Alweyd Tesser de Morais

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

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

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

São Paulo
2018

Alweyd Tesser de Morais

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

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

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

São Paulo
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

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

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

USP/FM/DBD-512/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

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

Ao **Thiago**, meu namorado, noivo e marido ao longo desta jornada, por ser tão cumplice, companheiro, amigo e apoiar todas as minhas decisões. Estar aqui só foi possível porque tenho você ao meu lado.

Às minhas filhas de quatro patas **Pipoca**, **Amora** e **Paçoca**, por estarem sempre ao meu lado, me preenchendo com carinho e alegria.

Aos meus sogros **Sebastião** e **Aparecida**, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim, por terem me acolhido em um dos momentos mais difíceis de minha vida.

Agradecimento Especial

Ao Professor Dan L. Waitzberg a quem guardo profunda admiração e respeito. Minha gratidão pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transpira sabedoria e por toda atenção dispensada, apoio constante e expressiva contribuição para meu crescimento pessoal e principalmente, científico. Agradeço a confiança depositada em mim, as sábias orientações e, sobretudo, o carinho e a compreensão sempre presentes.

Agradecimentos

"Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe."

Clarice Lispector

Meus sinceros votos de agradecimento,

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

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

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

À **Márcia Antunes**, que foi ponto de ignição deste grande projeto. Muito obrigada por tornar este trabalho possível.

Aos membros do Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo (Metanutri) pelo compartilhamento diário de conhecimentos científicos, em especial à nutricionista **Jéssica Reis**, pela amizade e paciência em meus momentos de estresse e pela ajuda em revisar esta dissertação.

À **Giliane Belarmino**, meu presente do Metanutri, amiga-irmã, mulher admirável e cheia de virtudes. Meu sincero respeito pela pessoa humana sem igual que és e que muito me ensinou. Gratidão por poder contar com sua amizade, e pelo apoio que me deu em todos os momentos de minha vida.

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

Ao **Ricardo Garib**, que me ensinou com profissionalismo e paciência a técnica de cateterização da veia jugular dos ratinhos.

À minha querida orientadora de treinamento técnico, **Dra. Carmem Maldonado Peres**, pelo incentivo, por todos os ensinamentos e aquele bom humor inigualável. Você é uma das melhores pessoas que eu já conheci na vida, e foi quem me inspirou a continuar. Obrigada por ter confiado e acreditado em mim. Ainda bem que tive o prazer de te conhecer!

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

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

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

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

Aos professores **Philip Calder** e **Pierre Singer**, pela atenção dispensada, durante suas visitas ao Brasil, em conhecer este projeto e ajudarem no desenho metodológico e discussão dos resultados preliminares.

À secretaria da pós-graduação do departamento de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Hospital das Clínicas da FMUSP, **Vilma de Jesus Libério** pela dedicação e gentileza de sempre.

Aos professores **Dr. José Jukemura**, **Dr. Francisco Soriano** e **Dra. Raquel Torrinhas,** muito obrigada pelo aceite em compor a banca de minha prova de qualificação e pelo aconselhamento científico para interpretar os dados deste estudo.

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

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

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

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

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

por isso
devo muito
a vocês

- mas devo algumas coisas a mim mesma também”

Amanda Lovelace

Trabalho realizado no Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo – Metanutri do Laboratório de Investigação Médica – LIM 35 da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo, do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Auxílio Pesquisa: B. Braun Brasil

Bolsa Mestrado: Capes

Normalização Adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 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

LISTA DE ABREVIATURAS
LISTA DE SÍMBOLOS
LISTA DE SIGLAS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE QUADROS
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE GRÁFICOS
RESUMO
ABSTRACT
1. INTRODUÇÃO 25
1.1. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (ω-3) 25
1.2. AGPIs ω-3 e modulação inflamatória 25
1.3. Administração de AGPIs ω-3 por via parenteral 27
2. RACIONAL E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO 30
3. OBJETIVOS 33
3.1. Objetivo Geral 33
3.2. Objetivos Específicos 33
4. MÉTODOS 35
4.1. Local 35
4.2. Aspectos éticos 35
4.3. Delineamento Experimental 35
4.4. Procedimentos Gerais 38
4.4.1. Animais 38
4.4.2. Ambientação 38
4.4.3. Cateterização do sistema venoso central 39
4.4.4. Descrição da técnica de cateterização venosa central 39
4.4.5. Infusão parenteral de emulsão lipídica 41
4.4.6. Obtenção de leucócitos do sangue 44
4.4.7. Avaliação do perfil de ácidos graxos de células leucocitárias 45
4.4.8. Esterificação de ácidos graxos leucocitários 46

4.4.9. Análise por cromatografia gasosa 46
4.5. Análise estatística dos dados.....47
5. RESULTADOS 49
5.1. Considerações gerais.....49
5.2. Dados da Amostra.....50
5.3. Avaliação do conteúdo de AL, AA, EPA e DHA 51
5.4. Avaliação da razão AGPIs ω-3:ω-6 64
5.5. Avaliação da razão EPA:AA.....67
6. DISCUSSÃO.....71
6.1. Do método.....71
6.2. Dos resultados 75
7. CONCLUSÕES.....82
8. ANEXOS.....84
8.1. Anexo A – Aprovação CEUA.....84
8.2. Anexo B – Estudo piloto para a determinação da quantidade de animais necessária para obter amostra suficiente de leucócitos para análise cromatográfica. 85
8.3. Anexo C – Composição de ácidos graxos da ração AIN-93 M ofertada aos animais durante o período experimental. 88
9. REFERÊNCIAS 92
10. APÊNDICES

Lista de Abreviaturas

AG	Ácido Graxo
AGCL	Ácidos Graxos de Cadeia Longa
AGCM	Ácidos Graxos de Cadeia Média
AGPIs	Ácidos Graxos Poli-Insaturados
AL	Ácido Linoleico
ALA	Ácido Alfa-Linolênico
BF3	*Boron Trifluoride-Methanol Solution*
CB	Controle Basal
cm	Centímetros
cols.	Colaboradores
CVC	Cateterização do Sistema Venoso Central
DHA	Ácido Docosahexaenoico
EL	Emulsão Lipídica
ELP	Emulsão Lipídica Parenteral
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
FO	*Fish Oil*
FOLE	*Fish Oil Lipid Emulsion*
g	Gramas
h	Hora
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*
IL	Interleucina
kg	Quilogramas

LCT	*Long Chain Triglycerides*
LE	*Lipid Emulsions*
LT	Leucotrieno
MCT	*Medium Chain Triglycerides*
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetros
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
OP	Óleo de Peixe
PBS	Tampão fosfato-salino
PG	Prostaglandina
PUFA	*Polyunsaturated Fatty Acids*
rpm	Rotações por minuto
SI	Sem infusão
SPM	*Specialized Pro Resolving Mediators*
TCL	Triglicérides de Cadeia Longa
TCM	Triglicérides de Cadeia Média
TNF	Fator de Necrose Tumoral – alfa
TX	Tromboxano
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

Lista de Símbolos

%	Porcento
Δ	Delta
®	Marca registrada
°C	Graus centígrados
α	Alfa
β	Beta
ω	Ômega

Lista de Siglas

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

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Descrição dos grupos de animais 36

Tabela 2 - Composição das emulsões lipídicas controle (TCL/OP – Lipovenus® 10%[1] + Omegaven® 10%[2] - 8:2 v/v) e estudo (TCM/TCL/OP - Lipidem® 20%[3]) 43

Tabela 3 – Variação do peso corpóreo (g) nos diferentes grupos de ratos entre o início e o final do estudo. 50

Tabela 4 – Quantidade em gramas de ração consumida nos diferentes grupos de ratos entre o início e o final do estudo.....51

Tabela 5 - Concentração de ácido linoleico em leucócitos mononucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas 52

Tabela 6 - Concentração de ácido araquidônico em leucócitos mononucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas. 52

Tabela 7 – Concentração de ácido eicosapentaenóico em leucócitos mononucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas. 53

Tabela 8 – Concentração de ácido docosahexaenóico em leucócitos mononucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas. 54

Tabela 9 - Concentração de ácido linoleico em leucócitos polimorfonucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas. ...55

Tabela 10 - Concentração de ácido araquidônico em leucócitos polimorfonucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas. 55

Tabela 11 - Concentração de ácido eicosapentaenóico em leucócitos polimorfonucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas. 56

Tabela 12 - Quantidade total de ácido docosahexaenóico em leucócitos polimorfonucleares de ratos Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções por 48 e 72 horas. 57

Lista de Quadros

Quadro 1 - Emulsões lipídicas parenterais contendo óleo de peixe disponíveis para a pratica clínica 79

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema ilustrativo do protocolo experimental 37

Figura 2 – Fases da cateterização do sistema venoso central 41

Figura 3 - Distribuição dos sujeitos da pesquisa 49

Figura 4 – Gráficos que mostram a concentração dos ácidos graxos poli-insaturados linoleico, araquidônico, eicosapentaenóico e docosahexaenóico no plasma para cada rato Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções nos períodos de 0, 48 e 72 horas. 60

Figura 5 - Gráficos que mostram a concentração dos ácidos graxos poli-insaturados linoleico, araquidônico, eicosapentaenóico e docosahexaenóico no fígado para cada rato Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções nos períodos de 0, 48 e 72 horas. 63

Figura 6 - Transporte de ácidos graxos de cadeia média sem necessidade de carnitina e de cadeia longa com auxílio de carnitina, mediado pela ação de carnitina aciltransferase I e II. 72

Figura 7 - Cromatograma do perfil de ácidos graxos poli-insaturados de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares obtidos de um rato 85

Figura 8 - Cromatograma do perfil de ácidos graxos poli-insaturados de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares obtidos de dois ratos.....86

Figura 9 - Cromatograma do perfil de ácidos graxos poli-insaturados de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares obtidos de três ratos 87

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Razão entre ácidos graxos ômega-3 : ômega-6 no plasma de ratos antes e após a infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 48 e 72 horas. 65

Gráfico 2 - Razão entre ácidos graxos ômega-3 : ômega-6 no fígado de ratos antes e após a infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 48 e 72 horas. 66

Gráfico 3 - Razão entre ácidos graxos eicosapentaenóico : arquidônico no plasma de ratos antes e após a infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 48 e 72 horas. 68

Gráfico 4 - Razão entre ácidos graxos eicosapentaenóico : arquidônico no fígado de ratos antes e após a infusão parenteral de diferentes emulsões lipídicas por 48 e 72 horas. 69

RESUMO

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

Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPIs ω-3), particularmente dos ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexanoico (DHA), infundidos por via parenteral, e incorporados em membranas celulares, tem benefício clínico em condições de estresse inflamatório. Experimentalmente, o pico de incorporação celular de AGPIs ω-3 ocorreu 72 horas após a infusão parenteral de emulsões lipídicas (ELs) contendo óleo de peixe como fonte de EPA e DHA. Em humanos, a incorporação celular de AGPIs ω-3, administrados por via parenteral, foi mais rápida quando infundidos em conjunto com triglicérides de cadeia média (TCM). EL parenteral, contendo quantidades elevadas de TCM (50%) e 10% de óleo de peixe, está clinicamente disponível e poderia ser útil para facilitar a incorporação celular de AGPIs ω-3. Avaliamos, experimentalmente, as modificações de incorporação plasmática, leucocitária (mono e polimorfonucleares) e hepática de AGPIs ω-3 após infusão parenteral de EL contendo óleo de peixe e alto teor de TCM (grupo TCM/TCL/OP) após 48 e 72 horas em comparação com EL experimental contendo a mesma quantidade de AGPIs ω-3 e menor de TCM (grupo TCL/OP). Observamos que em nenhum dos tecidos houve maior incorporação dos AGPIs ω-3 no grupo que recebeu TCM/TCL/OP em comparação ao grupo que recebeu EL sem adição de TCM. Com relação aos tempos de infusão das ELs, nossos resultados indicaram que a incorporação leucocitária de AGPIs ω-3 atingiu seu pico após 48 horas de infusão e diminuiu após 72 horas. Após 48 horas de infusão, a razão ω-6 : ω-3 no plasma foi maior no grupo TCM / TCL / OP do que no grupo TCL / OP e após 72h de infusão, a razão diminuiu significativamente nos dois grupos, sendo maior no grupo TCL / OP do que no grupo TCM / TCL / OP. No fígado, a razão ω-3 : ω-6 foi significativamente maior no grupo TCL / OP em relação ao grupo TCM / TCL / OP após 48 e 72 horas de infusão. Em conjunto, nossos dados sugerem que não houve benefício da adição de TCM em termos de incorporação de AGPI ω-3 nos leucócitos, fígado e plasma de ratos.

