



**PROGRAMA DE APRIMORAMENTO
PROFISSIONAL**

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS

FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO ADMINISTRATIVO -
FUNDAP



CAMILA SANCHES MANCA

Efeitos dos ácidos graxos de diferentes óleos vegetais no
metabolismo lipídico e estresse oxidativo em ratos
alimentados com dieta hiperlipídica rica em frutose.

Ribeirão Preto/ SP

2015



PROGRAMA DE APRIMORAMENTO
PROFISSIONAL

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS

FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO ADMINISTRATIVO -
FUNDAP



CAMILA SANCHES MANCA

Efeitos dos ácidos graxos de diferentes óleos vegetais no
metabolismo lipídico e estresse oxidativo em ratos alimentados com
dieta hiperlipídica rica em frutose

Monografia apresentada ao Programa de Aprimoramento Profissional/CRH/SES-SP e FUNDAP, elaborada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP/ Departamento de Clínica Médica

Área: Especialização em Nutrição

Orientador: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior

Supervisor: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior

Supervisor (titular) – Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior

Ribeirão Preto/ SP

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Manca, Camila Sanches

Efeitos dos ácidos graxos de diferentes óleos vegetais no metabolismo lipídico e estresse oxidativo em ratos alimentados com dieta hiperlipídica rica em frutose.

12 p. : il. ; 30cm

Monografia , apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Especialização em Nutrição

Orientador: Alceu Afonso Jordão Junior.

1. esteatose hepática não-alcoólica. 2. ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados. 3. frutose; 4. ratos.

RESUMO

A crescente incidência de obesidade e comorbidades vinculadas a esta têm ganhado atenção em políticas de Saúde Pública e na pesquisa. O elevado consumo de frutose junto a uma dieta hiperlipídica parece estar diretamente ligada a essas comorbidades, em especial a esteatose hepática. O consumo de óleos vegetais ricos em gorduras monoinsaturadas e poli-insaturadas tem se mostrado benéfico para o tratamento e prevenção dessas comorbidades, porém existem poucos estudos relacionando o uso de tais óleos. Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo avaliar o consumo de óleos vegetais ricos em MUFAs e PUFAs usados comercialmente na prevenção da esteatose hepática analisando parâmetros do metabolismo lipídico hepático e sérico, estresse oxidativo e resistência à insulina.

Materiais e métodos: Inicialmente ratos *wistar* machos foram separados em cinco grupos: Grupo HL * Hiperlipídica, na qual recebeu 50 % de gordura animal; Grupo HL * AZ que receberão 25 % de gordura animal e 25 % de azeite extra virgem; Grupo HL* CN na qual receberão 25 % de gordura animal e 25 % de óleo de canola; Grupo HL* M na qual receberão 25 % de gordura animal e 25 % de óleo de milho; Grupo HL * S na qual receberão 25 % de gordura animal e 25 % de óleo de soja. As análises realizadas serão para verificação de parâmetros lipídicos, estresse oxidativo e resistência à insulina.

Palavras-chave: Esteatose Hepática não alcoólica, Frutose, Hiperlipídica, Ácidos graxos Monoinsaturados, Ácidos Graxos Poliinsaturados.

1.0 INTRODUÇÃO

A doença hepática não alcoólica (NAFLD) em especial é caracterizada pela incorporação citoplasmática primariamente de triglicerídeos (TG) no fígado em indivíduos que consomem menos que 30 g/dia de etanol em homens e 20 g/dia em mulheres, não sendo afetados por outras causas do fígado gorduroso, tais como consumo de drogas ou exposição a toxinas (ZIVKOVIC; GERMAN; SANYAL, 2007; DIETRICH; HELLERBRAND, 2014). O tratamento da doença ainda não está escrito em um guia específico. Entre as intervenções do estilo de vida, a ingestão dietética foi encorajada com grande ênfase. (KARIN *et al*, 2014). Atualmente vem sendo discutido a composição de macronutrientes da dieta nesta patologia, que tem se mostrado tão importante quanto à perda de peso (ASRIH; JORNAYVAZ, 2014).

1.1. Óleos vegetais

Apesar da mudança dos hábitos alimentares na qual o excesso de consumo de carboidratos ou gorduras possam provocar a esteatose hepática, a proposta é que o consumo de ácidos graxos ou carboidratos específicos sejam propensos a induzir ou melhorar o quadro patológico. (ASRIH; JORNAYVAZ, 2014). Os ácidos graxos da dieta são capazes de regular várias vias metabólicas envolvidas no metabolismo lipídico principalmente através de uma fina modulação da transcrição de genes de enzimas específicas, podem não somente influenciar na patogênese mais também na prevenção ou reversão das manifestações da esteatose (JUMP, 2011; FERRAMOSCA; ZARA, 2014).

