RONALDO SOUSA OLIVEIRA FILHO

Impacto da infusão parenteral de emulsão lipídica contendo óleo de peixe sobre a peroxidação lipídica e defesas antioxidantes no fígado de ratos

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

2020

RONALDO SOUSA OLIVEIRA FILHO

Impacto da infusão parenteral de emulsão lipídica contendo óleo de peixe sobre a peroxidação lipídica e defesas antioxidantes no fígado de ratos

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

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira Filho, Ronaldo Sousa
Impacto da infusão parenteral de emulsão lipídica contendo óleo de peixe sobre a peroxidação lipídica e defesas antioxidantes no fígado de ratos / Ronaldo Sousa Oliveira Filho. -- São Paulo, 2020.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: Dan Linetzky Waitzberg.

Descritores: 1.Ácido eicosapentaenoicô 2.Óleos de peixe 3.Nutrição parenteral 4.Estresse oxidativo 5.Peroxidação lipídica 6.Enzimas antioxidantes 7.Fígado 8.Ratos

USP/FM/DBD-193/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

A conclusão deste projeto não é apenas sobre alcançar o cobiçado Título de Mestre pela Universidade de São Paulo. Na minha humilde opinião, este projeto representa uma linda caminhada guiada pela fé, superação, perseverança e vitória. Ao subir no pódio para comemoração, eu não poderia deixar de exaltar os anjos que sempre estiveram ao meu lado nesta jornada. Eles estavam o tempo todo disfarçados de guias, mental e espiritual. O direcionamento e as bênçãos deles foram essenciais para esta linda vitória. Portanto eu compartilho o lugar mais alto deste pódio com todos eles.

Eu dedico e divido este título de Mestre com toda minha linda **Família** que mesmo longe, compreendeu que tudo isso tinha um grande propósito.

À **Roseane,** minha mãe, que sempre priorizou a nossa educação e nos mostrou o verdadeiro significado de investimento de vida. Obrigado pelo grande exemplo de mulher, mãe e profissional.

À **Emanuelly**, minha irmã, que atualmente segue com muita maturidade no manejo dos seus sonhos. Você sempre contará com minha eterna torcida.

Aos meus avós **Edilson e Rosalba**, pois eles me mostraram que tudo é possível quando guiado pela fé e trabalho. Obrigado pelas bênçãos.

Dedico ao meu companheiro **Gerardo**, que sempre compactuou com minhas ideias, me apoiou e confiou em mim. Obrigado pela dedicação, você foi essencial para minha chegada até aqui.

Aos meus filhos **Sophia e Theo**, que sempre estiveram ao meu lado. Obrigado pelo carinho, atenção e companhia nas madrugadas frias e geladas.

Agradecimento Especial

Ao meu querido **Professor Dr. Dan Linetzky Waitzberg** que me proporcionou esta rica experiência de estudar e pesquisar com os maiores nomes da terapia nutricional no cenário nacional e internacional. Lembro como se fosse hoje, ainda como estudante de graduação, o dia em que consegui alugar o famoso livro do Dr. Dan para desbravar o universo da nutrição enteral e parenteral na universidade. Meus professores sempre me disseram: “Se você almeja aprender e trabalhar com terapia nutricional, este deve ser o seu livro de cabeceira”. Naquela época, eu jamais imaginaria que o famoso Dr Dan Waitzberg seria o meu grande mestre e orientador. Entretanto hoje, eu tenho a honra de discutir ideias, planos e projetos. Esta linda dissertação de mestrado, foi fruto de nossas valiosas discussões. Dr Dan agradeço pela incomensurável oportunidade, atenção, carinho, reconhecimento e direcionamento profissional. Esta experiência foi única e incomparável. Muito Obrigado por reconhecer o talento daqueles que tiveram a oportunidade de estudar no respeitado Metanutri.

“Há uma coisa muito escassa, muito mais distante, muito mais rara que o talento. É o talento para reconhecer o talento.”

Elbert Hubbard

Agradecimentos

"Uma máquina pode fazer o trabalho de cinquenta pessoas comuns. Nenhuma máquina pode fazer o trabalho de uma equipe extraordinária."

Elbert Hubbard

Meus sinceros votos de agradecimento,

À **Alweyd Tesser**, que desde o princípio me recebeu no grupo experimental de braços abertos e coração puro. Obrigado pelos ensinamentos e paciência durante o treinamento dos procedimentos cirúrgicos (passagem de cateter central e eutanásia). Fico muito feliz por ter iniciado essa caminhada com você. Foram longos dias de reuniões, cirurgias, eutanásia, preparo de amostra, reposição de ração e muitas discussões (científicas, profissionais e pessoais). Muito obrigado pelo apoio, essa caminhada foi leve e prazerosa ao seu lado.

À **Priscila Garla**, grande pesquisadora e incentivadora do nosso grupo experimental. Antes da minha chegada ao laboratório eu já sabia da sua grande competência e sabedoria. Quando eu ainda estava na universidade (último ano de graduação) você avaliou o meu pôster no congresso, e anos depois nos tornamos parceiros de laboratório. Que mundo pequeno né? Obrigado pelas dicas, ensinamentos e confiança. Estou muito feliz pelo seu crescimento pessoal e profissional. Parabéns pela linda trajetória.

À **Raquel Torrinhas,** agradeço a supervisão e orientação para o desenho e conclusão deste estudo. Todas nossas discussões foram ricas e repletas de conteúdo técnico/científico. Eu sempre imaginei/desejei possuir apenas 0,1% das suas ideias e hipóteses. Você é genial. Ver o sobrenome Torrinhas em todos os artigos do nosso laboratório, em diferentes temáticas, me enche de orgulho. Todos nós sabemos que a sua contribuição científica é essencial para o sucesso de nossas publicações.

Aos amigos da equipe extraordinária de Cirurgia Experimental, **Felipe e Érika**. O trabalho de vocês foi incrível. Ter biólogos no nosso grupo é motivo de orgulho. Vocês nos mostraram como é importante respeitar os animais, principalmente em pesquisa científica. Obrigado por tudo. Desde os momentos de discussão científica até os nossos dias de faxina no biotério. Vocês são incríveis.

À **Márcia Antunes**, que foi o ponto de partida deste grande projeto que resultou em duas dissertações, um doutorado, muitas apresentações em congressos e publicações científicas. Muito obrigado pela iniciativa.

Aos membros do Laboratório de **Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo (Metanutri)** pelo compartilhamento diário de conhecimentos científicos.

Ao querido **Francisco Balbino**, nosso funcionário do **Metanutri,** que sempre trabalhou com zelo para manter adequado o ambiente de cirurgia experimental e armazenamento de nossas amostras no laboratório.

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.

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.**

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 professores **Philip Calder** e **Pierre Singer**, pela atenção dispensada, durante suas visitas ao Brasil, em conhecer nossos projetos e ajudarem no desenho metodológico e discussão dos resultados preliminares do nosso grupo.

À **Ana Carolina Tamburrino**, minha parceira de UTI. Obrigado por me ajudar nos momentos de correria deste projeto. Obrigado por segurar o meu ramal durante as reuniões científicas no Metanutri, obrigado por continuar a visita multiprofissional por mim quando eu precisei repor a ração dos ratos, obrigado por ajudar na rotina da UTI quando eu precisei correr para trocar as bolsas de emulsões lipídicas, obrigado pelas risadas e parceira de sempre.

Aos coordenadores do **Serviço de Nutrição do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – ICESP**, que desde o princípio me apoiaram e incentivaram no desenvolvimento deste projeto. **Vinícius, Manuela e Gislaine,** muito obrigado pelo apoio.

Aos meus amigos e colegas **Nutricionistas - ICESP** que sempre me perguntavam sobre o andamento do projeto, quando eu iria terminar e quando seria a defesa. Infelizmente, devido à pandemia, a defesa foi *on-line.* Mas quem sabe na defesa do próximo projeto? Quero todo mundo lá.

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. 3a 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

INTRODUÇÃO..... 21

Mecanismos oxidantes, antioxidantes e estresse oxidativo..... 22

Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3..... 24

Papel dos ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 nas defesas antioxidantes..... 26

Defesas antioxidantes no fígado..... 29

RACIONAL DO ESTUDO..... 31

Contribuição científica..... 32

OBJETIVO..... 34

Objetivos específicos..... 35

MÉTODOS..... 36

Local de execução do estudo..... 37

Animais..... 37

Delineamento experimental..... 37

Ambientação dos animais..... 38

Cateterização do sistema venoso central..... 39

Infusão de soluções parenterais..... 41

Eutanásia..... 43

Análise por cromatografia gasosa..... 44

Análise do fator de transcrição gênica, enzimas antioxidantes e marcador de peroxidação lipídica no fígado 45

Análise estatística..... 45

RESULTADOS..... 46

DISCUSSÃO..... 75

CONCLUSÕES..... 96

REFERÊNCIAS..... 98

ANEXOS..... 111

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido araquidônico

AACC – *Acetil CoA carboxilase α e acetil CoA carboxilase* β

AG – Ácidos graxos

AGPIS – Ácidos graxos poli-insaturados

AGPIS ω-3 – Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3

AGPIS ω-6 – Ácidos graxos poli-insaturados ômega-6

AGMI ω9 – Ácidos graxos monoinsaturados ômega-9

AL – Alfa Linoleico

ARE – *Antioxidant Response Elements*

CAT – Catalase

CB – Controle basal

Cols. – Colaboradores

COX2 – Cicloxigenase-2

CVC – Cateter venoso central

ELOS – Emulsão lipídica composta por óleo de soja

EPA – Ácido Eicosapentaenoico

EL – Emulsão lipídica

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ERO's – Espécies reativas de oxigênio

ERN's – Espécies reativas de oxigênio

DHA – Ácido Docosahexaenoico

g – Gramas

h – Hora

HO-1 – Heme oxigenase 1

IL – Interleucina

Kg – Quilogramas

Keap1 – *Kelch-like ECH associated protein* 1

LT – Leucotrieno

MDA – Malondialdeído

Mg – Miligramas

NOX4 – NADPH oxidase 4

NF-κB – Fator de transcrição nuclear κapa B

NQO1 – NAD(P)H quinona oxidoredutase 1

OO – Óleo de oliva

OP – Óleo de peixe

OS – Óleo de soja

PBS – Tampão fosfato-salino

PG – Prostaglandina

GCL – Glutamato cisteína ligase

GPX – Glutationa peroxidase

GSH – Glutationa

GST – Glutationa S transferase

GR – Glutationa redutase

NRF2 – *Nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2*

PG – Prostaglandina

PPAR – Proliferador de peroxissomos

PPM – Parte por milhão

SHAM – Grupo sem infusão de infusão parenteral

SOD – Superóxido dismutase

SPMs – Mediadores lipídicos especializados (*Specialized lipid mediators)*

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCL – Triglicerídeos de cadeia longa

TCM – Triglicerídeos de cadeia média

TG – Triglicérides

TNF – Fator de necrose tumoral

TNP – Terapia nutricional parenteral

TRX – Tioredoxina

T0h – Tempo zero hora. Aferição realizada no primeiro dia do protocolo experimental

T48h – Tempo 48 horas. Aferição realizada no tempo 48 horas de infusão de emulsão lipídica do protocolo experimental

T72h – Tempo 72 horas. Aferição realizada no tempo 72 horas de infusão de emulsão lipídica do protocolo experimental

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcento

® - Marca registrada

°C - Graus centígrados

α - Alfa

β - Beta

ω - Ômega

LISTA DE SIGLAS

AIN – *American Institute of Nutrition*

ASPEN – *American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*

CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

ESPEN – *European Society for Clinical Nutrition and Metabolism*

FMUSP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

FCF-IQ/USP – Faculdade de Ciências Farmacêutica e Instituto de Química da Universidade de São Paulo

FSP-USP – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo

LIM – Laboratório de Investigação Médica

UNICAMP – Universidade de Campinas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema antioxidante enzimático.

Figura 2 - Mecanismos propostos para os efeitos inibidores modulados por ácidos graxos ômega-3 e seus metabólitos sobre a via NFkB e estresse oxidativo.

Figura 3 - Mecanismos propostos de ativação das defesas antioxidantes modulado pela ação sinérgica de ácidos eicosapentaenoico e docosahexaenoico na vigência de estresse.

Figura 4 - Distribuição dos ratos conforme grupos experimentais.

Figura 5 - Ilustração do protocolo experimental.

Figura 6 - Fases da cateterização do sistema venoso central.

Figura 7 - Distribuição dos ratos conforme grupo experimental.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das emulsões lipídicas estudadas: TCL/TCM (Lipofundin® 20%) e TCL/TCM/OP (Lipidem® 20%).

Tabela 2 – Distribuição dos ácidos graxos das emulsões lipídicas estudadas (mg/ml): TCL/TCM (Lipofundin® 20%) e TCL/TCM/OP (Lipidem® 20%).

Tabela 3 – Caracterização do peso no dia da passagem de cateter venoso central (T0h) e no dia da eutanásia (T48h ou T72h) conforme grupo experimental.

Tabela 4 – Quantidade de ração consumida no dia da implantação de cateter venoso central (T0h) e no dia da eutanásia (T48h ou T72h) conforme grupo experimental.

Tabela 5 – Razão entre ácidos graxos ômega-3: ômega-6; EPA: DHA e oleico: linoleico no plasma e fígado de ratos após a infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 48 ou 72 horas.

Tabela 6 – Quantificação de Nrf2 no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 ou 72 horas nos grupos SHAM, TCL/TCM, TCL/TCM/OP e 0 hora para o grupo CB.

Tabela 7 – Quantificação de F2 isoprostano no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 ou 72 horas nos grupos SHAM, TCL/TCM, TCL/TCM/OP e 0 hora para o grupo CB.

Tabela 8 – Quantificação da enzima antioxidante GPx no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 ou 72 horas nos grupos SHAM, TCL/TCM, TCL/TCM/OP e 0 hora para o grupo CB.

Tabela 9 – Quantificação da enzima antioxidante CAT no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 ou 72 horas nos grupos SHAM, TCL/TCM, TCL/TCM/OP e 0 hora para o grupo CB.

Tabela 10 – Quantificação da enzima antioxidante SOD no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 ou 72 horas nos grupos SHAM, TCL/TCM, TCL/TCM/OP e 0 hora para o grupo CB.

Tabela 11 – Resumo dos resultados dos marcadores antioxidantes observados conforme grupo experimental estudado.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 2 – Concentração dos ácidos graxos ômega 3 (ppm) encontrados no plasma de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 horas nos grupos: controle basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.

Gráfico 3 – Concentração dos ácidos graxos ômega 6 e ômega 9 (ppm) encontrados no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 horas nos grupos: controle basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.

Gráfico 4 – Concentração dos ácidos graxos ômega 3 (ppm) encontrados no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 horas nos grupos: controle basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.

Gráfico 5 – Concentração dos ácidos graxos ômega 6 e ômega 9 (ppm) encontrados no plasma de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 72 horas nos grupos: controle basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.

Gráfico 6 – Concentração dos ácidos graxos ômega 3 (ppm) encontrados no plasma de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 72 horas nos grupos: controle basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.

Gráfico 7 – Concentração dos ácidos graxos ômega 6 e ômega 9 (ppm) encontrados no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 72 horas nos grupos: controle basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.

Gráfico 8 – Concentração dos ácidos graxos ômega 3 (ppm) encontrados no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 72 horas nos grupos: controle basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.

Gráfico 9 – Quantificação do fator de transcrição gênica Nrf2 encontrado no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 horas nos grupos: Controle Basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.

Gráfico 10 – Quantificação do fator de transcrição gênica Nrf2 encontrado no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 72 horas nos grupos: Controle Basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.

Gráfico 11 – Quantificação do biomarcador de peroxidação lipídica F2 isoprostano encontrado no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 horas nos grupos: Controle Basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.

Gráfico 12 – Quantificação do biomarcador de peroxidação lipídica F2 isoprostano encontrado no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 72 horas nos grupos: Controle Basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.

Gráfico 13 - Quantificação da enzima antioxidante glutationa peroxidase encontrada no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 horas nos grupos: Controle Basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.

Gráfico 14 – Quantificação da enzima antioxidante glutationa peroxidase encontrada no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 72 horas nos grupos: Controle Basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.

Gráfico 15 – Quantificação da enzima antioxidante catalase encontrada no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 horas nos grupos: Controle Basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.

Gráfico 16 – Quantificação da enzima antioxidante catalase encontrada no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 72 horas nos grupos: Controle Basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.

Gráfico 17 – Quantificação da enzima antioxidante superóxido dismutase encontrada no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 horas nos grupos: Controle Basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.

Gráfico 18 – Quantificação da enzima antioxidante superóxido dismutase encontrada no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 72 horas nos grupos: Controle Basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.

RESUMO

Oliveira Filho RS. *Impacto da infusão parenteral de emulsão lipídica contendo óleo de peixe sobre a peroxidação lipídica e defesas antioxidantes no fígado de ratos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPIs ω-3) eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA), naturalmente encontrados em altas concentrações no óleo de peixe (OP), são conhecidos por suas propriedades anti-inflamatórias. Estudos experimentais e clínicos revelaram que AGPIs ω-3 também podem conferir potencial proteção antioxidante para o organismo. Recentemente, emulsão lipídica (EL) contendo OP e triglicérides de cadeia média (TCMs) tornou-se disponível como parte integral de soluções de terapia nutricional parenteral. Como TCMs são substrato lipídico energético preferencial para a mitocôndria, esta nova EL poderia propiciar maior disponibilidade celular de EPA e DHA para outras funções biológicas, como por exemplo, combate ao estresse oxidativo. Infusão de EL enriquecida com OP se associou com a melhora da atividade de enzimas antioxidantes e menor peroxidação lipídica em humanos. Por outro lado, infusão parenteral de EL composta exclusivamente por triglicerídeos de cadeia longa (TCL) se associou com redução de defesas antioxidantes no fígado de ratos. Nós avaliamos, experimentalmente, o impacto da infusão parenteral de duas EL's compostas por TCL/TCM contendo ou não OP sobre o estresse oxidativo no fígado de ratos. Após cateterização do sistema venoso central, ratos Lewis isogênicos foram aleatoriamente e proporcionalmente subdivididos em 4 grupos, de acordo com o tipo de ELs selecionadas de maneira a administrar 4,3g de gordura/kg de peso corpóreo (6 mL/dia). Os grupos estudados foram: 1) Controle basal (CB) sem intervenção cirúrgica; 2) SHAM – realizada passagem de CVC, porém sem infusão de EL; 3) TCL/TCM: controle do tratamento, submetido à administração endovenosa de EL composta por 50% de óleo de soja (OS) e 50% de TCM; e 4) TCL/TCM/OP: com administração parenteral, de EL composta por 40% OS, 50% TCM e 10% OP. Após o período de infusão parenteral de 48 ou 72 horas, os animais foram submetidos a eutanasia para coleta de tecido hepático. Posteriormente, dosamos o fator de transcrição gênica Nrf2, biomarcador de peroxidação lipídica F2 Isoprostano e enzimas antioxidantes glutationa peroxidase (Gpx), catalase (CAT), e superóxido dismutase (SOD) no fígado de ratos. Nossos resultados apontaram, em ambos os períodos estudados, no grupo de ratos tratados com infusão parenteral de EL composta por TCL/TCM/OP maiores níveis de Nrf2, de enzimas antioxidantes Gpx, CAT e SOD, além de menor taxa de F2 isoprostano no fígado em comparação aos grupos TCL/TCM, SHAM e CB. Em conclusão, sugerimos que a administração parenteral de EL composta pela mistura de TCL/TCM/OP promove menor peroxidação lipídica e contribui para o combate ao estresse oxidativo no fígado de ratos.

Descritores: Ácido eicosapentaenoico; Óleos de peixe; Nutrição parenteral; Estresse oxidativo; Peroxidação lipídica; Enzimas antioxidantes; Fígado; Ratos.

ABSTRACT

Oliveira Filho RS. *Impact of parenteral infusion of fish oil containing lipid emulsion on lipid peroxidation and antioxidant defenses in rat liver* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA), naturally found in high concentrations in fish oil (FO) are known for their anti-inflammatory properties. On the other hand, studies have shown that PUFAs can also confer potential antioxidant protection. Experimental and clinical studies have shown that PUFAs can also confer potential antioxidant protection to the body. Recently, a lipid emulsion (LE) containing FO and medium chain triglycerides (MCTs) has become available for the nutrition support of patients requiring parenteral nutritional therapy. As MCTs are preferred energy substrate for lipid mitochondria, this new LE could provide greater availability of EPA and DHA for other biological functions, such as in combating oxidative stress. Parenteral infusion of LE enriched with FO has been shown to improve antioxidant enzymes activity and promote less lipid peroxidation in humans. Differently, parenteral infusion of LE composed exclusively by long chain triglycerides (LCT) reduced the antioxidant defenses in the liver of rats. In the present study, we evaluated, experimentally, the parenteral infusion impact of FO on oxidative stress in rats liver by infusing two LE's composed of LCT/MCT containing or not FO. After central venous system catheterization, Lewis rats were randomly and proportionally subdivided into 4 groups, according to the type of parenteral solution, to deliver 4.3g fat/kg body weight (6mL/day). The groups studied were: 1) Basal control group; 2) SHAM Group – with catheterization of the central venous system, but without LE infusion; 3) LCT/MCT Group: treatment control, submitted to LE administration composed of 50% soybean oil (SO) and 50% MCT; 4) LCT/MCT/FO Group: experimente group, infused with LE composed of 40% SO, 50% MCT and 10% FO. After the parenteral infusion period of 48 or 72 hours, the animals were euthanized to collect liver tissue. Subsequently, we dosed the gene transcription factor Nrf2, the lipid peroxidation biomarker F2 Isopostane and the antioxidant enzymes glutathione peroxidase (Gpx), catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD) in rat’s liver. We observed, after parenteral infusion of LE composed of LCT/MCT/FO, the highest levels of Nrf2, antioxidant enzymes Gpx, CAT and SOD, in addition to lower rates of isoprostane F2 in the liver of rats in both periods studied, compared to LCT/MCT, Sham and Basal Control groups. Therefore, our data could suggest that parenteral administration of LE composed of LCT/MCT/FO promoted less lipid peroxidation and reduced oxidative stress in rat liver.

Descriptors: Eicosapentaenoic acid; Fish oils; Parenteral nutrition; Oxidative stress; Lipid peroxidation; Antioxidant enzymes; Liver; Rats.

1. Introdução

1 - INTRODUÇÃO

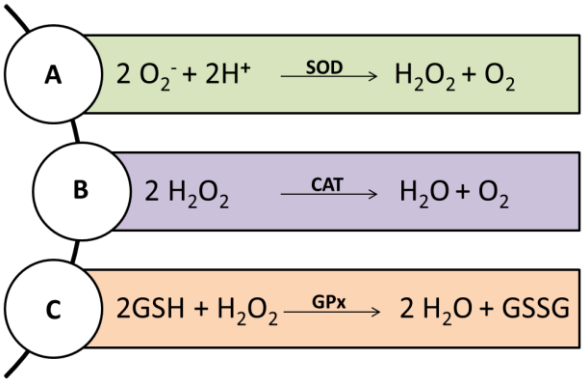
1.1 - Mecanismos oxidantes, antioxidantes e estresse oxidativo

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são produtos normais do metabolismo celular aeróbico e podem desempenhar papel vital na ativação de vias de sinalização, em resposta a alterações de condições ambientais externas ou internas à célula. EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) desempenham ainda papeis fisiológicos importantes, como controle da pressão sanguínea, sinalização celular, apoptose e fagocitose de agentes patogênicos[1,2]. Adiciona-se que esses e outros agentes oxidantes também podem ter efeitos tóxicos à célula.

Basicamente, os efeitos tóxicos de agentes oxidantes se associam ao dano de macromoléculas, como açúcares, DNA, proteínas e lipídeos[3,4]. A membrana celular constitui um dos focos de atuação de agentes oxidantes. A manutenção da integridade de sua camada fosfolipídica é vital para funções celulares e pode ser interrompida pela ação de agentes oxidantes. Além disso, membranas de organelas intracelulares (mitocôndria, retículo endoplasmático, núcleo) também podem constituir alvo de dano oxidativo, por apresentarem estrutura bilipídica e variedade de proteínas e açúcares em sua constituição.

Os efeitos tóxicos oxidantes são evitados por mecanismos naturais orgânicos, redutores ou antioxidantes. O sistema antioxidante que atenua a ação deletéria das EROs e ERNs pode ser classificado como enzimático e não enzimático. O sistema enzimático inclui a participação de enzimas antioxidantes, consideradas de “primeira linha”: A-superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 (Figura 1 A); B- catalase (CAT), que atua na decomposição de H_2O_2 a H_2O e O_2 (Figura 1 B); e C- glutationa peroxidase (GPx), que atua sobre peróxidos em geral, com a utilização da glutationa como cofator (Figura 1 C)[4]. Essas enzimas de “primeira linha” limitam os níveis intracelulares de radicais livres e de outros compostos oxidativos, em condições fisiológicas ou na vigência de estresse[1].

Figura 1 - Sistema antioxidante enzimático



Adaptado Halliwell B e cols[1].
Legenda – Reações antioxidantes de enzimas de primeira linha (A) superóxido dismutase (SOD), (B) catalase (CAT) e (C) glutationa peroxidase (GPx).

O sistema antioxidante não enzimático é formado por muitos agentes, com destaque para glutationa (GSH, principal composto antioxidante intracelular), tocoferóis, ascorbato, ácido úrico e β-caroteno. Proteínas de transporte de metais de transição, como transferrina (transporte de ferro) e ceruloplasmina (transporte do cobre e oxidação do ferro para ser captado pela transferrina)[1], também fazem parte importante do sistema antioxidante não enzimático.

As enzimas de primeira linha do sistema antioxidante enzimático e a glutationa estão predominantemente presentes no meio intracelular entretanto, agentes do sistema antioxidante não enzimático localizam-se predominantemente no meio extracelular. No sangue circulam importantes antioxidantes, como vitaminas C, E, β-caroteno, bem como biomarcadores do dano oxidativo causados após a ação das ERO's e ERN's, como malondialdeído (MDA), F_2-isoprostanos e outros derivados da peroxidação lipídica das membranas celulares[1].

Estresse oxidativo é o desequilíbrio entre produção de oxidantes e sua eliminação por mecanismos antioxidantes. Doenças crônicas inflamatórias são frequentemente acompanhadas por estresse oxidativo, com diminuição da atividade de defesas antioxidantes e/ou aumento da produção de agentes

oxidantes. É o caso, por exemplo, do aumento de F_2-isoprostanos em doenças de origem pulmonar e de EROs em hepatopatias[5,6,7].

A inflamação per si, especialmente crônica, é reconhecida como fator de risco importante para a ocorrência de estresse oxidativo, e vice-versa. O mecanismo envolvido nessa relação não é claro mas, durante a inflamação, leucócitos são recrutados para o local do dano e podem causar uma "explosão respiratória" (*respiratory burst*) - essencial para a eliminação de patógenos, embora favoreça a liberação e acúmulo de EROs no local do dano[8].

Esse cenário pode ser agravado pela produção de eicosanoides e citocinas por células inflamatórias, que sinalizam para maior recrutamento de leucócitos para o local da lesão, sustentam e intensificam a liberação de EROs. Por sua vez, esses mediadores-chave podem ativar cascatas de transdução de sinal e atividade de fatores de transcrição que podem mediar respostas de estresse celular imediatas e intensificar a inflamação, o que incluir o fator de transcrição nuclear κapa B (NF-κB). Este ambiente oxidativo / inflamatório prolongado conduz a um ciclo vicioso, que pode culminar em repetidos danos celulares[8].

1.2 - Ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) ômega-3

Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPIs ω-3) compreendem família de ácidos graxos de cadeia longa, cuja primeira dupla-ligação encontra-se entre o terceiro e quarto carbono, a partir do radical metil de sua cadeia carboxílica[9]. Alguns de seus membros, abundantes no óleo de peixe, especialmente ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosaexaenoico (DHA), têm propriedades biológicas com especial interesse clínico. AGPIs ω-3 são importante fonte de energia, participam da síntese de hormônios e estruturas celulares, do transporte de vitaminas lipossolúveis, e de sinalizações intra e extracelulares. Em adição, os AGPIs ω-3 EPA e DHA têm ações anti-inflamatórias e antioxidantes importantes[10].

AGPIs ω-3 e ω-6 participam diretamente da resposta imunológica, por servirem como substrato para a síntese de mediadores imunológicos

lipídicos[11]. Mediadores lipídicos, que compreendem os eicosanoides e mediadores lipídicos especializados da resolução inflamatória (SPMs), têm papel definido na resposta vascular e no recrutamento de leucócitos, do início até a resolução da inflamação[11].

Frente a um estímulo antigênico, eicosanóides são críticos para iniciar o processo inflamatório. Eles são formados, nas vias enzimáticas de cicloxigenase e lipoxigenase, de forma competitiva, a partir de EPA e do ácido araquidônico (AA) da família n-6. Assim, a maior disponibilidade de EPA pode diminuir a produção de eicosanoides pró-inflamatórios e pró-trombóticos derivados de AA, como prostaglandina (PG) E2, PGI2 e leucotrieno (LT) LTB4, e aumentar a síntese de eicosanoides com menor potencial inflamatório e com papel antitrombótico (PGE3, LTB5)[10].