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

ABSTRACT

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

Omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω-3 PUFA), particularly eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), parenterally infused and incorporated into cell membranes, have clinical benefit under stress inflammatory conditions. Experimentally, the cellular uptake peak of ω-3 PUFAs occurred 72 hours after parenteral infusion of fish oil-containing lipid emulsions (FOLE) as a source of EPA and DHA. In humans, the cellular uptake of parenterally administered ω-3 PUFAs was faster when infused together with medium chain triglycerides (MCT). Parenteral lipid emulsion, containing high amounts of MCT (50%) and 10% fish oil, is clinically available and could be useful to facilitate the cellular uptake of ω-3 PUFAs. We evaluated experimentally the changes in ω-3 PUFAs concentration in plasma, leukocyte (mono and polymorphonuclear) and liver after parenteral infusion of FOLE and high MCT content (MCT/LCT/FO group) after 48 and 72 hours compared to an experimental LE containing the same amount of ω-3 and lower amounts of MCT (LCT/FO group). We observed that in none of the tissues studied had greater incorporation of ω-3 PUFAs in the group that received MCT/LCT/FO compared to the group that received LE without MCT addition. Regarding infusion times of LE, our results indicated that the leukocyte incorporation of ω-3 PUFAs peaked after 48 hours of infusion and decreased after 72 hours. After 48 hours of infusion, the ω-6 : ω-3 ratio in plasma was higher in the MCT/LCT/FO group than in the LCT/FO group and after 72h of infusion, the ratio decreased significantly in both groups, being higher in the LCT/FO group than in the MCT/LCT/FO group. In the liver, the ω-3: ω-6 ratio was significantly higher in the LCT/FO group compared to the MCT/LCT/FO group after 48 and 72 hours of infusion. In general, our data suggest that there was no benefit of adding MCT in terms of ω-3 PUFA incorporation into leukocytes, liver and plasma of rats.

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

1 Introdução

1. INTRODUÇÃO

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

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

No organismo humano, após processos enzimáticos sequenciais de elongamento e dessaturação, o ALA pode ser convertido endogenamente em outros AGPIs, como ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) [1]. Estes apresentam propriedades biológicas com especial interesse clínico, mas suas taxas de conversão pelo organismo humano são muito baixas (cerca de 0,2% e 0,05% do total de ácido α-linolênico consumido, respectivamente) [2]. Nesse cenário, a ingestão de óleos de peixes ricos em EPA e DHA podem suprir as necessidades desses AGPIs para o homem [3].

1.2. AGPIs ω-3 e modulação inflamatória

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

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

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

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

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

1.3. Administração de AGPIs ω-3 por via parenteral

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

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

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

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

Em estudos conduzidos no Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo do LIM-35, por nosso grupo, em diferentes modelos experimentais, a infusão de ELP de óleo de peixe se associou à melhora de marcadores de funções imunológicas e inflamatórios. Esses benefícios foram mais acentuados quando ELP de óleo de peixe foi infundida em mistura física com ELs ricas em TCMs [22,23]. Uma possível explicação consiste que, experimentalmente, AGPIs ω-3 infundidos por via parenteral se incorporam mais rapidamente em membranas celulares quando associados a TCMs, podendo exercer suas funções imunomoduladoras mais precocemente [24,25].

Uma ELP composta por 50% de TCM, 40% de óleo de soja e 10% de óleo de peixe, na concentração final de 20% de gordura (Lipidem®, B. Braun, Melsungen – Alemanha) está disponível, entre nós, para prática clínica. A aplicação desta formulação poderia acelerar a depuração plasmática e captação extra-hepática de AGPIs ω-3, graças à sua combinação com alta quantidade de TCMs [26]. Além disso, AGPIs ω-3 infundidos na presença de TCMs podem ser poupados da beta-oxidação e síntese de energia (permanecendo disponíveis para outras funções celulares), já que TCMs tem rápida depuração plasmática e oxidação pois dispensam, parcialmente, a ação de carnitina para atravessarem a membrana mitocondrial [27].

2 RACIONAL E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

2. RACIONAL E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

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

Em estudo prévio de nosso grupo, infundimos ELP composta exclusivamente por óleo de peixe puro durante três dias pré-operatórios em pacientes com câncer do aparelho digestivo. Não observamos aumento de AGPIs ω-3 em membranas leucocitárias, quando avaliadas 18 horas após o término da infusão da ELP. Observamos melhora de marcadores imunológicos leucocitários e plasmáticos, mas sem impacto significativo na evolução clínica pós-operatória dos pacientes [28]. A ELP de óleo de peixe foi infundida pelo tempo considerado ideal pela literatura, até então disponível, para se obter os benefícios imunomoduladores de AGPIs ω-3. No entanto, uma das limitações do estudo referido pode ter sido que o tempo de infusão não fora suficiente para propiciar o aparecimento de benefícios clínicos.

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

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

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

3 OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar, em ratos, a dinâmica das alterações de concentrações plasmática, leucocitária e hepática de ácidos graxos poli-insaturados, em distintos períodos de infusão de emulsão lipídica parenteral contendo óleo de peixe e rica em triglicérides de cadeia média.

3.2. Objetivos Específicos

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

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

4 MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1. Local

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

4.2. Aspectos éticos

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

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

4.3. Delineamento Experimental

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

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

Tabela 1 – Descrição dos grupos de animais

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

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

Os períodos de infusão das distintas ELs foram de 48h e 72h. Estes períodos foram selecionados a partir do estudo de Hagi e cols., que encontrou pico de incorporação de AGPIs ω-3 após 72h de infusão de diferentes ELs contendo óleo de peixe, sem TCM, em ratos saudáveis [29]. Nosso planejamento metodológico foi desenhado para observar se a presença de alta quantidade de TCM contribui para atingir pico de incorporação de AGPIs ω-3, mensurado em em diferentes tecidos, por cromatografia gasosa, em menor tempo de infusão, e em maior quantidade. A inclusão do grupo CB fornece dados de comparação

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

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

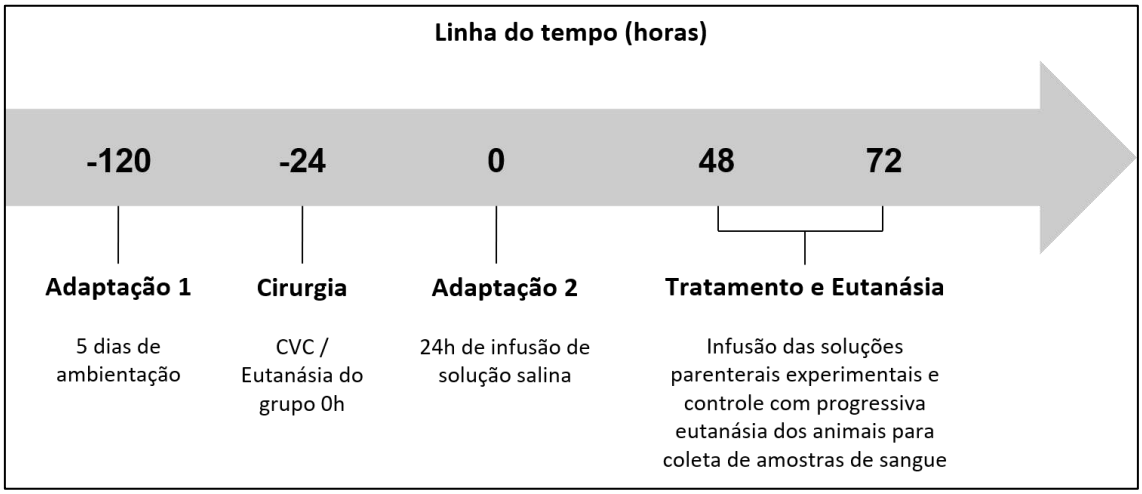


Figura 1 - Esquema ilustrativo do protocolo experimental
Legenda - CVC: cateterização do sistema venoso central

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

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

4.4. Procedimentos Gerais

4.4.1. Animais

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

4.4.2. Ambientação

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

4.4.3. Cateterização do sistema venoso central

Para acesso parenteral, os animais foram submetidos à cateterização do sistema venoso central. Previamente ao procedimento cirúrgico, os animais foram pesados em balança digital com auxílio de recipiente próprio. Após obtenção do peso, foi calculado dose de anestésico cloridrato de Cetamina 80 mg/Kg (Ketamin-S®, do Laboratório Cristália, Brasil) e cloridrato de Xilazina 8,0 mg/Kg (Rompun 2%® do Laboratório Bayer, Brasil). A administração do preparado anestésico foi realizada com utilização de seringa de 1,0 mL na região intraperitonial dos animais. Após anestesia os animais foram tricotomizados na região ventral do pescoço, supraclavicular direita e retroauricular da região dorsal do pescoço. Após assepsia local com iodopovidona a 10% os animais foram então submetidos à cateterização da veia jugular direita externa, conforme técnica padronizada por Yamaguchi e cols. [30].

4.4.4. Descrição da técnica de cateterização venosa central

Com o animal em decúbito dorsal horizontal em campos estéreis realizou-se incisão transversa com aproximadamente 1,0 cm de extensão na região supraventricular direita. Posicionou-se o animal em decúbito ventral e com auxílio de agulha Intracath (Biotecno Produtos Plásticos e Médicos Ltda, São Paulo), a partir da borda distal da incisão, tunelizou-se o tecido subcutâneo em direção a região dorsal, com exteriorização a 1,0 cm da região retroauricular. Pelo interior do Intracath, passou-se cateter de silicone (Ciencor® Brasil), de aproximadamente 1,0 mm de diâmetro e 70,0 mm de comprimento, que foi

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

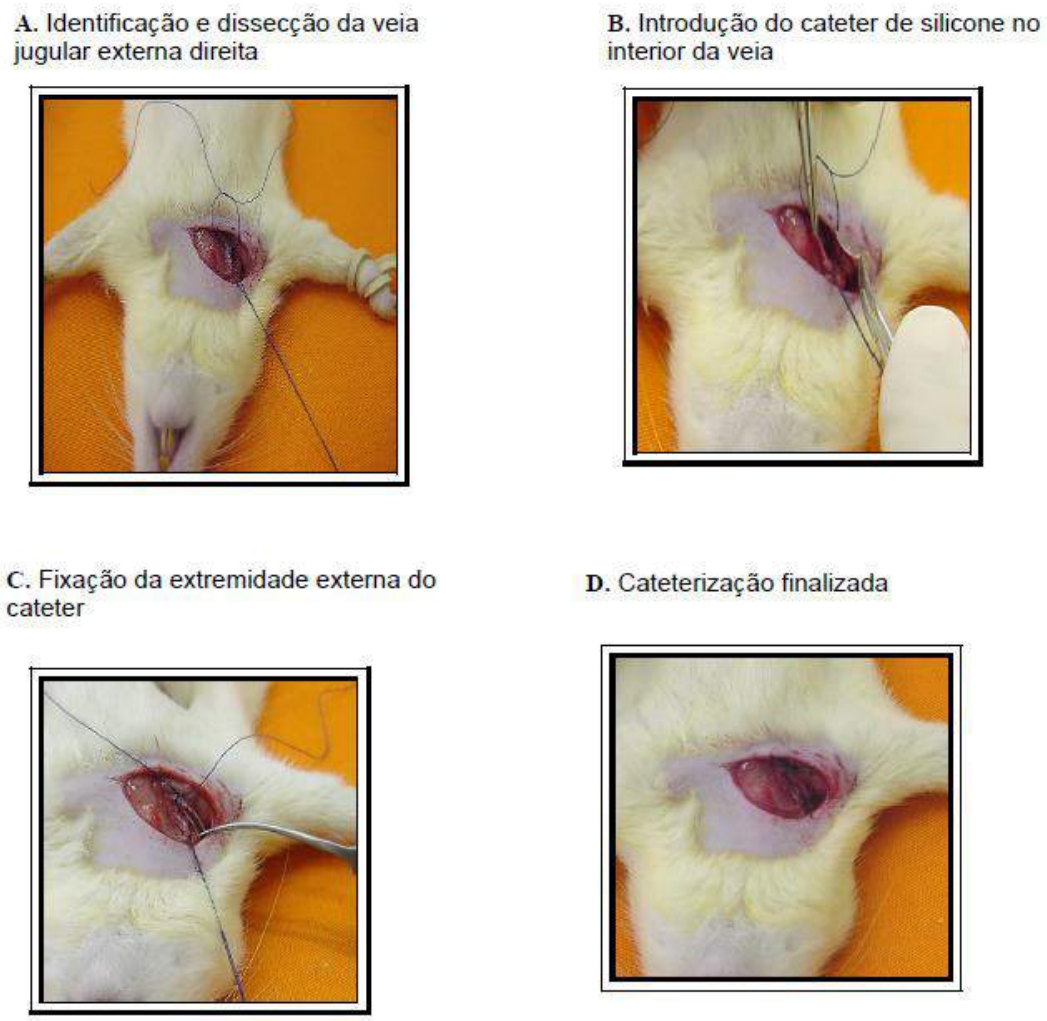


Figura 2 – Fases da cateterização do sistema venoso central

4.4.5. Infusão parenteral de emulsão lipídica

Após cateterização do sistema venoso central, os animais foram alocados em gaiolas metabólicas individuais, conectando-se o dispositivo de acesso venoso preso ao animal ("borboleta") ao intermediário de infusão, denominado *swível*, que gira em torno de seu eixo e permite a livre movimentação do animal [31]. Ao *swível* foi conectado um perfusor (Perfusor Space®, B. Braun Brasil) de 150 cm, para infusão gravitacional, específico para a bomba de infusão modelo de seringa, o Perfusor Space® (B. Braun Brasil).

