Shirai e cols. (2006)⁴⁰. Em um tubo de 15 mL foi adicionado 1 mL de solução NaOH 0,5 M (Synth, Brasil) em metanol (Synth, Brasil) e 500 uL de amostra e foi procedida homogeneização com uso de vórtex, por 15 segundos, seguida de aquecimento em banho maria a 100 C, por 5 minutos, e resfriamento a temperatura ambiente. Dois mL de BF₃-Metanol 14% (Synth, Brasil) foram adicionados, seguido por agitação em vórtex, por 15 segundos, e aquecimento em banho maria a 100 C, por 30 minutos e resfriamento a temperatura ambiente.

Em seguida, foi adicionado 1mL de isoctano e foi procedida agitação no vórtex, por 30 segundos. Foi adicionado 5 mL de solução saturada de NaCl a 39% (Synth, Brasil) seguida da agitação vigorosa por 30 segundos (agitação manual). Após separação de fases, a camada de isoctano (camada superior) foi transferida para tubos Eppendorf® e procedeu-se a evaporação do isoctano com nitrogênio gasoso. O resíduo seco foi então ressuspendido com 120 uL de hexano grau HPLC (Cer, Brasil), seguido da homogeneização em vórtex.

4.4.9. Análise por cromatografia gasosa

As condições cromatográficas empregadas foram feitas de acordo com Iverson e cols. (2001)⁴¹, com algumas adaptações específicas que se fizeram necessárias para otimizar as amostras do estudo, de acordo com parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão, limites de detecção e quantificação. Os ácidos graxos foram avaliados por padronização externa,

utilizando seus padrões de referência (Sigma) para obtenção da curva de calibração.

4.5. Análise estatística dos dados

Para a análise estatística dos dados, adotou-se limite de confiança de 5% para todos os testes realizados. As análises intragrupo e intergrupo foram realizadas com o teste não paramétrico Kruskal-Wallis e um teste *post-hoc* Mann-Whitney. Diferenças entre os grupos, assim como a variação no peso dos animais e no consumo de ração ao longo do estudo, foram avaliadas pelo teste de Wilcoxon. As análises estatísticas foram realizadas com uso do programa [RCoreTeam2016] R Core Team “R: A language and environment for statistical computing”, 2016, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, com participação essencial do estatístico Guaraci Requena.

5 RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Considerações gerais

Dos 57 animais que adentraram nosso estudo, obtivemos dados válidos em 42 deles, distribuídos nos tempos 0, 48 e 72 horas, conforme ilustrado na figura 3.

Devido à necessidade da realização de *pool* das amostras de leucócitos para a obtenção de material suficiente para análises cromatográficas, o n foi insuficiente para a realização de teste estatístico. Dessa forma, exclusivamente para as células mononucleares e polimorfonucleares, os resultados demonstrados são descritivos.

Figura 3 - Distribuição dos sujeitos da pesquisa

Legenda – CB: controle basal; TCL/OP: emulsão lipídica (EL) composta por mistura de EL à base de óleo de soja e EL à base de óleo de peixe (8:2 v/v); TCM/TCL/OP: emulsão lipídica composta e por óleo de peixe associado a óleo de soja e triglicérides de cadeia média; SI: grupo controle sem infusão após cateterização do sistema venoso central.

5.2. Dados da Amostra

De acordo com os registros diários de evolução clínica, não foram encontradas nos ratos alterações dignas de nota relativas ao estado geral, excreção de urina e fezes e comportamento na gaiola metabólica durante todo o período de experimentação. A variação de peso dos animais entre os períodos antes e 48 ou 72 horas após infusão parenteral não apresentou significância estatística e está demonstrada na Tabela 3.

Tabela 3 – Variação do peso corpóreo (g) nos diferentes grupos de ratos entre o início e o final do estudo.

Tempo	Grupo	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	p ¹
48h	SI	-0.01	0.02	-0.02	-0.02	0.02	0,56
	TCL / OP	0.00	0.02	0.00	-0.02	0.01	1,00
	TCM/TCL/OP	-0.01	0.01	-0.01	-0.02	0.01	0,16
72h	SI	0.01	0.02	0.01	-0.01	0.04	0,31
	TCL / OP	0.01	0.01	0.01	-0.01	0.03	0,34
	TCM/TCL/OP	0.00	0.00	0.00	-0.01	0.00	0,06

Legenda – DP: desvio padrão; SI: sem infusão; TCL/OP: infusão de emulsão lipídica (EL) composta de óleo de soja + óleo de peixe; TCM/TCL/OP: infusão de EL composta de óleo de peixe + óleo de soja + triglicérides de cadeia média; ¹ Wilcoxon.

Nos 5 dias de ambientação que precederam a CVC, os ratos ingeriram, diariamente, as 20 g de ração oferecidas. Conforme mostra a Tabela 4, após a CVC, todos os animais diminuíram sua ingestão, inclusive no grupo sem infusão parenteral. Entre os animais do tempo 48 h, essa variação não apresentou significância estatística em nenhum dos grupos. Já no tempo 72 h, houve uma redução significativa na ingestão de ração entre os animais do grupo TCM / TCL / OP ($p = 0,0031$).

Tabela 4 – Quantidade em gramas de ração consumida nos diferentes grupos de ratos entre o início e o final do estudo.