Entre os óleos vegetais usados comercialmente o azeite extra virgem é um componente básico da dieta do mediterrâneo, rico em MUFAs 73.7 g (n-9 oléico, 18:1); ácidos graxos saturados (SFA) 13.5 g (16:0 ácido palmítico); ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) 7.9 g (n-6 ácido linoleico 18:2, and n-3 alfa linolênico 18:3. Também caracterizado por seu alto poder antioxidante e rico em fitoquímicos. O óleo de canola é caracterizado pelo baixo teor SFA (7 %), alta quantidade de MUFAs (62 g), além de uma quantidade considerável de PUFAs, incluindo 61 % do ácido oleico, 21 % de ácido linoleico e 11 % de alfa- linolênico (ALA). Já o óleo de soja é caracterizado com um maior teor de SFA 14,9 %, 24, 2 % de MUFAs e 60,4 % de

PUFAs. O óleo de milho é composto por 13,3 % de SFA, 25,4 % de MUFAs e 61 % de PUFAs (MARTIN et al, 2008; LIN *et al*, 2013; FERRAMOSCA; ZARA, 2014).

Devido ao aumento gradual do consumo de frutose e gorduras saturadas levando a um quadro de obesidade e comorbidades relacionadas a esta na população humana, tem provocado o interesse e a necessidade de uma compreensão mais aprofundada dessa condição. Na literatura são escassos os trabalhos que correlacionam tais comorbidades, em especial esteatose hepática com os diferentes tipos de óleos vegetais usados comercialmente. Fica evidente o estudo mais aprofundado sobre os óleos vegetais e sua influência no quadro da patogênese.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Analisar os efeitos dos diferentes tipos de óleos vegetais ricos em MUFAs e PUFAs usados comercialmente na prevenção da esteatose hepática através da análise de parâmetros do metabolismo lipídico hepático e sérico, estresse oxidativo e resistência á insulina.

2.2. Objetivos específicos

- I. Analisar alterações na composição lipídica através da gordura total hepática, frações lipídicas hepáticas e séricas;
- II. Determinar o perfil hepático dos ácidos graxos submetidos às diferentes dietas experimentais
- III. Avaliar a ação dos óleos vegetais na esteatose hepática, resistência à insulina;
- IV. Analisar alterações no sistema antioxidante através da determinação de vitamina E, glutathiona reduzida e no estresse oxidativo através da peroxidação lipídica (Malondialdeído - MDA).
- V. Analisar o comprometimento hepático através das enzimas transaminases séricas (AST e ALT)

3. Materiais e Métodos

Este trabalho será avaliado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O desenvolvimento contará com estrutura e apoio técnico do Laboratório de Nutrição e

Metabolismo, do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

3.1 Animais

Serão utilizados 50 ratos machos da linhagem *Wistar* com peso médio de 150 ± 200 g provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. As dietas serão preparadas segundo as recomendações do *American Institute of Nutrition* para a dieta AIN-93G pesadas e repostas três vezes na semana, com período de adaptação por 7 dias. Os animais receberão água e dieta à vontade durante 60 dias, e serão divididos em cinco grupos (cada grupo com $n = 10$): Grupo I – 20,25 % de frutose + Hiperlipídica (50 % de gordura saturada); (GC HL*); Grupo II – Animais que receberão 20,25 % frutose, 25 % gordura animal e 25 % de azeite de oliva extra virgem (HL *AZ); Grupo III- Animais que receberão 20,25 % % frutose, 25 % gordura animal e 25 % de óleo de canola (HL * CN); Grupo IV- Animais que receberão 20,25 % frutose, 25 % de gordura animal e 25 % de óleo de milho (HL * M); Grupo V – Animais que receberão 20,25 % de frutose, 25 % de gordura animal e 25 % de óleo de soja (HL * S).

Como as dietas são formuladas com fontes lipídicas diferentes será feito o cálculo do Índice de Peroxibilidade da Dieta, conforme descreve Pamplona *et al* (1998) A fórmula utilizada para o cálculo é descrita a seguir: $IP = (\% \text{ monoenóicos} \times 0,025) + (\% \text{ dienóicos} \times 1) + (\% \text{ trienóicos} \times 2) + (\% \text{ tetraenóicos} \times 4) + (\% \text{ pentaenóicos} \times 6) + (\% \text{ hexaenóico} \times 8)$.