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

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

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

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

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

Fonte – [1] Versleijen M e cols. Clin Nutr. 2005 [32]; [2] Dados fornecidos pelo fabricante (Fresenius Kabi, Bad Homberg - Alemanha;); [3] Dados fornecidos pelo fabricante (B. Braun, Melsungen - Alemanha).

Para tornar os grupos tratados com ELs comparáveis em termos de conteúdos de AGPIs ω-6 e ω-3, o volume de EL administrado nos animais do

grupo TCL/OP foi o mesmo que o administrado nos animais do grupo TCM/TCL/OP, que receberam 4,3g de gordura/kg de peso corpóreo (≅ 6 mL). Como a EL infundida no grupo TCL/OP tem a metade de concentração de gordura que a administrada no grupo TCM/TCL/OP (10% *vs* 20%, respectivamente), os animais desse grupo receberam metade da quantidade total de gordura por via parenteral. A quantidade de 4,3 g de gordura/kg de peso corpóreo foi a mesma utilizada pelo Hagi e seus colaboradores [29] e nos permitiu administrar o aporte de ácidos graxos essenciais recomendado pela AIN-93 [33] em quantidades similares entre esses dois grupos, já que o excedente de gordura parenteral do grupo TCM/TCL/OP é proveniente de seu conteúdo de AGs não essenciais, ou seja de TCM.

4.4.6. Obtenção de leucócitos do sangue

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

As amostras de sangue foram submetidas à centrifugação na velocidade de 1800 rpm, à temperatura de 20ºC, por 10 min. O plasma foi separado e armazenado em freezer (- 80ºC) e o restante da amostra foi diluída em solução fisiológica (1;1 v/v), acrescida cuidadosamente a tubos contendo Ficoll Hypaque com diferentes densidades (Histopaque® 1077 (1:1) e Histopaque® 1119, Sigma

Aldrich) e centrifugada por 30 minutos, na velocidade de 1800 rpm, à 21ºC, para isolar leucócitos mononucleares e polimorfonucleares, respectivamente. As nuvens de leucócitos formadas na interface com elementos figurativos do sangue foram coletadas com pipeta Pasteur, ressuspendidas em tampão fosfato-salino (PBS), adicionadas a tubos Eppendorf® e armazenadas em freezer (-80ºC) para futura análise.

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

4.4.7. Avaliação do perfil de ácidos graxos de células leucocitárias

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

4.4.8. Esterificação de ácidos graxos leucocitários

Para obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos, as amostras de células foram submetidas ao protocolo proposto por Shirai e cols. [34] . Em um tubo de 15 mL foi adicionado 1 mL de solução NaOH 0,5 M (Synth, Brasil) em metanol (Synth, Brasil) e 500 uL de amostra e foi procedida homogeneização com uso de vórtex, por 15 segundos, seguida de aquecimento em banho maria a 100 C, por 5 minutos, e resfriamento a temperatura ambiente. Dois mL de BF3-Metanol 14% (Synth, Brasil) foram adicionados, seguido por agitação em vórtex, por 15 segundos, e aquecimento em banho maria a 100 C, por 30 minutos e resfriamento a temperatura ambiente.

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

4.4.9. Análise por cromatografia gasosa

As condições cromatográficas empregadas foram feitas de acordo com Iverson e cols. [35], com algumas adaptações específicas que se fizeram necessárias para otimizar as amostras do estudo, de acordo com parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão, limites de detecção e

quantificação. Os ácidos graxos foram avaliados por padronização externa, utilizando seus padrões de referência (Sigma) para obtenção da curva de calibração.

4.5. Análise estatística dos dados

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

5 RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Considerações gerais

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

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

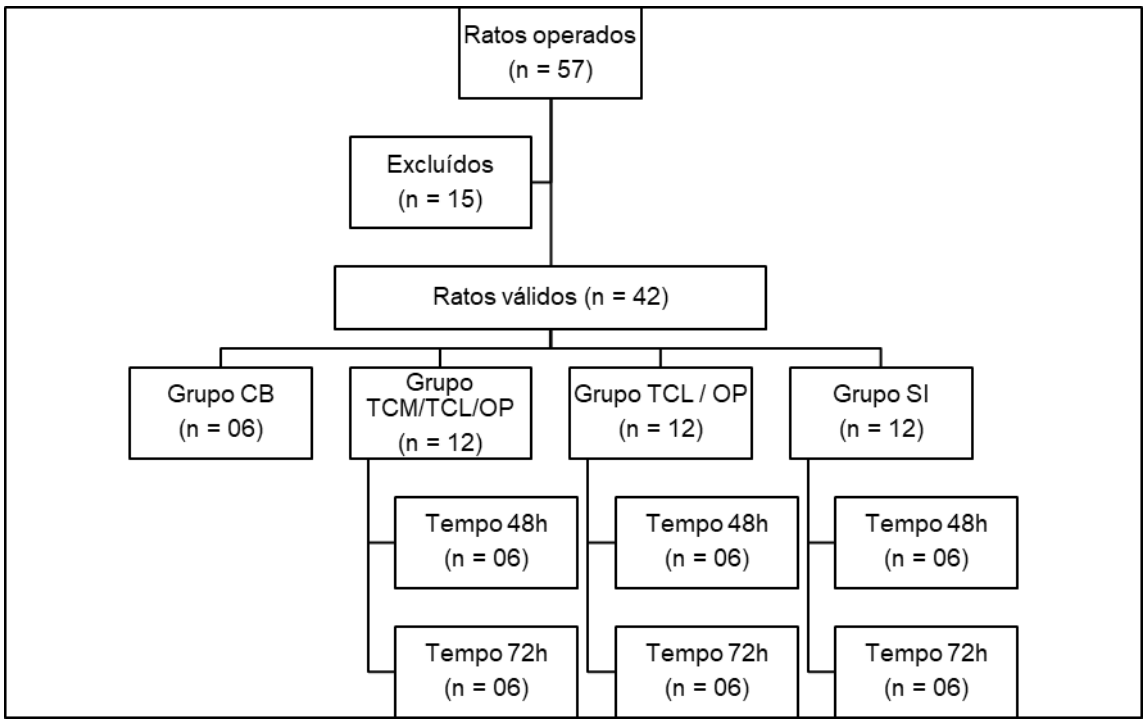


Figura 3 - Distribuição dos sujeitos da pesquisa

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

5.2. Dados da Amostra

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

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

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

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

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

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

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

Legenda – SI: sem infusão; TCL/OP: infusão de emulsão lipídica (EL) composta de óleo de soja + óleo de peixe; TCM/TCL/OP: infusão de EL composta de óleo de peixe + óleo de soja + triglicérides de cadeia média; * $p<0,05$ em relação a 0 e 48h

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

5.3.1. Leucócitos Mononucleares

Ácido Linoleico (AL)

A concentração total de AL em células mononucleares, expressa no grupo CB no tempo 0h, foi considerada a basal para todos os animais neste período. Houve diminuição da concentração de AL em 48h e 72h para os dois grupos sob infusão parenteral de ELs. O grupo SI foi o que apresentou menor concentração quantidade deste ácido graxo após a cirurgia (tabela 5).

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

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

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

Ácido Araquidônico (AA)

Para todos os animais considerou-se a concentração basal de ácido araquidonico em células mononucleares de 21,8% do total de ácidos graxos de sua composição. Após a CVC, houve um ligeiro aumento na quantidade deste AG entre os animais do grupo SI, em 48 e em 72 horas de infusão. Entretanto, observou-se que os animais que receberam infusão de ambas as emulsões lipídicas, mostraram valores não detectáveis nas concentraçoes deste AG nos dois tempos de infusão avaliados, conforme demonstrado na tabela 6.

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

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

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

Ácido Eicosapentaenóico (EPA)

A concentração de ácido eicosapentaenoico encontrada nas células mononucleares dos animais do grupo CB (tempo 0h) foi de 1,3%. Após 48h de infusão, essa concentração aumentou ligeiramente nos grupos TCL/OP e TCM/TCL/OP, e reduziu-se para valor não determinável no grupo sem infusão. Após 72 horas de infusão, não encontramos quantidades deste ácido graxo em nenhum dos grupos estudados, conforme mostra a tabela 7. Essas análises foram repetidas e os resultados confirmados.

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

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

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

Ácido Docosahexaenóico (DHA)

Os animais do grupo CB não apresentaram concentração mensurável de DHA nas células mononucleares. Após 48h de infusão, encontramos 5,55% e 5,05% deste ácido graxo nos grupos TCL/OP e TCM/TCL/OP, respectivamente, enquanto o grupo sem infusão permaneceu com sem valor determinável. Após

72 horas, as concentrações desse AG diminuíram nos grupos que receberam infusão de ambas as ELs, e aumentou no grupo SI, conforme dados apresentados na tabela 8.

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

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

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

5.3.2. Leucócitos Polimorfonucleares

Ácido Linoleico (AL)

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

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

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

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

Ácido Araquidônico (AA)

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

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

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

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

Ácido Eicosapentaenóico (EPA)

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

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

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

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

Ácido Docosahexaenóico (DHA)

Não foi detectada a presença de DHA nas células polimorfonucleares no tempo 0. No tempo 48h, a maior concentração de DHA em células polimorfonucleares foi encontrada no grupo TCM/TCL/OP, enquanto no tempo 72h, foi no grupo TCL / OP, de acordo com os dados apresentados na tabela 12.

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

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

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

5.3.3. Plasma

A figura 4 ilustra a concentração plasmática dos AGPIs linoleico, araquidônico, eicosapentaenoico e docosahexaenóico nos tempos estudados.

Ácido Linoleico (AL)

A quantidade média de AL encontrada no tempo 0 foi de 8,41% ± 0,41. Após 48h, essa quantidade aumentou significativamente para 10,02% ± 0,41 no grupo SI (p = 0,0022) e diminuiu significativamente nos grupos TCL/OP (6,46% ± 0,21; p = 0,0022) e TCM/TCL/OP (6,36% ± 0,17; p = 0,0022). Após 72 horas, as quantidades se mantiveram sem alterações significativas em todos os grupos, conforme mostrado na figura 4 (A).

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

Ácido Araquidônico (AA)

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

Na comparação entre os grupos para cada tempo, podemos observar que após 48h de infusão as concentrações de AA encontradas nos grupos que receberam infusão foram 2,18% ± 0,28 no grupo TCL/OP e 1,95% ± 0,20 no grupo TCM/TCL/OP, concentrações significativamente maiores do que a encontrada no grupo SI (0,37% ± 0,05; p = 0,0022), e que não houve diferença estatística entre os grupos TCL/OP e TCM/TCL/OP (p = 0,13). Já após 72 horas de infusão, a diferença aumenta expressivamente (p = 0,0022) (figura 4 - B).

Ácido Eicosapentaenóico (EPA)

Não detectamos presença de EPA no plasma dos animais do grupo CB (tempo 0h), nem nos animais do grupo SI para ambos os tempos (48 e 72h). A concentração do ácido graxo encontrada nos animais do grupo TCM/TCL/OP foi maior do que a encontrada no grupo TCL/OP após 48horas de infusão (TCM/TCL/OP = 13,11% ± 0,13; TCL/OP = 6,46% ± 0,21; p = 0,0022). É possível observar na figura 4 - C que após 72 horas de infusão, a quantidade de EPA no plasma dos animais do grupo TCL/OP aumenta (14,72% ± 0,12), ao passo em que diminui drasticamente no grupo TCM/TCL/OP (1,54% ± 1,59), em relação ao tempo 48 horas.