Como parte dos eventos sequenciais da inflamação, AGPIs ω-3 podem ser desviados da produção de eicosanóides para dar início à síntese de resolvinas, protectinas e maresinas. Esses mediadores lipídicos especializados são coletivamente chamados de SPMs, por contra-regularem mediadores pró-inflamatórios, e reduzirem a magnitude e duração da inflamação. Além disso, os SPMs estimulam reepitelização, cicatrização de feridas e regeneração de tecidos em modelos experimentais[12].

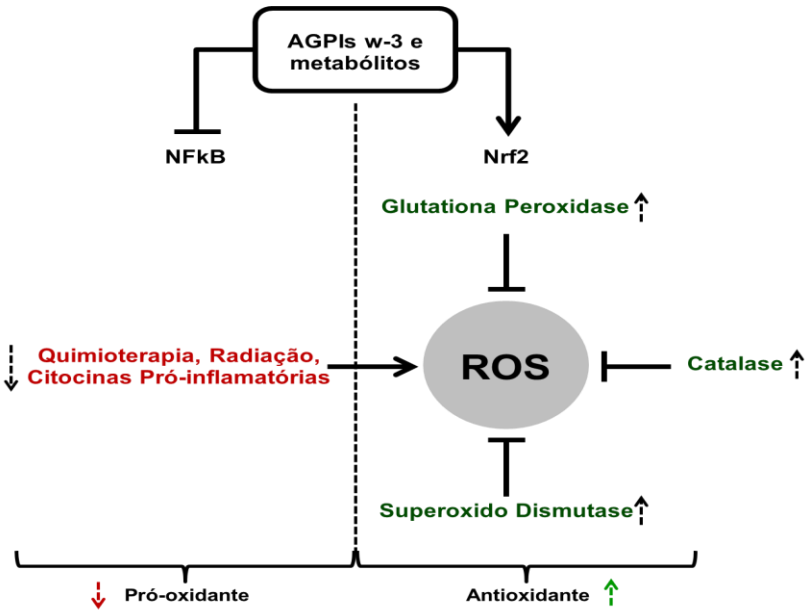
AGPIs ω-3 ainda são associados com inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-1β e IL-6[11], por mecanismos que incluem regulação da expressão de genes via receptores nucleares ativados por proliferador de peroxissomos (PPAR)[14]. Quando ativados, PPARs (principalmente PPAR-gama) podem se ligar diretamente a outros fatores de transcrição, como NF-κB, e inibir a transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória, que incluem citocinas, moléculas de adesão e outros mediadores com importante potencial inflamatório[14,15]. Adicionalmente, uma vez incorporadas em membranas, as moléculas altamente insaturadas de AGPIs ω-3 podem modificar a estrutura caracteristicamente rígida de *rafts* lipídicos, tornando-as mais fluidas e assim dificultar a ativação de receptores imunológicos a eles associados[16].

1.3 - Papel dos AGPIs ômega-3 nas defesas antioxidantes

Em conjunto, os efeitos anti-inflamatórios de AGPIs ω-3 podem contribuir para diminuição da produção de EROs, com potencial efeito antioxidante para o organismo[8]. No entanto, sua característica poli-insaturada pode propiciar peroxidação lipídica. Ocorre que átomos de oxigênio são mais propensos a se incorporarem em região insaturada (dupla ligação), e formarem peróxidos lipídicos oxidantes[18]. A peroxidação de AGPIs ω-3 pode ser evitada com a administração conjunta de antioxidantes, como alfa-tocoferol, como acontece , de rotina, em emulsões lipídicas parenterais[9,11,18].

Cabe destacar ainda, que o efeito antioxidante de AGPIs ω-3 parece prevalecer em que pese serem esses ácidos graxos altamente insaturados. Observações experimentais encontraram poderoso efeito antioxidante do óleo de peixe e seus AGPIs ω-3 isolados, em modelos de asma[19] e radioterapia em câncer[20], com aumento de atividade de enzimas antioxidantes como SOD, CAT e GPx (Figura 3). Os mecanismos envolvidos especificamente nessa ação antioxidante dos AGPIs ω-3 permanecem por serem compreendidos, mas parecem envolver ativação de fator de transcrição de genes citoprotetores, como o Nfr2 (*Nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2*) – Figura 2[21-23].

Figura 2 - Mecanismos propostos para os efeitos inibidores modulados por ácidos graxos ômega-3 e seus metabólitos sobre a via NFkB e estresse oxidativo.



Legenda: Em vermelho, fatores que induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs); e em verde, fatores antioxidantes. No estresse oxidativo ocorre aumento da produção de EROs, que se sobrepõe a mecanismos antioxidantes. A produção de EROs pode ser diminuída por ácidos graxos ômega-3 (AGPIs ω-3) e seus metabólitos, por inibirem inflamação (ex: síntese de citocinas) mediada NFkB; bem como a atividade de enzimas antioxidantes (ex: superóxido dismutase) pode ser estimulada por esses AGPIs, via ativação de Nrf2. O resultado é a diminuição de estímulos pró-oxidantes e aumento daqueles antioxidantes, com potencial restabelecimento da homeostase oxidativa.

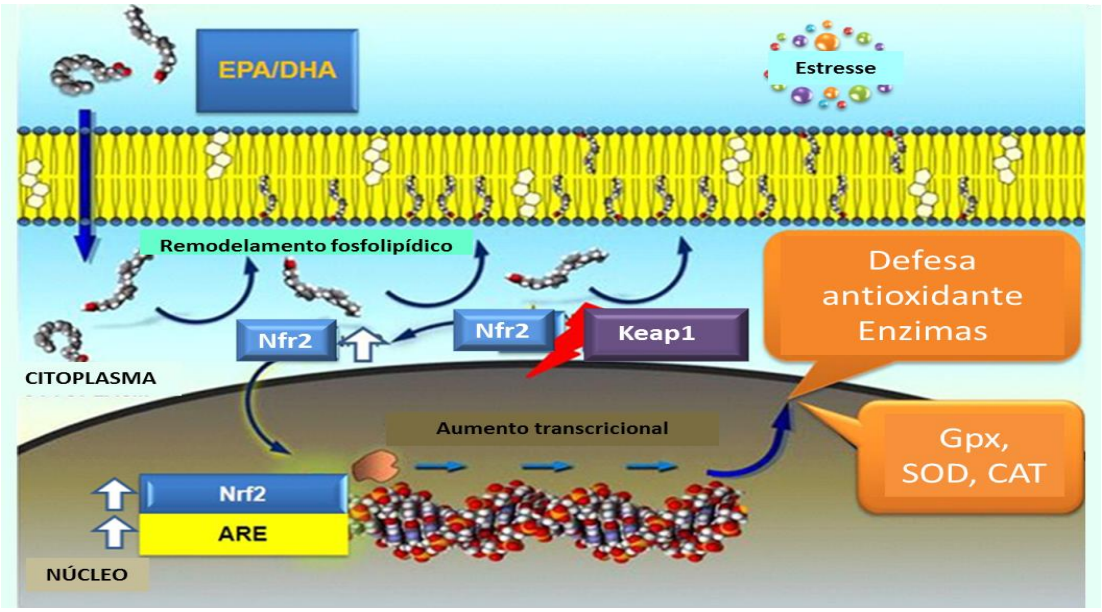
O fator de transcrição Nfr2 atua em nível nuclear e, na sua forma inativa, permanece sequestrado no citoplasma por uma proteína, a Keap1 (do inglês, *Kelch-like ECH associated protein* 1). A Keap1 precisa ser fosforilada para que Nfr2 se transloque para o núcleo e exerça sua função. No núcleo, Nrf2 liga-se ao ARE (do inglês, *Antioxidant Response Elements*), para iniciar o processo de resposta à sobrevivência celular com ativação de defesas antioxidantes[21-23].

Experimentalmente, a suplementação de EPA ou DHA, na forma isolada em modelos de estresse, se associou com aumento de expressão da via Nfr2 / ARE no núcleo celular[21-23]. A adição de EPA em culturas de células hepáticas se correlacionou com maior concentração de Nrf2 no citoplasma e núcleo celulares e aumento da atividade de enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx[21]. O DHA (o ácido graxo poli-insaturado mais encontrado na natureza) se relaciona com modulação favorável de mecanismos antioxidantes, como aumento da expressão gênica de Nrf2, de enzimas tiorredoxina e Gpx; e

inibição da super-expressão de vias da cicloxigenase-2 (COX2) e NADPH oxidase 4 (NOX4) via NF-κB, com atenuação de dano inflamatório e oxidativo[22,23,24].

A ativação da via Nrf2 por EPA e DHA parece ser independente da fosforilação de Keap1 e ocorrer apenas na presença de agente agressor (Figura 3)[25]. É possível que esses AGPIs possam ter efeito sinergético quando administrados conjuntamente, como parte do óleo de peixe, e, assim, promover proteção oxidativa. No entanto, essa hipótese permanece por ser melhor explorada.

Figura 3 – Mecanismos propostos de ativação das defesas antioxidantes modulado pela ação sinérgica de ácidos eicosapentaenoico e docosahexaenoico na vigência de estresse.



Adaptado Casañas-Sánchez e cols[25]
Legenda: Em vigência de estresse, ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) da camada fosfolipídica de membranas celulares aumentam a concentração citoplasmática de Nrf2 (*Nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2*), não sequestrada por Keap1 (*Kelch-like ECH associated protein* 1). Nfr2 transloca-se para o núcleo da célula e liga-se ao ARE (*Antioxidant Response Elements*). Em seguida ocorre ligação dessas duas proteínas (Nrf2 e ARE), via heterodimerização, com consequente ativação de genes responsáveis pela síntese de enzimas antioxidantes.

1.4 - Defesas antioxidantes no fígado

Sabe-se que o fígado é órgão central para metabolismo de nutrientes e tem importante função fisiológica por ser considerado usina metabólica do organismo. As atividades metabólicas desse tecido são essenciais para prover material energético para cérebro, músculo e outros órgãos periféricos[26].

O fígado remove dois terços da glicose do sangue (glicose proveniente da dieta) e deixa o restante para a utilização para outros tecidos. A glicose removida tem uma gama de destinos, embora o fígado pouco a utilize para suas próprias necessidades energéticas[27]. A maior parte da glicose é convertida em glicogênio e desta maneira, armazenada neste tecido. O excesso de glicose é metabolizado a Acetil-CoA, utilizado para formar ácidos graxos, colesterol e sais biliares. A via das pentoses também utiliza glicose para a produção de NADPH que será utilizado para biossínteses redutoras. O fígado pode também produzir e liberar glicose para o sangue, por meio de degradação de glicogênio e ativação de gliconeogênese. O fígado desempenha também importante papel no metabolismo do lactato, em sua transformação, para a produção de glicose e glicogênio, por meio do Ciclo de Cori[26-29].

A regulação do metabolismo lipídico também é desempenhada pelo fígado. Ele determina o destino dos ácidos graxos no organismo. Quando há alimento abundante, os ácidos graxos derivados da dieta ou sintetizados pelo fígado são secretados no sangue na forma de lipoproteína de muito baixa densidade, ou são exportados para o tecido adiposo e incorporados aos triglicerídeos. Contudo, no jejum prolongado, o fígado transforma os ácidos graxos em corpos cetônicos[26-29].

Além disso, o fígado também desempenha papel essencial no metabolismo de aminoácidos ao absorver a maior parte deles, e deixar o restante para ser utilizado pelos tecidos periféricos. O uso prioritário dos aminoácidos é para a síntese protéica e não para o catabolismo, mas quando ocorre catabolismo, ele se inicia com a remoção do nitrogênio. Os α-cetoácidos

são então utilizados para a gliconeogênese ou para a síntese de ácidos graxos. Eles também são fonte de energia para o próprio fígado[26-29].

O fígado também é responsável pela síntese de enzimas antioxidantes Gpx, SOD e CAT para atuação local, com o objetivo de reduzir os danos causados pelas EROs e ERNs. Por ser órgão central do metabolismo, o fígado também pode sofrer danos graves em virtude da produção exacerbada de radicais livres, principalmente, superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila[30].

Eventos fisiológicos como a respiração celular, principalmente a cadeia transportadora de elétrons, contribuem para produção de radicais livres. Os níveis elevados de EROs podem culminar em lesão mitocondrial grave, oxidação de proteínas celulares, modificações no DNA, peroxidação lipídica e elevado estresse oxidativo hepático. Além disso, condições especiais como, por exemplo, colestase e esteatose hepática podem ocorrer após uso prolongado de nutrição parenteral ricas em AGPI ω-6. Esses eventos podem favorecer a produção excessiva de radicais livres, redução das defesas antioxidantes e consequentemente gerar danos ao tecido hepático[30-31].

Com base nessas observações, o fígado foi, por nós, escolhido para avaliar o efeito de EL enriquecida com óleo de peixe sobre a peroxidação lipídica e defesas antioxidantes teciduais.

2. Racional do Estudo

2 - RACIONAL DO ESTUDO

2.1 - Contribuição científica

Diversas doenças comuns podem se associar com estresse oxidativo, particularmente em pacientes hospitalizados cirúrgicos e em estado crítico grave. Esses doentes têm propensão para hipercatabolismo e podem se apresentar em alto risco nutricional, desnutridos[32,33] e / ou em síndrome de caquexia[33]. Atualmente, a terapia nutricional parenteral (TNP) é recomendada para manter/recuperar o estado nutricional desses pacientes, quando a nutrição oral ou enteral é impossível, contraindicada ou insuficiente[34].

A administração de gordura, como fonte de energia não-glicídica de alta densidade calórica (≅9 kcal/g) e de ácidos graxos (AG) essenciais, é parte integral da TNP e se dá pela infusão de emulsões lipídicas (ELs). De acordo com suas características físico-químicas, ácidos graxos podem influenciar de diferentes formas a composição de fosfolípides das membranas celulares e, consequentemente, funções celulares. As propriedades nutricionais, estruturais e reguladoras individuais de lipídios têm impacto significante em funções fisiológicas importantes, incluindo funções hemodinâmicas, de oxigenação, metabólicas e imunológicas[36].

O uso de gordura via parenteral na prática clínica teve início em 1961, com o desenvolvimento de emulsão lipídica composta por óleo de soja (ELOS). Apesar de clinicamente segura para pacientes estáveis, dados experimentais indicaram que ELOS pode influenciar negativamente funções imunológicas em função de seu alto conteúdo em AGPIs ω-6[363]. Por conta de sua elevada insaturação e síntese de eicosanoides e outras moléculas inflamatórias os AGPIs ω-6 podem contribuir para liberação de EROs e inflamação. Experimentalmente, a administração parenteral de ELOS se associa à inibição de enzimas antioxidantes GPx, CAT e SOD hepáticas[37].

Essas observações, entre outras, sugeriram que ELOS poderia acentuar quadros inflamatórios e oxidativos de pacientes instáveis e motivaram o desenvolvimento de ELs alternativas. Essas novas ELs foram desenhadas, basicamente, para reduzir a oferta de AGPIs n-6, por meio da substituição

parcial de OS por triglicerídeos de cadeia média (TCM), óleo de oliva (OO), e / ou óleo de peixe (OP). Assim, atualmente as ELs disponíveis para uso clínico são compostas por diferentes fontes de gordura e fornecem diferentes tipos e proporções de AGs. Dentre elas, as ELs com óleo de peixe são de particular interesse, por serem rica fonte de AGPIs ω-3[38].

Diretrizes brasileira[39], americana[40] e europeia[41] atuais, que norteiam a conduta em terapia nutricional parenteral, sugerem evitar o uso de ELOS em pacientes críticos, e recomendam a prescrição de ELs compostas por TCM, TCL e AGPIs ω3 respeitando a tolerância e a condição clínica do paciente. Em recente estudo meta-analítico, Pradelli e colaboradores[42] concluíram que a administração de EL enriquecida de óleo de peixe em pacientes adultos sob cuidados intensivos se associa com redução de infecções, desenvolvimento de sepse, tempo de internação em UTI e hospitalar.

Em estudo experimental desenvolvido no laboratório Metanutri do LIM-35, observamos que a infusão parenteral de OP por 48h prévia à indução de pancreatite aguda, se associou com expressão de enzimas antioxidantes Gpx e SOD no pulmão e baço de ratos. Entretanto, este efeito não foi observado para os ratos do grupo SHAM[43,44].

Nossa hipótese considera, em estudo experimental, que emulsão lipídica contendo AGPIs ω-3, infundida por via parenteral, possa atenuar o estresse oxidativo no fígado. Caso ela se confirme, será uma vantagem adicional para o uso de ELs contendo óleo de peixe como melhor opção para pacientes hospitalizados com necessidade de nutrição parenteral[43,44].

3. Objetivos

3 – OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto da infusão parenteral de emulsão lipídica contendo óleo de peixe sobre peroxidação lipídica e estresse oxidativo no fígado de ratos.

3.2 - Objetivos específicos

Avaliar em amostras de plasma e tecido hepático de ratos tratados por 48 e 72 horas com infusão de diferentes ELs contendo ou não óleo de peixe:

1. Concentrações plasmáticas e teciduais dos AGPIs;
2. Níveis hepáticos do fator de transcrição gênica Nfr2;
3. Níveis hepáticos do biomarcador de peroxidação lipídica F2 isoprostano;
4. Níveis hepáticos de enzimas antioxidantes GPx, SOD e CAT.

4. Métodos

4 - MÉTODOS

4.1 - Local de execução do estudo

O presente estudo experimental foi realizado no Laboratório de Investigação Médica 35 (LIM 35) do Hospital das Clínicas da FMUSP, no grupo Metanutri em parceria com o Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP).

4.2 - Animais

Foram utilizados ratos isogênicos Lewis, machos, com peso médio de 350 gramas provenientes do Biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Com base em estudos anteriores desenvolvidos por nossa equipe e publicados em artigos nacionais e internacionais, foram estudados 6 animais por grupo.

As normas de proteção e cuidados aos animais de experimentação, bem como o descarte de suas carcaças, foram feitas de acordo com as recomendações da Comissão de Ética em Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA – FMUSP). O presente estudo foi previamente aprovado pelo CEUA – FMUSP, protocolo nº 025/17 (Anexo A).

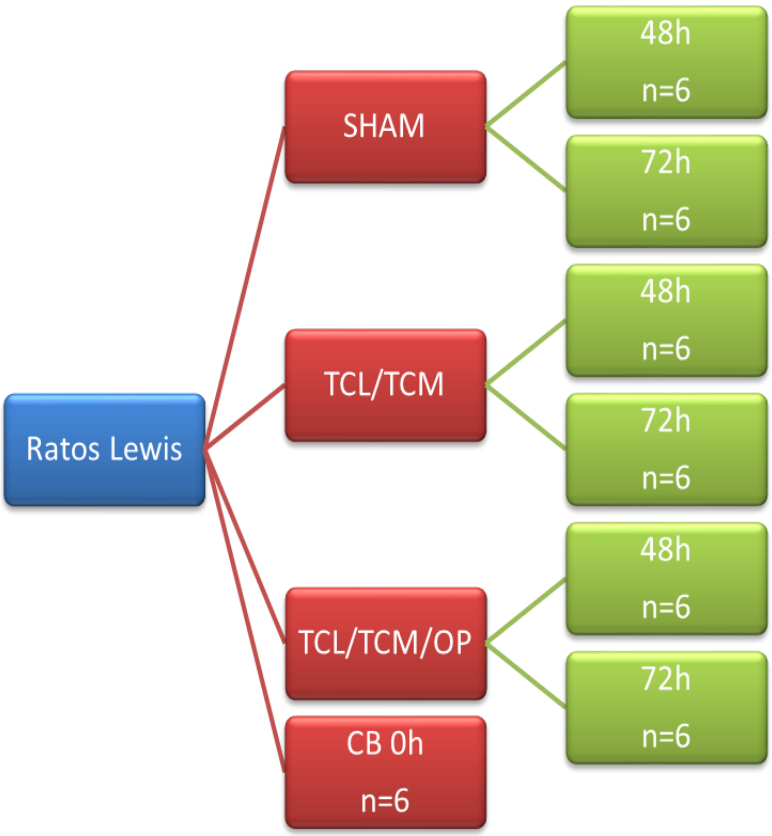
4.3 - Delineamento Experimental

O delineamento experimental desta investigação foi baseado no estudo desenvolvido por Morais e cols[45] com o objetivo de utilizar número reduzido de animais por experimento. Estes projetos foram desenvolvidos no LIM 35 e apresentam o mesmo desenho metodológico, no entanto ambos expõem hipóteses e objetivos distintos.

Os ratos foram distribuídos em diferentes grupos experimentais de acordo com o tempo e tipo de infusão parenteral a que foram submetidos, conforme descrito na Figura 4. Para efeitos de comparação, além dos grupos

experimentais, foram criados os grupos controle basal (CB) e sem infusão (SHAM). O grupo SHAM é um controle puro do procedimento cirúrgico de cateterização da veia jugular, portanto sem nenhum tipo de infusão parenteral. Enquanto o grupo CB fornece dados de comparação dos animais em seu estado natural, sem intervenção.

Figura 4 – Distribuição dos ratos conforme grupos experimentais.



Legenda - CB: controle basal; SHAM: grupo sem infusão de emulsão lipídica; TCL/TCM: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média; TCL/TCM/OP: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média / óleo de peixe.

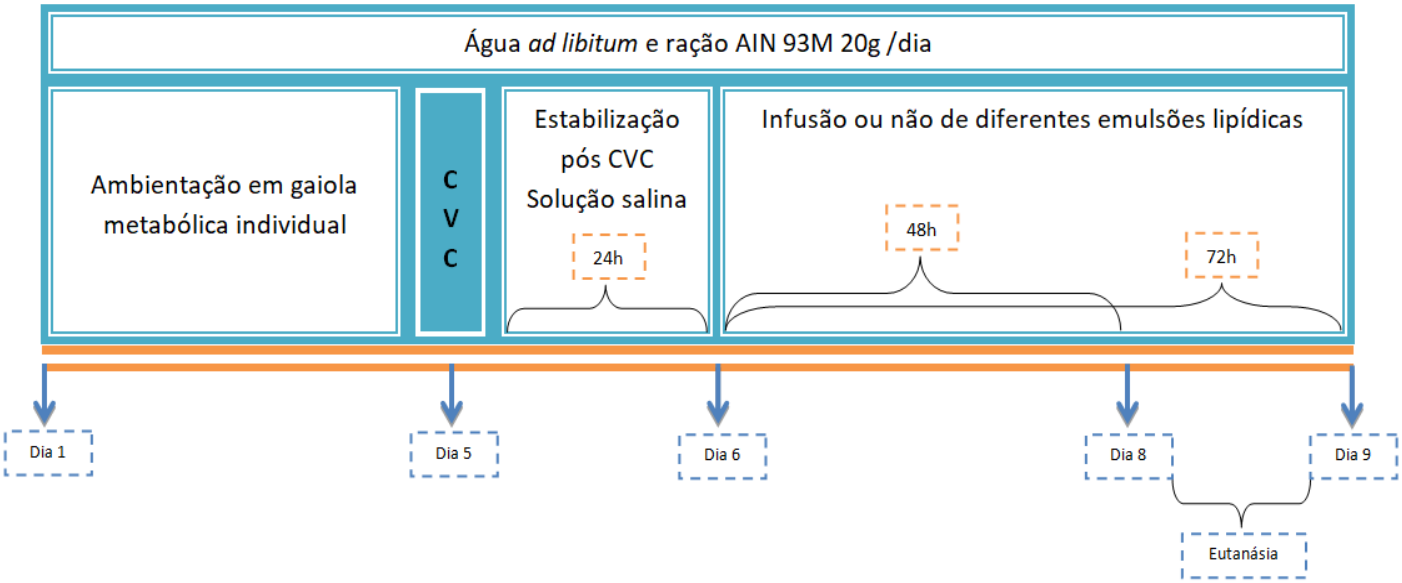
4.4 - Ambientação dos animais

Previamente aos procedimentos experimentais, os animais foram mantidos por 5 dias em gaiolas individuais, sob temperatura controlada (20 - 25°C), com dieta padrão AIN 93M (Anexo B), água *ad libitum* e ciclos diuturnos de luz.

Durante o período de ambientação e ao longo do tempo de infusão ou não das emulsões lipídicas, os animais receberam dieta oral padrão AIN 93M 20g por dia. Esta quantidade diária de ração foi padronizada pelo nosso grupo em consonância com Manual de Cuidados em Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção Experimental da FCF-IQ/USP[46].

A Figura 5 ilustra as diferentes etapas do protocolo experimental, desde a ambientação dos animais até eutanásia.

Figura 5 – Ilustração do protocolo experimental.



Legenda - CVC: cateter venoso central

4.5 - Cateterização do sistema venoso central

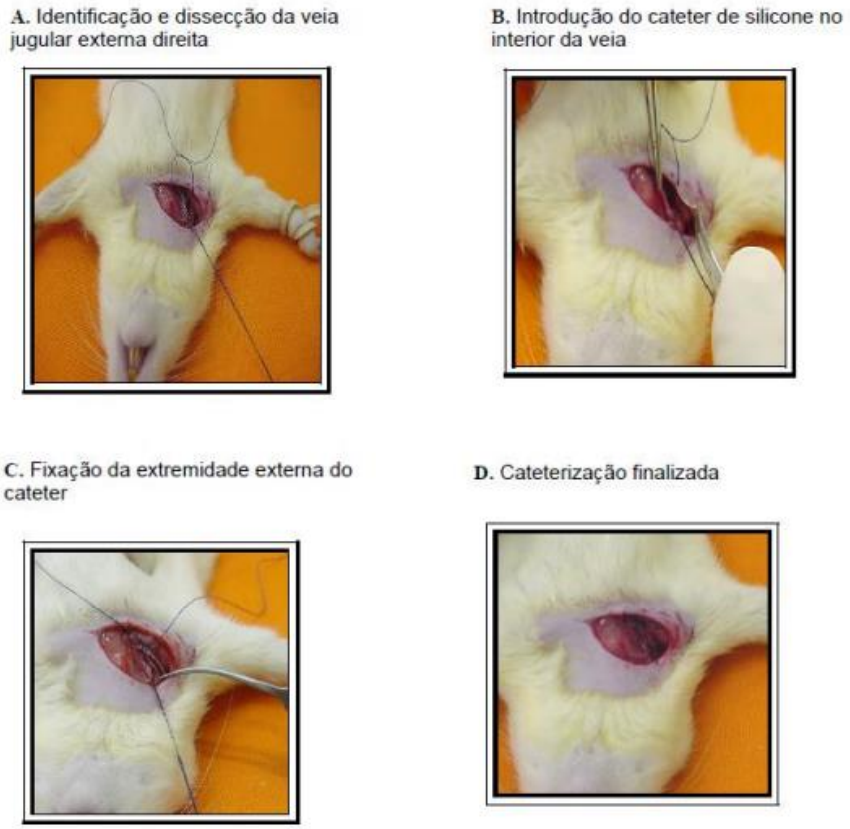
Para acesso parenteral, os animais foram submetidos à cateterização do sistema venoso central[47]. Após anestesia com injeção intraperitoneal de cloridrato de Cetamina 80 mg/Kg (Ketamin-S®, do Laboratório Cristália, Brasil) e cloridrato de Xilazina 8,0 mg/Kg (Rompun 2%® do Laboratório Bayer, Brasil) e a assepsia local com álcool iodado a 2%, os animais foram tricotomizados na região ventral do pescoço, supraclavicular direita e retroauricular da região dorsal do pescoço.

Os animais foram submetidos à cateterização da veia jugular direita externa. Com o animal em decúbito dorsal horizontal, foi realizada a incisão transversa de aproximadamente 1,0 cm na região supra clavicular direita. Posteriormente, o animal foi posicionado em decúbito ventral e com auxílio de uma agulha Intracath (Biotecno Produtos Plásticos e Médicos Ltda, São Paulo), a partir da borda distal da incisão, o tecido subcutâneo foi tunelizado em direção à região dorsal, com exteriorização a 1,0 cm da região retro auricular.

Pelo interior de um dispositivo de acesso foi passado cateter de silicone (Ciencor® Brasil), de aproximadamente 1,0 mm de diâmetro e 70,0 mm de comprimento, o qual foi tracionado pelo túnel em direção a incisão ventral. Em seguida foi fixada na região dorsal do animal uma peça intermediária, representada por agulha anatomicamente adequada para ratos e soldada a uma pequena peça metálica que possui duas asas laterais do tipo “borboleta”. Essas laterais contêm dois orifícios paralelos em cada extremidade para fixação ao dorso do animal por meio de dois pontos separados, utilizando-se para isto, fio mononylon 3-0 estéril, agulhado e não absorvível (Shalon® suturas, Brasil), que atravessa a pele e tecido subcutâneo.

Em seguida, os animais foram colocados em decúbito dorsal, procedendo se identificação, dissecção e reparo da veia jugular direita com fio de algodão torcido 4-0, estéril, pré-cortado, não absorvível e não agulhado (Polycot®- Ethicon, New Jersey, EUA). A veia jugular externa foi então ligada distalmente e cateterizada na sua porção proximal pelo tubo de silicone posicionado anteriormente, contendo solução fisiológica heparinizada. A incisão da pele foi suturada de forma contínua com fio mononylon 3-0 e desinfetada com álcool iodado 2%. As etapas da passagem de CVC encontram-se descritas na figura 6.

Figura 6 – Fases da cateterização do sistema venoso central.