Ração consumida (g)	Antes	48h	72h
SI	20,00 ± 0,00	16,83 ± 1,84	17,83 ± 3,68
TCL / OP	20,00 ± 0,00	16,44 ± 1,99	18,21 ± 1,10
TCM / TCL / OP	20,00 ± 0,00	16,39 ± 1,42	9,92 ± 5,56

Legenda – SI: sem infusão; TCL/OP: infusão de emulsão lipídica (EL) composta de óleo de soja + óleo de peixe; TCM/TCL/OP: infusão de EL composta de óleo de peixe + óleo de soja + triglicérides de cadeia média.

5.3. Avaliação do conteúdo de AL, AA, EPA e DHA

5.3.1. Leucócitos Mononucleares

Ácido Linoleico (AL)

A quantidade total de AL em células mononucleares foi maior no tempo 0h do que nos tempos 48 e 72h após CVC, inclusive para o grupo que não recebeu infusão após a cirurgia. Conforme demonstrado na tabela 5, o grupo SI foi o que apresentou menores quantidades deste ácido graxo após a cirurgia.

Tabela 5 - Quantidade total de ácido linoleico em leucócitos mononucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas

	0h	48h	72h
CB	13,4%	-	-
SI	-	7,77%	7,04%
TCL / OP	-	9,89%	9,03%
TCM / TCL / OP	-	9,34%	9,43%

Legenda – CB: controle basal; SI: sem infusão; TCL/OP: infusão de emulsão lipídica (EL) composta de óleo de soja + óleo de peixe; TCM/TCL/OP: infusão de EL composta de óleo de peixe + óleo de soja + triglicérides de cadeia média.

Ácido Araquidônico (AA)

Nos animais do grupo basal, a quantidade de ácido araquidônico encontrada nas células mononucleares equivale a 21,8% do total de ácidos graxos de sua composição. Após a CVC, houve um ligeiro aumento na quantidade deste AG entre os animais do grupo SI, tanto em 48 quanto em 72 horas de infusão. Entretanto, observou-se que os animais que receberam infusão de ambas as emulsões lipídicas, zeraram as concentrações deste AG nos dois tempos de infusão avaliados, conforme demonstrado na tabela 6.

Tabela 6 - Quantidade total de ácido araquidônico em leucócitos mononucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas.

	0h	48h	72h
CB	21.80%	-	-
SI	-	24.20%	22.14%
TCL / OP	-	0.00%	0.00%
TCM / TCL / OP	-	0.00%	0.00%

Legenda – CB: controle basal; SI: sem infusão; TCL/OP: infusão de emulsão lipídica (EL) composta de óleo de soja + óleo de peixe; TCM/TCL/OP: infusão de EL composta de óleo de peixe + óleo de soja + triglicérides de cadeia média.

Ácido Eicosapentaenóico (EPA)

A concentração de ácido eicosapentaenóico encontrada nas células mononucleares dos animais do grupo CB (tempo 0h) foi de 1,3%. Após 48h de infusão, essa concentração aumentou ligeiramente nos grupos TCL / OP e TCM / TCL / OP, e reduziu para 0 no grupo sem infusão. Após 72 horas de

infusão, não encontramos quantidades deste ácido graxo em nenhum dos grupos estudados, conforme demonstrado na tabela 7. Essas análises foram repetidas e os resultados confirmados.

Tabela 7 - Quantidade total de ácido eicosapentaenóico em leucócitos mononucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas.

	0h	48h	72h
CB	1.30%	-	-
SI	-	0,00%	0,00%
TCL / OP	-	1.83%	0,00%
TCM / TCL / OP	-	1.89%	0,00%

Legenda – CB: controle basal; SI: sem infusão; TCL/OP: infusão de emulsão lipídica (EL) composta de óleo de soja + óleo de peixe; TCM/TCL/OP: infusão de EL composta de óleo de peixe + óleo de soja + triglicérides de cadeia média.

Ácido Docosahexaenóico (DHA)

Os animais do grupo CB não apresentaram concentração de DHA nas células mononucleares. Após 48h de infusão, encontramos 5,55% e 5,05% deste ácido graxo nos grupos TCL / OP e TCM / TCL / OP, respectivamente, enquanto o grupo sem infusão permaneceu com 0%. Após 72 horas, as concentrações desse AG diminuíram nos grupos que receberam infusão de ambas as ELs, e aumentou no grupo SI, conforme dados apresentados na tabela 8.

Tabela 8 - Quantidade total de ácido docosahexaenóico em leucócitos mononucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas.

	0h	48h	72h
CB	0,00%	-	-
SI	-	0,00%	3.73%
TCL / OP	-	5.55%	4.21%
TCM / TCL / OP	-	5.05%	3.83%

Legenda – CB: controle basal; SI: sem infusão; TCL/OP: infusão de emulsão lipídica (EL) composta de óleo de soja + óleo de peixe; TCM/TCL/OP: infusão de EL composta de óleo de peixe + óleo de soja + triglicérides de cadeia média.

5.3.2. Leucócitos Polimorfonucleares

Ácido Linoleico (AL)

Antes da infusão parenteral, a concentração média de ácido linoleico nas células polimorfonucleares dos animais foi de 10%. Após 48h de infusão, essa quantidade diminuiu em todos os grupos, mas foi maior no grupo SI. Após 72h, as concentrações aumentaram em relação ao tempo 48h, mas permaneceram menores do que no tempo 0h. Neste período, o grupo SI também apresentou a maior concentração deste ácido graxo (tabela 9).

Tabela 9 - Quantidade total de ácido linoleico em leucócitos polimorfonucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas.