Ácido Docosahexaenóico (DHA)

Não detectamos presença de DHA no plasma dos animais do grupo CB (tempo 0h), no grupo SI no tempo 48h e em nenhum dos grupos no tempo 72 horas. No tempo 48h, a quantidade de DHA encontrada foi maior no grupo TCM/TCL/OP (17,39% ± 0,17) do que a encontrada no grupo TCL/OP (16,90% ± 0,18; $p = 0.0022$).

Ilustrada na figura 4 - D, a comparação entre os diferentes tempos mostra as concentrações de DHA encontradas nos grupos TCL/OP e TCM/TCL/OP que foram significativamente maiores nos tempos 48h e 72h, quando comparadas ao tempo 0h ($p = 0.0028$) e significativamente menores no tempo 72h em comparação ao tempo 48h ($p = 0.0028$).

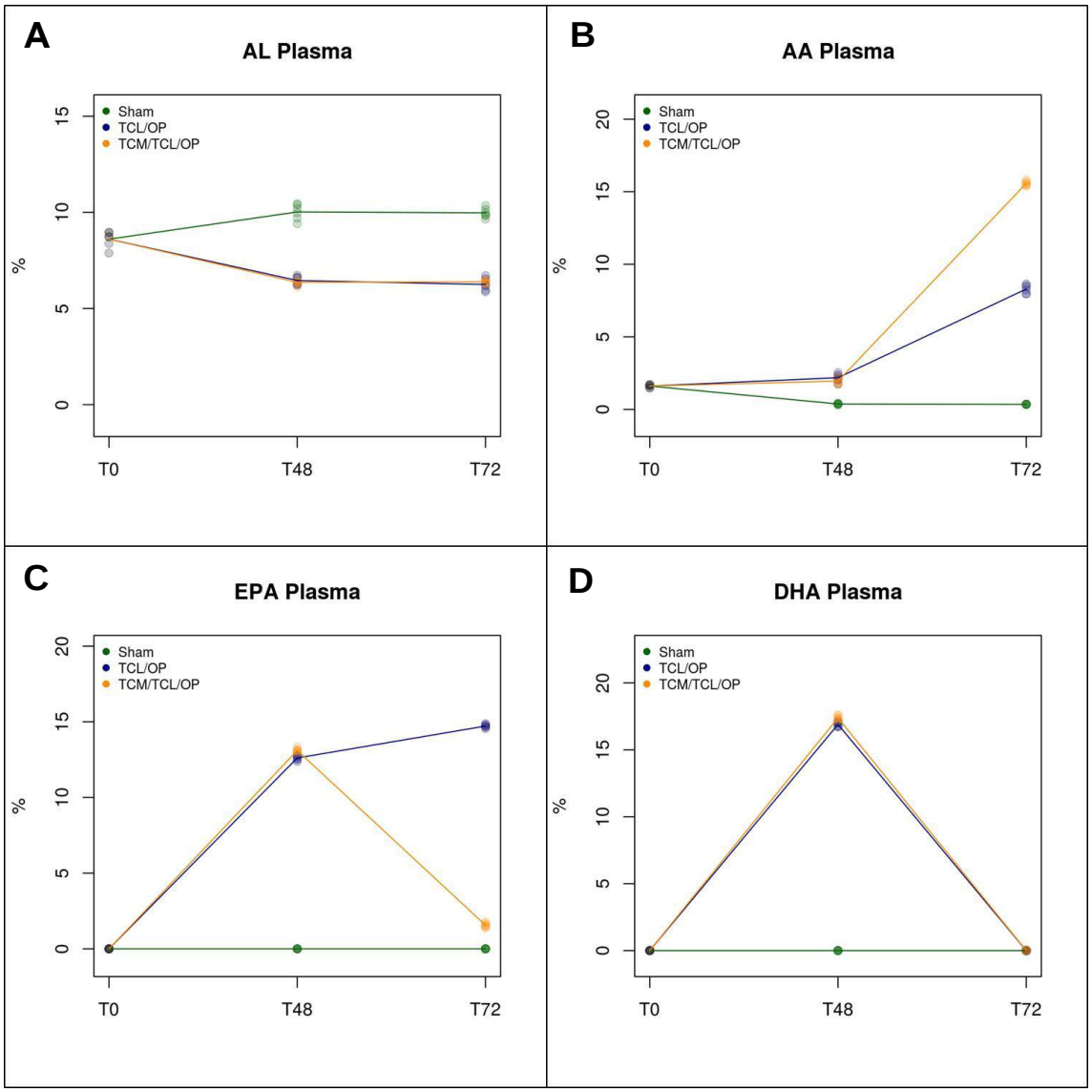


Figura 4 – Gráficos que mostram a concentração dos ácidos graxos poli-insaturados linoleico, araquidônico, eicosapentaenóico e docosahexaenóico no plasma para cada rato Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções nos períodos de 0, 48 e 72 horas.

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

5.3.4. Fígado

Ácido Linoleico (AL)

Podemos observar na figura 5 - A que a concentração de ácido linoleico encontrada no fígado dos ratos diminuiu significativamente entre 0 e 48 horas de infusão, para todos os grupos (p = 0,0022). Neste período, a concentração de AL encontrada no grupo SI foi de 10,91% ± 0,35, no grupo TCL/OP foi 5,21% ± 0,15 e no grupo TCM/TCL/OP foi 5,86% ± 0,20. A diferença entre os grupos que receberam infusão, apesar de pequena, foi estatisticamente significativa (p = 0,0022).

Após 72 horas de infusão, a concentração de AL diminuiu significativamente com relação ao tempo 48h nos grupos SI (8,84% ± 0,47; p = 0,0022) e TCM/TCL/OP (5,48% ± 0,17; p = 0,015), e aumentou no grupo TCL/OP (5,79% ± 0,20%; p = 0,0022).

Ácido Araquidônico (AA)

A incorporação de ácido araquidônico no fígado dos ratos apresentada na figura 5 - B apresenta dinâmica semelhante à do mesmo AG no plasma. Observamos que a concentração de AA aumentou ao longo do tempo nos grupos que receberam infusão parenteral de EL, apresentando maior pico de incorporação após 72 horas de infusão no grupo TCM/TCL/OP (14,39% ± 0,19). A diferença entre os grupos foi significativa em ambos os tempos de estudo (p = 0,0022). A diferença entre os tempos 48h e 72h foi significativa apenas para o grupo TCM/TCL/OP (p = 0,0022).

Ácido Eicosapentaenóico (EPA)

Assim como nos leucócitos e no plasma, não detectamos presença de EPA no fígado dos animais do grupo CB, e do grupo SI nos tempos estudados.

Após 48 horas de infusão, a concentração deste ácido graxo encontrada no grupo TCL/OP foi de 2,37% ± 0,14, significativamente maior do que a encontrada no grupo TCM/TCL/OP (1,66% ± 0,19) no mesmo período ($p = 0,0022$).

No tempo 72 horas, a concentração de EPA cai para 1,85% ± 0,21 no grupo TCL/OP e para 1,18% ± 0,07 no grupo TCM/TCL/OP, sendo a diferença entre os dois grupos estatisticamente significativa ($p = 0,0022$).

Quando avaliamos a diferença na incorporação entre 0h, 48h e 72h, verificamos que a quantidade de EPA encontrada no fígado dos animais foi maior nos tempos 48 e 72 do que as encontradas no tempo 0h ($p = 0,0028$), e maior no tempo 72h em comparação ao tempo 48h ($p = 0,0022$). Estes resultados estão ilustrados na figura 5 - C.

Ácido Docosahexaenóico (DHA)

Os resultados das análises de DHA no fígado dos animais são mostrados na figura 5 – D. Os animais nos grupos CB e SI, em ambos os tempos estudados, não apresentaram concentrações detectáveis desse AG, enquanto a quantidade encontrada no grupo TCL/OP foi significativamente maior do que a encontrada no grupo com TCM, em ambos os períodos de infusão (p 48 e 72h = 0.0022).

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

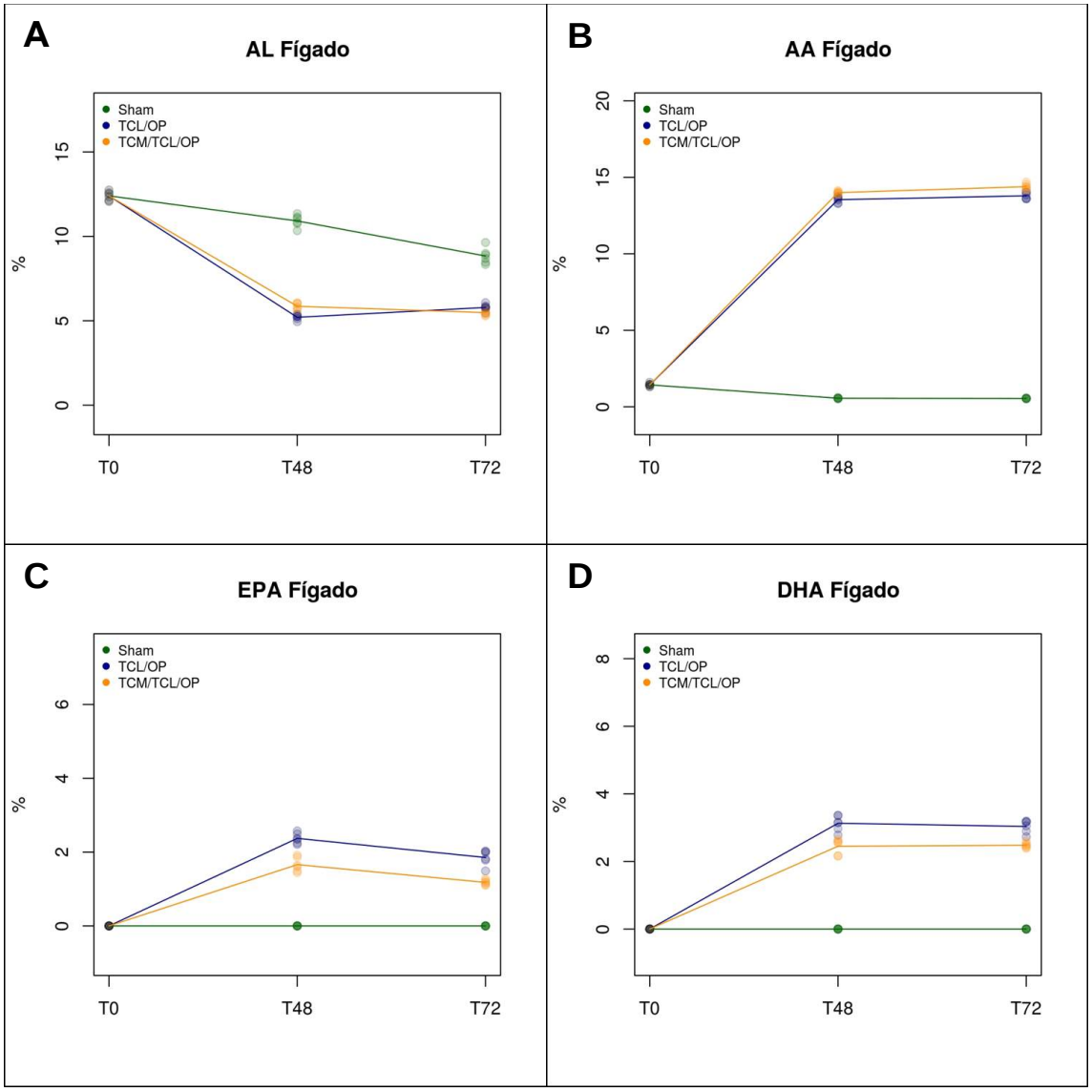


Figura 5 - Gráficos que mostram a concentração dos ácidos graxos poli-insaturados linoleico, araquidônico, eicosapentaenóico e docosahexaenóico no fígado para cada rato Lewis antes e após infusão parenteral de diferentes soluções nos períodos de 0, 48 e 72 horas.

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

5.4. Avaliação da razão AGPIs ω-3:ω-6

A razão entre AGPI ω-3:ω-6 foi calculada por meio da soma dos valores absolutos de EPA e DHA (ω-3) dividida pela soma dos valores absolutos de AL e AA (ω-6).