4.6 - Infusão endovenosa de soluções e emulsões parenterais

Após cateterização do sistema venoso central, os animais foram distribuídos em gaiolas metabólicas individuais, conectando-se a “borboleta” ao intermediário de infusão, denominado swível, que gira em torno de seu eixo permitindo a livre movimentação do animal[48]. 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 contínua de 6 mL de solução salina 0,9%, na velocidade de 0,25mL/h, durante as primeiras 24 horas após a cateterização. Após este período de 24 horas para estabilização clínica pós cateterização, os animais do grupo SHAM tiveram

seus cateteres fechado, e foram mantidos sem infusão conforme protocolo, enquanto os outros grupos experimentais receberam as suas respectivas ELs.

Os animais dos grupos experimentais receberam por mais 48 ou 72 horas infusão parenteral de emulsão lipídica contendo óleo de soja e triglicerídeos de cadeia média (TCL/TCM Lipofundin® 20%, Bbraun) ou emulsão lipídica contendo 40% de óleo de soja, 50% de TCM de óleo de coco e 10% de óleo de peixe (TCL/TCM/OP - Lipidem® 20%, BBraun), de maneira a administrar 4,3g de gordura/kg de peso corpóreo (≅ 6 mL), na velocidade de 0,25 mL/h. As composições de ácidos graxos de ambas ELs encontram-se nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Composição das emulsões lipídicas estudadas: TCL/TCM (Lipofundin® 20%) e TCL/TCM/OP (Lipidem® 20%).

Emulsão Lipídica	**Composição**	**TG** (g/L)	**Energia** (kcal/ml)	**OS** (g/L)	**OP** (g/L)	**TCM** (g/L)	**Vit.E** (mg/L)
TCL/TCM	50% Óleo de soja; 50% Óleo de coco	200	2	100	0	100	170
TCL/TCM/OP	40% Óleo de soja; 50% Óleo de coco; 10% Óleo de peixe	200	2	80	20	100	190

Legenda - OP: óleo de peixe; OS: óleo de soja; TCM: triglicerídeos de cadeia média; TG: triglicérides; Vit E: vitamina E. Dados fornecidos pelo fabricante (B. Braun, Melsungen - Alemanha).

Tabela 2 – Distribuição dos ácidos graxos das emulsões lipídicas estudadas (mg/ml): TCL/TCM (Lipofundin® 20%) e TCL/TCM/OP (Lipidem® 20%).

Ácido graxo	TCL/TCM	TCL/TCM/OP
Caprílico - C8:0	18,64	18,48
Cáprico - C10:0	13,43	23,91
Palmítico - C16:0	5,33	4,91
Palmitoleico - C16:1(n-7)	-	0,16
Esteárico - C18:0	2,06	12,06
Oleico - C18:1(n-9)	8,23	7,20
Octadecenoico - C18:1(n-7)	0,57	0,68
Linoleico - C18:2(n-6)	15,50	13,05
Alfa Linolênico - C18:3(n-3)	1,67	1,52
Docosanoico - C20:0	0,16	0,16
Eicosenoico - C20:1(n-9)	0,17	0,19
Eicosatetraenoico - C20:4 (n-6)	0,29	0,35
Docosenoico - C22:1 (n-9)	-	0,16
Eicosapentanoico - C20:5 (n-3)	-	2,14
Docosapentanoico - C22:5 (n-3)	-	0,20
Docosahexaenóico - C22:6 (n-3)	-	1,70

Fonte Sala-Vila e cols[49]. Dados fornecidos pelo fabricante (B. Braun, Melsungen - Alemanha).

4.7 – Eutanásia e colheita de sangue

Os animais foram anestesiados, por meio de 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 submetidos à punção cardíaca (para coleta de sangue em tubos heparinizados) e laparotomia (para coleta do fígado). As amostras de sangue foram submetidas à centrifugação (1800 rpm, 20ºC, 10 min) para obtenção de plasma. O material biológico coletado foi armazenado em freezer -80ºC (plasma) e em solução de formol tamponado 10% (tecidos).

4.8 - Análise por cromatografia gasosa

A avaliação do perfil de AG no plasma e fígado foi feita 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), do LIM-35, locado no Laboratório de Desenvolvimento de Alimentos Funcionais – FSP, Universidade de São Paulo.

Os procedimentos cromatográficos empregados foram feitos de acordo com Iverson e cols[50], com algumas adaptações específicas que se fizeram necessárias para otimizar as análises das amostras plasmáticas do estudo, de acordo com variáveis de seletividade, linearidade, precisão e exatidão, limites de detecção e quantificação específicos. Os ácidos graxos foram avaliados por padronização externa, utilizando seus padrões de referência (Sigma) para obtenção da curva de calibração[50].

A avaliação do perfil de AGPIs foi conduzida de acordo com as seguintes abordagens: 1. Avaliação do conteúdo total de AGPIs ω-3 e ω-6; 2. Avaliação do conteúdo de alfa linoleico (AL), oleico, EPA, DHA e AA; 3. Avaliação da razão AGPIs ω-3: ω-6; 4. Avaliação da razão EPA:AA; 5. Avaliação da razão oleico:linoleico. A inclusão da análise de AGPIs n-6 se justifica porque parte das propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes de AGPIs ω-3 é atribuída à sua capacidade de competir com AGPIs ω-6 para incorporação celular e síntese de mediadores inflamatórios, em especial AA.

4.9 - Análise do fator de transcrição gênica, enzimas antioxidantes e marcador de peroxidação lipídica no fígado

Para avaliação do fator de transcrição gênica Nrf2, biomarcador de peroxidação lipídica F2 isoprostano e enzimas antioxidantes Gpx, CAT e SOD, foram utilizados ensaios do tipo imuno enzimático ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*).

Para o preparo da amostra biológica, 100mg de fígado foram enxaguados com PBS gelado (0,01M, pH 7,4) para remoção do excesso de sangue. Posteriormente o tecido foi fragmentado em pedaços pequenos e homogeneizado com PBS (9 ml para cada 1g). Na sequência, a amostra foi sonicada e posteriormente centrifugada por 5 minutos a 5000xg e sobrenadante foi coletado para análise.

Foram utilizados materiais e reagentes providos por kit específico para cada proteína estudada. Procedeu-se a dosagem no tecido hepático e o ensaio foi realizado conforme metodologia descrita no kit de análise (*Fine Test ®, Wuhan, China*).

4.10 - Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com uso do *Sofware* R 3.5.3, versão 2019 com participação essencial do estatístico Guaraci Requena. Utilizou-se o teste Kolmogorov-Mirnov para verificação da normalidade da amostra. Quando a variável quantitativa foi de distribuição normal, foram utilizados valores de média e desvio padrão; caso contrário, foram utilizados valores de mediana, valores mínimo e máximo e intervalo interquartis. Para comparação entre variáveis quantitativas, utilizaram-se os testes t de *Student*, para variáveis com distribuição normal, e *Mann-Whitney*, para as outras variáveis. Além disso, foram utilizados os testes de Análise de Variância (ANOVA) e Kruskal-Wallis, para avaliar diferença entre três ou mais variáveis. Para todos os testes, consideraram-se como diferença estatisticamente significante valores de $p<5\%$ ($p<0,05$).

5. Resultados

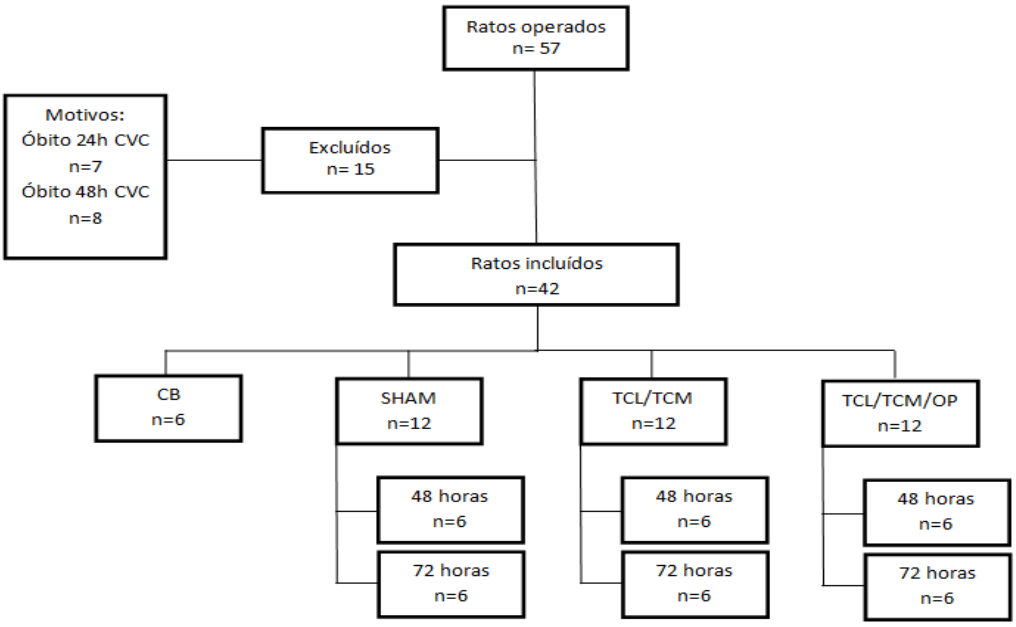
5 - RESULTADOS

5.1 - Dados gerais da amostra

Dos ratos previamente selecionados para o presente estudo, 57 tiveram a passagem de CVC concluída com sucesso. No entanto, 15 ratos foram excluídos do estudo por dois motivos: sete evoluíram a óbito dentro das primeiras 24 horas após implantação do CVC - período de estabilização pós-procedimento cirúrgico; e oito morreram entre 24h e 48h após passagem de CVC.

Portanto, 42 ratos completaram o protocolo experimental sem evidencia de problemas mecânicos relacionados ao CVC ou seus dispositivos. Durante o período de infusão das diferentes ELs, não foram identificadas alterações clínicas relativas ao estado geral dos ratos conforme registros diários de evolução clínica. Na figura 7 está descrita a distribuição dos ratos conforme os grupos estudados.

Figura 7 – Distribuição dos ratos conforme grupo experimental.



Legenda - CB: controle basal; CVC: cateter venoso central; SHAM: grupo sem infusão de emulsão lipídica; TCL/TCM: triglicerídeos de cadeia longa / triglicérides de cadeia média; TCL/TCM/OP: triglicerídeos de cadeia longa / triglicérides de cadeia média / óleo de peixe.

5.2 - Alteração de peso corpóreo

As alterações de peso constatadas no período do estudo foram registradas em prontuário físico conforme cada grupo experimental. No entanto, não se observou diferenças com significado estatístico na alteração de peso dos ratos no período entre o dia da implantação do CVC (0h) e o dia da eutanásia (48h ou 72h). Os valores médios de peso inicial e final dos ratos que completaram o protocolo experimental estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 – Caracterização do peso no dia da passagem de cateter venoso central (T0h) e no dia da eutanásia (T48h ou T72h) conforme grupo experimental.

Peso corpóreo (g)	T0h	T48h	P
SHAM	355,8 (±2,7)	353 (±3,5)	
TCL/TCM	358 (±3,6)	359,8 (±6,9)	>0,05
TCL/TCL/OP	357,7 (±3,3)	355 (±1,4)	
	T0h	**T72h**	
SHAM	367,7 (±9,04)	371,3 (±11,41)	
TCL/TCM	360,7 (±10,17)	359,2 (±9,7)	>0,05
TCL/TCL/OP	356,3 (±7,5)	354 (±7,9)	

Legenda - SHAM: grupo sem infusão de emulsão lipídica; TCL/TCM: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média; TCL/TCM/OP: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média / óleo de peixe.

5.3 – Consumo oral de ração

Nos cinco dias de ambientação que precederam a passagem de CVC, todos os ratos ingeriram diariamente todas as 20g de ração ofertadas conforme descrito no protocolo experimental.

Entretanto nós observamos que houve uma redução significativa no consumo de ração em todos os grupos de animais no tempo 48h em

comparação ao dia de implantação do CVC (T0h). Os menores registros de consumo de ração foram observados no grupo TCL/TCM/OP, 15g para tempo 48h e 8,5g em 72h.

Os ratos incluídos no período 72h que não receberam infusão de EL, os do grupo SHAM, restabeleceram o consumo diário de ração. Enquanto os grupos que receberam a infusão de ELs (TCL/TCM ou TCL/TCM/OP) apresentaram baixa aceitação no consumo de ração para este mesmo período. No entanto é importante considerar que apenas o grupo TCL/TCM apresentou redução estatisticamente significante no consumo de ração para o tempo 72h quando comparado ao T0h, dia de implantação do CVC (p=0,03).

As medianas do consumo de ração dos ratos conforme o tipo de intervenção e tempo estão descritas na tabela 4.

Tabela 4 – Quantidade de ração consumida no dia da implantação de cateter venoso central (T0h) e no dia da eutanásia (T48h ou T72h) conforme grupo experimental.

Ração consumida (g)	T0h	T48h	T72h
CB	19 (17 – 20)	-	-
SHAM	20 (20 – 20)	15,5 (14 – 16)*	20 (15 – 20)
TCL/TCM	20 (20 – 20)	16,5 (15 – 18)*	10 (4 – 20)**
TCL/TCL/OP	20 (20 – 20)	15 (14 – 16)*	8,5 (7 – 16)

Legenda - CB: controle basal, s/intervenção cirúrgica; SHAM: grupo sem infusão de emulsão lipídica; TCL/TCM: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerideos de cadeia média; TCL/TCM/OP: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média / óleo de peixe. Valores expressos em mediana, (valor mínimo e valor máximo). *T0h *vs* T48h - p=0,033; **T0h *vs* T72h - p=0,034.

5.4 - Avaliação da composição de ácidos graxos no tempo 48 horas

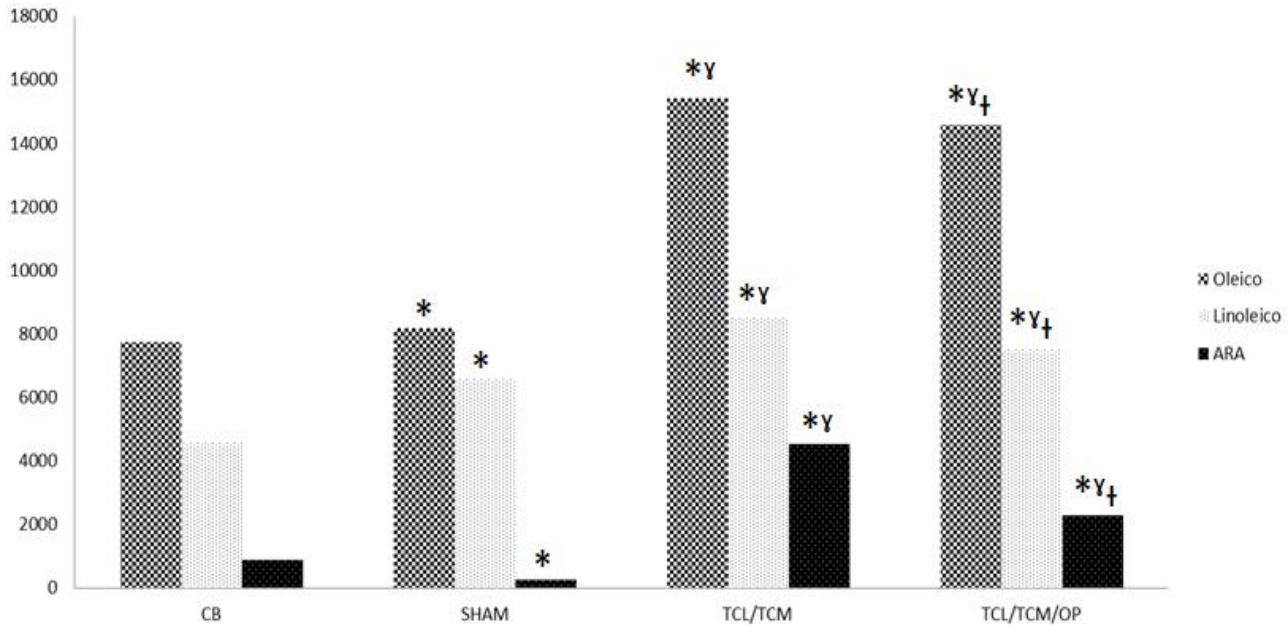
5.4.1 - Oleico, linoleico e araquidônico no plasma

A concentração plasmática, de todos os ácidos graxos, encontrada nos ratos para o grupo CB foi considerada como basal para todos os animais neste estudo.

Observou-se aumento estatisticamente significante nas concentrações dos ácidos graxos oleico, linoleico e ARA, após 48h de infusão com ambas ELs em comparação aos grupos CB e SHAM.

Por outro lado, os níveis de linoleico (p=0,02) e ARA (p=0,02) foram estatisticamente maiores no grupo TCL/TCM em comparação ao grupo TCL/TCM/OP. Todos estes dados estão representados no gráfico 1.

Gráfico 1 – Concentração de ácidos graxos ômega 6 e ômega 9 (ppm) encontrados no plasma de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 horas nos grupos: controle basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.



*CB vs SHAM; CB vs TCL/TCM; CB vs TCL/TCM/OP p<0,05

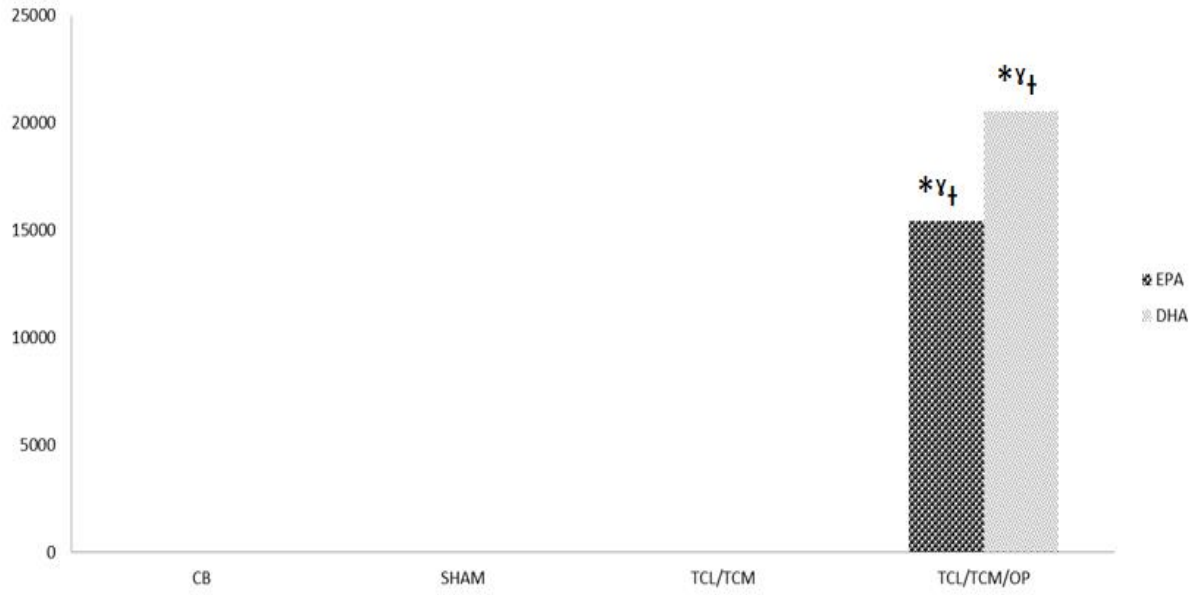
ɣSHAM vs TCL/TCM; SHAM vs TCL/TCM/OP p<0,05

ɨTCL/TCM vs TCL/TCM/OP p<0,05

5.4.2 - Eicosapentaenoico e docosahexaenóico no plasma

Não foram detectados níveis de EPA e DHA no plasma dos ratos pertencentes aos grupos CB, SHAM e TCL/TCM no tempo 48h. Entretanto, taxas de EPA e DHA foram encontradas no plasma dos ratos do grupo TCL/TCM/OP no período 48h de infusão. As concentrações de EPA e DHA estão apresentados no gráfico 2.

Gráfico 2 – Concentração dos ácidos graxos ômega 3 (ppm) encontrados no plasma de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 horas nos grupos: controle basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.



*CB vs TCL/TCM/OP p<0,05
ɣSHAM vs TCL/TCM/OP p<0,05
ǂTCL/TCM vs TCL/TCM/OP p<0,05

5.4.3 - Oleico, linoleico e araquidônico no fígado

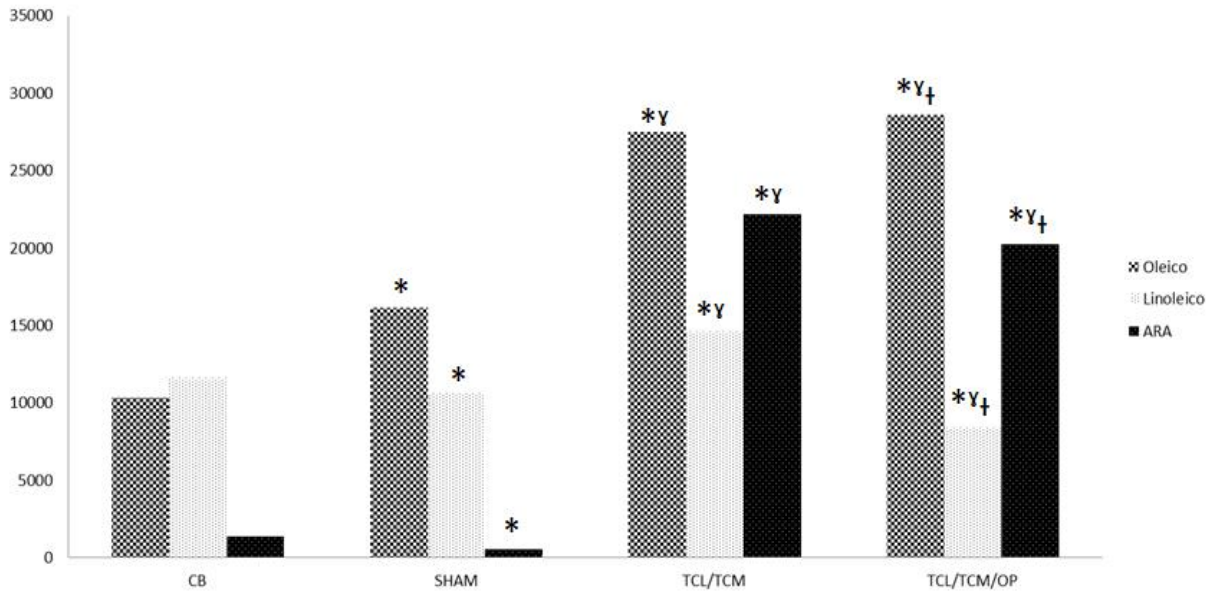
No fígado dos ratos do grupo CB, os ácidos graxos oleico, linoleico e ARA, apresentaram níveis inferiores quando comparados aos outros três grupos experimentais.

No entanto, a concentração de linoleico (p=0,02) e ARA (p=0,02) foi estatisticamente maior no grupo TCL/TCM quando comparada ao grupo TCL/TCM/OP.

Os níveis do ácido graxo oleico foram maiores nos grupos de ratos que receberam a infusão parenteral independente do tipo de EL em comparação aos outros grupos de ratos que não receberam este tratamento.

Porém, o grupo de ratos que recebeu TCL/TCM/OP por 48h apresentou os maiores índices de oleico em relação aos outros grupos (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Concentração dos ácidos graxos ômega 6 e ômega 9 (ppm) encontrados no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 horas nos grupos: controle basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.



*CB vs SHAM; CB vs TCL/TCM; CB vs TCL/TCM/OP p<0,05

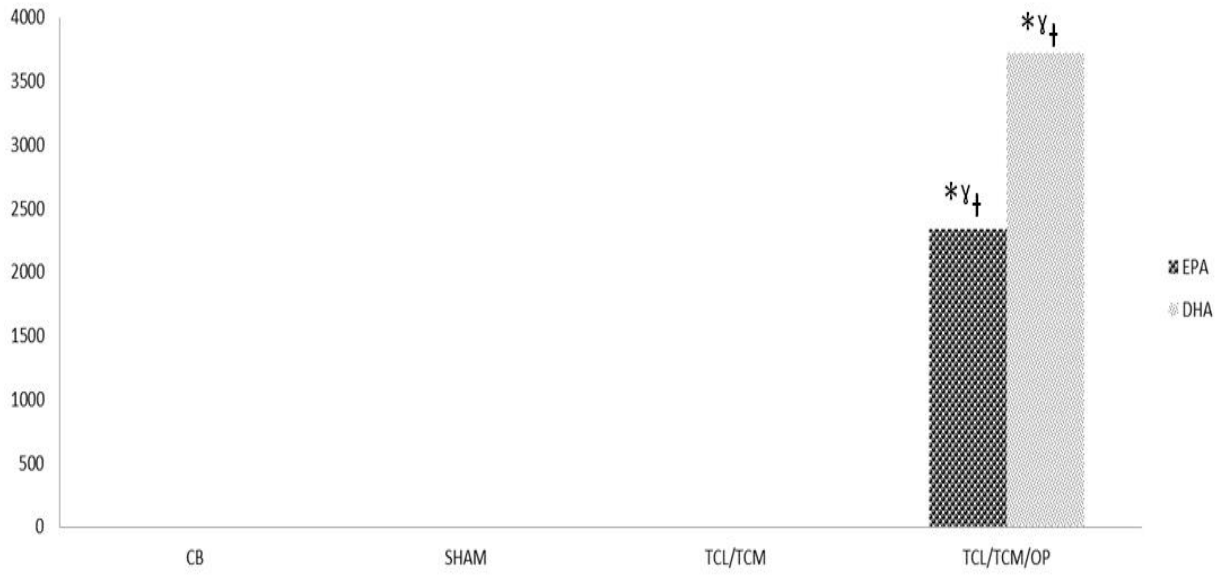
ɣSHAM vs TCL/TCM; SHAM vs TCL/TCM/OP p<0,05

ɨTCL/TCM vs TCL/TCM/OP p<0,05

5.4.4 - Eicosapentaenoico e docosahexaenóico no fígado

Semelhante aos dados encontrados no plasma, não foram detectados níveis de EPA e DHA no fígado dos ratos dos grupos CB, SHAM e TCL/TCM. Por outro lado, EPA e DHA foram identificados no fígado dos ratos do grupo que recebeu TCL/TCM/OP. Estes dados foram apresentados no gráfico 4.

Gráfico 4 – Concentração dos ácidos graxos ômega 3 (ppm) encontrados no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 horas nos grupos: controle basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.



*CB vs TCL/TCM/OP p<0,05

ɣSHAM vs TCL/TCM/OP p<0,05

†TCL/TCM vs TCL/TCM/OP p<0,05

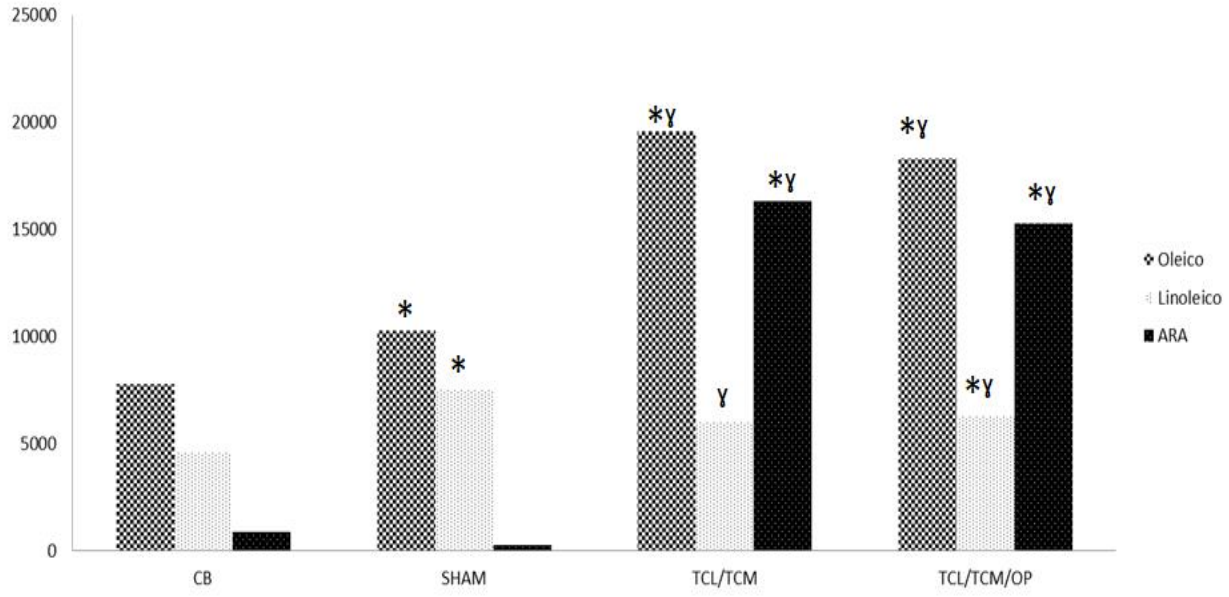
5.5 - Avaliação do conteúdo dos ácidos graxos no tempo 72 horas

5.5.1 - Oleico, linoleico e araquidônico no plasma

Os grupos de ratos que não receberam tratamento com diferentes ELs, os grupos CB e SHAM, apresentaram as menores taxas dos ácidos graxos oleico, linoleico e ARA no plasma.