	0h	48h	72h
CB	10,11%	-	-
SI	-	8.39%	9.07%
TCL / OP	-	5.34%	7.70%
TCM / TCL / OP	-	4.85%	7.36%

Legenda – CB: controle basal; SI: sem infusão; TCL/OP: infusão de emulsão lipídica (EL) composta de óleo de soja + óleo de peixe; TCM/TCL/OP: infusão de EL composta de óleo de peixe + óleo de soja + triglicérides de cadeia média.

Ácido Araquidônico (AA)

Pode ser observado na tabela 10 que a quantidade total de AA nas células polimorfonucleares reduziu substancialmente após a infusão parenteral, chegando a 0 após 72 horas de infusão em todos os grupos. No tempo 48 h, os animais do grupo TCL / OP foram os que apresentaram menor concentração desse ácido graxo na composição das células. As análises foram repetidas e os resultados foram confirmados.

Tabela 10 - Quantidade total de ácido araquidônico em leucócitos polimorfonucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas.

	0h	48h	72h
CB	20,48%	-	-
SI	-	3,11%	0,00%
TCL / OP	-	1,77%	0,00%
TCM / TCL / OP	-	2,00%	0,00%

Legenda – CB: controle basal; SI: sem infusão; TCL/OP: infusão de emulsão lipídica (EL) composta de óleo de soja + óleo de peixe; TCM/TCL/OP: infusão de EL composta de óleo de peixe + óleo de soja + triglicérides de cadeia média.

Ácido Eicosapentaenóico (EPA)

Não foi detectada a presença de EPA nas células polimorfonucleares dos animais no tempo 0 horas. Após 48 h de infusão, os animais dos grupos TCL / OP e TCM / TCL / OP apresentaram concentrações de 4,42% e 4,06%, respectivamente. O grupo sem infusão permaneceu sem aumentar a quantidade desse ácido graxo nas células estudadas. Após 72 horas de infusão, em todos os grupos quantidade voltou para 0, conforme demonstrado na tabela 11. Estes resultados também foram repetidos e confirmados.

Tabela 11 - Quantidade total de ácido eicosapentaenóico em leucócitos polimorfonucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas.

	0h	48h	72h
	0,00%	-	-
SI	-	0,00%	0,00%
TCL / OP	-	4,42%	0,00%
TCM / TCL / OP	-	4,06%	0,00%

Legenda – CB: controle basal; SI: sem infusão; TCL/OP: infusão de emulsão lipídica (EL) composta de óleo de soja + óleo de peixe; TCM/TCL/OP: infusão de EL composta de óleo de peixe + óleo de soja + triglicérides de cadeia média.

Ácido Docosahexaenóico (DHA)

Não foi detectada a presença de DHA nas células polimorfonucleares no tempo 0. Após a infusão, nos dois tempos grupo SI apresentou as menores concentrações desse ácido graxo em sua composição. No tempo 48h, a maior concentração de DHA em células polimorfonucleares foi encontrada no grupo TCM / TCL / OP, enquanto no tempo 72h, foi no grupo TCL / OP, de acordo com os dados apresentados na tabela 12.

Tabela 12 - Quantidade total de ácido docosahexaenóico em leucócitos polimorfonucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas.

	0h	48h	72h
CB	0,00%	-	-
SI	-	1,49%	1,70%
TCL / OP	-	5,53%	6,07%
TCM / TCL / OP	-	5,70%	5,25%

Legenda – SI: sem infusão; TCL/OP: infusão de emulsão lipídica (EL) composta de óleo de soja + óleo de peixe; TCM/TCL/OP: infusão de EL composta de óleo de peixe + óleo de soja + triglicérides de cadeia média.

5.3.3. Plasma

A figura 12 ilustra a concentração plasmática dos AGPIs linoleico, araquidônico, eicosapentaenoico e docosahexaenóico nos tempos estudados.

Ácido Linoleico (AL)

A quantidade média de AL encontrada no tempo 0 foi de $8,41\% \pm 0,41$. Após 48h, essa quantidade aumentou significativamente no grupo SI ($p = 0,0022$) e diminuiu significativamente nos os grupos TCL / OP ($p = 0,0022$) e TCM / TCL / OP ($p = 0,0022$). Após 72 horas, as quantidades se mantiveram sem alterações significativas em todos os grupos, conforme mostrado na figura 12 (A).

Na comparação entre grupos para cada tempo observamos que a quantidade de AL detectada não apresentou diferença estatística entre os grupos TCL / OP e TCM / TCL / OP ($p_{48h} = 0,67$; $p_{72h} = 0,39$).

Ácido Araquidônico (AA)

Inversamente ao que aconteceu com o ácido linoleico, observamos que a quantidade de AA no plasma aumentou ao longo do tempo nos grupos eu receberam EL, tendo seu pico de concentração atingido após 72 horas de infusão no grupo TCM / TCL / OP, a medida em que no grupo SI, essa quantidade diminuiu.

Na comparação entre os grupos para cada tempo, podemos observar que após 48 h de infusão a quantidade de AA encontrada nos grupos que receberam infusão foi maior do que a encontrada no grupo SI ($p = 0,0022$), e que não houve diferença estatística entre os grupos TCL / OP e TCM / TCL / OP ($p = 0,13$). Já após 72 horas de infusão, a diferença aumenta expressivamente ($p = 0,0022$) (figura 12 - B).

Ácido Eicosapentaenóico (EPA)

Não detectamos presença de EPA no plasma dos animais do grupo CB (tempo 0h), nem nos animais do grupo SI para ambos os tempos (48 e 72h). A quantidade do ácido graxo encontrada nos animais do grupo TCM / TCL / OP foi maior do que a encontrada no grupo TCL / OP após 48 horas de infusão. É possível observar na figura 12 (C) que após 72 horas de infusão, a quantidade de EPA no plasma dos animais do grupo TCL / OP aumenta, ao passo em que diminui drasticamente no grupo TCM / TCL / OP.