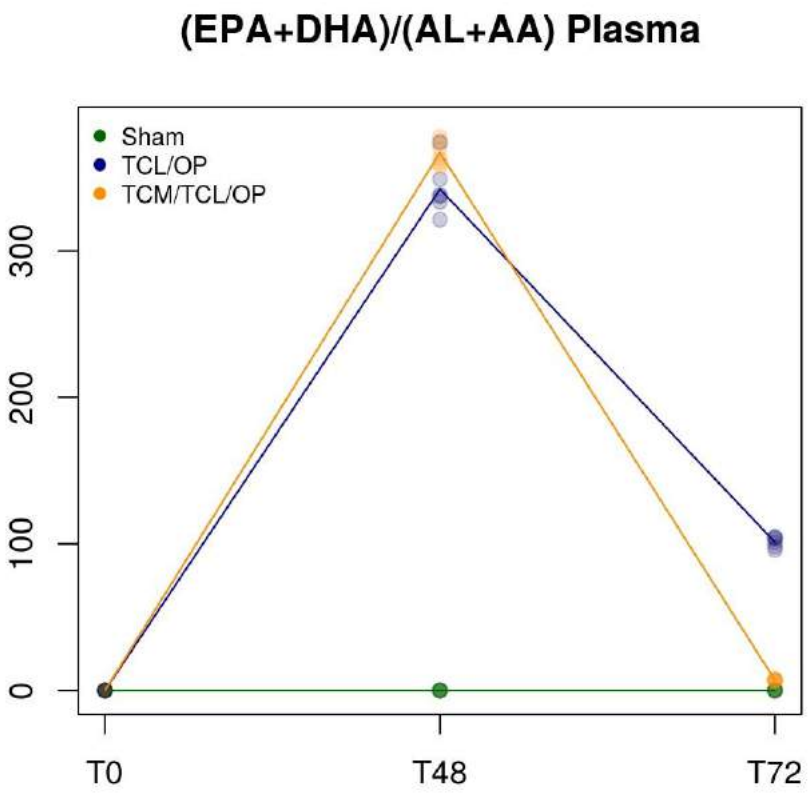
Como não detectamos presença dos AGPIS ω-3 nos leucócitos mononucleares e polimorfonucleares em alguns tempos estudados, não foi possível calcular a razão nessas células. Dessa forma, apresentaremos os dados de plasma e fígado dos animais.

5.4.1. Plasma

A dinâmica da razão entre ω-3:ω-6 entre os tempos estudados e os grupos, está ilustrada no gráfico 1.

Observamos que, após 48h de infusão das ELs, a razão encontrada no plasma dos ratos foi maior no grupo TCM/TCL/OP do que no grupo TCL/OP ($p = 0,03$). Após 72h de infusão, a razão diminuiu significativamente nos dois grupos, sendo maior no grupo TCL/OP do que no grupo TCM/TCL/OP .

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



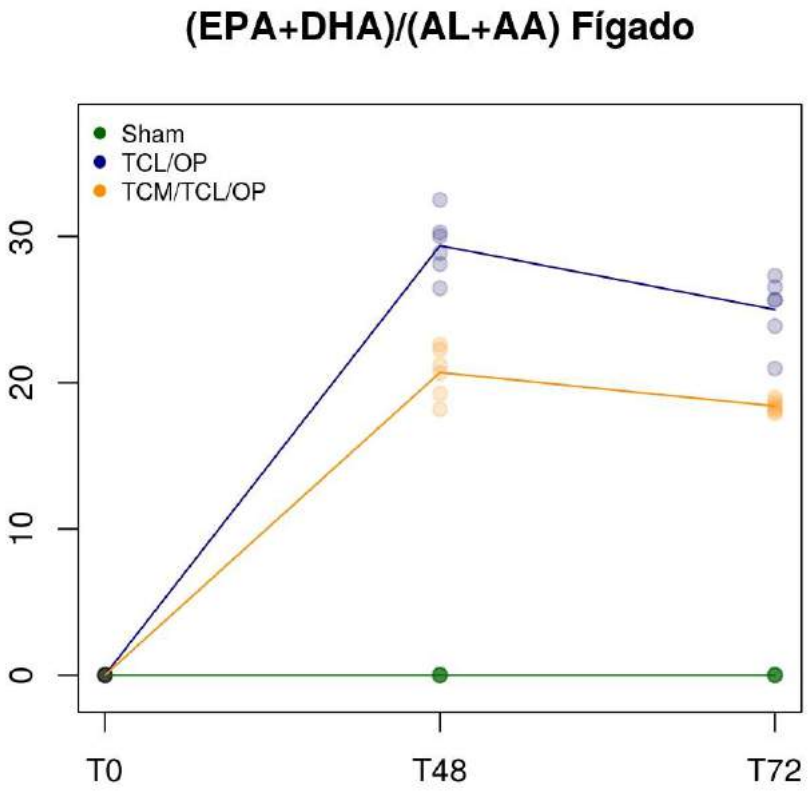
Legenda – EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenóico; AL: ácido linoleico; AA: ácido araquidônico SI: sem infusão; TCL/OP: infusão de emulsão lipídica (EL) composta de óleo de soja + óleo de peixe; TCM/TCL/OP: infusão de EL composta de óleo de peixe + óleo de soja + triglicérides de cadeia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

5.4.2. Fígado

A razão ω-3:ω-6 foi significativamente maior no grupo TCL/OP em relação ao grupo TCM/TCL/OP após 48 (p = 0,0022) e 72 horas (p = 0,0022) de infusão das ELs, como mostra o gráfico 2

Também observamos diferenças entre os tempos estudados. A razão foi maior no tempo 48h do que no tempo 72h, tanto no grupo TCL/OP (p = 0,001) quanto no grupo TCM/TCL/OP (p = 0,03).

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



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

5.5. Avaliação da razão EPA:AA

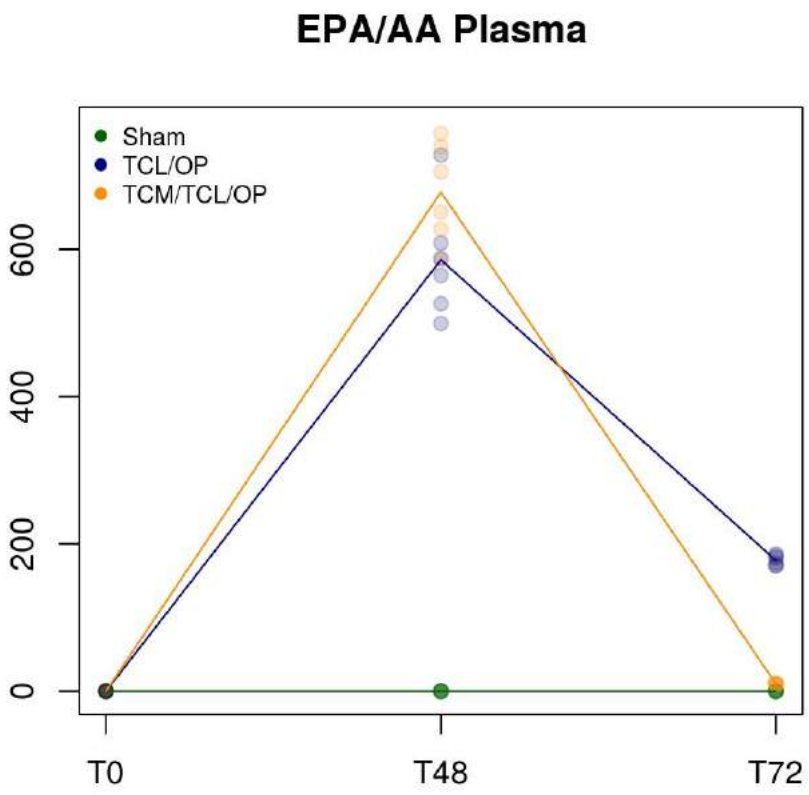
A razão entre EPA:AA foi calculada dividindo-se o valor absoluto encontrado de EPA pelo valor absoluto encontrado de AA. Como não encontramos EPA nos leucócitos em todos os tempos, esses dados também serão demonstrados apenas em fígado e plasma.

5.5.1. Plasma

Observamos que a razão EPA:AA no plasma aparentou ser maior no grupo TCM/TCL/OP do que no grupo TCL/OP após 48 horas de infusão, entretanto, essa diferença entre os grupos não foi significativa ($p = 0,06$) devido à grande variação entre os indivíduos que pode ser observada no gráfico 3.

Após 72 horas de infusão, a razão entre EPA:AA no plasma comportou-se de maneira semelhante à razão ω-3:ω-6 no mesmo fluido: diminuiu significativamente nos dois grupos, chegando a 0 no grupo TCM/TCL/OP, e, portanto, foi maior no grupo TCL/OP neste tempo.

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



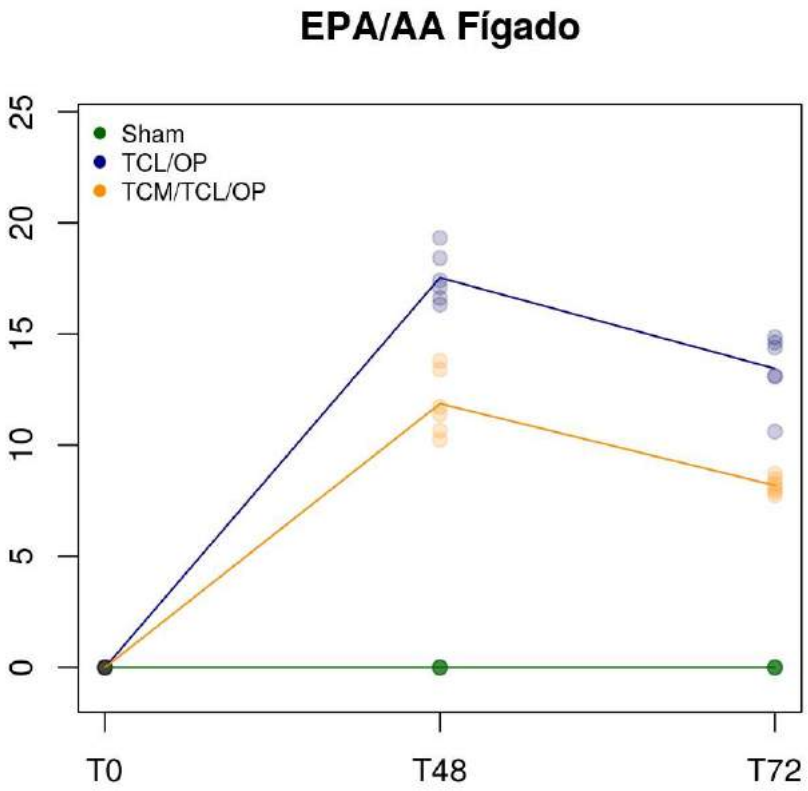
Legenda – EPA: ácido eicosapentaenoico; AA: ácido araquidônico SI: sem infusão; TCL/OP: infusão de emulsão lipídica (EL) composta de óleo de soja + óleo de peixe; TCM/TCL/OP: infusão de EL composta de óleo de peixe + óleo de soja + triglicérides de cadeia média; T0: animais sem infusão (controle basal);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

5.5.2. Fígado

No fígado, a razão entre EPA:AA foi significativamente maior no grupo TCL/OP em relação ao grupo TCM/TCL/OP após 48 (p = 0,0022) e 72 horas (p = 0,0022) de infusão das ELs.

Após 72 horas de infusão, a razão diminuiu significativamente nos dois grupos que receberam infusão de EL (p = 0,0022), mas ainda foi maior no grupo TCL/ OP do que no grupo TCM/TCL/OP (p = 0,0022). Esta dinâmica está ilustrada no gráfico 4.

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



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

6 Discussão

6. DISCUSSÃO

6.1. Do método

O presente estudo experimental buscou verificar se a infusão parenteral de uma emulsão lipídica contendo associação de TCM com óleo de peixe aumenta a biodisponibilidade de AGPI ω -3 em distintos tecidos de ratos Lewis, em termos de quantidade e tempo. O delineamento experimental do estudo incluiu diferentes grupos a fim de determinar o perfil basal de AGPIs em leucócitos, fígados e plasma. Como grupo controle, utilizamos animais infundidos com ELP de perfil lipídico muito similar à EL teste, com exceção de seu conteúdo de TCM, o que permitiu observar efeitos específicos das duas emulsões sobre a biodisponibilidade leucocitária dos AGPIs ω -3.