Por outro lado, os níveis desses ácidos graxos no plasma dos ratos que receberam o tratamento com TCL/TCM ou TCL/TCM/OP por 72h, não demonstraram diferenças estatisticamente significantes como mostra o gráfico 5.

Gráfico 5 – Concentração dos ácidos graxos ômega 6 e ômega 9 (ppm) encontrados no plasma de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 72 horas nos grupos: controle basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.



*CB vs SHAM; CB vs TCL/TCM; CB vs TCL/TCM/OP p<0,05

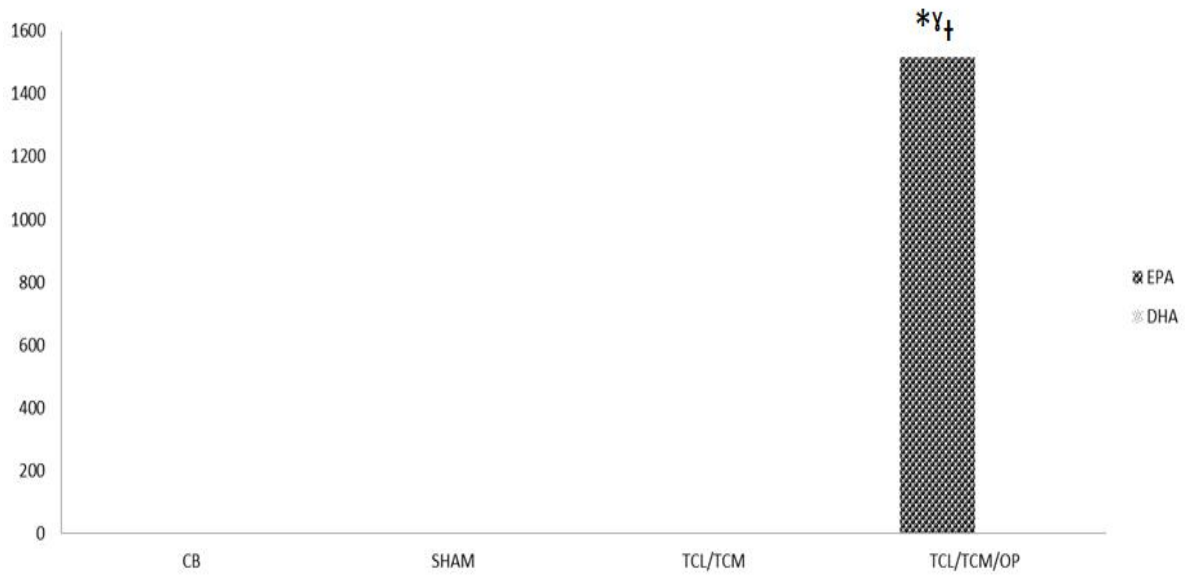
ɣSHAM vs TCL/TCM; SHAM vs TCL/TCM/OP p<0,05

5.5.2 - Eicosapentaenoico e docosahexaenóico no plasma

Não foram constatados níveis de EPA e DHA no plasma dos ratos dos grupos CB, SHAM e TCL/TCM no tempo 72h.

Entretanto, apenas o EPA foi encontrado no plasma de ratos do grupo que recebeu TCL/TCM/OP por 72h. (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Concentração dos ácidos graxos ômega 3 (ppm) encontrados no plasma de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 72 horas nos grupos: controle basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.



*CB vs TCL/TCM/OP p<0,05

ɣSHAM vs TCL/TCM/OP p<0,05

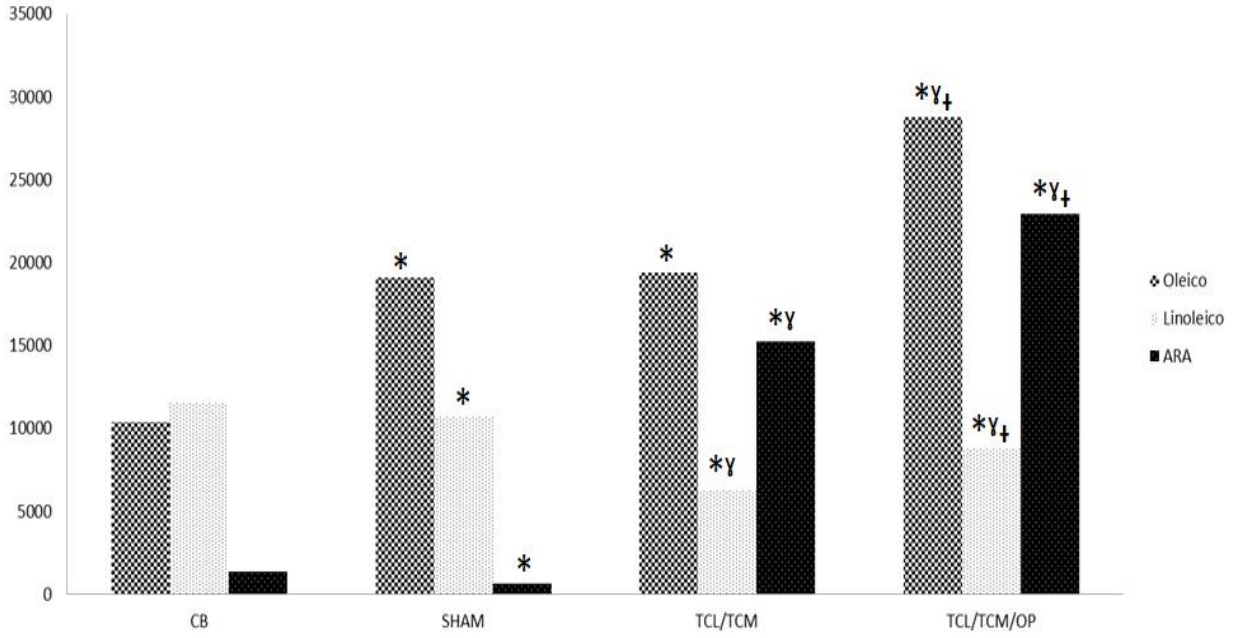
†TCL/TCM vs TCL/TCM/OP p<0,05

5.5.3 - Oleico, linoleico e araquidônico no fígado

Interessantemente, os níveis dos ácidos graxos linoleico e ARA, foram maiores no grupo de ratos que receberam TCL/TCM/OP por 72h.

Enquanto os níveis de linoleico (p=0,026) e ARA (p=0,02) foram menores nos ratos do grupo TCL/TCM quando comparado ao grupo TCL/TCM/OP (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Concentração dos ácidos graxos ômega 6 e ômega 9 (ppm) encontrados no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 72 horas nos grupos: controle basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.



*CB vs SHAM; CB vs TCL/TCM; CB vs TCL/TCM/OP p<0,05

ɣSHAM vs TCL/TCM; SHAM vs TCL/TCM/OP p<0,05

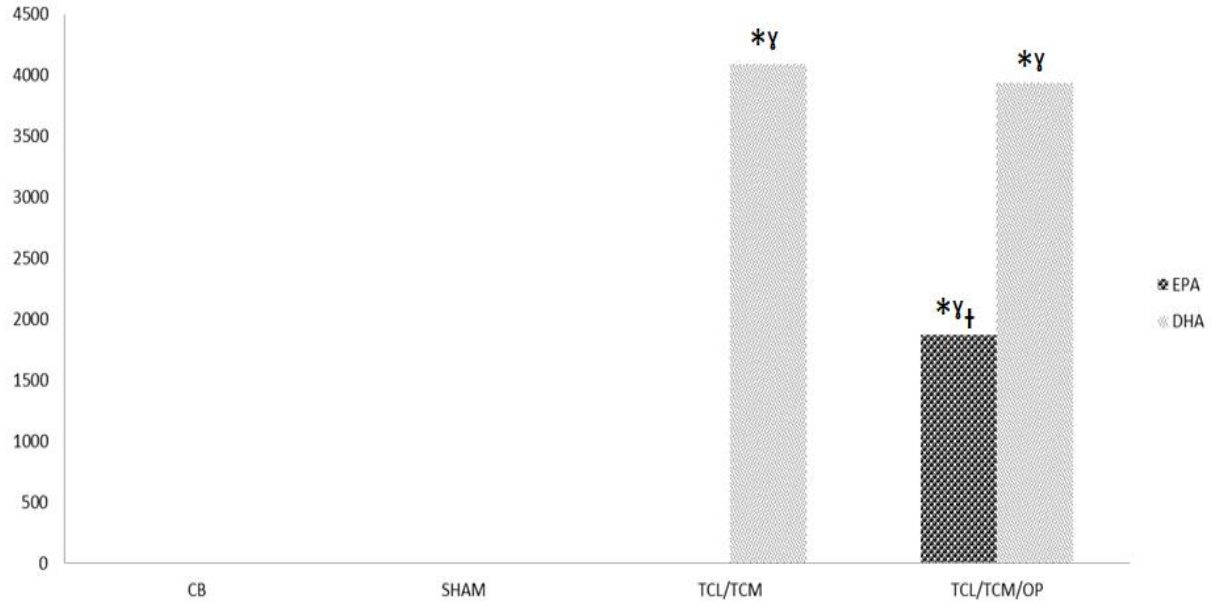
ɨTCL/TCM vs TCL/TCM/OP p<0,05

5.5.4 - Eicosapentaenoico e docosahexaenóico no fígado

Não foram detectados EPA e DHA no fígado dos ratos do grupo CB e SHAM, por outro lado, foram identificados EPA e DHA no fígado dos ratos do grupo TCL/TCM/OP.

Interessantemente, foi detectado apenas DHA no fígado dos ratos tratados com TCL/TCM por 72h (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Concentração dos ácidos graxos ômega 3 (ppm) encontrados no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 72 horas nos grupos: controle basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.



*CB vs TCL/TCM; CB vs TCL/TCM/OP p<0,05

ɣSHAM vs TCL/TCM; SHAM vs TCL/TCM/OP p<0,05

ɬTCL/TCM vs TCL/TCM/OP p<0,05

5.5.5 - Razões entre: ω-3: ω-6, EPA: ARA e Oleico: Linoleico

A razão entre AGPI ω-3: ω-6 foi calculada por meio da soma dos valores absolutos de EPA e DHA (para ω-3) dividida pela soma dos valores absolutos de linoleico e AA (para ω-6). Para o cálculo da razão EPA: ARA e oleico: linoleico, foram utilizados os valores absolutos de cada AG.

Apenas o grupo de ratos que recebeu a infusão parenteral de EL composta por TCL/TCM/OP apresentou expressivas razões de ω-3: ω-6 e EPA: ARA. Principalmente no grupo de ratos que foram tratados por 48h. Interessantemente, nós identificamos uma modesta razão ω-3: ω-6 no grupo TCL/TCM para o período de 72h conforme aponta a tabela 5.

Os maiores valores para razão oleico: linoleico foram encontrados no plasma e fígado dos ratos do grupo que recebeu TCL/TCM/OP em ambos os períodos 48h e 72h.

Tabela 5 – Razão entre ácidos graxos ômega-3: ômega-6; EPA: ARA e oleico: linoleico no plasma e fígado de ratos após a infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 48 ou 72 horas.

Grupos	**Razão ω-3: ω-6**		**Razão EPA:ARA**		**Razão Oleico:Linoleico**	
Plasma	**T48h**	**T72h**	**T48h**	**T72h**	**T48h**	**T72h**
SHAM	0	0	0	0	1,26: 1	1,39: 1
TCL/TCM	0	0	0	0	1,81: 1	3,52: 1
TCL/TCL/OP	3,67: 1	0,1: 1	6,78: 1	0,1: 1	1,94: 1	2,91: 1
Fígado	**T48h**	**T72h**	**T48h**	**T72h**	**T48h**	**T72h**
SHAM	0	0	0	0	1,53: 1	1,79: 1
TCL/TCM	0	0,2: 1	0	0	1,87: 1	2,94: 1
TCL/TCL/OP	0,2: 1	0,2: 1	0,12: 1	0,08: 1	3,38: 1	3,29: 1

Legenda - ARA: araquidônico; EPA: eicosapentaenóico SHAM: grupo sem infusão de emulsão lipídica; TCL/TCM: triglicerídeos de cadeia longa / triglicérides de cadeia média; TCL/TCM/OP: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média / óleo de peixe.

5.6 - Avaliação do fator de transcrição gênica Nrf2 no fígado

O fator de transcrição gênica Nrf2 foi identificado em todos os grupos estudados, inclusive no fígado de ratos do grupo CB que não sofreram estresse cirúrgico (tabela 6).

Tabela 6 – Quantificação de Nrf2 no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 ou 72 horas nos grupos SHAM, TCL/TCM, TCL/TCM/OP e 0 hora para o grupo CB.

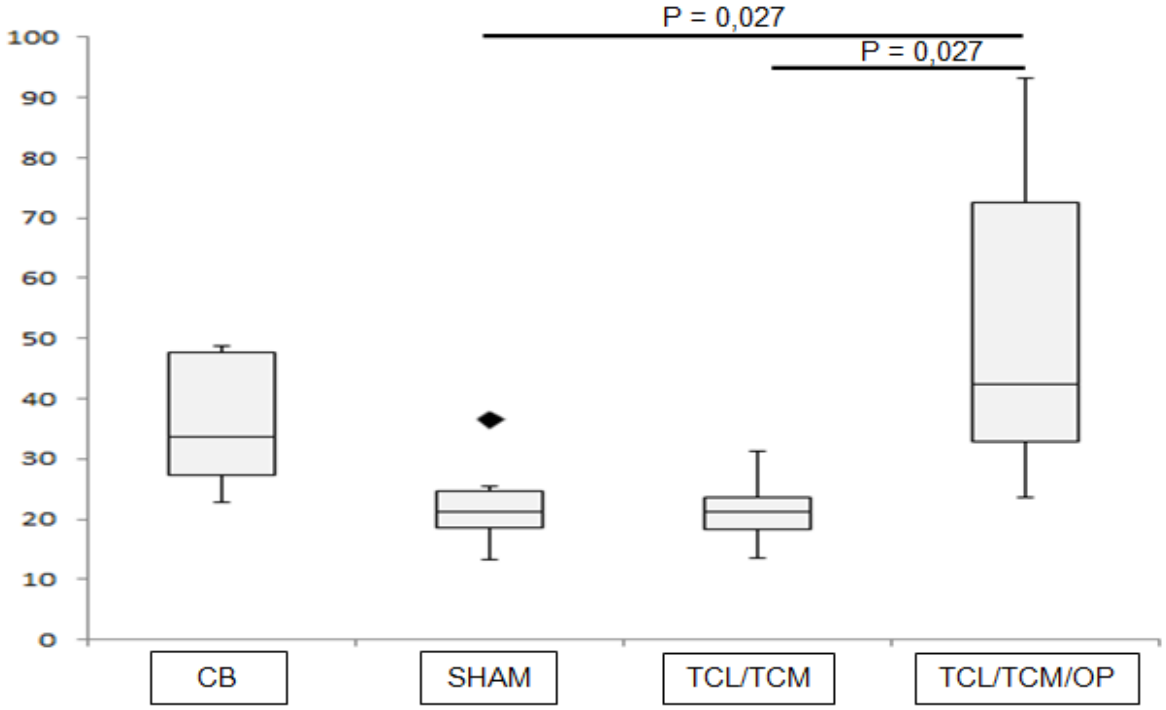
		T48h			**T72h**	
Nrf2 (pg/mg)	**Mediana**	**Mínimo**	**Máximo**	**Mediana**	**Mínimo**	**Máximo**
SHAM	21,24	13,27	36,59	33,25	29,63	34,87
TCL/TCM	21,07	13,48	31,26	27,49	16,75	31,92
TCL/TCL/OP	42,44	23,63	93,11	52,66	40,79	187,12
		T0h				
Nrf2 (pg/mg)	**Mediana**	**Mínimo**	**Máximo**			
CB	33,62	22,70	47,56			

Legenda - CB: controle basal; SHAM: grupo sem infusão de emulsão lipídica; TCL/TCM: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média; TCL/TCM/OP: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média / óleo de peixe. Valores expressos em mediana, valor mínimo e valor máximo.

A mediana de Nrf2 observada no grupo de ratos que recebeu a infusão de EL composta por TCL/TCM foi de 21,07 pg/mg, enquanto o grupo TCL/TCM/OP apresentou uma mediana duas vezes maior 42,44pg/mg.

Nós observamos diferença estatística na comparação entre os grupos SHAM *vs* TCL/TCM/OP (p=0,027) e TCL/TCM/OP *vs* TCL/TCM (p=0,027) para o tempo de 48h. A dispersão dos valores e seus respectivos *outliers* estão apresentados no gráfico 9.

Gráfico 9 – Quantificação do fator de transcrição gênica Nrf2 (pg/mg) encontrado no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 horas nos grupos: Controle Basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.

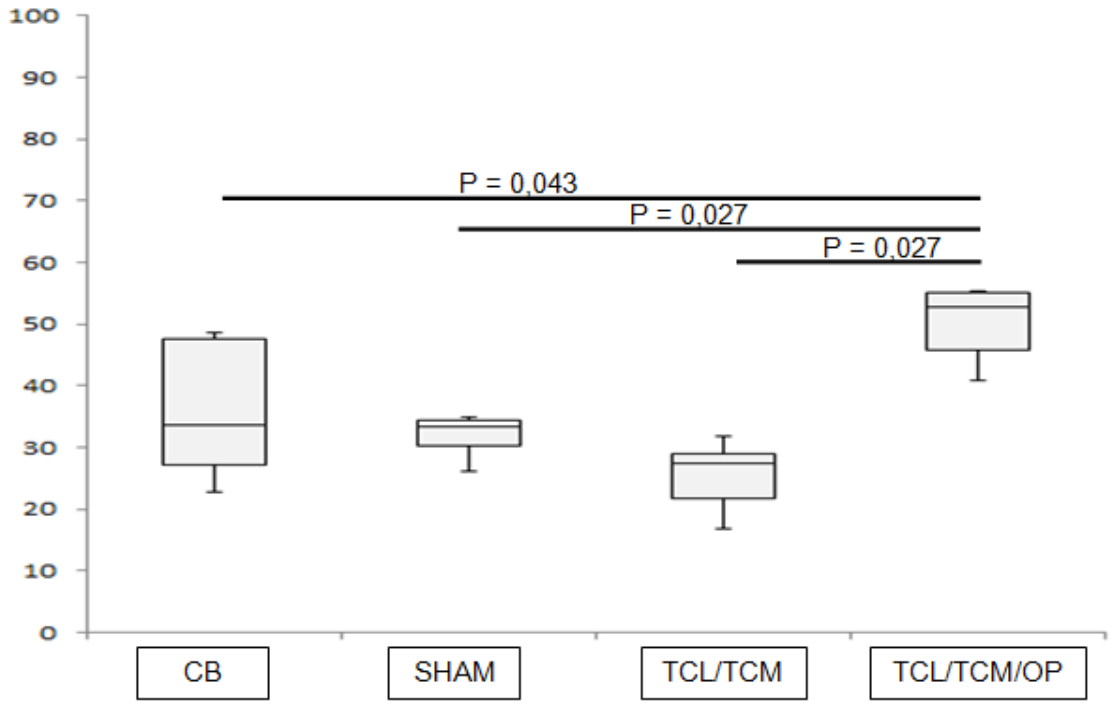


Legenda - CB: controle basal; SHAM: grupo sem infusão de emulsão lipídica; TCL/TCM: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média; TCL/TCM/OP: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média / óleo de peixe. TCL/TCM/OP *vs* TCL/TCM $p<0,05$; TCL/TCM/OP *vs* SHAM $p<0,05$.

Para o período de 72h, o Nrf2, no grupo de ratos que recebeu infusão parenteral de EL composta por TCL/TCM, apresentou mediana de 27,49 pg/mg, inferior ao grupo TCL/TCM/OP com valor de 52,66 pg/mg.

Após análise estatística dos dados, observamos diferença significativa na comparação entre todos os grupos estudados: SHAM *vs* TCL/TCM/OP (p=0,027); CB *vs* TCL/TCM/OP (p=0,043) e TCL/TCM/OP *vs* TCL/TCM (p=0,027) para o tempo de 72h conforme indica o gráfico 10.

Gráfico 10 – Quantificação do fator de transcrição gênica Nrf2 (pg/mg) encontrado no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 72 horas nos grupos: Controle Basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.



Legenda - CB: controle basal; SHAM: grupo sem infusão de emulsão lipídica; TCL/TCM: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média; TCL/TCM/OP: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média / óleo de peixe. TCL/TCM/OP *vs* TCL/TCM $p<0,05$; TCL/TCM/OP *vs* SHAM $p<0,05$; TCL/TCM/OP *vs* CB $p<0,05$.

5.7 - Avaliação do marcador de peroxidação lipídica F2 Isoprostano no fígado

Identificamos o biomarcador de estresse oxidativo F2 isoprostano em todos os grupos estudados, inclusive no fígado de ratos do grupo CB que não sofreram estresse cirúrgico conforme se observa na tabela 7.

Tabela 7 – Quantificação de F2 isoprostano no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 ou 72 horas nos grupos SHAM, TCL/TCM, TCL/TCM/OP e 0 hora para o grupo CB.

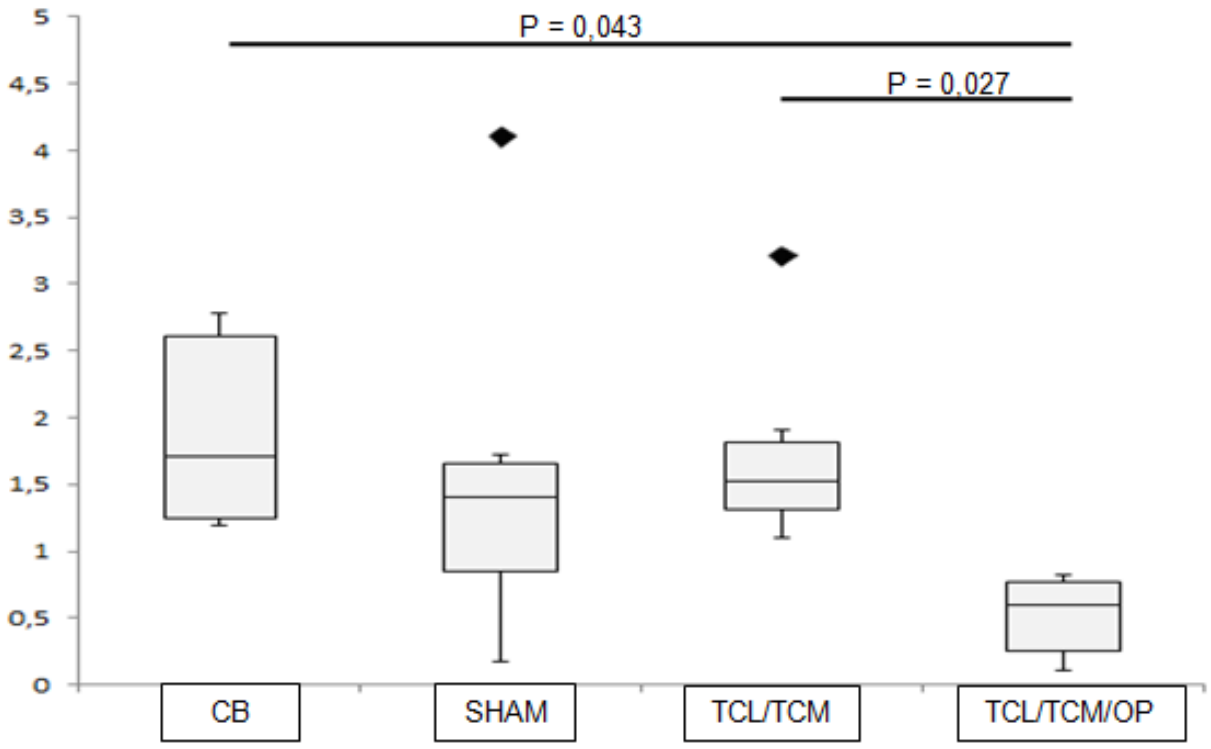
		T48h			T72h	
F2 Isoprostano (pg/mg)	**Mediana**	**Mínimo**	**Máximo**	**Mediana**	**Mínimo**	**Máximo**
SHAM	1,40	0,16	4,10	0,69	0,58	0,73
TCL/TCM	1,52	1,10	3,21	1,01	0,74	3,01
TCL/TCL/OP	0,59	0,10	0,82	0,35	0,25	0,41
		T0h				
F2 Isoprostano (pg/mg)	**Mediana**	**Mínimo**	**Máximo**			
CB	1,70	1,19	2,78			

Legenda - CB: controle basal; SHAM: grupo sem infusão de emulsão lipídica; TCL/TCM: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média; TCL/TCM/OP: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média / óleo de peixe. Valores expressos em mediana, valor mínimo e valor máximo.

A mediana de F2 isoprostano observada no grupo que recebeu infusão parenteral de EL composta por TCL/TCM por 48h foi de 1,52 pg/mg, quantidade superior em comparação ao grupo TCL/TCM/OP, que foi 0,59 pg/mg.

Após análise dos dados, nós constamos diferença estatística significativa na comparação entre os grupos: TCL/TCM/OP *vs* CB (p=0,043) e TCL/TCM/OP *vs* TCL/TCM (p=0,027) para o tempo de 48h conforme mostra o gráfico 11.

Gráfico 11 – Quantificação do biomarcador de peroxidação lipídica F2 isoprostano (pg/mg) encontrado no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 horas nos grupos: Controle Basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.



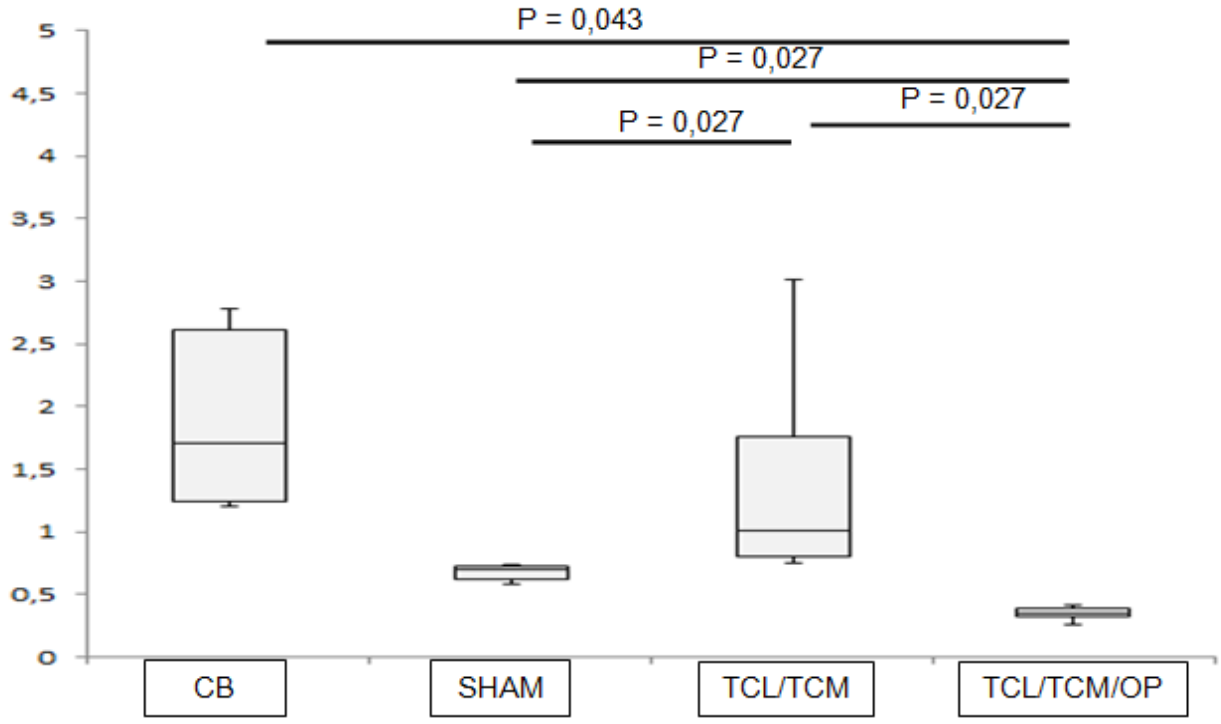
Legenda - CB: controle basal; SHAM: grupo sem infusão de emulsão lipídica; TCL/TCM: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média; TCL/TCM/OP: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média / óleo de peixe. TCL/TCM/OP *vs* TCL/TCM $p<0,05$; TCL/TCM/OP *vs* CB $p<0,05$.

O grupo de ratos que recebeu infusão parenteral de EL composta por TCL/TCM/OP por 72h apresentou mediana de 0,35 pg/mg, enquanto o grupo TCL/TCM apresentou mediana quase três vezes maior (1,01 pg/mg) para este mesmo período.

Após verificação dos dados, foi observada diferença estatisticamente significantiva na comparação entre todos os grupos estudados: TCL/TCM/OP *vs* CB (p=0,043); TCL/TCM/OP *vs* SHAM (p=0,027); TCL/TCM *vs* SHAM (p=0,027) e TCL/TCM/OP *vs* TCL/TCM (p=0,027) para o tempo de 72h. A dispersão dos

valores de F2 isoprotano com seus respectivos *outliers* foram descritos no gráfico 12.

Gráfico 12 – Quantificação do biomarcador de peroxidação lipídica F2 isoprostano (pg/mg) encontrado no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 72 horas nos grupos: Controle Basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.