A partir do consumo em cada grupo será calculado a Taxa de Eficiência da Dieta (TED): $TED = [\text{média ganho de peso diário (g)}/\text{média de consumo de dieta diário (g)}]$

Ao fim do experimento os animais serão eutanasiados por decaptação. O sangue, o fígado e o tecido adiposo foram coletados para as análises histológicas e bioquímicas. O sangue foi prontamente centrifugado a 3500 rpm, à 4°C durante 15 minutos para obtenção do soro. O fígado, o tecido adiposo epididimal e retroperitoneal serão removidos, pesados e prontamente congelados em nitrogênio líquido. As amostras serão armazenadas a -40°C para posteriores análises bioquímicas.

3.2 Análises

3.3.1 Análise Histopatológica do Fígado

Fragmentos de tecido hepático em parafina serão cortados com espessura de 4 μ m e corados com hematoxilina-eosina, com a finalidade de avaliar semi-quantitativamente a esteatose hepática, que será classificada em cruzes, segundo Kleiner *et al.* com algumas modificações. O grau de esteatose será associado com a localização morfológica.

3.3.2 Determinação da Gordura Hepática Total

A gordura total será extraída pelo método proposto por Folch *et al* (1957) a partir de 1g de tecido hepático em 20ml da solução de clorofórmio:metanol (2:1), para dosagem de triacilgliceróis hepáticos e para dosagem de colesterol os quais serão determinados com kit comercial (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil). As absorbâncias serão medidas por espectrofotômetro (SpectraMax M-5, Molecular Advices). O colesterol total, o colesterol presente na lipoproteína HDL (lipoproteína de alta densidade) e os TAG sérico e presentes na HDL serão determinados através de kits comerciais da Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil) no soro. A razão triglicerídeos/HDLcolesterol será calculada como preditor da resistência a insulina, conforme proposto por Fan *et al* (2011).

3.3.3 Determinação de Ácidos Graxos dos óleos e gordura das dietas experimentais

Os ácidos graxos dos óleos e gordura da dieta experimental serão determinados por cromatografia gasosa (SHIMADZU, GC-2014), equipado com auto-injetor AOC-20i, com coluna capilar Supelcowax de 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura de filme. O gás Hélio será utilizado como carreador, com fluxo de 1,6ml/min. O ar sintético vai ser utilizado para a ionização em chama com detecção a 250°C. As injeções serão realizadas em modo splitless. A determinação dos ácidos graxos dos óleos e gordura das dietas utilizadas irá ser adaptada de Andreoli *et al* (2007) através da extração com hexano.

3.3.4 Determinação da proteína sérica e hepática

A determinação da proteína sérica e hepática será realizada através kits comerciais, pelo método de Biureto (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil).

3.3.5 Determinação da glicemia

A glicemia dos animais será determinada a partir do soro utilizando-se o kit comercial da Labest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil).

3.3.6 Peroxidação Lipídica

Esta análise será realizada de acordo com o método proposto por Gerard-Monnier *et al* (1998), com algumas adaptações. Para a dosagem de MDA no soro serão utilizados 200µL de amostra. A determinação do MDA no fígado será realizada com a alíquota de 200µl retirada do homogenato de fígado (200mg de tecido em 1L de tampão fosfato).

3.3.7 Determinação de Glutathiona Reduzida (GSH) hepática e sérica

A dosagem de Glutathiona Reduzida (GSH) será realizada no soro e no tecido hepático de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968).

3.3.8 Determinação de retinol sérico e da vitamina E sérica e dos óleos e gordura das dietas experimentais

As análises hepáticas de vitamina E (alfa-tocoferol) e de retinol serão realizadas por HPLC, segundo método adaptado de Arnaud *et al* (1991). A razão Vitamina E/Colesterol será calculada conforme descrito por Ford *et al* (2006).

3.3.9 Determinação das concentrações séricas das Transaminases Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT)

As transaminases aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) serão determinadas em soro por meio de Kit comercial da Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil), por reação colorimétrica e leitura por espectrofotômetro (SpectraMax M-5, Molecular Advices)

4.0 Análises Estatísticas

KLEINER DE et al., Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**.Jun;41(6):1313-21., 2005 PubMed PMID: 15915461.

RAHIMI, R.S.; LANDAVERDE, C. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and the Metabolic Syndrome: Clinical Implications and Treatment. **Nutrition in Clinical Practice**. v. 28, n. 1, p. 40-51, 2013.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**. v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

SHAUNDA DURANCE-TOD, ALVIN BERGER, AND PETER JH JONES. Evidence of health benefits of canola oil. **Nutrition Reviews®** Vol. 71(6):370–385, 2013.

SI, O et al., "Chronic ethanol consumption affects glutathione status in rat liver." **J Nutr**. 128(4): 758-763, 1998

ZIVKOVIC, A.M, GERMAN, J.B, SANYAL, A.J. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. **Am J Clin Nutr**; 86:285–300, 2007.