O delineamento experimental do presente estudo foi inspirado pelo trabalho de Hagi e colaboradores [29]. Os referidos autores avaliaram em esplenócitos, células brancas e vermelhas do sangue e leucócitos polimorfonucleares peritoneais a velocidade de incorporação de AGPIs ω -3. Isto foi feito após a infusão parenteral contínua de diferentes formulações de nutrição parenteral total (composição: 4,3 g de gordura; 36,3 g de glicose e 6,2 g de aminoácidos por kg de peso corporal) que diferiram entre si pelas diferentes razões entre ω -3 e ω -6 que cada formulação apresentou. Entretanto, nenhuma das formulações estudadas por Hagi et al contiveram TCM em sua composição [29].

Uma característica comum dos ácidos graxos de cadeia média (AGCM) é a sua captação e ativação intramitocondrial parcialmente independente de carnitina e, portanto, garantindo clareamento plasmático mais rápido do que os

ácidos graxos de cadeia longa (AGCL). Em comparação aos AGCL, os AGCM apresentam metabolismo mais simples e mais orientado em direção à oxidação e, uma vez no interior da mitocôndria, são substrato para a maquinaria da beta-oxidação e síntese de energia (figura 14), liberando os AGPIs ω-3 para incorporar em membranas celulares e lá exercerem suas propriedades na modulação do sistema imunológico [36,37]

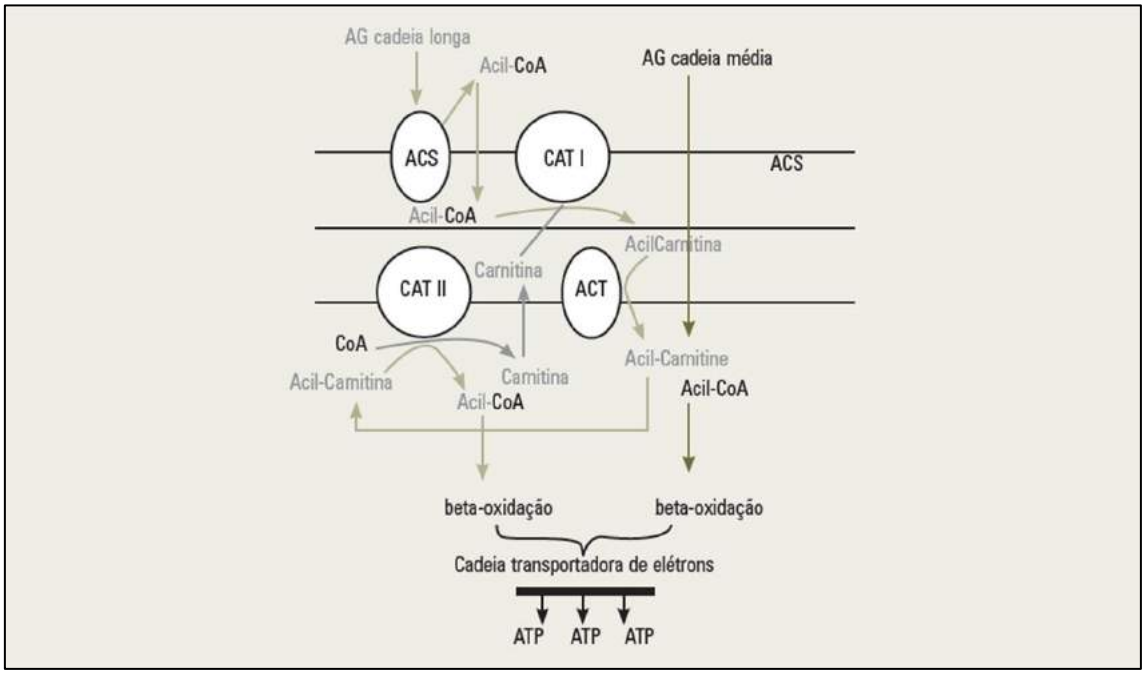


Figura 6 - Transporte de ácidos graxos de cadeia média sem necessidade de carnitina e de cadeia longa com auxílio de carnitina, mediado pela ação de carnitina aciltransferase I e II.

Fonte: Campos LN, Torrinhas RSMM, Antunes MS, Waitzberg DL. Gorduras. *In*: Waitzberg DL. Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. Vol 1. 5 ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2017:135 - 160.[36]

Estudos clínicos conduzidos por Carpentier e seus colaboradores, demonstraram benefício na adição de TCM à EL em termos de aumento na velocidade de incorporação de EPA em leucócitos. Entretanto, essas observações diferem do presente estudo pela metodologia de infusão parenteral realizada, injeção única ou em bolo, enquanto utilizamos infusão parenteral

contínua em animais [24,25]. A oferta continuada de EPA com e sem TCM poderia alterar a cinética de incorporação de AGPIs ω-3.

Nosso estudo apresenta uma limitação metodológica. Ocorre que a quantidade de leucócitos no sangue de um rato adulto de aproximadamente 350 gramas é insuficiente para permitir a análise de ácidos graxos em cromatografo gasoso. Para contornar esta dificuldade, optamos por utilizar um *pool* de leucócitos para esta análise. Estudos nessa área, de forma geral, optam por analisar a incorporação celular destes AGs em plaquetas ou células vermelhas do sangue por serem mais numerosas, contudo estas não refletem a incorporação em células leucocitárias mono e polimorfonucleares consideradas agentes importantes em estado inflamatório. Destaca-se aqui que o uso de animais isogênicos viabiliza uma resposta mais uniforme desses animais, reduzindo o viés da análise em *pool*. Além disso, todas as demais análises plasmáticas e teciduais foram feitas em separado para cada animal.

Observamos que outras pesquisas experimentais nesta mesma área utilizam número semelhante de animais que o do presente estudo, mas não isogênicos, a exemplo de Barros e colaboradores que conduziram estudo para comparar vias de administração parenteral e enteral de emulsão lipídica na incorporação de AGPI ω -3 em células brancas, vermelhas, tecido adiposo, fígado, pulmão e coração de ratos Wistar (n = 6 animais por grupo) [38]. Neste sentido, estamos confortáveis com a determinação do tamanho da amostra estudada, pois a similaridade genética leva à uniformidade fenotípica, de modo que menos animais são necessários em um experimento para atingir um dado nível de poder estatístico.

Para a análise do perfil plasmático, leucocitário e hepático de AGPIs foram aplicadas técnicas referência e de última geração. Diversos estudos da literatura utilizaram-se de cromatografia gasosa em estudos com AGPIs ω-3, para avaliar sua incorporação em diversos tipos celulares, principalmente, células do sangue [27,29,38-42]. A abordagem analítica por nós adotada incluiu a identificação de AGPIs ω-3 EPA e DHA, importante para que efeitos imunomoduladores favoráveis ocorram, e também dos AGPIs ω-6 AL e AA e das razões entre ω-3:ω-6 e EPA:AA, que podem refletir a propensão celular para a síntese de eicosanoides mais ou menos inflamatórios.

A quantidade de gordura ofertada por via parenteral (4,3 g de gordura / kg de peso corporal) foi a mesma utilizada por Hagi e colaboradores[29], que garante o aporte diário de ácidos graxos essenciais recomendados pela AIN-93 para roedores [33]. Esta quantidade, maior do que a comumente utilizada em estudos com humanos (0,2 g / kg / dia), deve-se ao fato de que a lipase lipoproteica, enzima com função conhecida de hidrolisar moléculas de triglicérides encontradas nas partículas de lipoproteínas, ser mais ativa nos ratos do que nos seres humanos, aumentando assim a necessidade deste nutriente para esses animais [43,44].

Chama atenção que os animais no estudo de Hagi e cols foram alimentados com ração livre de ácidos graxos essenciais duas semanas antes e durante o estudo, com o objetivo de causar depleção orgânica desses AGs nos ratos [29]. Entendemos que tais resultados sejam difíceis de extrapolar para a prática clínica, uma vez que causar depleção de ácidos graxos essenciais pode acarretar em diversos prejuízos ao paciente, e que, dificilmente, encontraremos um paciente sem ingestão de algum tipo de AG durante semanas, independente

da sua qualidade. Dessa forma, optamos por manter, durante todo o período do estudo, a oferta da ração padrão, com composição respeitando às preconizadas pela AIN-93 para ratos adultos.

É fato que a ração padrão que oferecemos aos animais possui AGPIs ω-3 em sua composição, o que poderia repercutir nos achados do presente estudo. Entretanto, alguns pontos devem ser considerados: o primeiro é o de que a quantidade de ω-3 presente na ração é muito baixa (0,05%) e está na forma de ácido alfa linolênico (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 controle, sem infusão, também foram alimentados com a mesma dieta.

6.2. Dos resultados

As análises de cromatografia gasosa revelaram que existem diferenças significativas em todos os tempos estudados com infusão de EL contendo OP com relação àquela dos grupos controle basal e controle sem infusão. Após a infusão das duas ELs (TCM/TCL/OP e TCL / OP) durante 48 e 72 horas, as concentrações de AGPI ω-3 (EPA e DHA) aumentaram, enquanto as de ω-6 (AA + AL) diminuíram no fígado, plasma e leucócitos mononucleares e polimorfonucleares. As concentrações de AGs nos grupos controles permaneceram praticamente estáveis. Dessa forma, o efeito da administração de EL contendo OP está alinhado com outros estudos que investigaram a

incorporação de AGPIs em fosfolipídios séricos e membranas celulares após a administração de ELs [42,45-48].

Nossa investigação discorda do efeito favorável da adição de TCM à EL contendo OP. Observamos que em nenhum dos tecidos por nós estudados houve maior incorporação dos AGPIs ω-3 no grupo que recebeu TCM/TCL/OP em comparação ao grupo que recebeu EL sem adição de TCM. Até onde vai nosso conhecimento, não encontramos disponíveis na literatura, estudos que tenham comparado ELs com OP com e sem TCM. Os estudos conduzidos por Carpentier e colaboradores que demonstraram rápido enriquecimento de AGPI ω-3 em fosfolípides celulares avaliaram injeções intravenosas, em bolo, de EL com ou sem OP, mas ambas continham TCM [24,25].

Com relação aos tempos de infusão das ELs, nossos resultados indicam que a incorporação leucocitária de AGPIs ω-3 atingiu seu pico após 48 horas de infusão e diminuiu após 72 horas, discordando dos dados apresentados por Hagi e colaboradores, que encontraram pico máximo de incorporação após 72 horas de infusão [29]. Nossa hipótese para explicar estes achados considera que o estresse inflamatório ocasionado pela intervenção cirúrgica para a colocação do cateter venoso central seja de grau leve a moderado, e que não teria sido suficiente para estimular a avidez das células leucocitárias por AGPIs para eventual produção de mediadores inflamatórios. Uma vez que estas células poderiam estar em *steady-state,* possivelmente rejeitariam a entrada de AGPIs além do necessário para manter suas funções celulares ativas. Essa hipótese pode ser corroborada pelos nossos achados em fígado e plasma. Enquanto no fígado manteve-se estável incorporação AGPIs, a concentração no plasma aumentou exponencialmente, mostrando maior pico às 72 horas de infusão, o

que pode sugerir que os AGs ofertados estariam circulando e não incorporados no fígado e leucócitos. Possivelmente, analisar no futuro a incorporação desses AGs após indução de estresse inflamatório possa responder esta hipótese.

Pudemos observar uma relação inversamente proporcional entre APGIs ω-3 e ω-6 após a infusão parenteral das diferentes ELs: as concentrações de AA e AL nos leucócitos polimorfonucleares e no plasma diminuíram ao mesmo tempo em que as concentrações de EPA e DHA aumentaram nesses tecidos.

Elevados níveis de eicosanoides derivados de AA são encontrados em pacientes com sepse e em hipercatabolismo. Parte dos efeitos pró-inflamatórios e imunossupressores desses mediadores podem ser fruto de sua influência na produção de citocinas. Por exemplo, leucotrienos da série 4 aumentam a produção de IL-1, IL-2, e IL-6 e a proliferação linfocitária [49]. Por outro lado, a prostaglandina E2, apesar de induzir febre, aumentar a permeabilidade vascular e vasodilatação, também inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-2, IL-6, e TNF, que ativam funções leucocitárias [49]. Com a oferta de AGPI ω-3, a síntese de prostaglandinas e leucotrienos da série par é reduzida e, portanto, ocorre modulação favorável de citocinas inflamatórias, particularmente em humanos [11,50,51].