Legenda - CB: controle basal; SHAM: grupo sem infusão de emulsão lipídica; TCL/TCM: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média; TCL/TCM/OP: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média / óleo de peixe. TCL/TCM/OP *vs* TCL/TCM $p<0,05$; TCL/TCM/OP *vs* SHAM $p<0,05$; TCL/TCM/OP *vs* CB $p<0,05$; TCL/TCM *vs* SHAM $p<0,05$.

5.8 - Avaliação da enzima antioxidante Glutationa Peroxidase

A enzima antioxidante GPx foi detectada em todos os grupos estudados, inclusive no fígado de ratos do grupo CB que não sofreram estresse cirúrgico (tabela 8).

A mediana de Gpx observada no grupo que recebeu infusão parenteral de EL composta por TCL/TCM por 48h foi de 52,33 pg/mg, enquanto o grupo TCL/TCM/OP apresentou mediana duas vezes maior, 108,01 pg/mg.

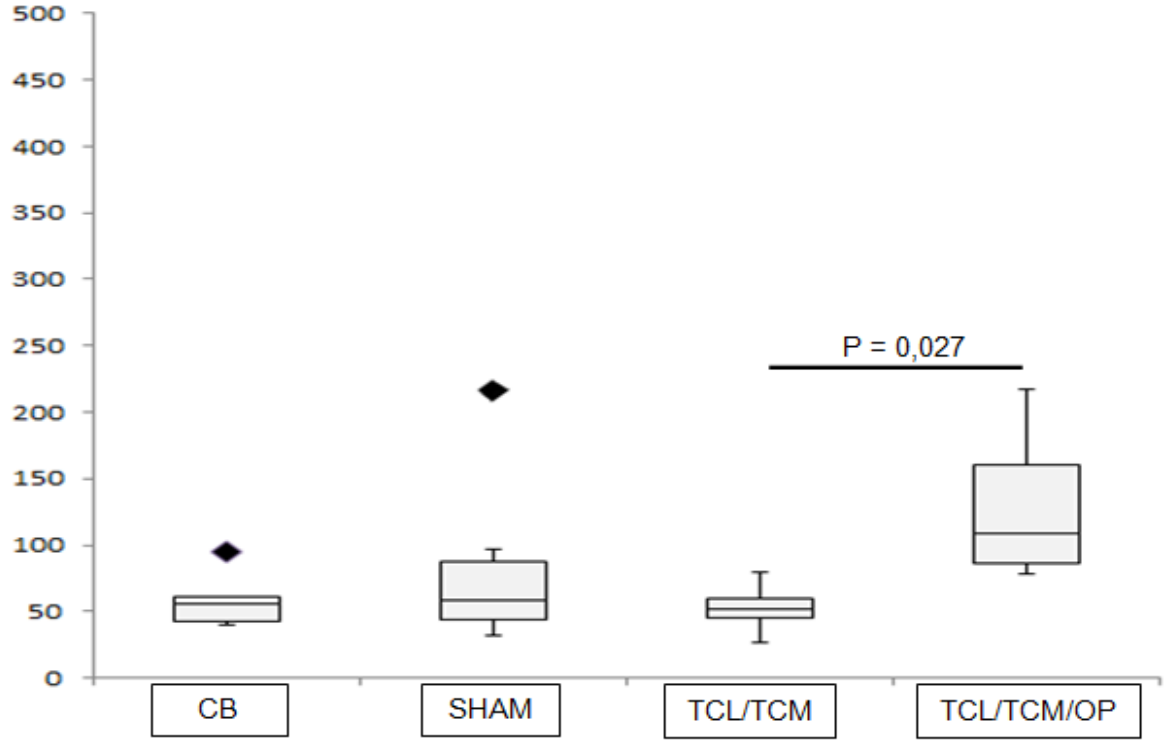
Tabela 8 – Quantificação da enzima antioxidante Gpx no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 ou 72 horas nos grupos SHAM, TCL/TCM, TCL/TCM/OP e 0 hora para o grupo CB.

	T48h			**T72h**		
Gpx (pg/mg)	**Mediana**	**Mínimo**	**Máximo**	**Mediana**	**Mínimo**	**Máximo**
SHAM	57,84	32,36	217,46	53,64	42,94	57,95
TCL/TCM	52,33	26,74	78,92	53,35	52,00	60,65
TCL/TCL/OP	108,01	78,20	217,46	87,17	71,42	328,66
	T0h					
Gpx (pg/mg)	**Mediana**	**Mínimo**	**Máximo**			
CB	56,24	39,95	94,93			

Legenda - CB: controle basal; SHAM: grupo sem infusão de emulsão lipídica; TCL/TCM: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média; TCL/TCM/OP: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média / óleo de peixe. Valores expressos em mediana, valor mínimo e valor máximo.

Foi constatada diferença estatisticamente significante na comparação entre os grupos TCL/TCM/OP *vs* TCL/TCM (p=0,027) para o tempo de 48h conforme aponta o gráfico 13.

Gráfico 13 – Quantificação da enzima antioxidante glutationa peroxidase (pg/mg) encontrada no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 horas nos grupos: Controle Basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.

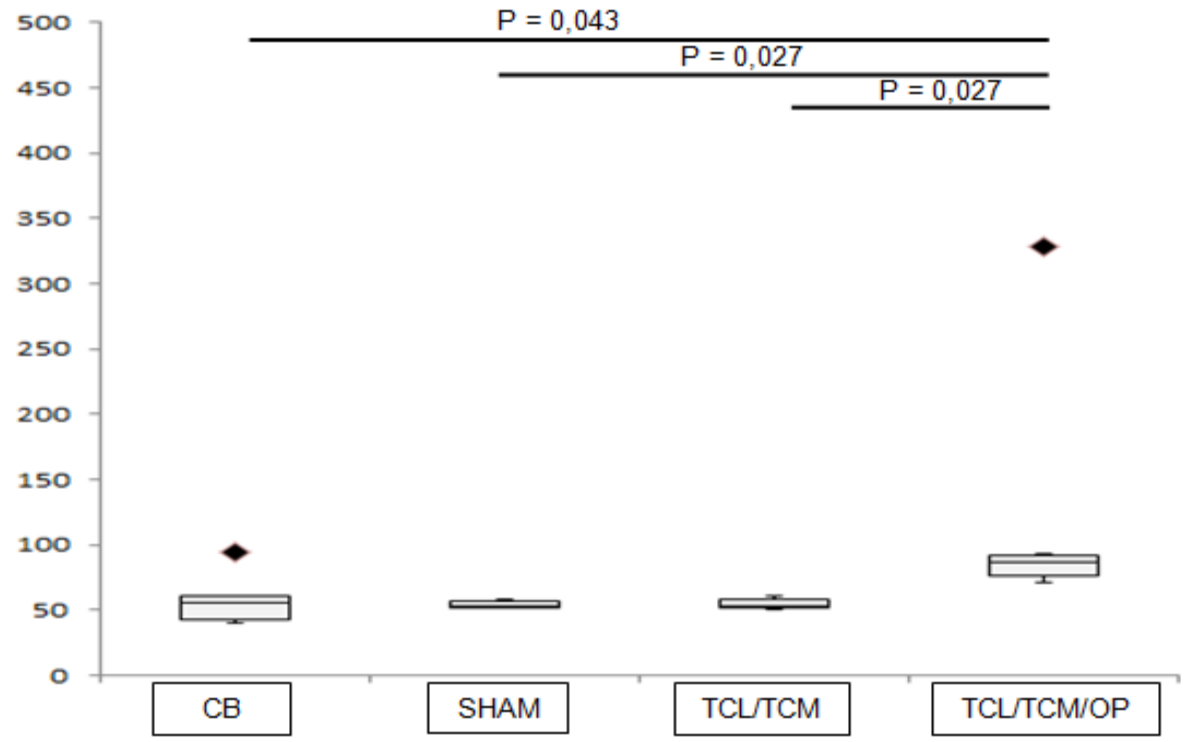


Legenda - CB: controle basal; SHAM: grupo sem infusão de emulsão lipídica; TCL/TCM: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média; TCL/TCM/OP: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média / óleo de peixe. TCL/TCM/OP *vs* TCL/TCM p<0,05.

No período 72h, nós observamos que o grupo de ratos que recebeu a infusão parenteral de EL composta por TCL/TCM apresentou mediana de 53,35 pg/mg, enquanto o grupo TCL/TCM/OP foi de 87,17 pg/mg.

Foi identificada diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos: TCL/TCM/OP *vs* CB (p=0,043); TCL/TCM/OP *vs* SHAM (p=0,027); e TCL/TCM/OP *vs* TCL/TCM (p=0,027) para o tempo de 72h. A dispersão dos valores de Gpx com seus respectivos *outliers* foram descritos no gráfico 14.

Gráfico 14 – Quantificação da enzima antioxidante glutationa peroxidase (pg/mg) encontrada no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 72 horas nos grupos: Controle Basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.



Legenda - CB: controle basal; SHAM: grupo sem infusão de emulsão lipídica; TCL/TCM: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média; TCL/TCM/OP: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média / óleo de peixe. TCL/TCM/OP *vs* TCL/TCM $p<0,05$; TCL/TCM/OP *vs* SHAM $p<0,05$; TCL/TCM/OP *vs* CB $p<0,05$.

5.9 - Avaliação da enzima antioxidante Catalase

A enzima antioxidante CAT foi detectada em todos os grupos estudados, inclusive no fígado de ratos do grupo CB que não sofreram estresse cirúrgico.

A mediana de CAT observada no grupo que recebeu infusão parenteral de EL composta por TCL/TCM por 48h foi de 66,67 mIU/mg , enquanto o grupo TCL/TCM/OP apresentou mediana superior, 117,13 mIU/mg (tabela 9).

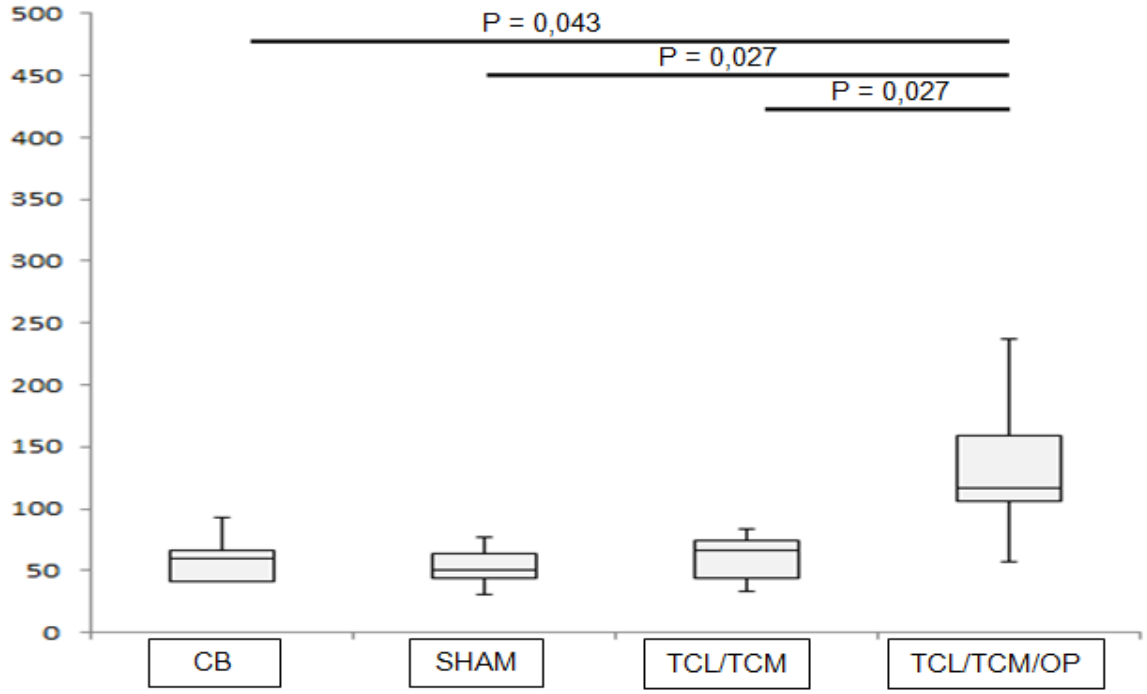
Tabela 9 – Quantificação da enzima antioxidante CAT no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 ou 72 horas nos grupos SHAM, TCL/TCM, TCL/TCM/OP e 0 hora para o grupo CB.

	T48h			**T72h**		
CAT (mIU/mg)	**Mediana**	**Mínimo**	**Máximo**	**Mediana**	**Mínimo**	**Máximo**
SHAM	50,82	30,99	77,19	61,77	43,85	74,01
TCL/TCM	66,67	33,00	83,56	56,54	53,21	65,34
TCL/TCL/OP	117,13	57,45	236,89	94,83	55,14	363,37
	T0h					
CAT (mIU/mg)	**Mediana**	**Mínimo**	**Máximo**			
CB	59,98	41,57	92,61			

Legenda - CB: controle basal; SHAM: grupo sem infusão de emulsão lipídica; TCL/TCM: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média; TCL/TCM/OP: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média / óleo de peixe. Valores expressos em mediana, valor mínimo e valor máximo.

Nós identificamos diferença estatisticamente significante na comparação entre todos grupos estudados: TCL/TCM/OP *vs* CB (p=0,043); TCL/TCM/OP *vs* SHAM (p=0,027); TCL/TCM/OP *vs* TCL/TCM (p=0,027) para o tempo de 48h conforme indica o gráfico 15.

Gráfico 15 – Quantificação da enzima antioxidante catalase (mIU/mg) encontrada no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 horas nos grupos: Controle Basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.

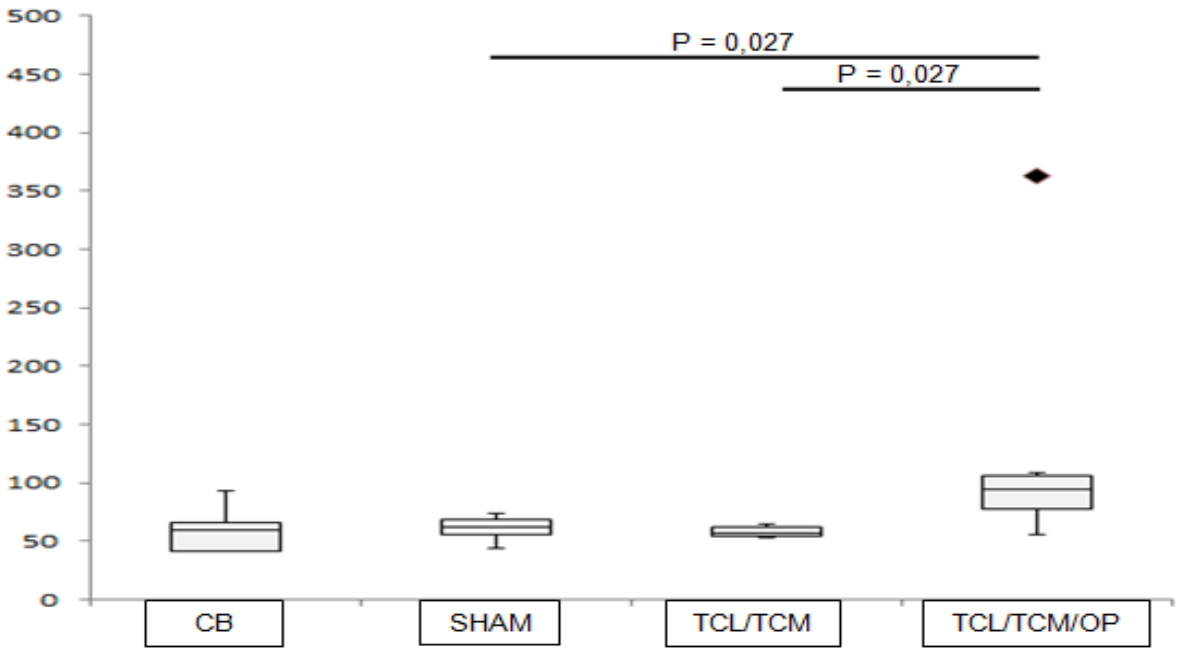


Legenda - CB: controle basal; SHAM: grupo sem infusão de emulsão lipídica; TCL/TCM: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média; TCL/TCM/OP: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média / óleo de peixe. TCL/TCM/OP *vs* TCL/TCM p<0,05; TCL/TCM/OP *vs* SHAM p<0,05; TCL/TCM/OP *vs* CB p<0,05.

Nós observamos que no período 72h, o grupo de ratos que recebeu infusão parenteral de EL composta por TCL/TCM apresentou mediana de 56,54 mIU/mg, enquanto o grupo TCL/TCM/OP mostrou mediana de 94,83 mIU/mg.

Foi identificada diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos: TCL/TCM/OP *vs* SHAM (p=0,027); e TCL/TCM/OP *vs* TCL/TCM (p=0,027) para o tempo de 72h conforme se pode ver no gráfico 16.

Gráfico 16 – Quantificação da enzima antioxidante catalase (mIU/mg) encontrada no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 72 horas nos grupos: Controle Basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.



Legenda - CB: controle basal; SHAM: grupo sem infusão de emulsão lipídica; TCL/TCM: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média; TCL/TCM/OP: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média / óleo de peixe. TCL/TCM/OP *vs* TCL/TCM $p<0,05$; TCL/TCM/OP *vs* SHAM $p<0,05$.

5.9.1 - Avaliação da enzima antioxidante Superóxido Dismutase

A enzima antioxidante SOD foi detectada em todos os grupos estudados, inclusive no fígado de ratos do grupo CB que não sofreram estresse cirúrgico (tabela 10).

Tabela 10 – Quantificação da enzima antioxidante SOD no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 ou 72 horas nos grupos SHAM, TCL/TCM, TCL/TCM/OP e 0 hora para o grupo CB.

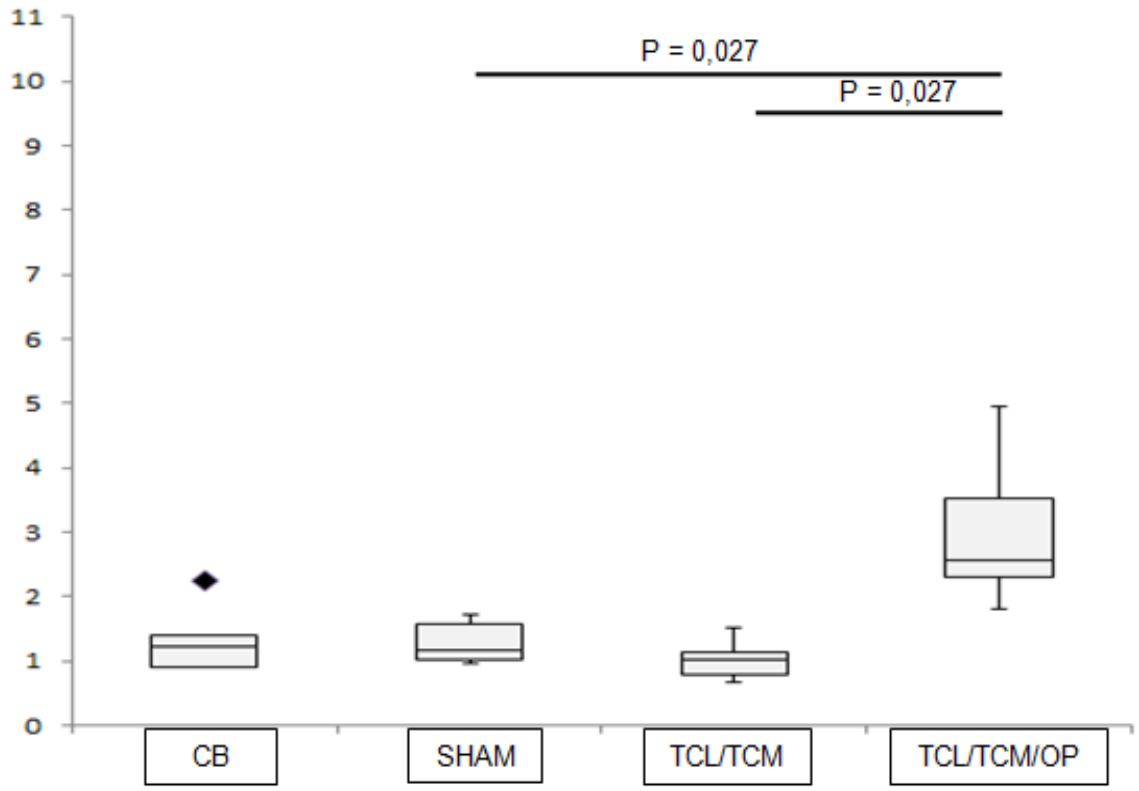
		T48h			**T72h**	
SOD (ng/mg)	**Mediana**	**Mínimo**	**Máximo**	**Mediana**	**Mínimo**	**Máximo**
SHAM	1,17	0,96	1,69	1,38	1,11	1,55
TCL/TCM	1,02	0,67	1,52	1,41	1,35	1,47
TCL/TCL/OP	2,55	1,81	4,95	2,53	1,51	10,02
		T0h				
SOD (ng/mg)	**Mediana**	**Mínimo**	**Máximo**			
CB	1,23	0,90	2,25			

Legenda - CB: controle basal; SHAM: grupo sem infusão de emulsão lipídica; TCL/TCM: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média; TCL/TCM/OP: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média / óleo de peixe. Valores expressos em mediana, valor mínimo e valor máximo.

A mediana de SOD observada no grupo que recebeu infusão parenteral de EL composta por TCL/TCM por 48h foi de 1,02 ng/mg, enquanto o grupo TCL/TCM/OP apresentou mediana duas vezes e meia maior para este mesmo período, 2,55 ng/mg.

Foi constatada diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos: TCL/TCM/OP *vs* SHAM (p=0,027) TCL/TCM/OP *vs* TCL/TCM (p=0,027) para o tempo de 48h conforme indica o gráfico 17.

Gráfico 17 – Quantificação da enzima antioxidante superóxido dismutase (ng/mg) encontrada no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 48 horas nos grupos: Controle Basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.



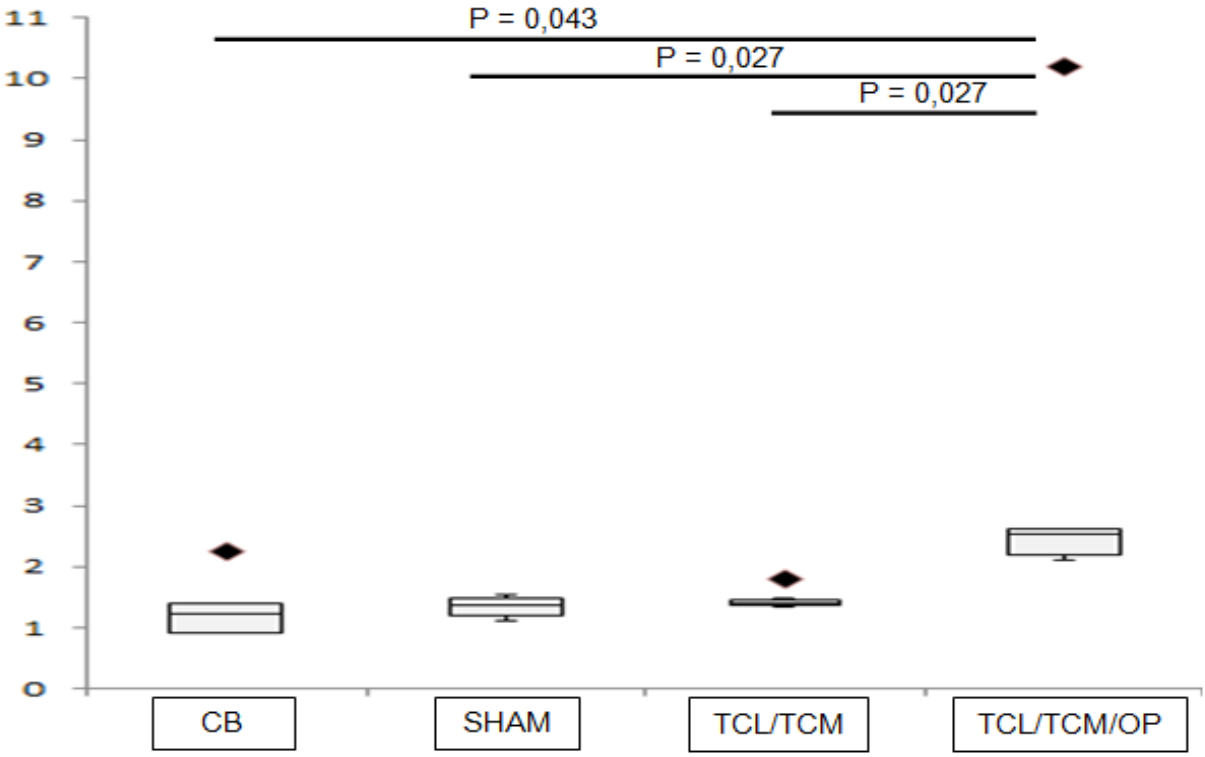
Legenda - CB: controle basal; SHAM: grupo sem infusão de emulsão lipídica; TCL/TCM: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média; TCL/TCM/OP: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média / óleo de peixe. TCL/TCM/OP *vs* TCL/TCM $p<0,05$; TCL/TCM/OP *vs* SHAM $p<0,05$.

Nós observamos que no período 72h, o grupo de ratos que recebeu infusão parenteral de EL composta por TCL/TCM apresentou mediana de 1,41 ng/mg, enquanto o grupo TCL/TCM/OP mostrou mediana de 2,53 ng/mg.

Foi identificada diferença estatisticamente significativa na comparação entre todos grupos estudados: TCL/TCM/OP *vs* CB ($p=0,043$); TCL/TCM/OP *vs*

SHAM (p=0,027); e TCL/TCM/OP *vs* TCL/TCM (p=0,027) para o tempo de 72h conforme aponta o gráfico 18.

Gráfico 18 – Quantificação da enzima antioxidante superóxido dismutase (ng/mg) encontrada no fígado de ratos após infusão ou não de emulsão lipídica por 72 horas nos grupos: Controle Basal, SHAM, TCL/TCM e TCL/TCM/OP.



Legenda - CB: controle basal; SHAM: grupo sem infusão de emulsão lipídica; TCL/TCM: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média; TCL/TCM/OP: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média / óleo de peixe. TCL/TCM/OP *vs* TCL/TCM p<0,05; TCL/TCM/OP *vs* SHAM p<0,05; TCL/TCM/OP *vs* CB p<0,05.

Na tabela 11 nós apresentamos de forma dinâmica e resumida o impacto da infusão ou não de diferentes EL's sobre os marcadores antioxidantes no fígado de ratos conforme protocolo experimental.

Tabela 11 – Impacto da infusão ou não de diferentes EL's sobre os marcadores antioxidantes no fígado de ratos conforme protocolo experimental.

	0 hora	48 horas			72 horas		
Marcador	**CB**	**SHAM**	**TCL/TCM**	**TCL/TCM/OP**	**SHAM**	**TCL/TCM**	**TCL/TCM/OP**
Nrf2 (pg/mg)	33,62	21,24	21,07↓	42,44↑	33,25	27,49↓	52,66↑
F2 isoprostanos (pg/mg)	1,70	1,40	1,52↑	0,59↓	0,69	1,01↑	0,35↓
Gpx (pg/mg)	56,24	57,84	52,33↓	108,01↑	53,64	53,35↓	87,17↑
CAT (mIU/mg)	59,98	50,82	66,67↓	117,13↑	61,77	56,54↓	94,83↑
SOD (ng/mg)	1,23	1,17	1,02↓	2,55↑	1,38	1,41↓	2,53↑

Legenda - CB: controle basal; SHAM: grupo sem infusão de emulsão lipídica; TCL/TCM: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média; TCL/TCM/OP: triglicerídeos de cadeia longa / triglicerídeos de cadeia média / óleo de peixe. ↓: menor; ↑: maior. Valores expressos em mediana.

6. Discussão

6 - DISCUSSÃO

O presente estudo experimental buscou verificar se a infusão parenteral de uma emulsão lipídica enriquecida com OP contribui para menor peroxidação lipídica e combate ao estresse oxidativo no tecido hepático de ratos Lewis. O delineamento experimental do estudo incluiu diferentes EL's enriquecidas ou não com OP a fim de determinar se de fato existe o potencial efeito antioxidante. Como grupo controle, utilizamos animais infundidos com EL de perfil lipídico muito similar à EL teste, com exceção de seu conteúdo de OP, o que permitiu observar efeitos específicos das duas emulsões sobre a proteção antioxidante no fígado dos animais.

6.1 - Dos animais

Estudos em nutrição experimental com ratos têm sido muito utilizados devido à facilidade de manuseio, adaptação ao ambiente laboratorial e reprodução de protocolos experimentais[51].

Ratos da linhagem Lewis são considerados isogênicos e foram elaborados a partir do cruzamento de animais consanguíneos por gerações consecutivas, gerando populações estáveis e geneticamente homogêneas. A homogeneidade genética destes ratos possibilitou a utilização de número reduzido de animais por experimento pela maior uniformidade dos resultados encontrados[52].

No presente estudo foram padronizados seis ratos Lewis isogênicos por grupo experimental, tendo como base resultados positivos e publicados previamente pelo nosso grupo de pesquisa[43,44].

Nesta investigação, foram selecionados 56 ratos para compor os grupos experimentais conforme protocolo de infusão das EL's. No entanto, sete ratos morreram nas primeiras 24h após passagem de CVC e oito ratos morreram no período entre 24h e 48h após a realização do mesmo procedimento cirúrgico.

Algumas complicações em cirurgia experimental descritas na literatura podem explicar os possíveis motivos de morte dos ratos no presente estudo como, por exemplo, a oclusão do CVC, presença de trombos pulmonares e/ou outros órgãos, hemorragia, choque hemorrágico, infecção no local da implantação do cateter, sepse, choque séptico, dentre outras causas de morte súbita. No entanto, essas intercorrências relacionadas ao procedimento cirúrgico não foram investigadas em nossa pesquisa por não ser o objetivo desta investigação[53].

A realização do acesso venoso central conforme técnica padronizada por Yamagushi e cols[47], que consiste na cateterização da veia jugular externa, também muito utilizada em estudos prévios publicados pelo nosso grupo.

A utilização do cateter venoso de silicone acoplado à peça giratória intermediária (Swivel) desenvolvida artesanalmente pelo Grupo METANUTRI, em parceria com a Escola Politécnica da USP, viabilizou a livre movimentação dos animais e possibilitou a infusão das EL's propostas sem registro de intercorrências durante o período analisado, já que permitiu total mobilização do animal dentro das gaiolas individuais[54].

6.2 - Da alteração de peso

O acompanhamento de peso corporal em ratos durante protocolos de pesquisas é importante em estudos que avaliam os efeitos de infusão parenteral de diferentes EL's. Em situações de estresse e/ou processos inflamatórios após implantação de CVC, a presença de edema ou ganho excessivo de peso corpóreo podem comprometer os resultados do estudo.

Garla e cols[55] não encontraram redução significativa de peso corpóreo no grupo de ratos que recebeu infusão parenteral de EL contendo óleo de peixe por 72 horas em modelo experimental de pancreatite aguda.

Em vigência de estresse agudo como, por exemplo, pancreatite aguda ou mesmo após procedimento cirúrgico, é comum a retenção de fluidos corporais. Em casos mais críticos da doença pode ocorrer anasarca que

compromete a identificação precisa de perda de peso e consequentemente pode mascarar os possíveis resultados sobre o peso corpóreo[55-56].

Por outro lado, perda de massa corporal e de massa absoluta de órgãos como fígado, pâncreas, pulmões e rins em ratos, foram relatadas em estudos que investigaram os efeitos de longos períodos de infusão de nutrição parenteral. Em estudo desenvolvido por Xu e cols[57], foi observada redução significativa no peso corpóreo de ratos após cinco dias de infusão de nutrição parenteral de EL enriquecida com ácidos graxo ômega-6.

No presente estudo nós não identificamos redução significativa no peso dos ratos nos períodos analisados. É importante considerar que em nossa investigação o tempo máximo de infusão de EL's foi até 72h. É possível que com maior tempo de infusão, talvez notássemos alterações significativas de peso nos ratos.

Nandivada e cols[31] relataram ganho de peso corporal em ratos que receberam infusão parenteral composta por diferentes ELs por período de 20 dias. Sabe-se que ratos com ganho excessivo de peso ou obesos, apresentam maior peroxidação lipídica, elevada produção de EROs e estresse oxidativo no fígado[30].

Portanto, a ausência de ganho de peso corporal excessivo nos ratos do nosso estudo, pode ter contribuído para menor estímulo ao estresse oxidativo no tecido hepático dos ratos.

6.3 - Do consumo de ração

A avaliação do consumo oral de ração foi realizada por meio de registros de pesagem de resto-ingestão dos ratos. A quantidade de ração ofertada e o resto-ingestão por rato foram diariamente registrados em prontuário físico e feitos sempre no mesmo horário para todos os grupos experimentais.

Nos cinco dias de ambientação que precederam a passagem de CVC, todos os ratos consumiram as 20g de ração, ofertadas diariamente conforme protocolo experimental, ingestão próxima a essa até o dia da passagem do

CVC para todos os grupos estudados. Dados semelhantes de consumo de ração foram observados por Li e cols[58], com ingestão média entre 21g e 24g de ração AIN93M no período de 90 dias de investigação.

Por outro lado, identificamos redução significativa no consumo de ração para todos os grupos de ratos durante a infusão das EL's, independente do tempo e tipo de EL administrada. Esta baixa aceitação alimentar observada nos ratos, após o procedimento cirúrgico e infusão de EL's, pode ser explicada pela atuação de citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, TNF-α, IL-1β e IL-6. Estas citocinas podem ser encontradas em concentrações expressivas em pacientes portadores de diferentes tipos de cateteres[59].

Em vigência de processo inflamatório, acontecem alterações do metabolismo, mediadas por hormônios (glicorticóides, catecolaminas e glucagon), citocinas (TNF, IL-1, IL-6) que reduzem a aceitação alimentar. No entanto, por não ser o objetivo desta investigação, essas citocinas não foram dosadas por nós[60].

O controle na oferta diária de ração, realizada nesta investigação, teve como objetivo limitar a ocorrência de vieses relacionados à elevada ingestão de nutrientes, principalmente de gorduras provenientes da ração quando ofertada *ad libitum*.

Em estudo desenvolvido por Santos e cols[61], os pesquisadores verificaram esteatose hepática e resistência à insulina em ratos que receberam dieta padrão AIN93M *ad libitum*. Levando esse estudo em consideração, compreendemos que a oferta de ração AIN93M *ad libitum* no período de ambientação e durante o período de infusão parenteral de EL's por 48h ou 72h, também poderiam favorecer o desenvolvimento de esteatose hepática.

É importante considerar que no presente estudo, a avaliação de defesas antioxidantes foi realizada, especificamente, no fígado dos ratos. Assim, limitar fatores que poderiam comprometer a função hepática dos ratos, como por exemplo, a oferta exagerada de nutrientes e portanto ganho excessivo de peso corporal, foi de interesse para nosso estudo.

Além de promover esteatose hepática, sabe-se que o consumo de quantidades elevadas de energia pode propiciar ambiente mais oxidativo no fígado de ratos[62]. O excesso de gordura pode estimular o desenvolvimento de

estresse oxidativo sistêmico em ratos. Este fato foi observado em ratos com resistência a insulina e que apresentaram maior peroxidação lipídica após verificação de elevados níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), EROs como peróxido de hidrogênio, além de redução na atividade das enzimas antioxidantes no fígado[30].

Portanto com o intuito de prevenir estresse oxidativo no tecido hepático, o presente estudo não ofertou ração *ad libitum* no período de investigação e seguiu a recomendação máxima de 20g/dia de ração AIN93M para ratos adultos. Esta quantidade foi determinada pelo nosso grupo de pesquisa em concordância com Manual de Cuidados em Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção Experimental da FCF-IQ/USP que sugeriu o intervalo entre 10g e 20g de ração por dia[46].

6.4 - Do conteúdo dos ácidos graxos

Na literatura há registros de estudos experimentais e clínicos que avaliaram os efeitos antioxidantes após administração de AGPIs-ω3 por via enteral ou parenteral. No entanto, até onde pudemos averiguar, poucos estudos investigaram se houve a incorporação desses AGPIs-ω3 no plasma ou órgão alvo durante o protocolo proposto.

Hagi e cols[63] demonstraram que o pico de incorporação de AGPI infundidos via nutrição parenteral ocorreu em 72h. No entanto, em recente estudo desenvolvido em nosso laboratório por Morais AT[45], foi observado que o pico de incorporação no tecido hepático ocorreu de forma mais precoce, em até 48h de infusão.

Portanto, com base em estudos prévios desenvolvidos pelo nosso laboratório Metanutri, entendemos ser importante identificar previamente se, os AG infundidos via nutrição parenteral foram de fato incorporados no plasma e no fígado dos ratos após o tratamento proposto. Seguindo essa linha de raciocínio, nosso grupo de pesquisa é pioneiro, em território nacional, na avaliação prévia de incorporação dos ácidos graxos oleico, linoleico, EPA e DHA no plasma e em tecidos de ratos tratados com diferentes EL's[45,55].

6.5 - Ácido oleico

O ácido oleico tem uma dupla ligação localizada entre os carbonos 9 e 10 do grupo metil final, sintetizado por todos os mamíferos , ele é designado ácido graxo monoinsaturado ω9 (AGMI-ω9)[64,65].

Os ácidos graxos encontrados no plasma e no fígado de ratos do presente estudo refletem os tipos de lipídios presentes na dieta ofertada. Análise da ração utilizada no nosso protocolo experimental apontou presença de AGMI-ω9 na composição da AIN93M (Anexo B). Além dos lipídios provenientes do consumo de ração, houve, também em nosso estudo, administração parenteral de EL's com diferentes concentrações de ácidos graxos que impactaram diretamente nos resultados de incorporação celular.

Identificamos elevados índices de AGMI-ω9 no plasma e fígado de ratos em todos os grupos estudados e, principalmente nos grupos que receberam a infusão parenteral de diferentes EL's. Esses apresentaram maiores valores de razão oleico:linoleico após 72h de infusão.

Além da ração consumida, vale ressaltar que existem AGMI-ω9 na composição das EL's estudadas. Provavelmente por estes motivos, foram identificadas expressivas taxas de AGMI-ω9 no plasma e no fígado dos ratos analisados. Principalmente nos grupos que receberam a dieta por via oral (ração) associada à infusão parenteral de EL's.

Em relação à incorporação destes AGs, estudos clínicos e experimentais relataram presença de AGMI-ω9 no plasma e tecidos após infusão de EL's. Maciá-Botejara e cols[66] detectaram a presença de AGMI-ω9 no cérebro de coelhos após infusão parenteral de EL composta com TCL/TCM por sete dias. Em estudo desenvolvido com humanos recém-nascidos pré-termo, AGMI-ω9 foi detectado no plasma do grupo sob infusão parenteral de EL de TCL/TCM por 14 dias[67]. Sala-Vila e cols[49] também confirmaram a presença de AGMI-ω9 em células hepáticas tratadas por 72h com EL enriquecida por óleo de peixe (TCL/TCM/OP).

Existem registros do efeito antioxidante de AGMI-ω9, mas com resultados ainda controversos. Por exemplo, após estudar o efeito de AGMI-ω9 em plaquetas isoladas do plasma humano, não se encontrou efeito estatisticamente significativo na atividade da enzima antioxidante Gpx[68].

Na mesma linha, a infusão parenteral de EL composta por óleo de oliva em recém-nascidos pré-termo por 14 dias por Wang e cols[67] também não se associou com efeito significativo na peroxidação lipídica após dosagem de MDA, capacidade antioxidante total e atividade de enzimas antioxidantes GPx e SOD.

Por outro lado, o efeito do consumo de azeite de oliva (25ml/dia) rico em compostos fenólicos sobre a peroxidação lipídica foi avaliado em 200 indivíduos saudáveis. Houve significativa redução no consumo de ácido linoleico, e o aumento de uma unidade na razão ácido oleico/linoleico se associou com diminuição de 4,2 mg/L no valor de F2 isoprostano[69].

Há fortes evidências de que o efeito antioxidante do AGMI-ω9 esteja associado aos componentes fenólicos presente em alta quantidade em azeites, principalmente naqueles cultivados e produzidos em solo europeu[69,70]. No entanto, nós não identificamos o registro de compostos fenólicos nas informações descritas no rótulo das EL's selecionadas para o nosso estudo. Portanto imaginamos que a presença deste AGMI-ω9 no plasma e fígado dos ratos não afetaria os nossos resultados.

6.6 - Ácido linoleico (AL) e araquidônico (AA)

Os AGPI ω-6 são essenciais para funções celulares normais, e atuam como precursores para síntese de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa como AA. Esses AGPI ω-6 fazem parte de numerosas funções celulares como a integridade de membranas, atividade das enzimas de membrana, interações lipídio-proteína e síntese de eicosanóides como as PG, LT e tromboxanos[71].

Entretanto, essas EL's, ricas em AGPI ω-6, foram associadas com prejuízos em termos de hiperlipidemia, disfunção hepática e promoção do estresse oxidativo em modelo experimental[72,73].

No presente estudo os níveis de ácido linoleico e ARA foram maiores no plasma e no fígado dos ratos que receberam infusão parenteral de TCL/TCM por 48h. Consequentemente, os ratos que receberam esta EL composta por OS, obtiveram as menores razões: ω-3: ω-6 e EPA: ARA.

Nossos resultados corroboram com dados disponíveis na literatura. D'Ascenzo e cols[74], demonstraram elevadas concentrações de AL e ARA no plasma de humanos recém-nascidos pré-termo que receberam solução de nutrição parenteral composta por TCL/TCM. Enquanto Nandivada e cols[31] detectaram a presença de AL e ARA no fígado de ratos que receberam nutrição parenteral composta por OS.

O uso de EL composta por OS foi relacionado com esteatose hepática em ratos. Acontece que as EL's enriquecidas com TCL contribuem para maior atuação das enzimas Acetil CoA carboxilase α e acetil CoA carboxilase β (AACC) que tem importante papel na lipogênese *de novo*[31].

A importância deste processo é seu possível papel no desenvolvimento de dislipidemias e acúmulo de gordura corporal. Embora lipogênese *de novo* seja altamente ativa em roedores, sua contribuição para o fluxo de ácidos graxos em humanos merece mais investigação[75].

Fatores nutricionais podem afetar a expressão das enzimas que participam da lipogênese de novo, como a ACC, que catalisa a carboxilação da acetil-CoA, reação mais importante na regulação da síntese *de novo* de ácidos graxos, e a ácido graxo sintase, que tem como produto final o palmitato. Fórmulas ricas em TCL aumentaram a expressão destas enzimas lipogências, enquanto AGPI ω-3 as reduziram[31].

Após 72 horas de infusão de TCL/TCM, as taxas de ácido linoleico e ARA detectadas no tecido hepático foram menores em comparação ao período 48h.

Após processos de transporte plasmático, os AG podem ser utilizados como fonte de energia e componentes estruturais de membranas. Adiciona-se que, ARA e EPA podem ser precursores de eicosanóides. Os AG também são importantes em uma série de sistemas fisiológicos, e como mediadores das respostas imune e inflamatório. Em nosso estudo, é possível que a redução nos níveis de linoleico e ARA no tempo 72h, tenha ocorrido em função da atividade de enzimas dessaturases, que posteriormente poderiam contribuir para síntese de seus respectivos mediadores inflamatórios. No entanto, a atuação destas enzimas dessaturases e as concentrações destes mediadores inflamatórios não foram dosados no presente estudo, pelo fato de não compor os nossos objetivos[76].

Com base nas informações dos estudos supracitados, pesquisadores reportaram que EL's ricas em AGPI n-6 se associam ao desenvolvimento de colestase e acentuam processos inflamatórios. Além disso, experimentalmente, a infusão parenteral de fórmulas enriquecidas com OS reduziram defesas antioxidantes no fígado dos ratos[37].

Em estudo clínico com pacientes recém-nascidos pré-termo que receberam nutrição parenteral com EL composta por TCL/TCM por 14 dias, Wang e cols[67] não observaram efeitos positivos na atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx. Portanto, EL's ricas em AGPI ω-6, parecem não contribuir no combate ao estresse oxidativo por não apresentarem impactos positivos na atividade de enzimas antioxidantes. Entretanto, AGPI ω-6 parecem contribuir para o desenvolvimento de lipogênse *de novo,* colestase, maior peroxidação lipídica e estresse oxidativo.

6.7 - Ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico

Dentre os nutrientes capazes de modular a resposta imunológica e inflamatória incluem-se AGPI ω-3, em especial EPA e DHA. AGPI ω-3 participam diretamente da resposta do sistema imunológico ao se incorporarem em fosfolípides de membranas celulares e competirem como substrato alternativo contra AGPI ω-6, na síntese de mediadores inflamatórios da família dos eicosanóides, e como interruptores da inflamação, denominados resolvinas[77,78].

Na presente investigação, não foram detectados níveis de EPA e DHA no plasma e no fígado dos ratos que receberam a infusão parenteral de TCL/TCM por 48h. No entanto, como esperado por nós, EPA e DHA, componentes de óleo de peixe foram encontrados no plasma e no tecido hepático de ratos que receberam EL composta por TCL/TCM/OP em 48h. Podemos observar também que, no período 48 horas, no grupo TCL/TCM/OP, as razões ω-3: ω-6 e EPA: ARA foram mais expressivas no plasma em comparação ao fígado.

A incorporação de EPA e DHA também foi encontrada no fígado de ratos que receberam infusão parenteral de emulsão lipídica composta por OS e OP (1:1), porém o período avaliado pelos pesquisadores foi de 20 dias, muito superior ao período analisado em nosso estudo[31]. Em nossa investigação, nota-se que a incorporação de EPA e DHA ocorreu de forma mais precoce (48h) no grupo que recebeu TCL/TCM/OP, enquanto no estudo de Hagi e cols[63], o pico de incorporação desses AGPI ω-3 ocorreu em 72h.

No período 72 horas, nós detectamos níveis de EPA no plasma dos ratos que receberam a infusão de TCL/TCM/OP, mas não DHA. Possivelmente por este motivo, verificamos uma reduzida razão ω-3: ω-6 e EPA: ARA para este mesmo grupo, neste período. Podemos especular que o DHA presente no plasma dos animais, no tempo 48h, poderia ter sido transportado e captado para outros tecidos, como por exemplo, o fígado com a finalidade de

incorporar-se na estrutura e composição de membranas. Justifica-se pois às 72h de infusão de TCL/TCM/OP, nós encontramos, no fígado, EPA e DHA.

Chamou nossa atenção termos identificado apenas DHA, no fígado de ratos do grupo que recebeu TCL/TCM por 72h, com discreta razão ômega 3: ômega 6. Nossos resultados estão concordes com os de Baker e cols que, também encontraram DHA presente no fígado ratos que receberam EL de OS[78].

Neste caso, vale considerar que o fígado é o órgão mais danificado por EROs[62]. Poderíamos sugerir que células hepáticas teriam captado DHA, proveniente da camada fosfolipídica de células degradadas em virtude da atuação de EROs. Esta hipótese tem valia na medida em que AGPI ω-6 estão associados a efeitos pró-inflamatórios, com potencial apoptótico, importante produção de ERO's, maior peroxidação lipídica e morte celular.

É fato que a ração padrão industrializada ofertada aos nossos animais possui AGPIs ω-3 em sua composição, o que poderia repercutir nos achados do presente estudo. Entretanto, devemos considerar que, a quantidade de AGPIs ω-3 presente na ração é muito baixa (0,05%) e está na forma de ALA. ALA deve passar por diversos processos de elongamento e dessaturação para ser convertido em EPA e DHA, e essa taxa de conversão geralmente é muito baixa. Adiciona-se que os animais dos grupos CB e SHAM, também foram alimentados com a mesma ração e não apresentaram taxas de incorporação de EPA e DHA.

6.8 Do fator de transcrição gênica NRF2

O Nrf2 é considerado regulador chave da resposta antioxidante do organismo. É responsável por induzir a expressão de genes que codificam proteínas e enzimas antioxidantes, além de enzimas da fase II de detoxificação do metabolismo. Desta forma, Nrf2 desempenha mecanismo de importância crítica para proteção e sobrevivência celular. Dentre os seus genes alvo estão a heme oxigenase 1 (HO-1), SOD, CAT, NAD(P)H quinona oxidoredutase 1

(NQO1), glutationa S transferase (GST), glutationa redutase (GR), GPx, tioredoxina (Trx) e glutamato cisteína ligase (GCL)[79].

A função do Nrf2 não é limitada somente à resposta antioxidante e de detoxificação. Ele também é responsável pela modulação da expressão de mais de 200 genes, com função em diversos outros processos celulares, que incluem função mitocondrial, regulação metabólica, proliferação celular e resposta inflamatória[80,81].

O Nrf2 estar relacionado com tantas outras funções, e expresso de forma ubíqua no organismo, sugere que ele funcione como sensor celular que comanda reprogramação metabólica para combater estímulos estressores, e, assim, aumentar a capacidade de sobrevivência celular e restauração da homeostase[82]. Adiciona-se que, Nrf2 confere proteção celular específica, ao modular a expressão de genes de acordo com a necessidade de cada célula[83].

A capacidade do Nrf2 em ativar genes citoprotetores permite que ele seja muito diverso na proteção hepática. Experiências realizadas com ratos *knock-out* - Nrf2-/- revelaram, nestes animais, maior suscetibilidade e dano hepático quando expostos a situações de estresse[84,85].

No presente estudo, nós observamos redução significativa nos valores de Nrf2 nos grupos SHAM e TCL/TCM em comparação ao grupo TCL/TCM/OP. Nossa hipótese é que a redução de Nrf2 no fígado dos ratos que sofreram a passagem de CVC, mas sem infusão de OP, tenha ocorrido como mecanismo de proteção celular em resposta ao trauma.

Por outro lado, a presença de EPA e DHA nas camadas fosfolipídicas das membranas celulares poderiam conferir favorável reprogramação metabólica no combate ao estresse oxidativo[86]. No presente estudo, nós observamos que o grupo de ratos sob infusão parenteral de EL composta por TCL/TCM/OP, apresentou valores estatisticamente superiores de Nrf2 em comparação o grupo TCL/TCM. É possível que este efeito tenha ocorrido em função da presença dos metabólitos do OP, o EPA e DHA, que estavam disponíveis nas camadas fosfolipídicas das células no tecido hepático. No entanto o mecanismo que descreve a ativação do Nrf2 permanece alvo de muitos pesquisadores.

Até o momento, sabe-se que a incorporação dos AGPI ω-3 na membrana plasmática das células é determinante para ativação do Nrf2. Considerando o papel central do Nrf2 nos processos de resposta adaptativa celular em resposta ao estresse oxidativo, a adição de EPA em culturas de células hepáticas se associou com maior concentração de Nrf2 no citoplasma e no núcleo das células[21]. DHA também está relacionado com modulação favorável de mecanismos antioxidantes, como aumento da expressão gênica de Nrf2 e inibição da superexpressão das vias da COX2 e da NOX4 via NF-κB, atenuando o dano inflamatório e oxidativo[22]. Estudos relataram que EPA e DHA, ambos foram responsáveis pela ativação de proteína quinase p38MAPK que está relacionada a via de sinalização e ativação do fator de transcrição gênica Nrf2[87,88].

No presente estudos a EL enriquecida com OP apresentou nível maior de Nrf2 em comparação ao grupo TCL/TCM em ambos os períodos avaliados. É possível que EPA e DHA possam ter efeito sinérgico quando administrados conjuntamente, como parte do óleo de peixe, e promover proteção celular contra o dano oxidativo. Essa hipótese pode ser corroborada pelos achados de Sakai e cols[89]. Nesse estudo os pesquisadores demonstraram que EPA e DHA tiveram papel similar na superexpressão de mRNA e responsáveis pela síntese de moléculas de proteção antioxidante via ativação do fator de transcrição Nrf2.

6.9 - Do biomarcador de peroxidação lipídica F2 - Isoprostanos

O F2 isoprostano é um isômero semelhante à prostaglandina, quimicamente estável, gerado pela reação entre AGPI em fosfolipídios da membrana e radicais livres ou ERO. O F2-isoprostano é considerado marcador de peroxidação lipídica padrão ouro e identificado como excelente e sensível biomarcador de dano oxidativo lipídico *in vivo*. De fato, verificou-se que os F2-isoprostanos estão elevados em síndromes potencialmente associadas ao estresse oxidativo como, por exemplo, doenças hepáticas[90].

No presente estudo, identificamos F2 isoprostano em todos os grupos experimentais. As amostras de tecido hepático dos ratos do grupo TCL/TCM/OP apresentaram valores significativamente menores de F2

isoprostano em comparação ao grupo controle que recebeu TCL/TCM. Neste caso é importante considerar que a EL do grupo tratamento, possui reduzida concentração de TCL, somada a presença de TCM e adição de OP em sua formulação. É possível que a composição diferenciada dos AGPI nesta EL, possa ter contribuído para menor peroxidação lipídica no fígado dos ratos. Estes dados corroboram com os achados de Yeh e cols[91], que após 7 dias de infusão parenteral de AGPI ω-3, verificaram menor peroxidação lipídica no fígado de ratos.

AGPI podem conferir efeitos pro e/ou antioxidantes. Estes efeitos podem surgir dependendo do tipo e concentração de AGPI disponíveis e incorporados em camadas fosfolipídicas das membranas celulares. AGPI ω-6, em especial ARA, podem favorecer cenário mais pro-oxidante. Nesse contexto, Nunzio e cols[92] relataram elevadas taxas de peroxidação lipídica em cultura de células hepáticas suplementadas exclusivamente com ARA na concentração de 60μM por 21 horas.

Portanto o próprio ARA pode contribuir para produção exacerbada de EROs em células HepG2 através da ativação de NADPH oxidase e elevadas taxas de peroxidação lipídica[93]. Além disso, sabe-se que a produção aumentada dessas EROs pode estar relacionada a síntese de eicosanóides derivados do metabolismo do ARA, como por exemplo, PGH2, PGF2 e LTB4[92]. Por outro lado, é possível que os AGPI-ω3 ao competirem pela via da ciclo-oxigenase-2 e Nox-4 podem contribuir com menor produção de ERO's e consequentemente reduzir danos às membranas celulares e a produção de F2 isoprostanos[94].

Existem outros ensaios clínicos que avaliaram o efeito de diferentes EL's enriquecidas ou não com OP sobre peroxidação lipídica e níveis de F2 isoprostanos em flúidos biológicos. Webb e cols[95] estudaram o efeito da infusão parenteral EL's compostas por OO (ClinOleic®) ou OS (Intralipid®) em pacientes recém-nascidos internados em UTI. Os autores observaram que as duas EL's avaliadas foram bem toleradas pelos pacientes, e não identificaram alteração significativa nos níveis de F2 isoprostano após 5 dias de infusão.

Neste mesmo cenário, Deshpande e cols[96] também investigaram o efeito da infusão parenteral de EL composta por OO (ClinOleic®) ou OS (Intralipid®) em pacientes recém-nascidos pré-termo (<28 semanas). Os pesquisadores não observaram efeitos significativos sobre os níveis de F2 isoprostanos após 5 dias de infusão parenteral.

Ainda, Deshpande e cols[97] optaram por avaliar o efeito da infusão parenteral de EL enriquecida com OP sobre a peroxidação lipídica. Em estudo randomizado, pacientes recém-nascidos pré-termo (28-30 semanas) receberam por 7 dias infusão parenteral de diferentes EL's enriquecidas com OO (Clinoleic®) ou OP (SMOFlipid®). Desta vez, o grupo de pacientes que recebeu EL enriquecida com OP apresentou redução significativa nos níveis de F2 isoprostanos em comparação ao grupo OO.

Experimentalmente, Sun e cols[98] avaliaram o efeito de EL composta exclusivamente por OP (Omegaven®) em ratos expostos a lesão intestinal induzida por radiação. Os ratos tratados com EL composta por OP (15 ml/kg/dia) por 10 dias apresentaram menor peroxidação lipídica em comparação ao grupo salina.

Em nosso estudo, o grupo de ratos que recebeu a EL composta por TCL/TCM/OP apresentou menor peroxidação lipídica no tecido hepático em comparação ao grupo controle, TCL/TCM. É possível que a adição de OP na composição desta nova EL, possa ter contribuído para menor peroxidação lipídica no fígado dos ratos.

A nossa hipótese é que EPA e DHA, presente na formulação da EL do grupo tratamento, uma vez incorporados às camadas fosfolipídicas das células, possam atuar diretamente na inibição de vias COX2 e NOX4, responsáveis também, pela produção exacerbada de ERO's. Além disso, é importante considerar a concentração reduzida de ARA, importante mediador para síntese de F2 isoprostanos. Portanto a inibição da superexpressão destas importantes vias de sinalização celular, poderia contribuir diretamente para redução na disponibilidade de radicais livres no meio extracelular e favorecer ao ambiente menos oxidativo.

6.9.1 Das enzimas antioxidantes

Os biomarcadores de estresse oxidativo mais relevantes em pesquisa científica são aqueles relacionados a defesas antioxidantes, muito representados pelas enzimas antioxidantes GPx, CAT e SOD. Pesquisadores têm estudado os efeitos da infusão de AGPI ω-3 sobre esses biomarcadores de estresse oxidativo, com resultados conflitantes[99,100].

O mecanismo pelo qual o AGPI ω-3 poderia potencializar a ação de enzimas antioxidantes ainda não foi completamente elucidado, no entanto sabe-se que esses efeitos podem ocorrer pela ativação do fator de transcrição gênica Nrf2 conforme discutido por nós anteriormente.

No presente estudo, ao lado do fator de transcrição gência Nrf2, nós avaliamos em amostras de fígado dos ratos as enzimas GPx, CAT e SOD que constituem a primeira linha de defesa antioxidante contra as ERO's. Ao considerar que, o fígado é órgão central do metabolismo e principal alvo de radicais livres, a atuação crônica de ERO's pode ocasionar em danos hepáticos irreversíveis. A ação de enzimas antioxidantes, que atuam de forma conjunta e sinérgica, poderia promover mecanismos de defesa local contra esses agentes agressores[62].

Na presente investigação, nós investigamos o impacto da infusão parenteral de EL enriquecia com OP sobre as defesas antioxidantes no fígado dos ratos. Nossos resultados apontaram que, a infusão parenteral de TCL/TCM/OP por 48 ou 72 horas apresentou melhora significativa nas defesas antioxidantes representada pelas enzimas GPx, CAT e SOD.

