

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DO ÓLEO DE PEIXE EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS À MUCOSITE INTESTINAL**

**EFFECTS OF SUPPLEMENTATION OF FISH OIL IN MICE SUBMITTED TO BOWEL
MUCOSITIS**

Juliana da Mata FERREIRA ¹

Erika Alessandra Melo COSTA ²

RESUMO

Objetivo: Analisar alterações no estado ponderal, e verificar os efeitos da suplementação do óleo de peixe, em camundongos submetidos à mucosite intestinal.

Métodos: Participaram do estudo 15 camundongos machos da linhagem swiss, com idade média de 02 meses. Mantidos em ambiente sobre temperatura controlada e ciclo claro escuro de 12 horas, alimentados com ração e livre acesso a água, os camundongos foram divididos em 03 grupos submetidos a 09 dias de experimentação cada grupo. O grupo controle recebeu 0,25ml de água via gavagem, o grupo suplementado com óleo de peixe recebeu via gavagem 0,25ml de óleo de peixe e indução da mucosite com o uso de 2,25ml/kg/dia de Metotrexato via subcutânea nos 3 últimos dias de experimento, o grupo Metotrexato recebeu água via gavagem e o medicamento para indução da mucosite. Todos os camundongos foram previamente anestesiados com ketamina e xilazina, para ser realizado o deslocamento cervical. Para as análises histomorfométrica, foram segmentados 3 partes do intestino. Sendo medido as vilosidades e as criptas em microscópio.

Resultados: Os grupo mucosite e óleo de peixe mucosite apresentaram manutenção do peso corporal em relação ao grupo controle. Na histomorfometria, o grupo óleo de peixe mucosite e o mucosite tiveram o comprimento das vilosidades menor em comparação ao grupo controle, e as criptas do grupo óleo de peixe mucosite tiveram seu comprimento maior que o grupo mucosite.

Conclusão: A suplementação de óleo de peixe via oral não atenuou o processo inflamatório.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Ácidos graxos poli-insaturados. Inflamação. Metotrexato.

ABSTRACT

Objective: To analyze changes in weight status and verify the effects of supplementation of fish oil in mice subjected to intestinal mucositis.

Methods: The study included 15 male mice of the Swiss strain, with a mean age of 02 months. Kept in the dark and controlled environment on a 12 hour light cycle temperature, fed with chow and free access to water, the mice were divided into 03 groups submitted to 09 days of each trial group. The control group received 0.25 ml of water by gavage, group supplemented with fish oil by gavage received 0.25 ml of fish oil and induced mucositis using 2.25 ml / kg / day subcutaneously in 3 Methotrexate last days of the experiment, methotrexate group received water by gavage and medication to induce mucositis. All mice were anesthetized with ketamine and xylazine, cervical displacement to be performed. For histomorphometric analysis were sectioned three shares of the intestine. As measured villi and crypts microscope.

Results: mucositis and mucositis fish oil group showed maintenance of body weight compared to the control group. In histomorphometry, the fish oil group mucositis and mucositis were the length of the villi lower compared to the control group, and the crypts of the fish oil group had mucositis its length greater than mucositis group.

CONCLUSION: We The omega 3 orally did not alter the progression of the inflammatory process.

INDEX TERMS: Polyunsaturated fatty acids. Inflammation. Methotrexate

¹ Acadêmica do Curso de Nutrição - Centro Universitário do Rio Grande do Norte – UNI-RN. Rua Prefeita Eliane Barros, 2000 – 59014-540, Tirol, Natal/RN, Brasil. TeleFax (84) 211-8688.
E-mail: juju_smile16@hotmail.com

² Professora, mestre em Ciências Farmacêuticas – UFRN
Curso de Nutrição - Centro Universitário do Rio Grande do Norte – UNI-RN. Natal/RN, Brasil.
E-mail: erikamelonutri@gmail.com

INTRODUÇÃO

Atualmente o consumo de suplementos nutricionais vem crescendo de forma acelerada, se tornando uma tendência, e, portanto, as pessoas vêm procurando a melhor qualidade de vida. Um dos suplementos que tem estado entre os que melhoram a qualidade de vida é o óleo de peixe. O mesmo apresenta uma importante função anti-inflamatória. (CRAVEIRO; CRAVEIRO, 2003)

Os peixes de águas profundas, como o salmão, atum e a sardinha, além de serem uma excelente fonte de proteína altamente digerível, possuem em sua composição o ômega 3 (um lipídio essencial), isso ocorre devido ao ciclo alimentar desses animais que contém como principal fonte os fito plânctons que possuem o EPA (Ácido Eicosapentaenoico) e DHA (Ácido Docosahexaenoico) (MARTIN et al, 2006).