Os ácidos graxos das famílias ω-6 e ω-3 competem pelas enzimas envolvidas nas reações de dessaturação e alongamento da cadeia. Embora essas enzimas tenham maior afinidade pelos AGPIs ω-3, a conversão do ácido alfa-linolênico em EPA e DHA é fortemente influenciada pelos níveis de ácido linoleico presentes na dieta 35. Dessa forma, a elevação da razão ω-3:ω-6 está associada a respostas inflamatórias menos intensas e também à redução na produção de citocinas pró-inflamatórias. A razão entre ω-3:ω-6 recomendada

para promover modulação imunológica é de cerca de 1 : 2,5 conforme demonstrado por Masters e colaboradores [52]. Por outro lado, razões inferiores a 1:1 não são recomendadas. Em nosso estudo, observamos que as razões entre AGPIs ω-3:ω-6 e entre EPA:AA mostraram-se maiores nos grupos com infusão de EL, em relação ao grupo CB e ao grupo SI. Até onde pudemos verificar, não encontramos benefícios da adição de TCM em ELs contendo óleo de peixe perante alterações nas razões mencionadas.

Pudemos observar diferenças na incorporação de AGPIs entre os dois tipos de leucócitos estudados, em que pese a ausência de análise estatística. Observamos que, aparentemente, leucócitos polimorfonucleares apresentaram concentrações de APGIS w-3 mais altas do que os mononucleares. Essa diferença na incorporação celular de ácidos graxos poderia ser explicada pelo metabolismo distinto dessas células. Enquanto monócitos têm meia vida de, em média, 10 a 20 horas na circulação, a vida dos neutrófilos varia entre 6 a 7 horas na circulação. Dessa forma, os leucócitos polimorfonucleares precisam de mais lipídios incorporados em sua membrana pois estão em constante processo de replicação celular [53,54].

Alguns fatores precisam ser considerados na escolha de uma EL para uso parenteral. Um deles é a forma em que a EL está disponibilizada comercialmente. Lipidem® (B. Braun Brasil) é uma EL contendo OP, pronta para uso que pode ser diretamente infundida por via parenteral, ou adicionada a soluções de nutrição parenteral sem necessidade de manipulação farmacêutica, o que garante segurança microbiológica e de estabilidade de micelas de gordura. Omegaven® (Fresenius Kabi) está disponível apenas como suplemento de emulsão lipídica e deve ser adicionado a uma emulsão lipídica padrão, enquanto

SMOFlipid® (Fresenius Kabi) possui, também, óleo de oliva em sua composição. O quadro 1 apresenta as ELs contendo óleo de peixe disponíveis para a prática clínica.

Nome comercial	Composição
Omegaven®[a]	100% OP a 10%
Lipoplus®[b] / **Lipidem®**[b]	40% OS + 50%TCM + 10%OP a 20%
SMOFlipid®[a]	30% OS + 30%TCM + 25%OO + 15% OP a 20%

Quadro 1 - Emulsões lipídicas parenterais contendo óleo de peixe disponíveis para a pratica clínica

Legenda: a - Fresenius-Kabi; b- B. Braun Brasil / OS = Óleo de soja; TCM = triglicérides de cadeia media; OO = Óleo de Oliva; OP = Óleo de peixe.

A comparação da estabilidade, em longo prazo, de misturas parenterais três em um contendo as ELs SMOFlipid® e Lipidem®, mostrou que ambas as ELs foram estáveis, mesmo na presença de altas concentrações de eletrólitos, No entanto, Lipidem® se mostrou superior ao SMOFlipid com relação à duração de armazenamento [55].

Em pacientes cirúrgicos, a infusão parenteral de Lipidem® foi bem tolerada. Em comparação com ELP de óleo de soja, Lipidem® associa-se ao aumento nos níveis de EPA e DH em fosfolipídios plasmáticos, incorporação de EPA na membrana de hemácias e modulação favorável da produção de leucotrienos (com aumento de LTB5 e razão LTB4:LTB5 e dos níveis de antioxidantes plasmáticos); além disso, há evidências de diminuição do tempo de internação hospitalar [42,56].

Em conjunto, e nas condições da presente investigação, nossos dados sugerem que não houve benefício da adição de TCM em termos de incorporação

de AGPI ω-3 nos leucócitos, fígado e plasma de ratos. Estudos que considerem a indução de estresse inflamatório poderiam ajudar a elucidar se essa dinâmica muda com a presença de inflamação.

7 CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Nas condições da presente pesquisa, em que ratos foram previamente submetidos à cateterização venosa central para infusão de emulsão lipídica rica em óleo de peixe contendo ou não triglicérides de cadeia média por 48 ou 72 horas, podemos concluir que:

1. A presença de triglicérides de cadeia média na emulsão lipídica parenteral contendo óleo de peixe não favorece a incorporação de ácidos graxos, em maior quantidade, em leucócitos mono e polimorfonucleares e em tecido hepático, mas aumenta sua concentração no plasma;
2. A presença de triglicérides de cadeia média na emulsão lipídica parenteral contendo óleo de peixe não favorece a incorporação de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 em menor tempo de infusão em leucócitos mononucleares e polimorfonucleares, fígado e plasma.

8 ANEXOS

8. ANEXOS

8.1. Anexo A – Aprovação CEUA

MEDICINA

USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

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

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

Pesquisador (a) Responsável: Dan Linetzky Waitzberg

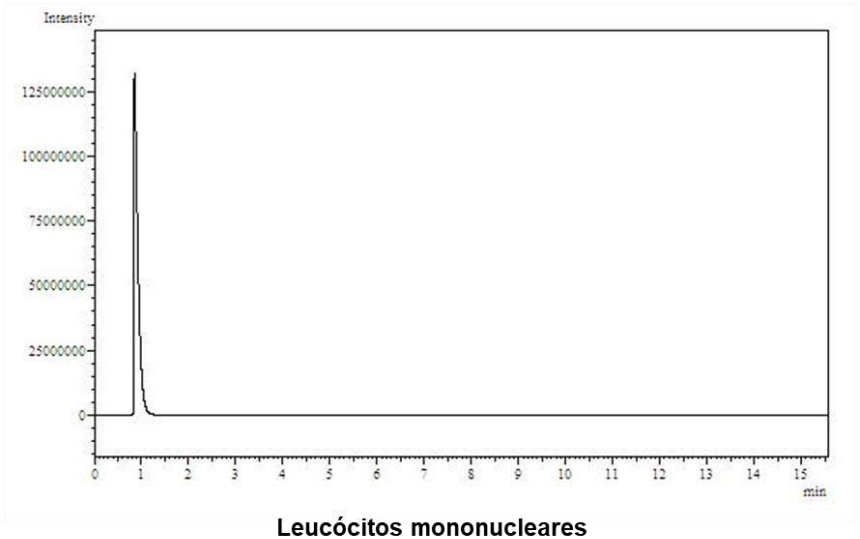
Pesquisador (a) Executante: Alweyd Tesser de Morais

CEUA-FMUSP, 08 de Abril de 2015

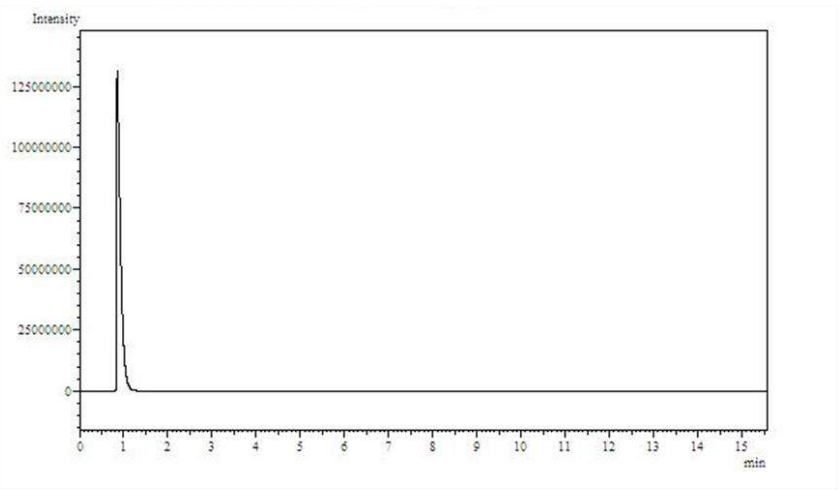
Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

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

8.2. Anexo B – Estudo piloto para a determinação da quantidade de animais necessária para obter amostra suficiente de leucócitos para análise cromatográfica.



Leucócitos mononucleares



Leucócitos polimorfonucleares

Figura 7 - Cromatograma do perfil de ácidos graxos poli-insaturados de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares obtidos de um rato

A quantidade de células mononucleares e polimorfonucleares obtidas de 1 animal foi insuficiente para boa leitura de cromatograma, como mostra a figura 7.

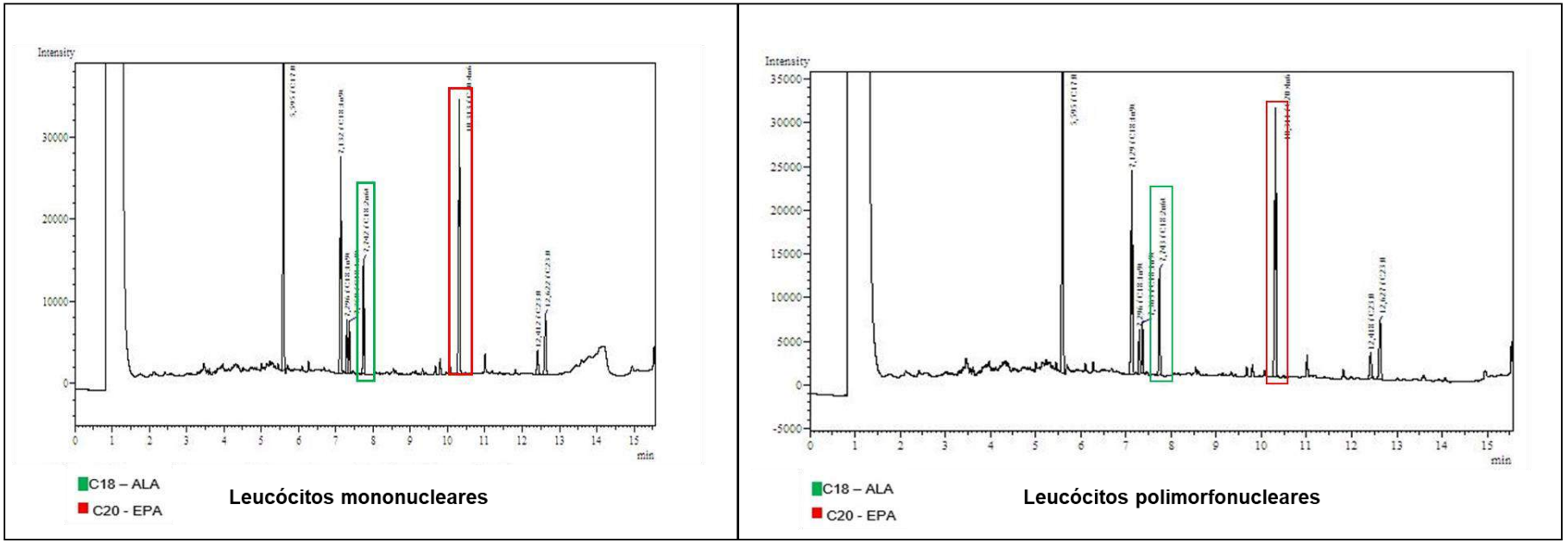


Figura 8 - Cromatograma do perfil de ácidos graxos poli-insaturados de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares obtidos de dois ratos

Os cromatogramas obtidos da leitura de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares em *pools* de 2 (Figura 8) e três ratos (Figura 9) apresentaram boas condições de leitura. No entanto, a amostra com 3 ratos possibilitou a melhor separação dos picos.