Ácido Docosahexaenóico (DHA)

Não detectamos presença de DHA no plasma dos animais do grupo CB (tempo 0h), no grupo SI no tempo 48h e em nenhum dos grupos no tempo 72 horas (análise repetida e confirmada). No tempo 48h, a quantidade de DHA encontrada foi maior no grupo TCM / TCL / OP do que a encontrada no grupo TCL / OP ($p = 0,0022$).

Ilustrada na figura 12 (D), a comparação entre os tempos mostra as quantidades de DHA encontradas nos grupos TCL / OP e TCM / TCL / OP foram significativamente maiores nos tempos 48h e 72h, quando comparados ao tempo 0h ($p = 0.0028$) e significativamente menor no tempo 72h em comparação ao tempo 48h ($p = 0.0028$).

Figura 4 - Quantidade dos ácidos graxos poli-insaturados linoleico, araquidônico, eicosapentaenóico e docosahexaenóico no plasma de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas.

Legenda – AL: ácido linoleico; AA: ácido araquidônico; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenóico; SI: sem infusão; TCL/OP: infusão de emulsão lipídica (EL) composta de óleo de soja + óleo de peixe; TCM/TCL/OP: infusão de EL composta de óleo de peixe + óleo de soja + triglicérides de cadeia média; T0: animais sem infusão (controle basal); T48: 48 horas após cateterização do sistema venoso central; T72: 72 horas após cateterização do sistema venoso central.

5.3.4. Fígado

Ácido Linoleico (AL)

Podemos observar na figura 13 (A) que a quantidade de ácido linoleico encontrada no fígado dos ratos diminuiu significativamente entre 0 e 48 horas de infusão, para todos os grupos ($p = 0,0022$). Neste período, a maior concentração de AL foi encontrada no grupo SI, seguido do grupo TCM / TCL / OP. A diferença entre os grupos que receberam infusão, apesar de pequena, foi estatisticamente significativa ($p = 0,0022$).

Após 72 horas de infusão, a concentração de AL diminuiu significativamente com relação ao tempo 48h nos grupos SI ($p = 0,0022$) e TCM / TCL / OP ($p = 0,015$), e aumentou no grupo TCL / OP ($p = 0,0022$).

Ácido Araquidônico (AA)

A incorporação de ácido araquidônico no fígado dos ratos apresentada na figura 13 (B) apresenta dinâmica semelhante à do mesmo AG no plasma. Observamos que a quantidade de AA aumentou ao longo do tempo nos grupos que receberam infusão parenteral de EL, apresentando maior pico de incorporação após 72 horas de infusão no grupo TCM / TCL / OP. A diferença entre os grupos foi significativa em ambos os tempos de estudo ($p = 0,0022$). A

diferença entre os tempos 48h e 72h foi significativa apenas para o grupo TCM / TCL / OP ($p = 0,0022$).

Ácido Eicosapentaenóico (EPA)

Como nos leucócitos e no plasma, não detectamos presença de EPA no fígado dos animais do grupo CB, e do grupo SI para ambos os tempos estudados.

Após 48 e 72 horas de infusão, a quantidade deste ácido graxo encontrada no grupo TCL / OP foi significativamente maior do que a encontrada no grupo TCM / TCL / OP ($p_{T48} = 0,0022$; $p_{T72} = 0,0022$).

Quando avaliamos a diferença na incorporação entre 0h, 48h e 72h, verificamos que a quantidade de EPA encontrada no fígado dos animais foi maior nos tempos 48 e 72 do que as encontradas no tempo 0h ($p = 0,0028$), e maior no tempo 72h em comparação ao tempo 48h ($p = 0,0022$). Estes resultados estão ilustrados na figura 13 (C).

Ácido Docosahexaenóico (DHA)

Os resultados das análises de DHA no fígado dos animais são mostrados na figura 13 (D) e se comportam de forma semelhante aos encontrados nas análises de EPA: Os animais nos grupos CB e SI, em ambos os tempos estudados, não apresentaram concentrações detectáveis desse AG, enquanto a quantidade encontrada no grupo TCL / OP foi significativamente

maior do que a encontrada no grupo com TCM, em ambos os períodos de infusão (p 48 e 72h = 0.0021645).

Quando avaliamos a diferença entre os tempos, observamos que a quantidade de DHA no fígado foi maior nos tempos 48 e 72 do que as encontradas no tempo 0h (p = 0,0028), mas não encontramos diferença estatisticamente significativa entre os tempos 48 e 72h (p = 0,7).

Figura 5 - Quantidade dos ácidos graxos poli-insaturados linoleico, araquidônico, eicosapentaenóico e docosahexaenóico no fígado de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas.

Legenda – AL: ácido linoleico; AA: ácido araquidônico; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenóico; SI: sem infusão; TCL/OP: infusão de emulsão lipídica (EL) composta de óleo de soja + óleo de peixe; TCM/TCL/OP: infusão de EL composta de óleo de peixe + óleo de soja + triglicérides de cadeia média; T0: animais sem infusão (controle basal); T48: 48 horas após cateterização do sistema venoso central; T72: 72 horas após cateterização do sistema venoso central.

5.4. Avaliação da razão AGPIs ω -3 : ω -6

Não foi possível calcular a razão entre ω -3 : ω -6 nos leucócitos mononucleares e polimorfonucleares, pois em alguns tempos, . Dessa forma, apresentaremos plasma e no fígado dos animais. ‘

5.4.1. Plasma

Conforme mostrado na tabela 5, as células mononucleares de ratos que receberam infusão durante 48 horas, apresentaram razão similar à recomendada para todos os insumos, enquanto as células polimorfonucleares no mesmo tempo apresentaram razões inferiores à recomendada, chegando a menos de 1:1 nos grupos OP48 e SS48.

Após 72 horas de infusão, apenas os ratos do grupo OP tinham razão próxima à recomendada tanto nas células mononucleares quanto nas polimorfonucleares (Tabela5).

Gráfico 1 - Razão entre ácidos graxos ômega-3 : ômega-6 no plasma de ratos antes e após a infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 48 e 72 horas.

(EPA+DHA)/(AL+AA) Plasma

Legenda – EPA: ácido eicosapentaenóico; DHA: ácido docosahexaenóico; AL: ácido linoleico; AA: ácido araquidônico SI: sem infusão; TCL/OP: infusão de emulsão lipídica (EL) composta de óleo de soja + óleo de peixe; TCM/TCL/OP: infusão de EL composta de óleo de peixe + óleo de soja + triglicérides de cadeia média; T0: animais sem infusão (controle basal); T48: 48 horas após cateterização do sistema venoso central; T72: 72 horas após cateterização do sistema venoso central.

5.4.2. Fígado

Gráfico 2 - Razão entre ácidos graxos ômega-3 : ômega-6 no fígado de ratos antes e após a infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 48 e 72 horas.

(EPA+DHA)/(AL+AA) Fígado

Legenda – EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenóico; AL: ácido linoleico; AA: ácido araquidônico SI: sem infusão; TCL/OP: infusão de emulsão lipídica (EL) composta de óleo de soja + óleo de peixe; TCM/TCL/OP: infusão de EL composta de óleo de peixe + óleo de soja + triglicérides de cadeia média; T0: animais sem infusão (controle basal); T48: 48 horas após cateterização do sistema venoso central; T72: 72 horas após cateterização do sistema venoso central.

5.5. Avaliação da razão EPA : AA

5.5.1. Plasma

Gráfico 3 - Razão entre ácidos graxos eicosapentaenóico : araquidônico no plasma de ratos antes e após a infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 48 e 72 horas.

EPA/AA Plasma

Legenda – EPA: ácido eicosapentaenoico; AA: ácido araquidônico SI: sem infusão; TCL/OP: infusão de emulsão lipídica (EL) composta de óleo de soja + óleo de peixe; TCM/TCL/OP: infusão de EL composta de óleo de peixe + óleo de soja + triglicérides de cadeia média; T0: animais sem infusão (controle basal); T48: 48 horas após cateterização do sistema venoso central; .T72: 72 horas após cateterização dos sistema venoso central.

5.5.2. Fígado

Gráfico 4 - Razão entre ácidos graxos eicosapentaenóico : araquidônico no fígado de ratos antes e após a infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 48 e 72 horas.

Legenda – EPA: ácido eicosapentaenoico; AA: ácido araquidônico SI: sem infusão; TCL/OP: infusão de emulsão lipídica (EL) composta de óleo de soja + óleo de peixe; TCM/TCL/OP: infusão de EL composta de óleo de peixe + óleo de soja + triglicérides de cadeia média; T0: animais sem infusão (controle basal); T48: 48 horas após cateterização do sistema venoso central; T72: 72 horas após cateterização do sistema venoso central.

6 DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O presente estudo experimental buscou verificar se a presença de TCM em uma emulsão lipídica contendo ω -3 aumenta a sua biodisponibilidade em distintos tecidos, em termos de quantidade e tempo. O delineamento experimental do estudo incluiu diferentes grupos afim de determinar o perfil basal de AGPIs em leucócitos, fígados e plasma de ratos Lewis e então avaliar o efeito do trauma cirúrgico e da infusão parenteral sobre a biodisponibilidade desses ácidos graxos nos tecidos estudados. Em paralelo, utilizamos a infusão de EL com perfil lipídico muito similar à EL teste, com exceção de seus conteúdos de TCM, permitindo a observação dos efeitos específicos das emulsões sobre a biodisponibilidade leucocitária dos AGPIs ω -3.

O estudo conduzido por Hagi e colaboradores, cujos resultados balizaram o delineamento experimental do presente estudo, utilizou esplenócitos, células brancas e vermelhas do sangue e leucócitos polimorfonucleares peritoneais para avaliar a velocidade de incorporação de AGPIs ω -3 após a infusão parenteral contínua de diferentes formulações de nutrição parenteral total (composição: 4,3 g de gordura; 36,3 g de glicose e 6,2 g de aminoácidos por kg de peso corporal) que diferiam entre si pelas diferentes razões entre ω -3 e ω -6 que cada formulação apresentava. Entretanto, nenhuma dessas formulações estudadas por Hagi continha TCM em sua composição.

Uma característica comum dos ácidos graxos de cadeia média (AGCM) é a sua captação e ativação intramitocondrial independente de carnitina. Ao contrário dos ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), o metabolismo celular dos

AGCM depende, em menor grau, das proteínas de ligação aos ácidos graxos. Dessa forma, a hipótese de que a adição de TCM poderia aumentar a disponibilidade de AGPI n-3 nas células leucocitárias, parte do princípio de que a taxa de oxidação dos AGCM é maior e mais rápida que dos AGCL, e, portanto, seriam preferenciais para a produção de energia, deixando os AGPIs n-3 livres para exercer suas propriedades na modulação do sistema imunológico.

Os estudos conduzidos por Carpentier e seus colaboradores, demonstraram o benefício da adição de TCM à EL no aumento da velocidade de incorporação de EPA em leucócitos. Entretanto, diferem do presente estudo pela metodologia de infusão parenteral realizada, injeção única ou em bolus, enquanto utilizamos a infusão parenteral contínua.

Uma limitação metodológica do presente estudo consistiu na necessidade de se avaliar o perfil de AGPIs leucocitários em *pool*. Ocorreu que o volume sanguíneo possível de ser coletado no rato inviabilizou a obtenção de quantidade de leucócitos suficiente para a análise cromatográfica. Estudos nessa área, de forma geral, optam por estudar a incorporação celular destes AGs em plaquetas ou células vermelhas do sangue por serem mais numerosas, contudo estas não refletem a incorporação em células leucocitárias mono e polimorfonucleares. Destaca-se aqui que o uso de animais isogênicos viabiliza uma resposta mais uniforme desses animais, reduzindo o viés da análise em *pool*. Além disso, todas as demais análises plasmáticas e teciduais foram feitas de forma individual, auxiliando na compreensão dos achados leucocitários.

Observamos que pesquisas nesta área utilizam o mesmo número de animais do presente estudo, mas não isogênico, a exemplo de Barros e colaboradores que conduziram um estudo com o objetivo de avaliar a melhor via de administração de emulsão lipídica para incorporação de AGPI ω -3 em células brancas, vermelhas, tecido adiposo, fígado, pulmão e coração de ratos Wistar (n = 6 animais por grupo). Tal fato nos deixa confortáveis com a determinação do tamanho da amostra estudada, uma vez que a similaridade genética leva à uniformidade fenotípica, de modo que menos animais são necessários em um experimento para atingir um dado nível de poder estatístico.

Para a análise do perfil plasmático, leucocitário e hepático de AGPIs de foram aplicadas técnicas referência e de última geração. Diversos estudos da literatura utilizam-se da cromatografia gasosa em estudos clínicos com AGPIs n-3, para avaliar sua incorporação em diversos tipos celulares, principalmente, células do sangue. A abordagem analítica aqui adotada incluiu a identificação não apenas de AGPIs n-3 EPA e DHA, mas também dos AGPIs n-6 AL e AA e das razões entre n-3:n-6 e EPA:AA. Ela se ampara no fato de que a primeira parece importante para que efeitos imunomoduladores favoráveis ocorram e a segunda pode refletir a propensão celular para a síntese de eicosanoides mais ou menos inflamatórios.

A quantidade de gordura ofertada por via parenteral (4,3 g de gordura / kg de peso corporal) foi a mesma utilizada pelo Hagi e nos permitiu garantir o aporte diários de ácidos graxos essenciais recomendados pela AIN-93 para roedores. Esta quantidade, maior do que a comumente utilizada em estudos com humanos (0,2 g / kg / dia), deve-se ao fato de que a lipase lipoproteica,

enzima com função conhecida de hidrolisar moléculas de triglicérides encontradas nas partículas de lipoproteínas, ser mais ativa nos ratos do que nos seres humanos, aumentando assim a necessidade deste nutriente para esses animais.

Outro ponto de atenção consiste no fato de que os animais no estudo de Hagi receberam uma ração livre de ácidos graxos essenciais duas semanas antes e durante o estudo, com o objetivo de causar uma depleção orgânica desses AGs nos ratos. Entendemos que tais resultados sejam difíceis de extrapolar para a prática clínica, uma vez que causar depleção de ácidos graxos essenciais pode acarretar em diversos prejuízos ao paciente, e que, dificilmente, encontraremos um paciente sem ingestão de algum tipo de AG durante semanas, independente da qualidade. Dessa forma, optamos por manter, durante todo o período do estudo, a oferta à ração padrão, com composição respeitando às preconizadas pela AIN-93 M.

É fato que a ração oferecida possui AGPI n-3 em sua composição, o que poderia repercutir nos achados do presente estudo. Entretanto, alguns pontos devem ser considerados: o primeiro é o de que a quantidade de n-3 presente é muito baixa (0,05%) está na forma de ácido alfa linolênico, que passa por diversos processos de alongamento e dessaturação para ser convertido em EPA e DHA, e essa taxa de conversão geralmente é muito baixa; e o segundo é o de que os animais dos grupos controle sem infusão foram alimentados com a mesma dieta e, portanto, apresentam o mesmo perfil.

Em conjunto, nossos dados sugerem que não houve benefício da adição de TCM em termos de incorporação de AGPI n-3 nos leucócitos, fígado e plasma de ratos.

7 CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Dada as condições da presente pesquisa, em que ratos foram previamente submetidos à cateterização venosa central para infusão de EL rica em OP contendo ou não TCM por 48 ou 72 horas, podemos concluir que:

1. A presença de triglicérides de cadeia média na emulsão lipídica parenteral contendo óleo de peixe possibilita a incorporação de ácidos graxos em maior quantidade em leucócitos mono e polimorfonucleares e em células hepáticas, assim como aumenta a disponibilidade plasmática desses ácidos graxos;
2. A presença de na emulsão lipídica parenteral contendo óleo de peixe possibilita a incorporação de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 em menor tempo de infusão em leucócitos mononucleares e polimorfonucleares, mas não para fígado e plasma.

8. ANEXOS

8.1. Anexo A – Aprovação CEUA

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08/04/2015, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 063/15 intitulado: "Cinética da incorporação de ácidos graxos poliinsaturados em leucócitos após infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas contendo óleo de peixe em ratos submetidos ou não à endotoxemia" que utilizará 60 animais da espécie rato, apresentado pelo Departamento de Gastroenterologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CEUA-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Dan Linetzky Waitzberg

Pesquisador (a) Executante: Alweyd Tesser de Moraes

CEUA-FMUSP, 08 de Abril de 2015

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

9. REFERÊNCIAS

1. Waitzberg DL, Torrinhas RS. Fish oil lipid emulsions and immune response: what clinicians need to know. *Nutr Clin Pract.* 2009;24:487-99.
2. Pawlosky RJ, Hibbeln JR, Novotny JA, Salem N Jr. Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans. *J Lipid Res.* 2001; 42:1257-65. Sargent JR. Fish oils and human diet. *Br J Nutr.* 1997; 78:S5-13.
3. Calder PC, Deckelbaum RJ. Dietary lipids: more than just a source of calories, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.*1999; 2:105-7.
4. Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A, Arita M, Tjonahen E, Gotlinger KH, Hong S, Serhan CN. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J Immunol.* 2005; 174:4345-55.
5. Fredman G, Serhan CN. Specialized proresolving mediator targets for RvE1 and RvD1 in peripheral blood and mechanisms of resolution. *Biochem J.* 2011; 437:185-97.
6. Spite M, Norling LV, Summers L, Yang R, Cooper D, Petasis NA, Flower RJ, Perretti M, Serhan CN. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature.* 2009; 461:1287-91.

7. Hasturk H, Kantarci A, Goguet-Surmenian E, Blackwood A, Andry C, Serhan CN, Van Dyke TE. Resolvin E1 regulates inflammation at the cellular and tissue level and restores tissue homeostasis in vivo. *J Immunol.* 2007; 179:7021-29.

8. Titos E, Rius B, González-Pérez A, López-Vicario C, Morán-Salvador E, Martínez-Clemente M, Arroyo V, Clària J. Resolvin D1 and Its Precursor Docosahexaenoic Acid Promote Resolution of Adipose Tissue Inflammation by Eliciting Macrophage Polarization toward an M2-Like Phenotype. *J Immunol.* 2011; 187:5408-18.

9. Khalfoun B, Thibault F, Watier H, Bardos P, Lebranchu Y. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6. *Adv Exp Biol Med.* 1997; 400:589–97.

10. Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ. The effect on human tumor necrosis factor and interleukin 1b production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin. Nutr.* 1996; 63:116–22.

11. Meydani SN, Endres S, Woods MM, Goldin BR, Soo C, Morrill-Labrode A, Dinarello CA, Gorbach SL. Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *J Nutr.* 1991; 121:547-55.

12. Hao W, Wong OY, Liu X, Lee P, Chen Y, Wong KK. ω -3 fatty acids suppress inflammatory cytokine production by macrophages and hepatocytes. *J Pediatr Surg*. 2010; 45:2412-8.
13. Sierra S, Lara-Villoslada F, Olivares M, Jiménez J, Boza J, Xaus J. IL-10 expression is involved in the regulation of the immune response by omega 3 fatty acids. *Nutr Hosp*. 2004; 19:376-82.
14. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008; 454:428–35.
15. Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1812:1007-22.
16. Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters J.M, Gonzalez F.J, Fruchart J.C, Tedgui A, Haegeman G, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem*. 1999; 274:32048–54.

17. Siddiqui RA, Harvey KA, Zaloga GP, Stillwell W. Modulation of Lipid Rafts by n-3 Fatty Acids in Inflammation and Cancer: Implications for Use of Lipids During Nutrition Support. *Nutr Clin Practice*. 2007; 22:74-88.
18. Shaikh SR, Rockett BD, Salameh M, Carraway K. Docosahexaenoic acid modifies the clustering and size of lipid rafts and the lateral organization and surface expression of MHC class I of EL4 cells. *J Nutr*. 2009; 139:1632-39.
19. Kim W, Fan YY, Barhoumi R, Smith R, McMurray DN, Chapkin RS. n-3 polyunsaturated fatty acids suppress the localization and activation of signaling proteins at the immunological synapse in murine CD4+ T cells by affecting lipid raft formation. *J Immunol*. 2008; 181:6236-43.
20. van der Meij BS, van Bokhorst-de van der Schueren MA, Langius JA, Brouwer IA, van Leeuwen PA. n-3 PUFAs in cancer, surgery, and critical care: a systematic review on clinical effects, incorporation, and washout of oral or enteral compared with parenteral supplementation. *Am J Clin Nutr*. 2011;94:1248-65.
21. Torrinhas R, Waitzberg D. Major abdominal surgery can lead to an excessive systemic inflammatory response, which in turn increases the risk of postoperative complications and multiple organ failure. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2011;35:292-4.

22. De Nardi L, Bellinati-Pires R, Torrinhas RS, Bacchi CE, Arias V, Waitzberg DL. Effect of fish oil containing parenteral lipid emulsions on neutrophil chemotaxis and resident-macrophages' phagocytosis in rats. *Clin Nutr.* 2008;27:283-8.
23. 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 Suppl 1:S83-8.
24. Carpentier YA, Portois L, Malaisse WJ. Rapid enrichment of cell phospholipids in long-chain polyunsaturated ω -3 fatty acids after a bolus intravenous injection of a medium-chain triacylglycerol: fish oil emulsion in humans. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2012;36:671-6.
25. Carpentier YA¹, Hacquebard M, Portois L, Dupont IE, Deckelbaum RJ, Malaisse WJ. Rapid cellular enrichment of eicosapentaenoate after a single intravenous injection of a novel medium-chain triacylglycerol:fish-oil emulsion in humans. *Am J Clin Nutr.* 2010; 91:875-82.
26. Waitzberg DL, Torrinhas RS, Jacintho TM. New parenteral lipid emulsions for clinical use. *JPEN J Parent Enteral Nutr.* 2006; 30:351–367.

27. Senkal M, Geier B, Hannemann M, Deska T. Supplementation of ω -3 fatty acids in parenteral nutrition beneficially alters phospholipid fatty acid pattern. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2007; 31:12-7.
28. Berger MM, Tappy L, Revely JP, Koletzko BV, Gepert J, Corpataux JM, Cayeux MC, Chiolero RL. Fish oil after abdominal aorta aneurysm surgery. *Eur J Clin Nutr.* 2008; 62:1116-22.
29. Wichmann MW, Thul P, Czarnetzki H-D, Morlion BJ, Kemen M, Jauch K-W. Evaluation of clinical safety and beneficial effects of a fish oil containing lipid emulsion (Lipoplus, MLF541): data from a prospective, randomized, multicenter trial. *Crit Care Med.* 2007; 35:700-6.
30. Köller M, Senkal M, Kenen M, König W, Zumbel V, Muhr G. Impact of omega-3 fatty acid enriched TPN on leukotriene synthesis by leukocytes after major surgery. *Clin Nutr.* 2003; 22:59-64.
31. Hagi A, Nakayama M, Shinzaki W, Haji S, Ohyanagi H. Effects of the omega-6:omega-3 fatty acid ratio of fat emulsions on the fatty acid composition in cell membranes and the anti-inflammatory action. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2010;34:263-70.
32. Barros KV1, Carvalho PO, Cassulino AP, Andrade I, West AL, Miles EA, Calder PC, Silveira VL. Fatty acids in plasma, white and red blood cells,

- and tissues after oral or intravenous administration of fish oil in rats. *Clin Nutr.* 2013;32:993-8.
33. De Miranda Torrinhas RS, Santana, R, Garcia T, Cury-Boaventura MF, Sales MM, Curi R, Waitzberg DL. Parenteral fish oil as a pharmacological agent to modulate post-operative immune response: randomized, double-blind and controlled clinical trial in patients with gastrointestinal cancer. *Clin Nutr.* 2013;32:503-10.
34. Pradelli L, Eandi M, Povero M, Mayer K, Muscaritoli M, Heller AR, Fries-Schaffner E. Cost-effectiveness of omega-3 fatty acid supplements in parenteral nutrition therapy in hospitals: a discrete event simulation model. *Clin Nutr.* 2014;33:785-92.
35. Yamaguchi N, Lima-Gonçalves E, Waitzberg DL, Diniz Filho AM, Goffi FS. Effects of parenteral nutrition on tumor growth: experimental aspects. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 1990;45:115-22.
36. Galizia MS, Alves CC, Tamanaha EM, 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 Sep;128(1):3-8.
37. Versleijen M, Roelofs H, Preijers F, Roos D, Wanten G. Parenteral lipids modulate leukocyte phenotypes in whole blood, depending on their fatty acid composition. *Clin Nutr.* 2005;24:822-9.

38. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. 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;123:1939-51.
39. Shirai T, Matsuzaki K, Kuzumoto M, Nagahisa K, Furusawa C, Shioya S, Shimizu H. Precise metabolic flux analysis of coryneform bacteria by gas chromatography-mass spectrometry and verification by nuclear magnetic resonance. *J Biosci Bioeng.* 2006;102:413-24.
40. Iverson SJ. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids.* 2001; 36:1283-7
41. Grimm H, Tibell A, Norrlind B, Clecher C, Wilker S, Schwemmler K. Immunoregulation by parenteral lipids: impact of the n-3 to n-6 fatty acid ratio. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1994; 18:417-21.

10 APÊNDICES

10. APÊNDICES

10.1. APÊNDICE A - Apresentação do estudo

Apresentação pôster no 14º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN, realizado em São Paulo em Agosto de 2017.

14º CONGRESSO NACIONAL DA SBAN
Alimentação e Nutrição: Mitos e Fatos
29 a 31 de agosto de 2017, Maksoud Plaza Hotel, São Paulo/SP

14º CONGRESSO NACIONAL
29 a 31 de agosto de 2017
Maksoud Plaza Hotel
São Paulo, SP

Certificamos que o trabalho **PO-29-096 - DINÂMICA DA INCORPORAÇÃO LEUCOCITÁRIA DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ÔMEGA-3 APÓS INFUSÃO PARENTERAL DE DIFERENTES EMULSÕES LIPÍDICAS CONTENDO ÓLEO DE PEIXE EM RATOS.**, participou do **14º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN**, realizado de 29 a 31 de agosto de 2017, no Maksoud Plaza Hotel em São Paulo - SP, na qualidade de **PÔSTER**.

Autores: **ALWEYD TESSER, RAQUEL S M M TORRINHAS, FELIPE G G APROBATO, RONALDO SOUZA OLIVEIRA-FILHO, ÉRIKA TAMANAHA, MÁRCIA DE SOUZA ANTUNES, DAN L WAITZBERG.**

São Paulo, 31 de agosto de 2017.

ANTONIO HERBERT LANCHA JUNIOR
Presidente do Congresso

OLGA MARIA SILVERIO AMANCIO
Presidente da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN

SBAN
realização
Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição

Certificado