De nota, os animais que receberam TCL/TCM apresentaram valores significativamente menores dessas enzimas antioxidantes, em consonância com os dados de Lespine e cols[37]. Os referidos autores relataram que a infusão parenteral de EL composta por OS (Ivelip®), foi capaz de reduzir a atividade das enzimas GPx, CAT e SOD no fígado de ratos[37].

Estudos clínicos e experimentais avaliaram o efeito de diferentes AGPI no combate ao estresse oxidativo. Wang e cols[67], em estudo randomizado com

156 crianças pré-termo que receberam por 14 dias infusão parenteral de fórmulas enriquecidas com OO (Clinileic®), OS (Intralipid®) ou OS/TCM (Lipofundin®), não observaram efeitos significativos sobre a peroxidação lipídica e ação das enzimas antioxidantes SOD e GPx.

Yildizdas e cols[99], em estudo randomizado com 67 pacientes pre-termo, avaliaram o efeito da infusão parenteral de fórmulas enriquecidas com OO (Clinoleic®) ou OP (SMOFlipid®) sobre estresse oxidativo. Neste estudo, os pesquisadores observaram que a infusão parenteral de OP não apresentou efeito significativos sobre as enzimas SOD e GPx. No entanto, o grupo que recebeu SMOFlipid®, apresentou menor peroxidação lipídica.

Baena-Gómez e cols[100], estudaram as principais alterações nos sistemas de defesa antioxidante em pacientes pediátricos após transplante de células hematopoiéticas. Os pacientes receberam infusão parenteral de EL composta por TCL (Intralipid®) ou TCL/TCM/OP (Lipoplus®) por 10 dias. Os autores relataram aumento significativo de alfa tocoferol no grupo que recebeu EL rica em OP, entretanto não foram observados efeitos positivos sobre a atividades das enzimas antioxidantes Gpx, CAT e SOD.

Com o objetivo de investigar o efeito da nutrição parenteral sobre o estresse oxidativo hepático em ratos, Bechynska e cols[86] analisaram o efeito da infusão de diferentes EL's no período de 12 dias. Os autores não observaram efeitos significativos sobre a peroxidação lipídica avaliada pela dosagem de MDA. No entanto, o grupo de ratos que recebeu a infusão de EL enriquecida com OP (mistura de Intralipid® e Omegaven®), apresentou aumento significativo na expressão dos genes Hmox-1, Nqo1, Gclc mRNA, além das NQO1 e GCLC *protein* diretamente relacionados com as defesas antioxidantes no fígado dos ratos[86].

Os resultados de Bechynska e cols[86], de forma parcial, estão em consonância com nossos resultados, pois nossos achados reforçam que EL's ricas em OP podem apresentar um potencial efeito protetor no combate ao estresse oxidativo no tecido hepático.

Por outro lado, resultados de diferentes estudos que investigaram o potencial efeito antioxidante do AGPI ω-3 ainda são controversos, com ações benéficas, neutras ou até negativas, dependendo do biomarcador de estresse oxidativo medido. Os autores que observaram efeito benéfico no estresse oxidativo sugeriram que o efeito poderia estar relacionado às propriedades imuno-moduladoras e anti-inflamatórias dos AGPI ω-3 e à sua capacidade de atuar com fatores de transcrição gênica e aumentar as enzimas antioxidantes, o que poderia contribuir para reduzir a geração de ERO e outros agentes de estresse oxidativo.

No entanto, a heterogeneidade dos pacientes nos estudos randomizados, as diferenças na duração do tratamento, doses e métodos para avaliar o estresse oxidativo dificultam o entendimento sobre o potencial efeito do AGPI-ω3 na redução do estresse oxidativo.

6.9.2 – Das diretrizes de terapia nutricional e estudos de meta-análises

Em pacientes graves a resposta à doença crítica inclui alterações no padrão metabólico para utilização de substratos energéticos. Em situação de estresse agudo/crônico, os lipídios constituem fonte importante de energia, principalmente para células hepáticas e músculo esquelético. Além de servirem como fonte de energia e componentes das estruturas celulares, os lipídios podem modular respostas em processos inflamatórios, oxidativos e contribuir para desfechos clínicos positivos em terapia intensiva[101].

Com o objetivo de evitar a deficiência de ácidos graxos essências como linoleico e alfa-linolênico, a diretriz americana de terapia nutricional, ASPEN, recomenda a infusão máxima de 2,5g/kg/dia de emulsão lipídica como componente da solução de nutrição parenteral para pacientes adultos[102]. A sociedade europeia, ESPEN, sugere o intervalo entre 1 – 1,5 g/kg/dia de gorduras, de acordo com as fases da doença crítica. A diretriz da ESPEN complementa que a prescrição de emulsões lipídica parenterais enriquecidas com EPA e DHA (0,1 – 0,2 g/kg/dia de OP) pode ser considerada em pacientes com necessidade de cuidados intensivos[103].

A diretriz brasileira de terapia nutricional proposta pela BRASPEN[39] segue as mesmas recomendações publicadas pelo *ESPEN expert group - Lipids in the Intensive Care*[104]. A BRASPEN recomenda que emulsões lipídicas devam ser parte integral em fórmulas de nutrição parenteral e infundidas de forma contínua em pacientes críticos. Para composição da fórmula, é recomendada quantidade reduzida de AGPI ω-6, que pode ser balanceada através da adição de diferentes EL's, como OO, TCM e OP[39,104].

Os efeitos benéficos da mistura de diferentes EL's em nutrição parenteral foram verificados por meio de estudos experimentais e clínicos. Grau-Carmona e cols[105] em estudo multicêntrico, prospectivo, randomizado e duplo cego em pacientes críticos, verificaram redução significativa nas taxas de infecção no grupo de pacientes que recebeu a infusão de EL composta por TCL/TCM/OP em comparação ao grupo TCL/TCM.

Estudos meta analíticos também avaliaram o efeito da infusão parenteral de EL's tradicionais em comparação com novas EL's que foram ou não enriquecidas com OP. Entre os estudos analisados, foi observado que a administração de OP revelou-se benéfica quanto ao tempo de ventilação mecânica e morbidade em pacientes sépticos[42,106-110].

Em estudo de revisão Kreymann e cols[111] encontraram melhora significativa em taxas de infecção em pacientes cirúrgicos graves que receberam a infusão de EL enriquecida de OP em comparação com outros tipos de EL's compostas por TCL ou TCL/TCM. No entanto, muitos estudos apresentaram baixa qualidade metodológica.

Em consonância com recomendações de diretrizes nacionais e internacionais de terapia nutricional, a prescrição de emulsões lipídicas parenterais enriquecida com OP tem sido prática clínica em pacientes graves[39,103,104]. No entanto, a potencial contribuição do OP sobre os processos inflamatórios, função imunológica, defesas antioxidantes no desfecho clínico de pacientes graves necessita ser mais explorado. Há poucos estudos de alta

qualidade metodológica registrados na literatura e os que estão disponíveis, em algumas situações, apresentam resultados mais conflitantes[112].

Em pacientes graves que receberam OP existem estudos que encontraram redução em processos inflamatórios e oxidativos, melhora em variáveis de ventilação mecânica e menor tempo de internação. No entanto, estudos meta analíticos ainda não nos fornecem uma imagem clara do impacto da infusão parenteral de OP em pacientes críticos. O fator limitante destes estudos realizados até o momento é o pequeno número de pacientes e a qualidade não uniforme da metodologia aplicada[112].

7. Conclusões

7 – CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo em que ratos Lewis foram submetidos à infusão parenteral de EL composta por TCL/TCM ou TCL/TCM/OP nos períodos de 48 ou 72 horas, pode - se concluir que:

1. A infusão parenteral de EL composta por TCL/TCM/OP está associada a menor peroxidação lipídica no tecido hepático em comparação ao grupo que recebeu TCL/TCM em ambos os períodos;
2. Os maiores níveis do fator de transcrição Nrf2 e de enzimas antioxidantes Gpx, CAT e SOD identificados nos animais sob infusão parenteral de EL composta por TCL/TCM/OP, sugerem potencial antioxidante do óleo de peixe.
3. EL enriquecida com OP pode conferir menor peroxidação lipídica e contribuir no combate ao estresse oxidativo no fígado de ratos.

8. Referências

8 - REFERÊNCIAS

1. Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1995, 35, 7.
2. Pagano G, Korkina LG, Brunk UT, Chessa L, Degan P, Del Principe D, Kelly FJ, Malorni W, Pallardó F, Pasquier C, Scovassi I, Zaterralle A, Franceschi C, Medical Hypothesis 1998, 51, 253.
3. Wiseman HJ. Dietary influences on membranefunction: Importance in protection againstoxidative damage and disease. Nutr. Biochem. 1996;7:2-15
4. Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Quim. Nova. 2006, 29, 113-123
5. Wood LG, Gibson PG, GARG ML. Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma. Eur Respir J 2003, 21, 177-186
6. Younossi Z, Diehl AM, Ong JP. Nonalcoholic fatty liver disease: An agenda for clinical research. Hepatology2002;35:746–52.
7. Reddy JK. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis III. Peroxisomal-oxidation, PPAR and steatohepatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001;281:1333–9.
8. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? Free Radic Biol Med. 2010;49:1603–16)
9. Calder PC, Deckelbaum RJ. Dietary lipids: more than just a source of calories, Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.1999;2:105-7.
10. Waitzberg DL, Torrinhas RS. Fish oil lipid emulsions and immune response: what clinicians need to know. Nutr Clin Pract. 2009;24:487-99
11. Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. Biochim Biophys Acta. 2015;1851:469-84.
12. Dalli J, Ramon S, Norris PC, Colas RA, Serhan CN. Novel proresolving and tissue-regenerative resolvin and protectin sulfido-conjugated pathways. FASEB J. 2015;29:2120-36.

13. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature. 2008; 454:428–35.
14. 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.
15. 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..
16. 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.
17. 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.
18. Wanten GJ. Parenteral lipids: safety aspects and toxicity. World Rev Nutr Diet. 2015;112:63-70.
19. Zanatta AL, Miranda DTSZ, Dias BCL, Campos RM, Massaro MC, Michelotto PV, West AL, Miles EA, Calder PC, Nishiyama A. Fish Oil Supplementation Decreases Oxidative Stress but Does Not Affect Platelet-Activating Factor Bioactivity in Lungs of Asthmatic Rats. Lipids 2014;49:665–75.
20. Saada HN, Said UZ, Mahdy EME, Elmezayen HE, Shedid SM. Fish oil omega-3 fatty acids reduce the severity of radiation-induced oxidative stress in the rat brain. Int J Rad Biol. 2014;90:1179–83.
21. Palanisamy K, Krishnaswamy R, Paramasivan P, Chih-Yang H, Vishwanadha VP. Eicosapentaenoic acid prevents TCDD-induced oxidative stress and inflammatory response by modulating MAP kinases and redox-sensitive transcription factors. Br J Pharmacol. 2015 Oct;172(19):4726-40.

22. Ishikado A, Morino K, Nishio Y, Nakagawa F, Mukose A, et al. 4-Hydroxy hexenal derived from docosahexaenoic acid protects endothelial cells via Nrf2 activation. PLoS One. 2013 Jul 23;8(7):e69415.
23. Casañas-Sánchez V, Pérez JA, Fabelo N, Herrera-Herrera AV, Fernández C, Marín R, González-Montelongo MC, Díaz M. Addition of docosahexaenoic acid, but not arachidonic acid, activates glutathione and thioredoxin antioxidant systems in murine hippocampal HT22 cells: potential implications in neuroprotection. J Neurochem. 2014;131:470-83.
24. Rahman M, Kundu JK, Shin JW, Na HK, Surh YJ. Docosahexaenoic acid inhibits UVB-induced activation of NF-κB and expression of COX-2 and NOX-4 in HR-1 hairless mouse skin by blocking MSK1 signaling. PLoS One. 2011;6:e28065.
25. Casañas-Sánchez V, Pérez JA, Fabelo N, Quinto-Alemany D, Díaz ML. Docosahexaenoic (DHA) modulates phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase (Gpx4) gene expression to ensure self-protection from oxidative damage in hippocampal cells. Front Physiol. 2015 Jul 22;6:203.
26. Orman MA, Berthiaume F, Androulakis IP, Ierapetritou MG. Pathway analysis of liver metabolism under stressed condition. Journal of Theoretical Biology, 272:131–140, 2011.
27. Girard J, Lafontan M. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism and insulin resistance. Part II: Visceral adipose tissue production and liver metabolism. Diabetes & Metabolism, 34:439– 445, 2008.
28. Tessari P, Coracina A, Cosma A, Tiengo A. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases, 19:291-302, 2009.
29. Okorie ON, Dellinger P. Lactate: biomarker and potential therapeutic target. Critical Care Clinics, 27(2):299-326, 2011.

30. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. J Clin Invest. 2004 Dec;114(12):1752-61.
31. Nandivada P, Fell GL, Pan AH et al. Parenteral Soybean Oil Induces Hepatosteatosis Despite Addition of Fish Oil in a Mouse Model of Intestinal Failure-Associated Liver Disease. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2017 Feb 1:148607117695249.
32. Oliveira Filho RS, Vianna SN, Almeida MMFA, Trevisani VS, Cardenas TC. Quality Indicators in Nutrition Therapy: Results at an Oncology Reference Hospital in São Paulo – Brazil. Clin Nutr 2014; 33:59.
33. Oliveiro Filho RS, Tamburrino AC, Trevisani VS, Rosa VM. Main Barriers in Control of Energy-Protein Deficit in Critical Oncologic Patient at Nutritional Risk. J Integr Oncol 2016; 5:156.
34. Singer P, Blaser AR, Beger MM, et al., ESPEN guideline on clinical nutrition in the intensive care unit. Clin Nutr. 2019 Feb;38(1):48-79.
35. Waitzberg DL, Torrinhas RS. The complexity of prescribing intravenous lipid emulsions. World Rev Nutr Diet. 2015;112:150-62.
36. Waitzberg DL, Torrinhas RS, Jacintho TM. New parenteral lipid emulsions for clinical use. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2006;30:351-67.
37. Lespine A, Fernandez Y, Periquet B, Galinier A, Garcia J, Anglade F, Ghisolfi J, Thouvenot JP. Total Parenteral Nutrition Decreases Liver Oxidative Metabolism and Antioxidant Defenses in Healthy Rats:Comparative Effect of Dietary Olive and Soybean Oil. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition 25:52-59, 2001.
38. Waitzberg DL, Torrinhas RS, Jacintho TM. New parenteral lipid emulsions for clinical use. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2006;30:351-67.
39. Castro, M. G. et al. Diretriz Brasileira de Terapia Nutricional no Paciente Grave. BRASPEN J 2018; 33 (Supl 1):2-36.
40. McClave SA, Taylor BE, Martindale RG, Warren MM, Johnson DR, Braunschweig C, McCarthy MS, Davanos E, Rice TW, Cresci GA, Gervasio JM, Sacks GS, Roberts PR, Compher C. Guidelines for the

provision and assessment of nutrition support therapy in the adult critically ill patient: Society of Critical Care Medicine (SCCM) and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.). JPEN J Parenter Enteral Nutr 2016;40:159-211.

41. Singer P, Blaser AR, Berger MM, Alhazzani W, Calder PC, Casaer M, et al. ESPEN guideline on clinical nutrition in the intensive care unit. Clin Nutr. 2018.
42. Pradelli L, Mayer K, Klek S, Alsaleh AJO, RAC Clark, MD Rosenthal, AR Heller, M Muscaritoli. ω-3 Fatty-Acid Enriched Parenteral Nutrition in Hospitalized Patients: Systematic Review With Meta-Analysis and Trial Sequential Analysis. JPEN J 2020;44(1):44-57.
43. Oliveira Filho RS, Garla PC, Torrinhas RSMDM, et al. Effect of Isolated or Combined Parenteral Infusion of Fish Oil Emulsion and Glutamine on the Tissue Antioxidant Potential of Rats Submitted to Acute Pancreatitis Model. Clin Nutr. 2017; 36:164.
44. Oliveira Filho RS, Garla PC, Torrinhas RSMDM, et al. Comment on: Influence of an omega 3-fatty acid-enriched enteral diet with and without added glutamine on the metabolic response to injury in a rat model of prolonged acute catabolism. Nutrition,2018; 50;107-108, 2018.
45. Morais, AT. Dinâmica da incorporação plasmática, leucocitária e hepática de ácidos graxos poli-insaturados após infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas contendo óleo de peixe. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2018.
46. Neves, Silvânia M. P. Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. Silvânia M. P. Neves [et al.]. São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013.
47. Yamaguchi N, Lima-Goncalves 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(3):115-22.
48. Galizia MS, Alves CC, Tamanaha EM, Torrinhas RS, Leite FC, Neto AH, et al. A new swivel model for parenteral and enteral infusion in rats. J Surg Res. 2005;128(1):3.

49. Sala-Vila A, Folkes J, Calder PC. The effect of three lipid emulsions differing in fatty acid composition on growth, apoptosis and cell cycle arrest in the HT-29 colorectal cancer cell line. Clin Nutr. 2010 Aug;29(4):519-24
50. Iverson SJ, Lang SL, Cooper MH. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. Lipids. 2001;36(11):1283-7.
51. COBEA - Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação em Animais. Manual para Técnicos em Bioterismo. 2a edição, São Paulo;1996.
52. Shaw R, Festing MF, Peers I, Furlong L. Use of factorial designs to optimize animal experiments and reduce animal use. ILAR J. 2002;43(4):223-32.
53. Feng J, Fitz Y, Li Y, Fernandez M, Cortes IC, Wang D, Pazniokas S, Bucher B, Cui X, Solomon SB. Catheterization of the Carotid Artery and Jugular Vein to Perform Hemodynamic Measures, Infusions and Blood Sampling in a Conscious Rat Model. J. Vis. Exp. 2015;(95),e51881.
54. Campos FG, Waitzberg DL, Habr-Gama A, Logullo AF, Noronha IL, Jancar S, et al. Impact of parenteral n-3 fatty acids on experimental acute colitis. Br J Nutr. 2002;87(S1):S83-8.
55. Garla P, Garib R, Torrinhas RS, Machado MC, Calder PC, Waitzberg DL. Effect of parenteral infusion of fish oil-based lipid emulsion on systemic inflammatory cytokines and lung eicosanoid levels in experimental acute pancreatitis. Clin Nutr. 2017 Feb;36(1):302-308.
56. Manual da equipe multidisciplinar de terapia nutricional (EMTN) do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo – HU/USP / Lúcia Caruso e Altamir Benedito de Sousa (organizadores) ; Altamir Benedito de Sousa et al. – São Paulo: Hospital Universitário da Universidade de São Paulo; São Carlos, Editora Cubo, 2014.
57. Xu Z, Sun Y. The Role of Parenteral Lipids in the Development of Hepatic Dysfunction and Hepatic Steatosis in a Mouse Model of Total Parenteral Nutrition. J Nutr Sci Vitaminol 2019 65, 24–30, 2019.

58. Li Y, Zhao F, Wu Q et al. Fish oil diet may reduce inflammatory levels in the liver of middle-aged rats. Sci Rep. 2017 Jul 24;7(1):624.1.
59. Yigit IP, Celiker H, Dogukan A, Ilhan N, Gurel A, Ulu R, Aygen B. Can Serum NGAL Levels Be Used as an Inflammation Marker on Hemodialysis Patients With Permanent Catheter? Ren Fail. 2015 Feb;37(1):77-82.
60. Arends J, Bachmann P, Baracos V et al. ESPEN guidelines on nutrition in cancer patients. Clin Nutri 2017;36;11-48
61. Santos JF, Amaral MS, Oliveira SL, Barbosa JP, Cabral-Jr CR, Melo IS, Bueno NB, Freitas JD, Sant'ana AG, Ataíde TR. Dietary intake of AIN-93 standard diet induces fatty liver with altered hepatic fatty acid profile in Wistar rats. Nutr Hosp. 2015;31(5):2140-2146.
62. Sanchez-Valle V, Chavez-Tapia NC, Uribe M, Mendez-Sanchez N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. Curr Med Chem. 2012:19:4850–4860.
63. 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(3):263-70.
64. Rose DP, Connolly, JM. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. Pharmacol. Ther., New York, v.83, p.217-244, 1999.
65. Teitelbaum JE, Walker, WA. Review: The role of omega 3 fatty acids in intestinal inflamation J. Nutr. Biochem., New York, v.12, p.21-32, 2001.
66. Macia-Botejara E, Morán-Penco JM, Espín-Jaime MT et al. Brain lipid composition in rabbits after total parenteral nutrition with two different lipid emulsions. Nutrition 2013 313–317.
67. Wang Y, Feng Y, Lu LN, .The effects of different lipid emulsions on the lipid profile, fatty acid composition, and antioxidantcapacity of preterm infants: A double-blind, randomized clinical trial. Clin Nutr. 2016 Oct;35(5):1023-31
68. Lemaitre D, Véricel E, Polette A, Lagarde M. Effects of fatty acids on human platelet glutathione peroxidase: possible role of oxidative stress. Biochem Pharmacol. 1997 Feb 21;53(4):479-86.

69. Cicero AF, Nascetti S, López-Sabater MC, et al. Changes in LDL fatty acid composition as a response to olive oil treatment are inversely related to lipid oxidative damage: the EUROLIVE study. J Am College Nutr, v. 27, n. 2, p. 314-20, 2008.
70. Tsartsou E, Proutsos N, Castanas E, et al. Network Meta-Analysis of Metabolic Effects of Olive-Oil in Humans Shows the Importance of Olive Oil Consumption With Moderate Polyphenol Levels as Part of the Mediterranean Diet. Front Nutr. 2019;6:6.Feb 12.
71. Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Essential fatty acids the brain: possible health implications. Int J Dev Neurosci. 2000;18(4-5):383-99.
72. Roche LD, Medina EA, Pérez AF, et al. Lipofundin induced hyperlipidemia promotes oxidative stress and atherosclerotic lesi ons in newzealand white rabbits. Int J Vasc Med. 2012;2012:898769.
73. El Kasmi KC, Anderson AL, Devereaux MW, Vue PM, Zhang W, Setchell D, et al. Phytosterols promote liver injury and Kupffer cell activation in parenteral nutrition-associated liver disease. Sci Transl Med 2013;5:206ra137.
74. D'Ascenzo R, D'Egidio S, Angelini L. Parenteral nutrition of preterm infants with a lipid emulsion containing 10% fish oil: effect on plasma lipids and long-chain polyunsaturated fatty acids. J Pediatr. 2011 Jul;159(1):33-38.e1
75. Parks EJ. Dietary carbohydrate's effects on lipogenesis and the relationship of lipogenesis to blood insulin and glucose concentrations. Br J Nutr 2002;87(suppl 2):S247-53.
76. Leonard AE, Pereira SL, Sprecher H, Huang YS. Elongation of long-chain fatty acids. Prog Lipid Res. 2004; 43(1):36-54.
77. Calder PC, Deckelbaum RJ. Dietary lipids: more than just a source of calories, Curr Opin Clin Nutr Metab Care.1999;2:105-7.
78. Baker MA, Cho BS, Anez-Bustillos L et al.Fish oil-based injectable lipid emulsions containing medium-chain triglycerides or added α-tocopherol offer anti-inflammatory benefits in a murine model of parenteral nutrition-induced liverinjury. Am J Clin Nutr. 2019 Mar 18. pii:nqy370.

79. Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. Free Radic Biol Med. 2009;47(9):1304-9.
80. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. Trends Biochem Sci. 2014;39(4):199- 218
81. Huang Y, Li W, Su ZY, Kong AN. The complexity of the Nrf2 pathway: beyond the antioxidant response. J Nutr Biochem. 2015;26(12):1401- 13.
82. Sihvola V, Levonen AL. Keap1 as the redox sensor of the antioxidant response. Arch Biochem Biophys. 2017;617:94-100.
83. Lee JM, Li J, Johnson DA, Stein TD, Kraft AD, Calkins MJ, et al. Nrf2, a multi-organ protector? FASEB J. 2005;19(9):1061-6.
84. Chan K, Han XD, Kan YW. An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Apr 10;98(8):4611-6.
85. Enomoto A, Itoh K, Nagayoshi E, Haruta J, Kimura T, O'Connor T, Harada T, Yamamoto M. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity a ssociated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. Toxicol Sci. 2001 Jan;59(1):169-77
86. Bechynska K, Daskova N, Vrzackova N et al. The effect of ω-3 polyunsaturated fatty acids onthe liver lipidome, proteome and bile acid profile: parenteral versus enteral administration. Sci Rep. 2019 Dec 13;9(1):19097.
87. Zgórzyńska E, Dziedzic B , Gorzkiewicz A et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve the antioxidative defense in rat astrocytes via an Nrf2-dependent mechanism. Pharmacol Rep. 2017 Oct;69(5):935-942.
88. Park EJ, Kim YM, Park SW, Kim HJ, Lee JH, Lee DU, et al. Induction of HO-1 through p38 MAPK/Nrf2 signaling pathway by ethanol extract of Inula helenium L: reduces inflammation in LPS-activated RAW264.7 cells and CLP-induced septic mice. Food Chem Toxicol 2013;55:386–95.

89. Sakai C, Ishida M, Ohba H, Yamashita H, Uchida H, Yoshizumi M, et al. Fish oil omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate oxidative stress-induced DNA damage in vascular endothelial cells. PLoS ONE. 2017 12(11): e0187934.
90. Kelley, N.S.; Yoshida, Y.; Erickson, K.L. Do n-3 polyunsaturated fatty acids increase or decrease lipid peroxidation in humans? Metab. Syndr. Relat. Disord. 2014, 12, 403–415.
91. Yeh SL, Chang KY, Huang PC, Chen WJ. Effects of n-3 and n-6 fatty acids on plasma eicosanoids and liver antioxidant enzymes in rats receiving total parenteral nutrition. Nutrition. 1997 Jan;13(1):32-6.
92. Di Nunzio M, Valli V, Bordoni A. Pro- and anti-oxidant effects of polyunsaturated fatty acid supplementation in HepG2 cells. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2011 Sep-Oct;85(3-4):121-7.
93. YS Lee, Arachidonic acid activates K–Cl-cotransport in HepG2 human hepatoblastoma cells, Korean J. Physiol. Pharmacol. 13 (2009) 401–408.
94. Giordano E, Visioli F. Long-chain omega 3 fatty acids: molecular bases of potential antioxidant actions. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2014 Jan;90(1):1-4.
95. Webb AN, Hardy P, Peterkin M, Lee O, Shalley H, Croft KD, Mori TA, Heine RG, Bines JE. Tolerability and safety of olive oil-based lipid emulsion in critically ill neonates: a blinded randomized trial. Nutrition; 2008;(24);1057–1064.
96. Deshpande GC, Simmer K, Mori T, Croft K. Parenteral lipid emulsions based on olive oil compared with soybean oil i n preterm (<28 weeks' gestation) neonates: randomised controlled trial. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2009 Nov;49(5):619-25.
97. Deshpande G, Simmer K, Deshmukh M, Mori TA, Croft KD, Kristensen J. Fish Oil (SMOFlipid) and olive oil lipid (Clinoleic) in very preterm neonates. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2014 Feb;58(2):177-82.

98. Sun M, Pang L, Ju X, Sun H, Yu J, Zhao H, Yao W, Wei M. Attenuating effects of omega-3 fatty acids (Omegaven) on irradiation-induced intestinal injury in mice. Food Chem Toxicol. 2014 Feb;64:275-80.

99. Yildizdas HY, Poyraz B, Atli G, Sertdemir Y, Mert K, Ozlu F, Satar M Effects of two different lipid emulsions on antioxidant status, lipid peroxid ation and parenteral nutrition- related cholestasis in premature babies, a randomized-controlled study. Pediatr Neonatol. 2019 Aug;60(4):359-367.

100. Baena-Gómez MA, Aguilar MJ, Mesa MD, Navero JL, Gil-Campos M. Changes in Antioxidant Defense System Using Different Lipid Emulsions in Parenteral Nutrition in Children after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Nutrients. 2015 Aug 28;7(9):7242-55.

101. Elke G, Hartl WH, Kreymann KG, et al. Clinical Nutrition in Critical Care Medicine - Guideline of the German Society for Nutritional Medicine (DGEM). Clin Nutr ESPEN. 2019 Oct;33:220-275.

102. Mirtallo J, Canada T, Johnson D, et al. Safe practices for parenteral nutrition. JPEN. 2004;28:S39e70.

103. Singer P, Blaser AR, Berger MM ESPEN guideline on clinical nutrition in the intensive care unit. Clin Nutr. 2019 Feb;38(1):48-79.

104. Calder PC, Adolph M, Deutz NE, et al. Lipids in the intensive care unit: recommendations from the ESPEN expert group. Clin Nutr 2018;37:1e18.

105. Grau-Carmona T, Bonet-Saris A, García-de-Lorenzo A, Sanchez-Alvarez C, Rodríguez-Pozo A, Acosta-Escribano J, et al. Influence of n-3 polyunsaturated fatty acids enriched lipid emulsions on nosocomial infections and clinical outcomes in critically ill patients: ICU lipids study. Crit Care Med 2015;43(1):31e9.

106. Barbosa V, Miles E, Calhau C, Lafuente E, Calder P. Effects of a fish oil containing lipid emulsion on plasma phospholipid fatty acids, inflammatory markers, and clinical outcomes in septic patients: a

randomized, controlled clinical trial. Crit Care (London, England) 2010;vol. 14:R5.

107. Mayer K, Gokorsch S, Fegbeutel C, Hattar K, Rosseau S, Walmrath D, et al. Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis. Am J Respir Crit Care Med 2003;167:1321e8.

108. Lu C, Sharma S, McIntyre L, Rhodes A, Evans L, Almenawer S, et al. Omega-3 supplementation in patients with sepsis: a systematic review and metaanalysis of randomized trials. Ann Intensive Care 2017;7:58.

109. Manzanares W, Langlois PL, Dhaliwal R, Lemieux M, Heyland DK. Intravenous fish oil lipid emulsions in critically ill patients: an updated systematic review and meta-analysis. Crit Care 2015;19:167

110. Tao W, Li PS, Shen Z, Shu YS, Liu S. Effects of omega-3 fatty acid nutrition on mortality in septic patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. BMC Anesthesiol 2016;16:39

111. Kreymann KG, Heyland DK, de Heer G, Elke G. Intravenous fish oil in critically ill and surgical patients e historical remarks and critical appraisal. Clin Nutr 2017;37:1075e81.

112. Calder PC. Intravenous Lipid Emulsions to Deliver Bioactive Omega-3 Fatty Acids for Improved Patient Outcomes. Mar Drugs. 2019 May 8;17(5);E274.

9. Anexos

9 - ANEXOS

9.1 - Anexo A – Aprovação CEUA.

MEDICINA USP

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada **"Impacto da infusão parenteral de emulsão lipídica contendo óleo de peixe sobre o estresse oxidativo tecidual de ratos submetidos à endotoxemia"**, registrada com o nº **025/17**, sob a responsabilidade de **Dan Linetzky Waitzberg** e **Ronaldo Sousa Oliveira Filho,** apresentada pelo Departamento de Gastroenterologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 08.03.17

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 28-02-2017 Término: 28-02-2019
Espécie/linhagem/raça	Rato Lewis
Nº de animais	**50**
Peso/Idade	08 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério CEMIB

CEUA-FMUSP, 08 de Março de 2017

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

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br

9.2 - Anexo B **-** Composição de ácidos graxos da ração AIN-93M ofertada aos animais durante o período experimental.

CBO Análises Laboratoriais

Relatório de Ensaio

Número: **016.041.999/00**

Cliente:	**FUND. FACULDADE DE MEDICINA**		
Contato:	Alweyd Tesser		
Endereço:	AV. REBOUÇAS	CIDADE:	SÃO PAULO / SP
Origem da Amostra:	RHOSTER INDUSTRIA E COMÉRCIO LTDA		
Contato:	Teresa Barreto		
Endereço:		CIDADE:	ARAÇOIABA DA SERRA / SP
Amostra:	DIETA PADRÃO AIN-93M	Controle:	
Fornecedor:	RHOSTER IND. E COM. LTDA.	NF:	
Fabricante:		Quantidade:	
Lote:	5050/16 Data Fabricação: 27/06/2016	Data Validade:	27/09/2016

Data da Coleta	Data Envio	Data Recebimento	Data Início:	Data Liberação
		21/10/2016	24/10/2016	16/11/2016

ANÁLISES	RESULTADOS		ESPECIFICAÇÃO Mínimo	Máximo	Método
Ácido Butírico (C4:0)	**0,01**	**%**			MA-006
Ácido Capróico (C6:0)	**0,03**	**%**			MA-006
Ácido Caprílico (C8:0)	**0,04**	**%**			MA-006
Ácido Cáprico (C10:0)	**0,01**	**%**			MA-006
Ácido Undecanóico (C11:0)	**NÃO DETECTADO**	**%**			MA-006
Ácido Láurico (C12:0)	**0,01**	**%**			MA-006
Ácido Tridecanóico (C13:0)	**NÃO DETECTADO**	**%**			MA-006
Ácido Miristico (C14:0)	**0,01**	**%**			MA-006
Ácido Miristoleico (C14:1)	**0,00**	**%**			MA-006
Ácido Pentadecanóico (C15:0)	**0,00**	**%**			MA-006
Ácido 10-Pentadecenóico (C15:1)	**0,00**	**%**			MA-006
Ácido Palmítico (C16:0)	**0,59**	**%**			MA-006
Ácido Palmitoleico (C16:1)	**0,01**	**%**			MA-006
Ácido Margárico (C17:0)	**0,01**	**%**			MA-006
Ácido cis-10-Ácido Heptadecenóico (C17:1)	**NÃO DETECTADO**	**%**			MA-006
Ácido Esteárico (C18:0)	**0,21**	**%**			MA-006
Ácido Elaidico (C18:1n9t)	**0,00**	**%**			MA-006
Ácido Oleico (C18:1n9c)	**1,14**	**%**			MA-006
Ácido Linolelaidico (C18:2n6t)	**NÃO DETECTADO**	**%**			MA-006
Ácido Linoleico (C18:2n6c)	**1,02**	**%**			MA-006
Ácido Gama-Linolênico GLA (C18:3n6)	**NÃO DETECTADO**	**%**			MA-006
Ácido Alfa Linolenico LNA (C18:3n3)	**0,05**	**%**			MA-006
Ácido Araquídico (C20:0)	**0,02**	**%**			MA-006
Ácido Cis-11-Eicosenóico (C20:1n9)	**0,01**	**%**			MA-006
Ácido Heneicosanóico (C21:0)	**0,00**	**%**			MA-006

Responsável Técnico: Oneida Vieira - CRQ IV 04219427

Os resultados deste relatório de ensaio referem-se somente à amostra enviada. O relatório de ensaio só pode ser reproduzido por completo. A amostragem é de responsabilidade do cliente. Os campos em branco não foram informados. R=Repetição.

Rua Waldemar José Strazzacappa, 272 - Jardim Indianápolis - Campinas / SP - CEP 13050-215
Fone/Fax: (19) 3229-8886 e-mail: suporte@cboanalise.com.br - site: www.cboanalise.com.br

Versão: 1 Pag:1/3

WinLabs - www.domit.com.br

CBO Análises Laboratoriais

Relatório de Ensaio

Número: 016.041.999/00

Cliente:	FUND. FACULDADE DE MEDICINA		
Contato:	Alweyd Tesser		
Endereço:	AV. REBOUÇAS	CIDADE:	SÃO PAULO / SP
Origem da Amostra:	RHOSTER INDUSTRIA E COMÉRCIO LTDA		
Contato:	Teresa Barreto		
Endereço:		CIDADE:	ARAÇOIABA DA SERRA / SP
Amostra:	DIETA PADRÃO AIN-93M	Controle:	
Fornecedor:	RHOSTER IND. E COM. LTDA.	NF:	
Fabricante:		Quantidade:	
Lote:	5050/16 Data Fabricação: 27/06/2016	Data Validade:	27/09/2016

Data da Coleta	Data Envio	Data Recebimento	Data Início:	Data Liberação
		21/10/2016	24/10/2016	16/11/2016

ANÁLISES	RESULTADOS		ESPECIFICAÇÃO Mínimo	Máximo	Método
Ácido cis-11,14- Eicosadienóico (C20:2)	**NÃO DETECTADO**	%			MA-006
Ácido cis-8,11,14-Eicosatrienóico (C20:3n6)	**NÃO DETECTADO**	%			MA-006
Ácido Araquidonico AA (C20:4n6)	**NÃO DETECTADO**	%			MA-006
Ácido cis-11,14,17-Eicosatrienóico	**NÃO DETECTADO**	%			MA-006
Ácido Behenico (C22:0)	**0,04**	%			MA-006
Ácido Erúcico (C22:1n9)	**NÃO DETECTADO**	%			MA-006
Ácido 5,8,11,14,17- EPA (C20:5n3)	**NÃO DETECTADO**	%			MA-006
Ácido Tricosanóico (C23:0)	**0,01**	%			MA-006
Ácido cis-13,16-Docosadienóico (C22:2)	**NÃO DETECTADO**	%			MA-006
Ácido Lignocérico (C24:0)	**0,02**	%			MA-006
Ácido Nervonico (C24:1n9)	**NÃO DETECTADO**	%			MA-006
Ácido Docosahexaenóico DHA(C22:6n3)	**NÃO DETECTADO**	%			MA-006
Gordura Monoinsaturada	**1,16**	%			MA-006
Gordura Poli-insaturada	**1,07**	%			MA-006
Gorduras Insaturadas	**2,23**	%			MA-006
Gorduras Saturadas	**1,00**	%			MA-006
Gorduras Trans	**0,00**	%			MA-006
Ômega 3	**0,05**	%			MA-006
Ômega 6	**1,02**	%			MA-006
Ômega 9	**1,15**	%			MA-006
Extrato Etéreo	**3,23**	%			

Comentários:

Cliente:

Responsável Técnico: Oneida Vieira - CRQ IV 04219427

Os resultados deste relatório de ensaio referem-se somente à amostra enviada. O relatório de ensaio só pode ser reproduzido por completo. A amostragem é de responsabilidade do cliente. Os campos em branco não foram informados. R=Repetição.

Rua Waldemar José Strazzacappa, 272 - Jardim Indianápolis - Campinas / SP - CEP 13050-215
Fone/Fax: (19) 3229-8886 e-mail: suporte@cboanalise.com.br - site: www.cboanalise.com.br

WinLabs - www.domit.com.br

CBO Análises Laboratoriais

Relatório de Ensaio

Número: **016.041.999/00**

Cliente:	**FUND. FACULDADE DE MEDICINA**		
Contato:	Alweyd Tesser		
Endereço:	AV. REBOUÇAS	CIDADE:	SÃO PAULO / SP

RH19521s
Peso Liq.:200g

MÉTODO:

MA-006	Rev.0	CG- ASSOCIATIONS OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analyses of A.O.A.C. International,18th ed, 2005, 2nd revision 2007.

Campinas,quinta-feira, 17 de novembro de 2016

Enédina S. Altomani

Responsável pela Liberação
Enédina S. Altomani
CRQ IV 04417378

Responsável Técnico: Oneida Vieira - CRQ IV 04219427

Os resultados deste relatório de ensaio referem-se somente à amostra enviada. O relatório de ensaio só pode ser reproduzido por completo. A amostragem é de responsabilidade do cliente. Os campos em branco não foram informados. R=Repetição.

Rua Waldemar José Strazzacappa, 272 - Jardim Indianópolis - Campinas / SP - CEP 13050-215
Fone/Fax: (19) 3229-8886 e-mail: suporte@cboanalise.com.br - site: www.cboanalise.com.br

WinLabs - www.domit.com.br

9.3 - Anexo C – Resumo apresentado no 39th ESPEN *Congress* 2017 na Holanda e publicado *Clinical Nutrition Supplement.*

ELSEVIER

Clinical Nutrition
Volume 36, Supplement 1, September 2017, Page S164

Vitamins, antioxidants and minerals 1

SUN-P298: Effect of Isolated or Combined Parenteral Infusion of Fish Oil Emulsion and Glutamine on the Tissue Antioxidant Potential of Rats Submitted to Acute Pancreatitis Model

R.S. Oliveira Filho, P.C. Garla, R.S.M.D.M. Torrinhas, R.A. Garib, A. Tesser, F.G.G. Aprobato, É.M. Tamanaha, M.S. Antunes, D.L. Waitzberg

SUN-P298

EFFECT OF ISOLATED OR COMBINED PARENTERAL INFUSION OF FISH OIL EMULSION AND GLUTAMINE ON THE TISSUE ANTIOXIDANT POTENTIAL OF RATS SUBMITTED TO ACUTE PANCREATITIS MODEL

R. S. Oliveira Filho[1], P. C. Garla[1], R. S. M. D. M. Torrinhas[1], R. A. Garib[1], A. Tesser[1], F. G. G. Aprobato[1], É. M. Tamanaha[1], M. S. Antunes[1], D. L. Waitzberg[1*]. [1]*Department of Gastroenterology, LIM 35, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*

Rationale: Experimental acute pancreatitis (AP) is a well-established oxidative stress model.[1] Evidence suggests that fish oil (FO) and glutamine (GLN) can improve oxidative stress.[2,3] The present study aimed to evaluate the tissue antioxidant response to isolated or combined parenteral infusion(PI) of FO and GLN prior the induction of experimental AP.

Methods: After central venous catheterization, isogenic rats received PI of FO10% (n = 2), GLN20% (n = 2), FO10%+GLN20% (n = 2) or not received PI (SHAM;n = 2) for 48 h. After this period, the animals were submitted to the induction of AP. After 12 h of AP induction, the rats were euthanized for lung and spleen collection and subsequent analysis of antioxidant enzymes glutathione peroxidase (Gpx) and superoxide dismutase (SOD) by immunohistochemistry. The intensity of these enzymes cell marking was determined according to the following classification: 0-negative, 1-weak (<35%), 2-intermediate (35-75%) and 3-strong (>75%). The genetic similarity of the animals and the high specificity of the immunohistochemistry technique allowed these analyzes to be explored in a small sample of animals.

Results: In the lung tissue, the Gpx cell marking showed intensities 3 in the FO group, 2 in the FO + GLN and 1 in the GLN and SHAM groups (FO*vs*GLN;SHAM $p < 0,05$); while SOD presented intensities 1 in the FO, GLN and SHAM groups and 0 in the FO + GLN. At the spleen, Gpx cell marking presented intensities 3 in the FO and FO + GN groups and 1 in the GLN and SHAM groups (FO;FO + GLN*vs*GLN;SHAM$p < 0,05$); while SOD presented intensities 2 in the FO and FO + GLN groups and 1 in the GLN and SHAM groups.

Conclusion: The previous PI of FO, but not GLN, improved the tissue antioxidant potential. This effect was partially lost when FO + GLN was infused.

References

1. Armstrong JA, *et al. Free Radic Res.* 2013.
2. Manzanares W, *et al. Crit Care.* 2015.
3. Wischmeyer PE, *et al. Crit Care.* 2014.

Disclosure of Interest: None declared.

9.4 - Anexo D – *Letter to the editor* publicada na revista *Nutrition* em 2017.

ARTICLE IN PRESS

Nutrition ■■ (2017) ■■–■■

Contents lists available at ScienceDirect

Nutrition

journal homepage: www.nutritionjrnl.com

Comment on: "Influence of an ω3-fatty acid-enriched enteral diet with and without added glutamine on the metabolic response to injury in a rat model of prolonged acute catabolism"

To the Editor:

Critically ill patients often experience metabolic disturbances that increase their susceptibility to oxidative stress [1,2]. In particular, oxidizing agents can compromise the integrity of the phospholipid layer of the cell membrane, impairing relevant cell functions. In a critical setting, oxidative stress may exacerbate organ damage and contribute to multiple organ failure, among other complications [3].

Specialized nutritional support is routinely applied in critical care and can aid patient recovery [4]. Due to their potential antiinflammatory properties, ω-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and glutamine (GLN) have been included as adjuvants in such therapy to minimize oxidative damage [5]. Experimentally, these nutrients have displayed relevant antioxidant effects, increasing the activity of potent antioxidant enzymes in asthma and intestinal ischemia models, when supplied enterally [6,7].

As researchers examining the effects of parenteral and enteral supplies of fish oil (FO), as a source of ω-3 PUFAs, and GLN under acute stress conditions, we read the recent article published by Ventura et al. [8] with great interest. The authors investigated the synergy between FO and GLN administered via an immunomodulatory enteral formula in a rat model of acute stress. They found that FO improved the metabolic response to injury and defense against oxidative stress, whereas GLN exerted only marginal additional effects, decreasing hepatic fat content [8].

Ventura et al.'s findings regarding the protective effect of FO via improvements in oxidative stress markers are in line with our observations in a pilot study [9]. We examined the effects of isolated and combined 48-h parenteral supplementation (0.4 g/kg body weight) with FO and GLN on lung and spleen levels of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase and superoxide dismutase by immunochemistry in an acute pancreatitis model. We observed a potential effect against tissue oxidative stress in Lewis rats receiving parenteral FO alone and combined with GLN, but not in animals receiving only GLN [9].

0899-9007/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

The mechanisms triggering the antioxidant effects of FO and GLN differ. Whereas FO can alleviate oxidative stress by inhibiting inflammation and modulating transcriptional factors, GLN is used for biosynthesis of the cellular antioxidant glutathione and seems to modulate heat-shock proteins, but not inflammatory modulators, in critically ill patients [6,7,10,11]. Thus, the antioxidant effects of a pharmaconutrient may depend on the pathophysiology of the clinical condition from which oxidative stress originates.

In conclusion, Ventura et al.'s [8] findings reinforce our impression that FO and GLN might not have synergistic effects under the acute stress condition, probably because oxidative disturbance in this condition arises mainly from mechanisms susceptible only to FO modulation. Pharmaconutritional science is a field requiring much further exploration. Knowledge of the pathologic origins of oxidative stress and the mechanisms involved in the individual antioxidant effects of specialized nutrients seems to be essential for the design of synergic combinations and achievement of clinical benefits.

References

[1] Calder PC, Jensen GL, Koletzko BV, Singer P, Wanten GJ. Lipid emulsions in parenteral nutrition of intensive care patients: current thinking and future directions. Intensive Care Med 2010;36:735–49.

[2] Goode HF, Cowley HC, Walker BE, Howdle PD, Webster NR. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. Crit Care Med 1995;23:646–51.

[3] Crimi E, Sica V, Williams-Ignarro S, Zhang H, Slutsky AS, Ignarro LJ, et al. The role of oxidative stress in adult critical care. Free Radic Biol Med 2006;40:398–406.

[4] McClave SA, Taylor BE, Martindale RG, Warren MM, Johnson DR, Braunschweig C, et al. Guidelines for the provision and assessment of nutrition support therapy in the adult critically ill patient: Society of Critical Care Medicine (SCCM) and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.). JPEN J Parenter Enteral Nutr 2016;40:159–211.

[5] Mizock BA. Immunonutrition and critical illness: an update. Nutrition 2010;26:701–7.

[6] Wang A, Niu Q, Shi N, Wang J, Jia X, Lian H, et al. Glutamine ameliorates intestinal ischemia-reperfusion injury in rats by activating the Nrf2/Are signaling pathway. Int J Clin Exp Pathol 2015;8:7896–904.

[7] Zanatta AL, Miranda DTSZ, Dias BCL, Campos RM, Massaro MC, Michelotto PV, et al. Fish oil supplementation decreases oxidative stress but does not affect platelet-activating factor bioactivity in lungs of asthmatic rats. Lipids 2014;49:665–7.

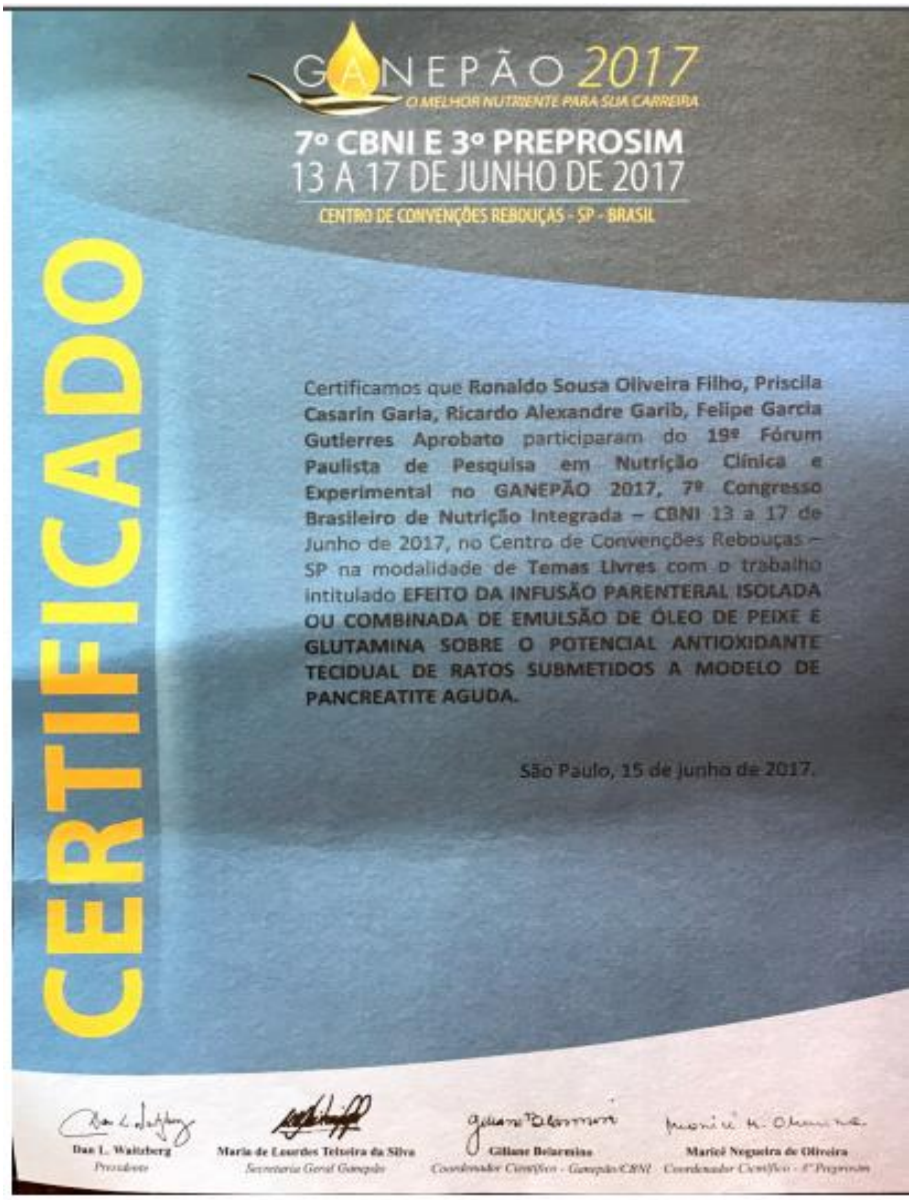
[8] Ventura G, Bortolotti M, Neveux N, Gummi X, Nakib S, Sarfati G, et al. Influence of an ω3-fatty acid–enriched enteral diet with and without added glutamine on the metabolic response to injury in a rat model of prolonged acute catabolism. Nutrition 2017;42:75–81.

[9] Oliveira Filho RS, Garla PC, Torrinhas RSMDM, Garib RA, Tesser A, Aprobato FGG, et al. Effect of isolated or combined parenteral infusion of fish oil emulsion and glutamine on the tissue antioxidant potential of rats submitted to acute pancreatitis model. Clin Nutr 2017;36:164.

[10] Kiecolt-Glaser JK, Epel ES, Belury MA, Andridge R, Lin J, Glaser R, et al. Omega-3 fatty acids, oxidative stress, and leukocyte telomere length: a randomized controlled trial. Brain Behav Immun 2013;28:16–24.

[11] Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I, Asenjo M, Márquez J. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. Int J Biochem Cell Biol 2002;34:439–58.

9.5 - Anexo E - Resumo apresentado na categoria Tema Livre, Ganepão 2017.



GANEPÃO 2017

O MELHOR NUTRIENTE PARA SUA CARREIRA

7º CBNI E 3º PREPROSIM

13 A 17 DE JUNHO DE 2017

CENTRO DE CONVENÇÕES REBOUÇAS - SP - BRASIL

CERTIFICADO

Certificamos que **Ronaldo Sousa Oliveira Filho, Priscila Casarin Garia, Ricardo Alexandre Garib, Felipe Garcia Gutierres Aprobato** participaram do **19º Fórum Paulista de Pesquisa em Nutrição Clínica e Experimental no GANEPÃO 2017, 7º Congresso Brasileiro de Nutrição Integrada – CBNI** 13 a 17 de Junho de 2017, no Centro de Convenções Rebouças – SP na modalidade de **Temas Livres** com o trabalho intitulado **EFEITO DA INFUSÃO PARENTERAL ISOLADA OU COMBINADA DE EMULSÃO DE ÓLEO DE PEIXE E GLUTAMINA SOBRE O POTENCIAL ANTIOXIDANTE TECIDUAL DE RATOS SUBMETIDOS A MODELO DE PANCREATITE AGUDA.**

São Paulo, 15 de junho de 2017.

Dan L. Waitzberg
Presidente

Maria de Lourdes Teixeira da Silva
Secretaria Geral Ganepão

Giliane Belarmino
Coordenador Científico - Ganepão/CBNI

Marici Nogueira de Oliveira
Coordenador Científico - 4º Preprosim

9.6 - Anexo F - Resumo apresentado na categoria Tema Livre, Ganepão 2019.

APSEN 50 ANOS

Nossa receita é melhorar vidas

GANEPÃO 2019

O MELHOR NUTRIENTE PARA SUA CARREIRA

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS QUE:

RONALDO SOUSA OLIVEIRA FILHO, FELIPE GARCIA GUTIERRES APROBATO, ÉRIKA MIDORI TAMANAHA, MARCIA DE SOUZA ANTUNES, PRISCILA CASARIN GARLA

Participaram do 21º Fórum Paulista de Pesquisa em Nutrição Clínica e Experimental no Ganepão 2019: 8º Congresso Brasileiro de Nutrição Integrada - CBNI e 4º Congresso Brasileiro de Pre, Pro e Simbióticos - PreProSim, de 11 a 14 de Junho de 2019, no Centro de Convenções Rebouças - SP, na modalidade Temas Livres com o trabalho intitulado Impacto da infusão parenteral de emulsão lipídica contendo óleo de peixe sobre a peroxidação lipídica e estresse oxidativo no fígado de ratos

SÃO PAULO, 14 DE JUNHO DE 2019

Dan L. Waitzberg
Presidente

Maria de Lourdes Teixeira da Silva
Secretária Geral

Giliane Belarmino
Coordenador Científico

9.7 - Anexo F - Resumo apresentado na categoria apresentação oral, BRASPEN 2019.

XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO PARENTERAL E ENTERAL

20 A 23 | OUTUBRO | 2019
FOZ DO IGUAÇU

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS QUE:

O TRABALHO: "IMPACTO DA INFUSÃO PARENTERAL DE EMULSÃO LIPÍDICA CONTENDO ÓLEO DE PEIXE SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO DE RATOS"

dos autores *RONALDO SOUSA OLIVEIRA FILHO; ALWEYD TESSER DE MORAIS; FELIPE GARCIA GUTIERRES APROBATO; ERIKA MIDORI TAMANAHA; MARCIA DE SOUZA ANTUNES; PRISCILA CASARIN GARLA; RAQUEL SUSANA MATOS DE MIRANDA TORRINHAS; DAN L. WAITZBERG* foi apresentado no formato **APRESENTAÇÃO ORAL** durante o **XXIII Congresso Brasileiro de Nutrição Parenteral e Enteral**, realizado de 20 a 23 de outubro de 2019 no Hotel Recanto Cataratas, localizado em Foz do Iguaçu - Paraná.

Foz do Iguaçu, 23 de outubro de 2019.

BRASPEN

Dr. Diogo O. Toledo
Presidente do Congresso BRASPEN 2019

Dra. Melina Gouveia Castro
Presidente da Comissão Científica

9.8 - Anexo F - *Best of ASPEN Award Parenteral Nutrition Topics,* ASPEN 2020.

aspen | LEADING THE SCIENCE AND PRACTICE OF CLINICAL NUTRITION

American Society for Parenteral and Enteral Nutrition

Congratulations

Ronaldo Oliveira Filho, RD

For attaining a 2020

Best of ASPEN Award – Parenteral Nutrition Topics

Abstract Title: Impact of parenteral infusion of fish oil containing lipid emulsion on lipid peroxidation and antioxidant defenses in rat liver.

Ronaldo Oliveira Filho, RD1; ALWEYD TESSER DE MORAIS2; FELIPE GARCIA GUTIERRES APROBATO2; ERIKA MIDORI TAMANAHA2; MARCIA DE SOUZA ANTUNES2; PRISCILA CASARIN GARLA2; Raquel Torrinhas, PhD3; Dan Waitzberg, PhD3

1Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo - FMUSP, Sao paulo, Sao Paulo; 2FMUSP, Sao Paulo, Sao Paulo; 3University of São Paulo / School of Medicine / Laboratory of Nutrition and Metabolic Surgery of Gastrointestinal Tract, Sao Paulo, Sao Paulo

In recognition of exceptional achievement in research

ASPEN Nutrition Science & Practice Virtual Conference March 28 – 31, 2020.

9.9 - Anexo F – *International Abstract of Distinction,* ASPEN 2020.

aspen | LEADING THE SCIENCE AND PRACTICE OF CLINICAL NUTRITION

American Society for Parenteral and Enteral Nutrition

Congratulations

Ronaldo Oliveira Filho, RD

For attaining a 2020

International Abstract of Distinction

Abstract Title: Impact of parenteral infusion of fish oil containing lipid emulsion on lipid peroxidation and antioxidant defenses in rat liver.

Ronaldo Oliveira Filho, RD1; ALWEYD TESSER DE MORAIS2; FELIPE GARCIA GUTIERRES APROBATO2; ERIKA MIDORI TAMANAHA2; MARCIA DE SOUZA ANTUNES2; PRISCILA CASARIN GARLA2; Raquel Torrinhas, PhD3; Dan Waitzberg, PhD3

1Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo - FMUSP, Sao paulo, Sao Paulo; 2FMUSP, Sao Paulo, Sao Paulo; 3University of São Paulo / School of Medicine / Laboratory of Nutrition and Metabolic Surgery of Gastrointestinal Tract, Sao Paulo, Sao Paulo

In recognition of exceptional achievement in research

ASPEN Nutrition Science & Practice Virtual Conference March 28 – 31, 2020.