Esses lipídios são considerados funcionais e essenciais no combate à inflamação, asma, artrite, dores de cabeça, associados no controle de doenças crônicas não transmissíveis, reduzindo os triglicerídeos sanguíneos a níveis seguros (GUTIERREZ, 1993). Sendo essa relação um tanto quanto direta já que não existe outro alimento na natureza que contenha esses ácidos graxos disponíveis de forma livre, por tanto é rapidamente incorporado por nossas membranas celulares, trazendo grandes benefícios a nossa saúde, sendo este o grande diferencial do ômega 3 (LUTTENBERG, 2009).

O EPA esta relacionado diretamente com o processo inflamatório, pois é a partir dele que são formados Prostaglandinas e leucotrienos da série ímpar, esse composto mantém inúmeras funções celulares que controlam mecanismos fisiológicos e patológicos (MARTIN et al, 2006).

O óleo de peixe possui uma ação anti-inflamatória relevante, podendo ter uma ação preventiva no tratamento da mucosite intestinal. Ainda não foram precisamente estabelecidas as concentrações mínimas do consumo de Ácidos graxos poli-insaturados de séries ômega 3, para atender as necessidades deste nutriente (PERINI et al, 2010).

A mucosite é um processo inflamatório e esta pode ser intestinal ou oral. Ela é considerada como um dos muitos efeitos colaterais decorrentes do uso de drogas antineoplásicas utilizadas no tratamento quimioterápico, levando ao comprometimento da função do aparelho gastrointestinal, devido a sua sensibilidade a ação da droga, afetando o seu normal funcionamento, ocasionando um ataque de forma desordenada

em outros órgãos, podendo resultar em uma resposta inflamatória das mucosas oral e gastrointestinal (SONIS, 1998; MOTA, 2004).

O uso do Metotrexato (MTX), que é um quimioterápico muito utilizado para o tratamento de câncer, pode causar severas disfunções, levando o paciente a um quadro clínico grave, com inúmeras ações adversas, dentre elas diarreia e má-absorção (MONTEIRO, 2006) isso ocorre devido às vilosidades intestinais estarem atrofiadas, diminuindo a área de absorção.

Estudos de Mota (2004) mostram os efeitos do Metotrexato (MTX) no intestino humano, reduzem as células após a administração, o grau de intensidade da mucosite depende basicamente do tipo de quimioterápico e das doses usadas, quando utilizadas doses intensivas, a mucosite é generalizada e severa e conduz a uma síndrome de má absorção, interferindo no estado nutricional.

Diante do exposto, o objetivo será analisar o efeito anti-inflamatório do ômega 3 em camundongos com mucosite intestinal, considerando as funções metabólicas dos animais utilizados.

MÉTODOS

Universo e Amostra

No referido trabalho foram utilizados 15 (quinze) camundongos machos, membros da classe *Mammalia*, família *Muridae*, gênero *Mus* da linhagem *mus mûsculos swiss* oriundos do biotério do Centro Universitário do Rio Grande do Norte (UNI-RN), no período de outubro de 2012.

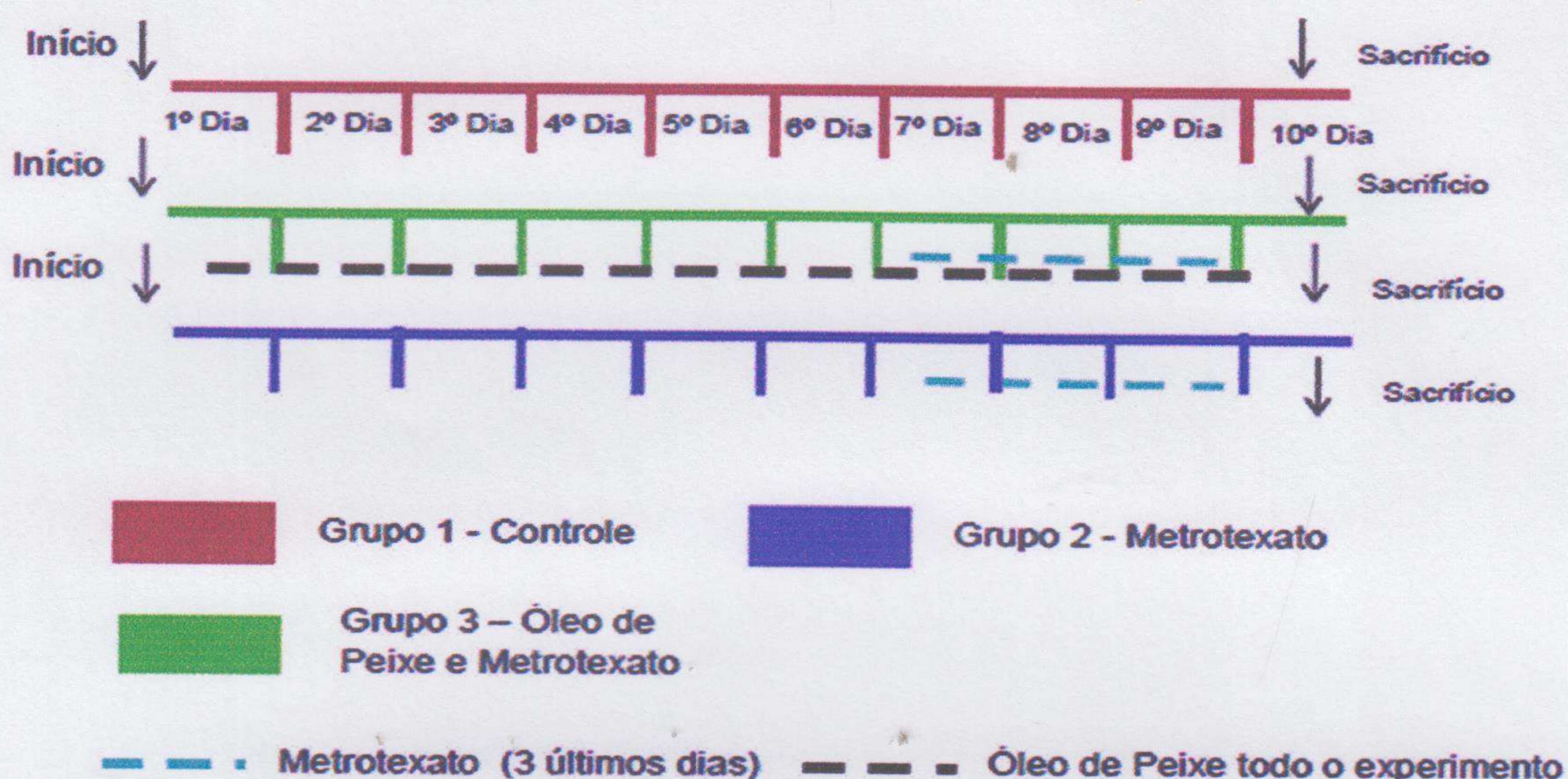
Os animais utilizados no estudo apresentavam idade média de 02 meses, com peso médio, aproximadamente de 41,53g, mantidos em ambiente sob temperatura controlada em torno de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e um ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo alimentado com ração comercial padrão para roedores da marca Purina (São Paulo, Brasil), e água *ad libitum*.

Descrição dos grupos de estudo

Os camundongos foram alocados em 03 grupos ($n=5/\text{grupo}$) e totalizando 15 animais e submetidos a 09 dias de estudo e no último dia os animais foram sacrificados.

Desenho Amostral

FIGURA 1: Representação esquemática do estudo ilustrando os protocolos de tratamento dos diferentes grupos.



Grupo 1 : no grupo controle, foram realizados a administração de 0,25mL/dia de água por gavagem durante os 09 dias de estudo e sacrifício no ultimo dia;. Grupo 2 assim como o grupo anterior o grupo metotrexato recebeu 0,25mL/dia de água por gavagem e nos 3 (três) últimos dias consecutivos receberam 2,5mg/kg. E o grupo 3 recebeu por gavagem 0,25mL/dia do óleo de peixe nos 09 dias do estudo e 0,25mL/kg de Metotrexato nos 03 últimos dias consecutivos do experimento por dose subcutânea. Todos os animais foram mantidos em jejum 24horas antes do sacrifício. suplementação do óleo da peixe e/ou do recebimento do metotrexato.

Suplementação

Para a suplementação foi utilizado o óleo de peixe da marca Performance science Nutrition®. Cada soft gels de óleo de peixe contendo 1000mg com 120mg de DHA e 180mg de EPA. Contendo em sua fórmula natural uma mistura em cada

softgels. Sendo ministrado por gavagem uma quantidade de 0,25mL/dia durante os 09 dias nos respectivos grupos em tratamento.

Evolução da Massa Corporal

O peso dos animais foi aferido diariamente do ensaio experimental. Estes tiveram a sua massa corporal pesada em balança digital de marca Toledo®, modelo 9094C/4, Brasil.

Procedimento de indução de mucosite

A indução da mucosite intestinal se deu através do medicamento metotrexato do laboratório Libbs Farmacêutica® com concentração 50mg/2ml e foi doado pela Liga Norte-Riograndense Contra o Câncer, Natal (RN), Brasil. Para a administração correta da dosagem do metotrexato foi retirado 0,6mL do fármaco e diluído em 3,15mL de água bidestilada e esterilizada. Os animais do grupo 2 e 3 receberam 2,5mL/kg subcutânea (sc) de metotrexato (já diluído)/dia, durante os 03 últimos dias consecutivos do experimento para a indução da mucosite intestinal de acordo com o descrito na literatura (CARNEIRO-FILHO et al., 2004).

Sacrifício dos animais

Ao final do experimento, os animais foram submetidos ao sacrifício por deslocamento cervical, estando sobre o efeito prévio de Quetamina (130mg/kg) e xilanzina (0,3mg/kg), anestésico e relaxante muscular, respectivamente. O intestino foi seccionado nos 3 seguimentos (duodeno, jejuno e íleo), armazenado em formol a 10% e submetidos a análise histomorfométrica, sendo desidratados e corados (CARNEIRO-FILHO, et al, 2004). Sendo as lâminas histológicas confeccionadas no departamento de morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

Análise Histomorfométrica

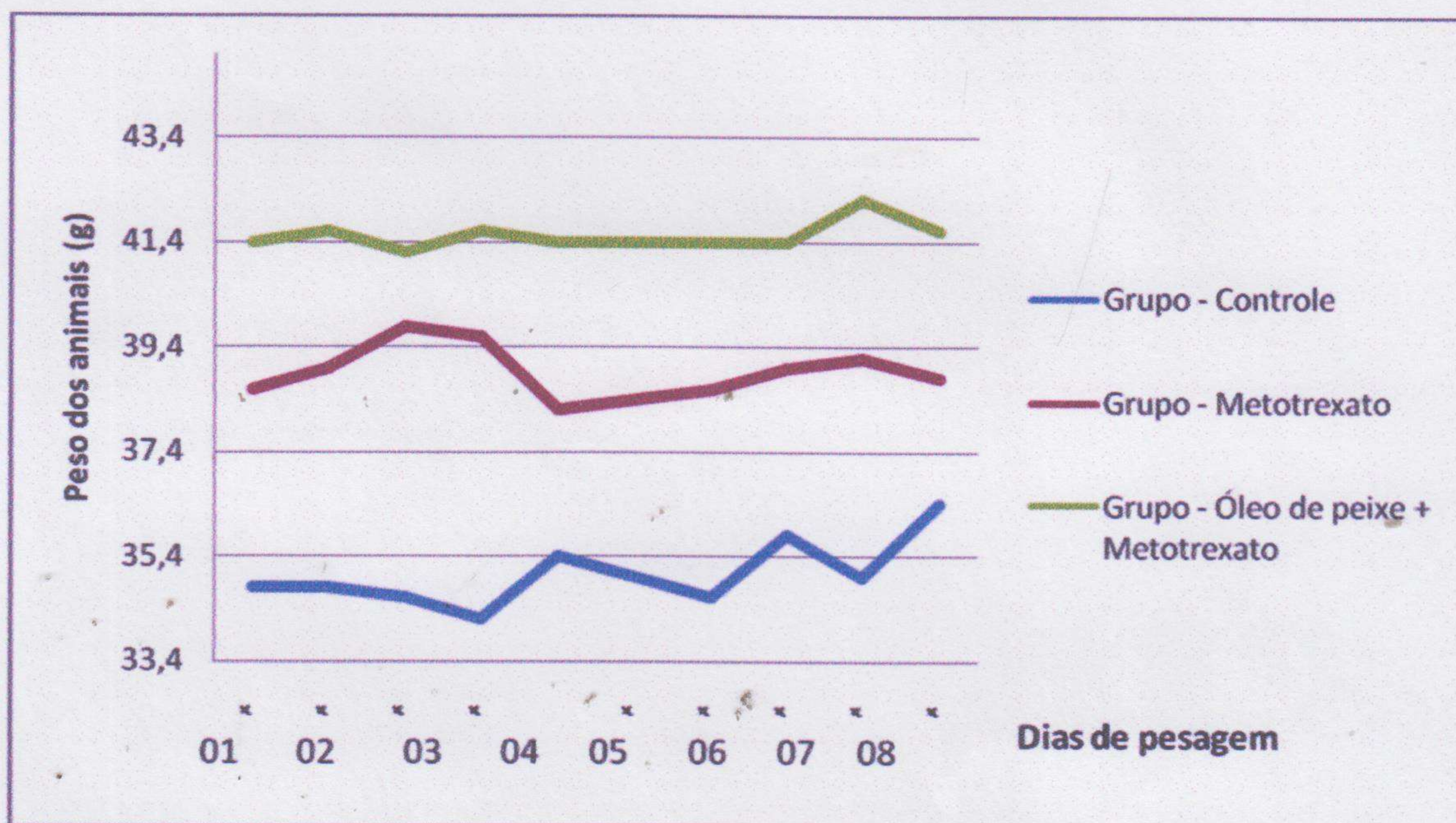
Foram coletados 3 cm dos seguimentos do intestino duodeno, jejuno e íleo para análise da morfologia dos epitélios. Conservados em formol a 10% e álcool 70% e posteriormente parafinizados. As lâminas foram preparadas no Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Em seguida, foram realizados cortes histológicos de 5µm de espessura e foram fixados a lâminas de vidro e pré-coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas foram codificadas e enumeradas de acordo com os grupos em tratamento. As leituras de todas as lâminas foram

realizadas em microscópio óptico com objetiva milimétrica da marca Olympus®, medidas quatro vilosidades intactas e bem definidas e quatro criptas foram medidas para cada amostra, realizadas no Departamento de Morfologia/UFRN,

RESULTADOS

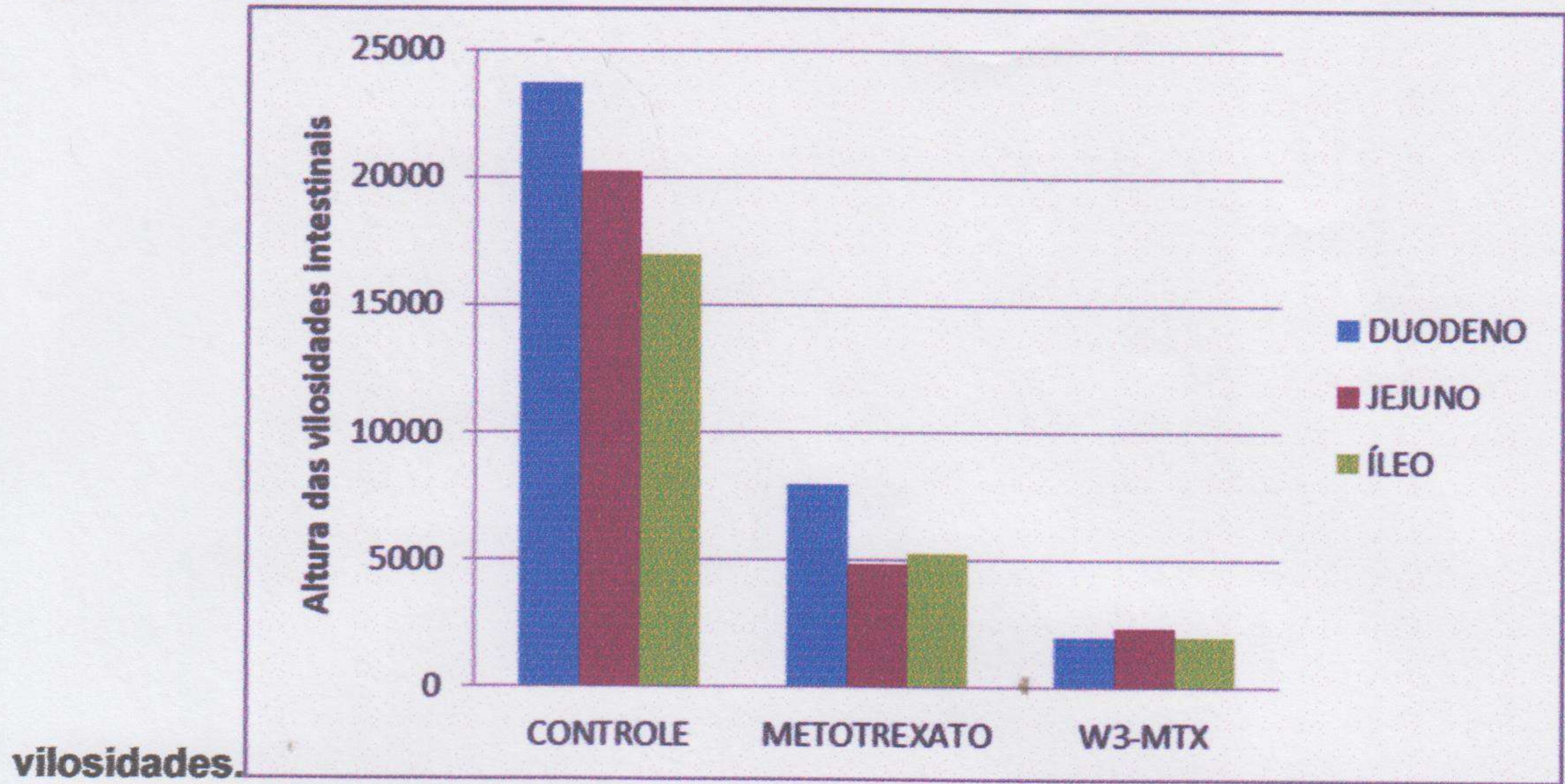
Verifica-se que no grupo controle nos quatros primeiros dias do experimento apresentou uma redução de peso e a partir do quinto dia apresentou um ganho de peso linear até o final do experimento (aumento de 1,6g). O grupo metotrexato e o grupo óleo de peixe mais metotrexato apresentaram um ganho de peso de 0,2g de massa corporal . (figura 2).

Figura 2: Analise da composição corporal



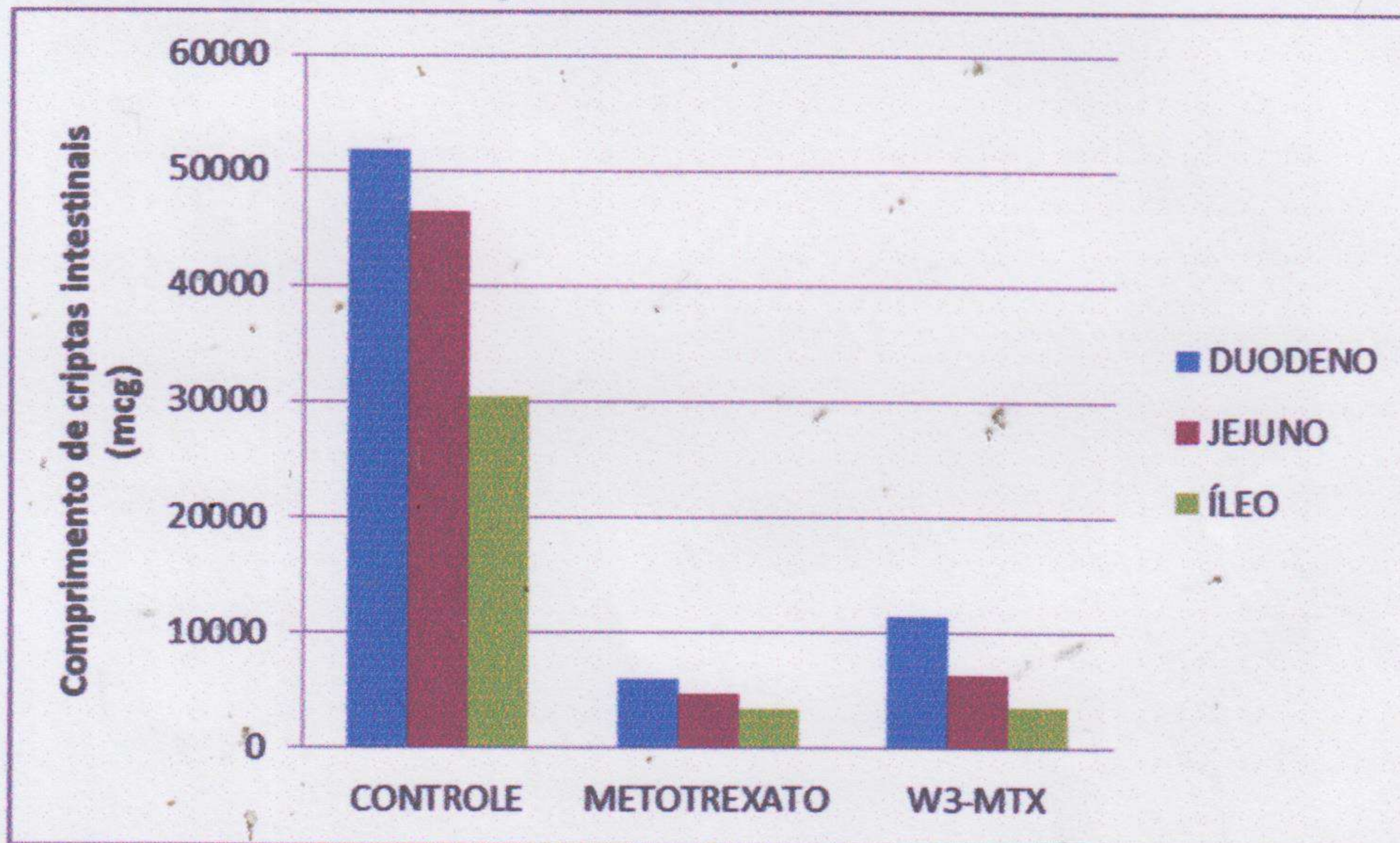
Avaliando-se o comprimento das vilosidades dos segmentos duodeno, jejuno e íleo dos camundongos suplementados com óleo de peixe e metotrexato, observou-se uma diminuição no comprimento quando comparado ao grupo controle, indicando que o óleo de peixe antes do uso do medicamento não foi capaz de prevenir o dano nas vilosidades.(figura 3)

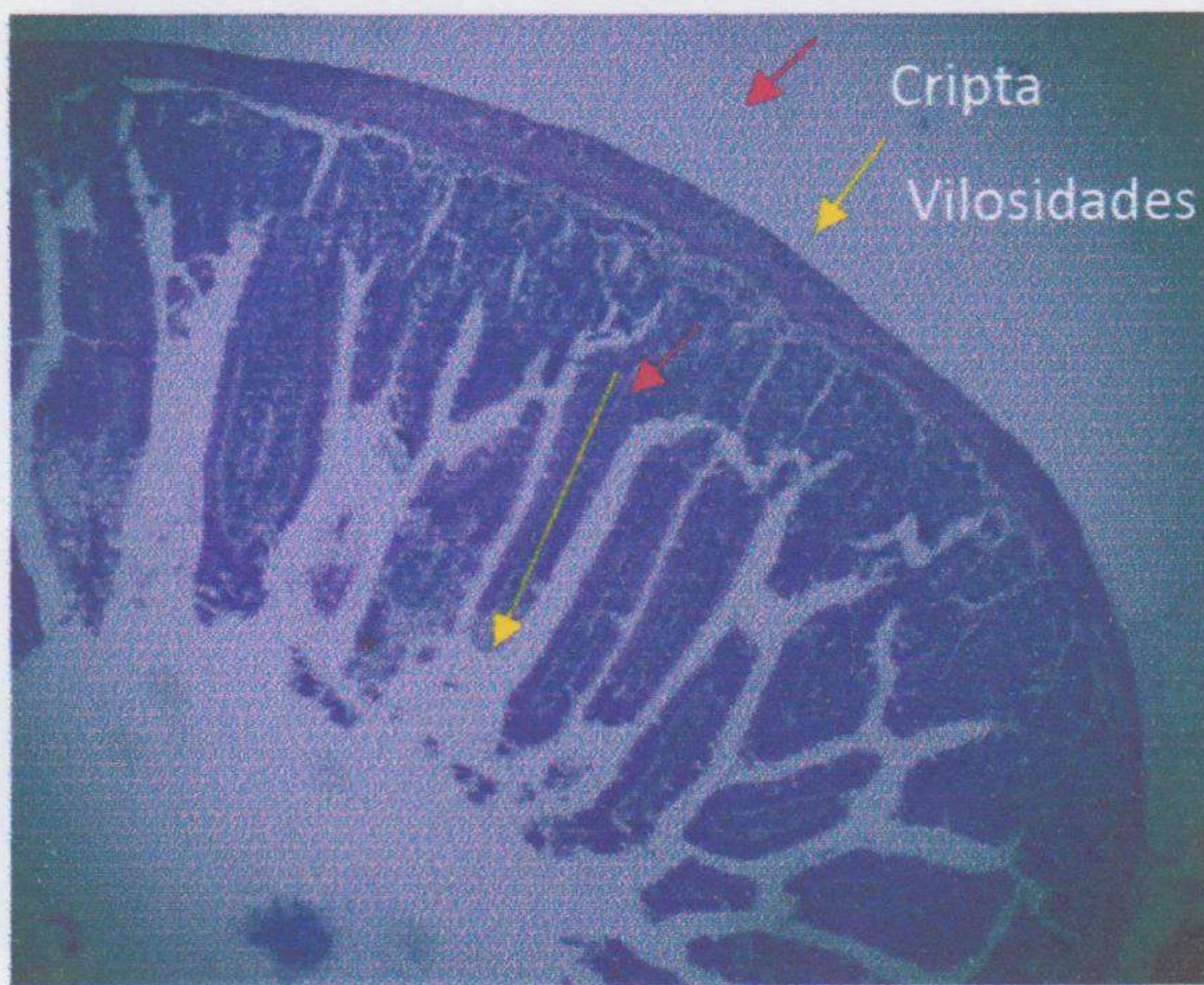
Figura 3: Análise das



A profundidade das criptas nos camundongos suplementados com óleo de peixe teve um aumento, quando comparado ao grupo metotrexato.(figura 4)

Figura 4: Análise das criptas intestinais.





DISCUSSÕES

No estudo de Boukhattala et al.(2009), observou-se que os ratos tratados com metotrexato, quando comparado com o grupo controle, o peso corporal foi significativamente reduzido. O uso de metotrexato influenciou a diminuição de peso nos camundongos quando comparados com o grupo controle nos experimentos de Carneiro-filho et al (2004), Konning et al (2007). Resultados similares pode-se observar no referido trabalho. (figura 2).

Recentes trabalhos vêm testando a ação antiinflamatória do óleo de peixe na manutenção morfohistológica do trato gastrointestinal. Brugalli (2003) relata em seu estudo que as vilosidades foram atrofiadas, mostrando que a qualidade do processo digestivo, foi afetado. Indicando que o uso de óleo de peixe com o Metotrexato não foi capaz de manter as vilosidades. No estudo de Mota (2004), as vilosidades apresentaram lesão severa da mucosa com a presença do tratamento inflamatório, assim como no presente estudo as vilosidades foram afetadas. (figura 3)

A profundidade das criptas do epitélio intestinal é um indicador importante da qualidade do processo digestivo, pois estar diretamente relacionado com a capacidade de absorção da mucosa intestinal (Junqueira, 2004). E o processo de descamação causados por agentes agressores. Mostraram uma redução na profundidade de criptas em camundongos (Manzanilla et al,2004). (figura 4)

CONCLUSÃO

A indução da mucosite causou uma redução da massa corporal dos animais e a suplementação de ômega 3 antes do metotrexato não atenuou o efeito do fármaco em relação as vilosidades intestinais.

ASP. A indução da mucosite causou uma redução da massa corporal dos animais e a suplementação de ômega 3 antes do metotrexato não atenuou o efeito do fármaco em relação as vilosidades intestinais. *Am J Physiol Endocrinol Metab* v. 296, p. e182-e190, 2008.

CARNEIRO- FILHO, B. A. et al. Intestinal Barrier Function and Secretion in Methotrexate- Induced Rat Intestinal Mucositis. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 49, n. 1, p. 55-72, Jan/2004.

CARVALHO, W. A. LEMONICA, L. Mecanismos celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Analgésia Tópica. *Rev Bras Anestesiol* v.48, n. 2, p. 137-153, 1998.

CRAVEIRO, A. C. CRAVEIRO, A. A. Alimentos Funcionais- A Nova Revolução. Fortaleza: Padtec, 2003.

GERALDO, J. M. ALFENAS, R. C. G. Papel da dieta na Prevenção e no Controle da Inflamação Crônica- Evidências Atuais. *Am Bras Endocrinol Metab* v. 52, n. 6, p. 951-967, 2008.

GUTIERREZ, L. E. Fatty acid composition of commercially important fish from Brazil. *Sci agric* v.5, p. 473-483, 1993.

HU, F. Ácido Graxos e Doenças Cardiovasculares: Uma revisão. *Rev. Nutr* P.242-247, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, José. *Histologia Básica: textos e atlas*, 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 402p. ISBN 85 277-0936.

KUNING, R. A. B et al. Methotrexate- induced mucositis in mouse 2- deficient mice. *Journal of Cellular Physiology* P 144- 152, 2007.

LOTTENBERG, A. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e de doenças cardiovasculares. *Rev. Brasileira de Endocrinologia Metabolica*, p. 55-60, 2009.

MARTIN, C. A. ALMEIDA, W. RUIZ, M. R. VISINTAINER, J. E. L. MATSUHITA, M. SOUZA, N. E. Ácidos graxos poli-insaturados Omega 3-e Omega 6. Importância e ocorrência em alimentos. *Ver Nutr* V.19, n.6, p. 761-770. Nov/dez, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estratégia global para a promoção da alimentação saudável: atividade física e saúde. Guia Alimentar para a População Brasileira- Promovendo a alimentação saudável. P 15-27 Distrito Federal 2006.

MONTEIRO, M. C. S. A. Restabelecimento da barreira mucosa- funcional intestinal através da suplementação com glutamato, alfa-glutarilina, e peptídeos em

Referências

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. (trab. Farias, A. S.); **Imunologia Celular e Molecular**, 6º Ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

BOUKHETTACA, N et al. Methotrexato induces intestinal mucositis and alters gut protein metabolism independently of reduced food intake. *Am j Physiol Endocrinol Metab.* v. 296, p. e182-e190.2008.

CARNEIRO- FILHO, B. A. et al. **Intestinal Barrier Function and Secretion in Methotrexate- Induced Rat Intestinal Mucositis**. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 49, n. 1, p. 65-72, Jan/2004.

CARVALHO, W. A; LEMÔNICA, L. **Mecanismos celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos**. *Rev Bras Anesthesiol.* v.48, n. 2, p. 137-158, 1998.

CRAVEIRO, A. C; CRAVEIRO, A. A. **Alimentos Funcionais- A Nova Revolução**. Fortaleza: Padetec, 2003.

GERALDO, J. M; ALFENAS, R. C. G. Papel da dieta na Prevenção e no Controle da Inflamação Crônica- Evidências Atuais. *Arq Bras Endocrinol Metab.* v. 52, n. 6, p. 951-967, 2008.

GUTIERREZ, L. E. Fatty acid composition of commercially important from Brazil. *Sci agric.* v.5, p. 478-483, 1993.

HU, F; **Ácido Graxos e Doenças Cardiovasculares: Uma revisão**. *Revs. Nutr.* P.242-247, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.: CARNEIRO, José, **Histologia Básica: textos e atlas**, 10 ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 488p. Il, ISBN 85-277-0906.

KONING, B, A. E et al. Methotrexate- induced muosites in mucin 2- deficient mice; *Jornal of Cellular Physiologi.* P 144- 152, 2007.

LOTTENBERG, A. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doenças cardiovascular. *Revs. Brasileira de Endocrinologia Metabólica*, p.55-60, 2009.

MARTIN, C. A; ALMEIDA, W; RUIZ M. R; VISENTAINER J. E. L; MATSHUSHITA, M; SOUZA, N. E. Ácidos graxos poli-insaturados Omega 3 e Omega 6: Importância e ocorrência em alumentôs. *Ver Nutr.* V.19, n.6, p. 761-770. Nov/dez, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estratégia global para a promoção da alimentação saudável ,atividade física e saúde. **Guia Alimentar para a População Brasileira- Promovendo a alimentação saudável**. P 15-27 Distrito Federal.2006.

MONTEIRO, M. C. S. A. **Restabelecimento da barreira morfo- funcional intestinal através da suplementação com glutamina, alanil-glutamina, e peptídeos em**

camundongos com mucosite induzida por 5- fluorouracil. 2006. 107f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia. Faculdade de Medicina) - Universidade Federal do Ceará, 2006.

PERINI, J. A. L; STEVANATO, F. B; SARGI, S. C; VISENTAINER, J. E. L; DALALIO, M. M. O; MATSHUSHITA, M; SOUZA, N. E; VISENTAINER, J.V. Ver. Nutri .V 22 p.1074-1087 . Nov/dez,2010.

ROBERFROID, M. Global view on functional foods. British journal of nutrition, p.133-138 2002.

SIMOPOULOS, A. Omega 3 e Omega 6 essential fatty acids ratio and chronic disease. Food ver int. p. 77-90. 2004.