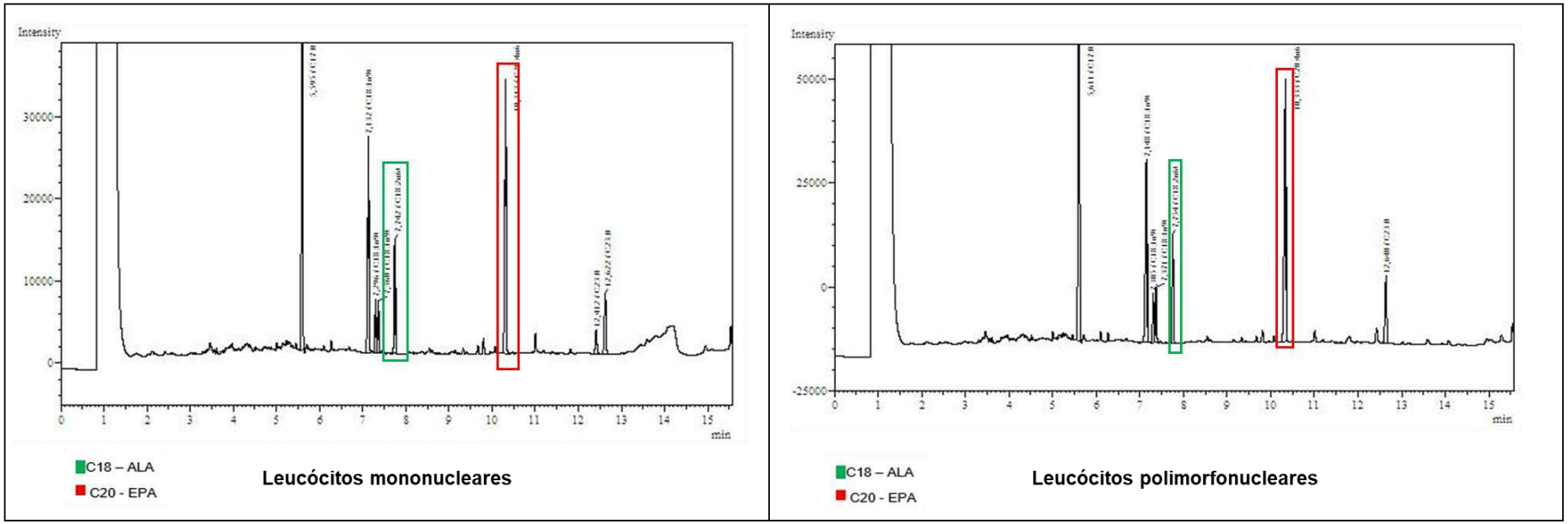


Figura 9 - Cromatograma do perfil de ácidos graxos poli-insaturados de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares obtidos de três ratos

8.3. Anexo C – Composição de ácidos graxos da ração AIN-93 M 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 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

9 REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

1. Waitzberg DL, Torrinhas RS. Fish oil lipid emulsions and immune response: what clinicians need to know. Nutr Clin Pract. 2009;24(4):487-99.

2. Pawlosky RJ, Hibbeln JR, Novotny JA, Salem N, Jr. Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans. J Lipid Res. 2001;42(8):1257-65.

3. Calder PC, Deckelbaum RJ. Dietary lipids: more than just a source of calories. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 1999;2(2):105-7.

4. Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A, Arita M, Tjonahen E, Gotlinger KH, et al. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. J Immunol. 2005;174(7):4345-55.

5. Fredman G, Serhan CN. Specialized proresolving mediator targets for RvE1 and RvD1 in peripheral blood and mechanisms of resolution. Biochem J. 2011;437(2):185-97.

6. Spite M, Norling LV, Summers L, Yang R, Cooper D, Petasis NA, et al. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. Nature. 2009;461(7268):1287-91.

7. Hasturk H, Kantarci A, Goguet-Surmenian E, Blackwood A, Andry C, Serhan CN, et al. Resolvin E1 regulates inflammation at the cellular and tissue level and restores tissue homeostasis in vivo. J Immunol. 2007;179(10):7021-9.

8. Titos E, Rius B, Gonzalez-Periz A, Lopez-Vicario C, Moran-Salvador E, Martinez-Clemente M, et al. Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype. J Immunol. 2011;187(10):5408-18.

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

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

11. Meydani SN, Endres S, Woods MM, Goldin BR, Soo C, Morrill-Labrode A, et al. Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. J Nutr. 1991;121(4):547-55.

12. Hao W, Wong OY, Liu X, Lee P, Chen Y, Wong KKY, et al. ω-3 fatty acids suppress inflammatory cytokine production by macrophages and hepatocytes. Journal of Pediatric Surgery. 2010;45(12):2412-8.

13. Sierra S, Lara-Villoslada F, Olivares M, Jimenez J, Boza J, Xaus J. [Il-10 expression is involved in the regulation of the immune response by omega 3 fatty acids]. Nutr Hosp. 2004;19(6):376-82.

14. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature. 2008;454(7203):428-35.

15. Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. Biochim Biophys Acta. 2011;1812(8):1007-22.

16. Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, et al. 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(45):32048-54.

17. Siddiqui RA, Harvey KA, Zaloga GP, Stillwell W. Modulation of lipid rafts by Omega-3 fatty acids in inflammation and cancer: implications for use of lipids during nutrition support. Nutr Clin Pract. 2007;22(1):74-88.

18. Shaikh SR, Rockett BD, Salameh M, Carraway K. Docosahexaenoic acid modifies the clustering and size of lipid rafts and the lateral organization and surface expression of MHC class I of EL4 cells. J Nutr. 2009;139(9):1632-9.

19. Kim W, Fan YY, Barhoumi R, Smith R, McMurray DN, Chapkin RS. n-3 polyunsaturated fatty acids suppress the localization and activation of signaling proteins at the immunological synapse in murine CD4+ T cells by affecting lipid raft formation. J Immunol. 2008;181(9):6236-43.

20. van der Meij BS, van Bokhorst-de van der Schueren MA, Langius JA, Brouwer IA, van Leeuwen PA. n-3 PUFAs in cancer, surgery, and critical care: a systematic review on clinical effects, incorporation, and washout of oral or enteral compared with parenteral supplementation. Am J Clin Nutr. 2011;94(5):1248-65.

21. Torrinhas R, Waitzberg D. Major abdominal surgery can lead to an excessive systemic inflammatory response, which in turn increases the risk of postoperative complications and multiple organ failure. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 35. United States2011. p. 292-4.

22. De Nardi L, Bellinati-Pires R, Torrinhas RS, Bacchi CE, Arias V, Waitzberg DL. Effect of fish oil containing parenteral lipid emulsions on neutrophil chemotaxis and resident-macrophages' phagocytosis in rats. Clin Nutr. 2008;27(2):283-8.

23. 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 Suppl 1:S83-8.

24. Carpentier YA, Portois L, Malaisse WJ. Rapid enrichment of cell phospholipids in long-chain polyunsaturated omega-3 fatty acids after a bolus intravenous injection of a medium-chain triacylglycerol: fish oil emulsion in humans. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2012;36(6):671-6.

25. Carpentier YA, Hacquebard M, Portois L, Dupont IE, Deckelbaum RJ, Malaisse WJ. Rapid cellular enrichment of eicosapentaenoate after a single intravenous injection of a novel medium-chain triacylglycerol:fish-oil emulsion in humans. Am J Clin Nutr. 2010;91(4):875-82.

26. Waitzberg DL, Torrinhas RS, Jacintho TM. New parenteral lipid emulsions for clinical use. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2006;30(4):351-67.

27. Senkal M, Geier B, Hannemann M, Deska T, Linseisen J, Wolfram G, et al. Supplementation of omega-3 fatty acids in parenteral nutrition beneficially alters phospholipid fatty acid pattern. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2007;31(1):12-7.

28. de Miranda Torrinhas RS, Santana R, Garcia T, Cury-Boaventura MF, Sales MM, Curi R, et al. Parenteral fish oil as a pharmacological agent to modulate post-operative immune response: a randomized, double-blind, and controlled clinical trial in patients with gastrointestinal cancer. Clin Nutr. 2013;32(4):503-10.

29. 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.

30. 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.

31. 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):3-8.

32. Versleijen M, Roelofs H, Preijers F, Roos D, Wanten G. Parenteral lipids modulate leukocyte phenotypes in whole blood, depending on their fatty acid composition. Clin Nutr. 2005;24(5):822-9.

33. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr. 1993;123(11):1939-51.

34. Shirai T, Matsuzaki K, Kuzumoto M, Nagahisa K, Furusawa C, Shioya S, et al. Precise metabolic flux analysis of coryneform bacteria by gas chromatography-mass spectrometry and verification by nuclear magnetic resonance. J Biosci Bioeng. 2006;102(5):413-24.

35. 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.

36. Campos LN, Torrinhas RSMM, Antunes MS, Waitzberg DL. Gorduras. In: Waitzberg DL, editor. Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. 1. 5 ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2017. p. 135 - 60.

37. Schönfeld P, Wojtczak L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. J Lipid Res. 2016;57(6):943-54.

38. Barros KV, Carvalho PO, Cassulino AP, Andrade I, West AL, Miles EA, et al. Fatty acids in plasma, white and red blood cells, and tissues after oral or intravenous administration of fish oil in rats. Clin Nutr. 2013;32(6):993-8.

39. 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;36(1):302-8.

40. Seppänen-Laakso T, Laakso I, Hiltunen R. Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. Analytica Chimica Acta. 2002;465(1-2):39-62.

41. Fisk HL, West AL, Childs CE, Burdge GC, Calder PC. The Use of Gas Chromatography to Analyze Compositional Changes of Fatty Acids in Rat Liver Tissue during Pregnancy. J Vis Exp2014.

42. Koller M, Senkal M, Kemen M, Konig W, Zumtobel V, Muhr G. Impact of omega-3 fatty acid enriched TPN on leukotriene synthesis by leukocytes after major surgery. Clin Nutr. 2003;22(1):59-64.

43. Lai HC, Ney DM. Corn oil, palm oil and butterfat fractions affect postprandial lipemia and lipoprotein lipase in meal-fed rats. J Nutr. 1995;125(6):1536-45.

44. S. Perona J, Ruiz-Gutiérrez V. Two highly monounsaturated oils, olive oil and high-oleic sunflower oil, induce different triacylglycerol molecular species distribution in rat liver. Nutrition Research. 1998;18(10):1723-32.

45. Culine S, Chambrier C, Tadmouri A, Senesse P, Seys P, Radji A, et al. Home parenteral nutrition improves quality of life and nutritional status in patients with cancer: a French observational multicentre study. Support Care Cancer. 2014;22(7):1867-74.

46. Grimm H, Tibell A, Norrlind B, Blecher C, Wilker S, Schwemmle K. Immunoregulation by parenteral lipids: impact of the n-3 to n-6 fatty acid ratio. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 1994;18(5):417-21.

47. Wachtler P, Konig W, Senkal M, Kemen M, Koller M. Influence of a total parenteral nutrition enriched with omega-3 fatty acids on leukotriene synthesis of peripheral leukocytes and systemic cytokine levels in patients with major surgery. J Trauma. 1997;42(2):191-8.

48. Carpentier YA, Hacquebard M. Intravenous lipid emulsions to deliver omega 3 fatty acids. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2006;75(3):145-8.

49. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids and cytokine production in health and disease. Ann Nutr Metab. 1997;41(4):203-34.

50. Endres S, Ghorbani R, Kelley VE, Georgilis K, Lonnemann G, van der Meer JW, et al. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. N Engl J Med. 2018;320(5):265-71.

51. Meydani SN. Modulation of cytokine production by dietary polyunsaturated fatty acids. Proc Soc Exp Biol Med. 1992;200(2):189-93.

52. Masters C. Omega-3 fatty acids and the peroxisome. Mol Cell Biochem. 1996;165(2):83-93.

53. Li KJ, Wu CH, Shen CY, Kuo YM, Yu CL, Hsieh SC. Membrane Transfer from Mononuclear Cells to Polymorphonuclear Neutrophils Transduces Cell Survival and Activation Signals in the Recipient Cells via Anti-Extrinsic Apoptotic and MAP Kinase Signaling Pathways. PLoS One. 2016;11(6):e0156262.

54. Morlion BJ, Torwesten E, Lessire H, Sturm G, Peskar BM, Furst P, et al. The effect of parenteral fish oil on leukocyte membrane fatty acid composition and leukotriene-synthesizing capacity in patients with postoperative trauma. Metabolism. 1996;45(10):1208-13.

55. Janu M, Brodska H, Vecka M, Masteikova R, Kotrlikova E, Lazauskas R, et al. Comparison of long-term stability of parenteral all-in-one admixtures containing new lipid emulsions prepared under hospital pharmacy conditions. Medicina (Kaunas). 2011;47(6):323-33.

56. Wichmann MW, Thul P, Czarnetzki HD, Morlion BJ, Kemen M, Jauch KW. Evaluation of clinical safety and beneficial effects of a fish oil containing lipid emulsion (Lipoplus, MLF541): data from a prospective, randomized, multicenter trial. Crit Care Med. 2007;35(3):700-6.

10 APÊNDICES

10. APÊNDICES

10.1. APÊNDICE A - Apresentação do estudo em formato de pôster no 14º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN, realizado em São Paulo em agosto de 2017.

sban

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

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

Certificado

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

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

São Paulo, 31 de agosto de 2017.

ANTONIO HERBERT LANCHA JUNIOR
Presidente do Congresso

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

realização
sban
Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição