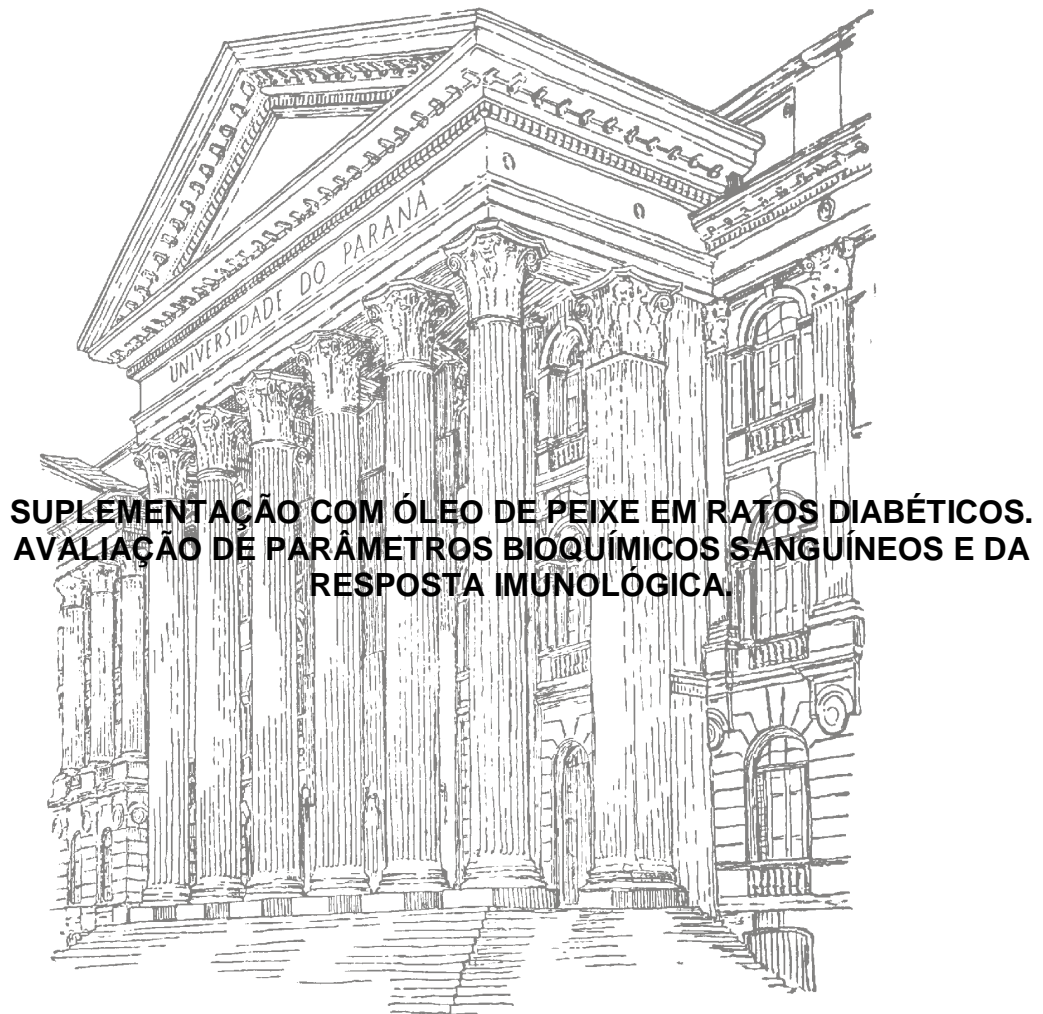


DANIELLE CRISTINA TONELLO PEQUITO



**CURITIBA
2009**

DANIELLE CRISTINA TONELLO PEQUITO

**SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE EM RATOS DIABÉTICOS.
AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SANGUÍNEOS E DA
RESPOSTA IMUNOLÓGICA.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular, Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio
Fernandes.

**CURITIBA
2009**

À minha família pela confiança e amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais, minha irmã e à toda minha família. Ao Uiliam. Por todo apoio e carinho nas horas mais difíceis.

Ao Prof. Luiz Cláudio por toda paciência, pela oportunidade e por ser um exemplo de Professor, Orientador e Pesquisador. Com certeza, o responsável pelo excelente ambiente de trabalho que é o LabMetab.

À todos os amigos que fiz no LabMetab (em ordem alfabética): Adri, Andressa, Carina, Cíntia, Dalton, Everson, Fabíola, Gina, Gleisson, Isa, Jaisson, Julia, Juliano, Kátya, Marcelo, Pedro, Rica, Ricelli, Sandro e Thiago. Pelo ambiente extremamente (sempre) agradável, pelas brincadeiras, pelas risadas e por todo o auxílio sempre que precisei. Este trabalho é de todos vocês.

Ao Rica (sempre pronto a ajudar), por toda paciência e por me ajudar a diabetizar os animais, e à Isa, por ser minha amiga e por ter me ajudado sempre nos experimentos, principalmente no início.

À Gina, Adri, Cíntia, Julia, Sandro e Andressa por serem meus amigos e me apoiarem sempre.

Ao Marcelo, Gleisson, Juliano, Everson, Ricelli, Thiago e Dalton pelas risadas e piadinhas infames que, de alguma forma (não sei como!) tornam o lab mais agradável.

À todos que, de alguma forma, sempre participaram nos experimentos (principalmente aos Domingos), seja com alguma técnica ou simplesmente descontraindo o ambiente, vocês tornaram tudo mais fácil.

Aos funcionários do biotério, principalmente o Luisão, por todo o auxílio com os animais.

Ao programa de Pós –Graduação em Biologia Celular e Molecular.

À Capes e Fundação Araucária, pelo auxílio financeiro.

À Fundação Herbarium, pela disponibilização das cápsulas de óleo de peixe.

A coisa mais bela que podemos experimentar é
o mistério. Essa é a fonte de toda a arte e
ciências verdadeiras.

(Albert Einstein)

RESUMO

Diabetes *mellitus* (DM) representa um grupo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia. Atualmente, a classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para a DM baseia-se na forma de tratamento. Assim, pode-se classificá-la em DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional e outros tipos específicos de DM. DM tipo 1 é caracterizado pela destruição autoimune das células β pancreáticas produtoras de insulina. Indivíduos diabéticos apresentam elevada incidência de doenças cardiovasculares e infecciosas. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (AGPI n3) são lipídios essenciais e estão relacionados à redução da triacilglicerolemia e colesterolemia. Estes AGPI n3 podem modular a função das células imunitárias através de alterações na estrutura das membranas celulares, modulando vias de transdução de sinais e a produção de mediadores lipídicos. Assim, nosso estudo objetivou avaliar os efeitos dos AGPI n3 sobre parâmetros bioquímicos sanguíneos e função das células imunitárias em ratos diabéticos. Diabetes experimental foi induzida em ratos da linhagem Wistar machos adultos através da injeção intravenosa de estreptozotocina (45 mg/kg). Após a constatação do quadro diabético (7 dias após a inoculação) os animais foram divididos em 8 grupos: controle ou diabético (C ou D), suplementado com óleo de peixe (OP e D/OP) ou gordura de coco (GC e D/GC) (1g/kg b.c.), e tratados com insulina (D/OP/I D/GC/I) (4UI). Foram analisados glicemia, triacilglicerolemia e colesterolemia e alguns parâmetros da funcionalidade de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal dos ratos e neutrófilos sanguíneos, como a fagocitose de zimosan, retenção de vermelho neutro, produção de ânion superóxido (O_2^-) e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (EROS). Proliferação de linfócitos mesentéricos estimulados com Concanavalina A também foi avaliada. Diabetes experimental resultou em hiperglicemia e hipertriacilglicerolemia. Suplementação com óleo de peixe reduziu a triacilglicerolemia (35%) e colesterolemia (46%) nos animais diabéticos e, o tratamento com insulina reduziu estes parâmetros nos grupo D/GC/I (46% e 57%). Diabetes experimental aumentou (31,4%) a fagocitose de macrófagos peritoneais, porém reduziu a retenção de vermelho neutro (33,7%) e a produção das EROS (49,8% e 42,5%, para ânion e peróxido), enquanto suplementação com óleo de peixe aumentou (102,7%) a retenção de vermelho neutro e a produção das EROS (42,5% e 43,1% para ânion e peróxido) e, já o tratamento com insulina resultou em redução de todos estes parâmetros. Já em neutrófilos sanguíneos, diabetes experimental resultou em aumento na retenção de vermelho neutro (43,7%) e redução na produção de H_2O_2 (33,7%). Já a suplementação com óleo de peixe aumentou a fagocitose (115%), retenção de vermelho neutro (20,8%) e produção de H_2O_2 (56,4%). O tratamento com insulina promoveu aumento na produção de H_2O_2 somente no grupo D/GC/I (33,4%). Com relação à proliferação de linfócitos, houve redução (49,5%) para os linfócitos obtidos de animais não diabéticos suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco. Diabetes experimental resultou em redução (50%) na proliferação e, o tratamento com insulina restaurou este parâmetro nos dois grupos tratados, D/OP/I e D/GC/I. Nossos resultados sugerem que óleo de peixe reduz o risco de doenças cardiovasculares e melhora a funcionalidade das células imunitárias em indivíduos diabéticos.

Palavras-chave: diabetes, insulina, ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, óleo de peixe, sistema imunológico, glicemia, perfil lipídico.

ABSTRACT

Diabetes *mellitus* (DM) is a group of disorders that have in common hyperglycemia. Currently, World Health Organization (WHO) classified DM as a treatment form. Therefore, DM has been classified in type 1 DM, type 2 DM, gestational DM and other specific forms. Type 1 DM is characterized by autoimmune process that destroy insulin-producing β cells. Diabetic individuals presents high incidence of infectious and cardiovascular disease. Omega-3 polyunsaturated fatty acids (n3 PUFA) are lipids and have been related to triacylglycerolemia and colesterolemia reduction. Yet n3 PUFA modulate immune cells function through membrane cells structure, pathways signals modulation and lipids mediators production. Thereby, our study aimed to investigate n3 PUFA effects on blood biochemical parameters and immune cells function in diabetic rats. Experimental diabetes was induced in male Wistar rats through streptozotocin (45mg/kg) intravenous injection. After diabetic (7 days after induction), status animals were divided into 8 groups: control or diabetic (C or D), fish oil supplemented (OP and D/OP) or coconut fat supplemented (GC and D/GC) and insulin treated (D/OP/I and D/GC/I). Glycemia, triacylglycerolemia and colesterolemia were measured some parameters of immune cells function like zimosan phagocytosis, neutral red retention, superoxide and hydrogen peroxide production (ROS). Macrophage were obtained from peritoneal cavity and neutrophils from the blood. Mesenteric lymphocyte proliferation stimulated with Concanavalin A were also evaluated. Experimental diabetes resulted in hyperglycemia and hypertriacylglycerolemia. Fish oil supplementation reduced triacylglycerolemia (35%) and colesterolemia (46%) in diabetic animals. Insulin treatment reduced this parameters in the group D/GC/I (46% and 57%). Experimental diabetes increased macrophage phagocytosis (31,4%), nevertheless reduced neutral red retention (33,7%) and ROS production (49,8% and 42,5%, for superoxide and peroxide). Fish oil supplementation increased neutral red retention (102,7%) and ROS production (42,5% e 43,1% for superoxide and peroxide), and insulin treatment resulted in reduction of all this parameters. In neutrophils, experimental diabetes increased neutral red retention (43,7%) and hydrogen peroxide production (33,7%). Fish oil supplementation also increased phagocytosis (115%), neutral red retention (20,8%) and hydrogen peroxide production (56,4%). Insulin therapy only increased hydrogen peroxide production (33,4%) in animals supplemented with coconut oil. Fish oil and coconut fat reduced lymphocyte proliferation (49,5%) in control animals. Experimental diabetes also reduced proliferation (50%) and insulin therapy restored this parameter in both treated groups. Our data suggest that fish oil reduce the risk of cardiovascular disease and ameliorates immune cells function.

Keywords: diabetes, n3 PUFA, fish oil, immune system, glycemia, lipid profile.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Interrelações teciduais no DM1.....	13
Figura 2 - Esquema ilustrando mudanças na dieta ao longo dos anos.....	26
Figura 3 - Metabolismo dos ácidos graxos n3 e n6.....	27
Figura 4 - Glicemia de jejum dos animais dos grupos controle e diabético.....	39
Figura 5 - Concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL).....	40
Figura 6 - Concentração de colesterol total (mg/dL).....	41
Figura 7 - Concentração de triacilglicerol plasmático (mg/dL).....	42
Quadro 1 - Resumo dos dados funcionais (mg/dL) dos grupos experimentais.....	44
Figura 8 - Fagocitose de zimosan por macrófagos peritoneais.....	45
Figura 9 - Volume lisossomal dos macrófagos peritoneais.....	46
Figura 10 - Produção de ânion superóxido por macrófagos peritoneais.....	47
Figura 11 - Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais.....	48
Quadro 2 - Resumo dos dados funcionais de macrófagos peritoneais.....	49
Figura 12 - Fagocitose de zimosan por neutrófilos.....	50
Figura 13 - Volume lisossomal em neutrófilos.....	51

Figura 14 - Produção de ânion superóxido pelos neutrófilos.....	52
Figura 15 - Produção de peróxido de hidrogênio pelos neutrófilos.....	53
Quadro 3 - Resumo dos dados funcionais de neutrófilos sanguíneos.....	54
Figura 16 - Índice de Proliferação de linfócitos obtidos dos linfonodos mesentéricos.....	55
Quadro 4 - Dados da proliferação de linfócitos mesentéricos.....	56
Figura 17 - Vias de sinalização envolvidas na fagocitose.....	65
Figura 18 - Ativação da NADPH oxidase.....	73
Figura 19 - Interação dos AGPIs com a NADPH oxidase.....	74
Figura 20 - Diferenciação e papéis de linfócitos Th1 e Th2.....	81
Figura 21 - Papel dos AGPI n3 sobre as células imunitárias.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA – Ácido Araquidônico
- AGE – Produtos finais de glicação avançados
- AGL – Ácidos Graxos Livres
- AGPI – Ácidos Graxos Poliinsaturados
- ANOVA – Análise de Variância
- APC – Célula apresentadora de antígenos
- ConA – Concanavalina A
- COX - Ciclooxigenase
- DAG – Diacilglicerol
- DCV – Doença Cardiovascular
- DHA – Ácido Docosaheptaenóico
- DM – Diabetes *mellitus*
- DNA – Ácido Desoxirribonucléico
- EPA – Ácido Eicosapentaenóico
- EROS – Espécies Reativas do Oxigênio
- FAS – Ácido Graxo Sintase
- GAD – Descarboxilase do Ácido Glutâmico
- GLUT – Transportador de Glicose
- GSK-3- Glicogênio Sintase Quinase – 3
- HDL – Lipoproteína de Alta Densidade
- HLA – Antígeno Leucocitário Humano
- HNF-4 – Fator Nuclear Hepático-4
- IA-2 – Antígeno das células das ilhotas-2
- IFN- γ – Interferon- γ
- IL – Interleucina
- iNOS – Enzima Óxido Nítrico Sintase, isoforma induzível
- IRS-1 – Insulin Receptor Substrate - 1
- ITAM – Immunoreceptor Tyrosine Activated *Motif*
- LAT – Ligante para Ativação das Células T

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade
LOX – Lipooxigenase
LTB₄ – Leucotrieno da série B₄
NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida
NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida
NBT – Axul de Nitrotolueno
NFκB – Fator Nuclear κ B
NK – *Natural Killer*
NOX – NADPH Oxidase
NPH – Protamina Neutra de Hagedorn
PAI-1 – Inibidor do Ativador do Plasminogênio – 1
PEPCK – Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase
PGE₂ - Prostaglandina E₂
PI(3,4,5)P₃ – Fosfatidil Inositol (3,4,5) trifosfato
PI(4,5)P₂ – Fosfatidil Inositol (4,5) bifosfato
PI3K – Fosfatidil Inositol-3-quinase
PKC – Proteína quinase C
PLC – Fosfolipase C
PPAR – Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomo
RAGE – Receptor dos produtos finais de glicação avançados
SFK – Quinases da família Src
SREBP – Proteína de ligação ao elemento regulatório esterol
TGF-β – Fator de crescimento transformante
Th1 – Linfócitos T *helper* 1
Th2 – Linfócitos T *helper* 2
TLR2 – Receptor Toll-like 2
TNF-α – Fator de necrose tumoral-α
UCP-3 – Proteína desacopladora 3
VCAM-1 – Molécula de adesão célula-vasculatura 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 DIABETES <i>MELLITUS</i>	12
1.1.1 Alterações na DM	14
1.1.2 Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	16
1.1.3 Outros tipos de Diabetes <i>mellitus</i>	20
1.2 SISTEMA IMUNOLÓGICO	21
1.3 ÁCIDOS GRAXOS	25
1.3.1 Ácidos Graxos Poliinsaturados Ômega 3	25
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 ANIMAIS	33
4.2 INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL	33
4.3 SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE	34
4.4 ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA	34
4.5 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	34
4.5.1 Mensuração da Glicose Plasmática	34
4.5.2 Perfil Lipídico Plasmático	34
4.6 ENSAIOS COM MACRÓFAGOS	35
4.6.1 Obtenção de macrófagos peritoneais	35
4.6.2 Fagocitose de Zimosan	35
4.6.3 Volume Lisossomal	35
4.6.4 Produção de Ânion Superóxido	36
4.6.5 Produção de Peróxido de Hidrogênio	36
4.6.6 Ensaio de adesão	37
4.7 ENSAIOS COM NEUTRÓFILOS	37
4.7.1 Obtenção de neutrófilos sanguíneos	37
4.7.2 Funcionalidade de Neutrófilos	37
4.8 PROLIFERAÇÃO LINFOCITÁRIA	38
4.8.1 Obtenção dos Linfócitos	38
4.8.2 Ensaio de Proliferação	38
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5 RESULTADOS	40
5.1 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SANGUÍNEOS	40
5.1.1 Glicemia	40
5.1.2 Lipídios Plasmáticos	42
5.2 PARÂMETROS IMUNITÁRIOS	45
5.2.1 Macrófagos Peritoneais	45
5.2.2 Neutrófilos Sanguíneos	50
5.2.3 Linfócitos Mesentéricos	55
6 DISCUSSÃO	57
6.1 alterações metabólicas causadas pela diabetes e efeito dos ácidos graxos ômega-3	57
6.2 ALTERAÇÕES EM CÉLULAS DO SISTEMA IMUNITÁRIO CAUSADAS PELA DIABETES E ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA 3	63
6.2.2 Sistema Lisossomal e Ácidos Graxos Ômega-3	70
6.2.3 Produção de espécies reativas de oxigênio e Ácidos Graxos Ômega-3	72
6.2.4 Linfócitos e Ácidos Graxos ômega-3	79

7 CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS.....	91
ANEXO	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES *MELLITUS*

Diabetes *mellitus* (DM) compreende uma série de distúrbios metabólicos apresentando em comum hiperglicemia (SBD, 2006). Isto ocorre em decorrência de defeitos na secreção da insulina, na sua ação ou em ambos (SBD, 2006; ADA, 2002). Diversos processos patogênicos estão relacionados com o desenvolvimento de DM que variam desde a destruição auto-imune das células β pancreáticas à anormalidades que resultam em resistência à ação da insulina nos tecidos alvo, tais como músculo esquelético e tecido adiposo (ADA, 2002). Como consequência, resultam deficiências no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, como mostrado na figura 1 (ABOU-SEIF; YOUSSEF, 2004).

Uma explicação viável para a ocorrência dessas anormalidades metabólicas é que, em todos os tipos de diabetes, o papel anabólico da insulina está comprometido e, na maioria das vezes, o glucagon opõe-se ao efeito da insulina sobre o fígado, estimulando a glicogenólise e a gliconeogênese, porém possuindo pouco efeito sobre a utilização periférica da glicose. Assim, promove aumento na produção hepática de glicose, reduz a sua captação pelos tecidos periféricos, além de diminuir a conversão de glicose em glicogênio pelo fígado e o resultado disto é acentuada hiperglicemia. Cetoacidose resulta do aumento da taxa lipolítica no tecido adiposo e, conseqüentemente maiores concentrações de ácidos graxos livres (AGL) no plasma, que são como substratos para síntese de corpos cetônicos. Hipertriacilglicerolemia é devido à maior produção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), através da síntese de triacilgliceróis promovida pelos AGL que derivam do tecido adiposo. Além do fato de, nos indivíduos diabéticos, haver menor degradação de lipoproteínas pela menor atividade da enzima lipase de lipoproteínas (insulina estimula síntese e ação desta enzima). Ainda, a inibição da proteólise e a maior captação de aminoácidos estimulada pela insulina estão comprometidas na DM. O resultado disto é o aumento nas concentrações plasmáticas de dois importantes aminoácidos, alanina e glutamina, sendo estes utilizados como substratos para a

gliconeogênese hepática e renal, respectivamente (GILMAN, 2003; CHAMPE *et al.*, 2006).

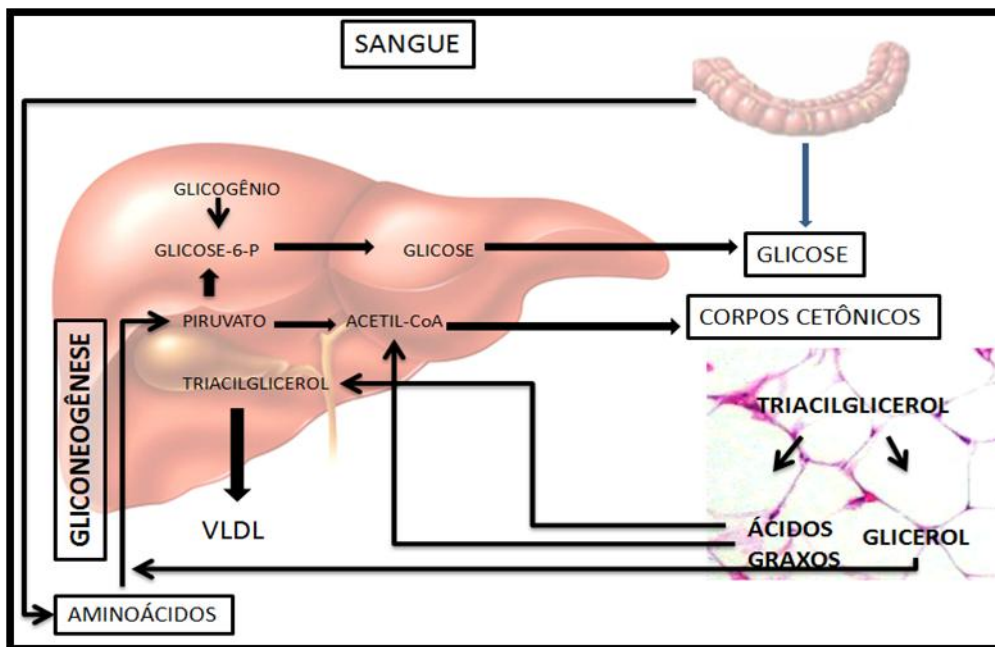


Figura 1 – Interrelações teciduais no DM1 (adaptado de CHAMPE *et al.*, 2006).

A incidência da DM vêm aumentando de forma epidêmica (WILD *et al.*, 2004) com projeções de atingir 300 milhões de indivíduos no mundo em 2030 (SBD, 2006). Estudos sobre a população brasileira mostram que a mortalidade por DM apresenta acentuado aumento com o progredir da idade, variando de 0,58 (por 100 mil habitantes) na faixa etária de 0-29 anos e de 181,1 (por 100 mil habitantes) para a de 60 anos ou mais. Este aumento se relaciona à modificações no estilo de vida com prevalência de sedentarismo e alimentação inadequada que pode resultar em obesidade, além do envelhecimento populacional e maior urbanização (SBD, 2006). Assim, segundo a Federação Internacional do Diabetes (IDF, 2008), em 2025 haverá cerca de 146 milhões de pessoas com idade entre 40-59 anos com diabetes e cerca de 147 milhões com idade acima de 60 anos. Da mesma forma com relação à influência da urbanização, é esperado para 2025 que o número de indivíduos diabéticos em áreas urbanas atinja 182 milhões enquanto em áreas rurais, 61 milhões.

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2006), a classificação atual da DM deve ser feita levando-se em conta a etiologia da doença e, não mais a forma de tratamento. Assim, pode-se classificar a DM em 4 classes clínicas diferentes, a saber: DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional e outros tipos específicos de DM. A categoria pré-diabetes não é considerada uma entidade clínica e, sim um fator de risco para o desenvolvimento de DM e doenças cardiovasculares (SBD, 2006; ADA, 2002).

1.1.1 Alterações na DM

A hiperglicemia crônica está associada com complicações que surgem a longo prazo, envolvendo órgãos como olhos, rins e coração (ADA, 2002), sendo também associada com acelerada doença macrovascular arteriosclerótica, resultando ao indivíduo diabético maior risco de infarto agudo do miocárdio e amputações. Há estreita correlação entre hiperglicemia e complicações crônicas da diabetes (BROWNLEE, 2001). Enquanto insulina exógena e outras medicações, como hipoglicemiantes, podem controlar muitos aspectos da doença, complicações que afetam rins, sistema vascular e nervos periféricos são comuns e extremamente custosos em termos de longevidade e qualidade de vida (ROLO; PALMEIRA, 2006). Complicações vasculares crônicas representam a principal causa de morbidade e mortalidade em indivíduos com DM. Assim, diversas desordens bioquímicas associadas com complicações vasculares coexistem na DM, tais como hiperlipidemia e estresse oxidativo, e parecem explicar o aumentado risco de doenças vasculares (ABOU-SEIF; YOUSSEF, 2004).

Complicações vasculares da diabetes dividem-se em macrovasculares ou cardiovasculares e microvasculares (tais como retinopatia, neuropatia e nefropatia). Diversos estudos demonstram a presença de marcadores de danos induzidos por radicais livres na circulação de indivíduos diabéticos, bem como reduzida capacidade antioxidante (MARTÍN-GALLÁN *et al.*, 2003; JAY; HITOMI; GRIENGLING, 2006). Segundo o estudo do *Diabetes Control and Complications Trial* (1993) tratamento intensivo com insulina efetivamente atrasou o início e diminuiu a progressão das complicações à longo prazo da DM em indivíduos diabéticos tipo 1 (MARTÍN-GALLÁN *et al.*, 2003). Assim, pode-se considerar o

papel da hiperglicemia em induzir estresse oxidativo e, isto ocorre através de diversos mecanismos (JAY; HITOMI; GRIENGLING, 2006).

A hiperglicemia intracelular se correlaciona com aumentado metabolismo da glicose nas células e, conseqüentemente maior geração de NADH. Assim, mais elétrons são transferidos ao oxigênio pela cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, originando ânion superóxido. Sabe-se que ânion superóxido aumenta a concentração de diacilglicerol (DAG) que ativa proteína quinase C (PKC) (JAY; HITOMI; GRIENGLING, 2006). PKC é ativada por DAG em células vasculares em cultura, retina e glomérulo de animais diabéticos. Ativação da PKC causa alteração de fluxo sanguíneo na retina e rim por diminuir a produção de óxido nítrico e aumentar a atividade de endotelina-1. Além disso contribui para o aumentado acúmulo de proteínas da matriz microvascular, bem como maior produção do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1) e ativação do fator nuclear κ B (NF κ B) em células vasculares e endoteliais em cultura (BROWNLEE, 2001).

As espécies reativas de oxigênio (EROS) produzidas pela mitocôndria, perante hiperglicemia, são capazes de danificar o DNA das células, causando ativação da poli-adenosina difosfato (ADP)-ribose polimerase, que reduz a atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Menor atividade desta enzima estimula a via do poli-ol, da PKC e a formação de produtos finais de glicação avançados (BROWNLEE, 2001).

A glicação não-enzimática, descrita pela primeira vez por Louis Camille Maillard no início do século 20, envolve a reação entre o grupo carbonil (aldeído ou cetona) de um açúcar redutor com grupos amino livres de biomoléculas, tais como proteínas, para formar rapidamente uma base de Schiff. Rearranjos intramoleculares ocorrem dando origem aos produtos de Amadori, os quais sofrem uma série de outros rearranjos incluindo reações de desidratação e condensação, originando os produtos finais de glicação avançada (AGEs) (WAUTIER; SCHIMIDT, 2004; HUIJBERTS; SCHAPER; SCHALKWIJK, 2008). AGEs interagem com o seu receptor específico (RAGE), o qual distribui-se entre células endoteliais, macrófagos e células musculares (BAYNES, 1999) e promove a geração de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente estímulo de fatores de transcrição, como NF κ B (JAY; HITOMI; GRIENGLING, 2006), incluindo a expressão de citocinas e fatores de crescimento por

macrófagos e células mesangiais, tais como interleucina 1, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e fator de crescimento transformante β (TGF- β). Também promove a expressão de moléculas pró-coagulantes e pró-inflamatórias por células endoteliais. Além disso, AGEs modificam proteínas da matriz extracelular podendo diminuir a elasticidade de grandes vasos (BROWNLEE, 2001).

Ativação da via do poliol, por hiperglicemia, promove geração de EROS através da atuação de duas enzimas. Uma delas é a aldose redutase que utiliza NADPH para reduzir glicose a sorbitol, o que em condições normoglicêmicas praticamente não ocorre. Redução de NADPH reduz regeneração de glutatona e, assim promove estresse oxidativo. A enzima sorbitol desidrogenase oxida sorbitol à frutose com produção de NADH e, como dito anteriormente, ocorre maior geração de ânion superóxido mitocondrial. Além disso, sorbitol causa dano osmótico pelo fato de não difundir-se facilmente pelas membranas celulares (BROWNLEE, 2001; JAY; HITOMI; GRIENGLING, 2006).

1.1.2 Diabetes *mellitus* tipo 1

A DM tipo 1 normalmente resulta da destruição auto-imune das células β pancreáticas produtoras de insulina (GIANANI; EISENBARTH, 2005; HOMANN; EISENBARTH, 2006; SBD, 2006; VON HERRATH; SANDA; HEROLD, 2007). Porém, existem casos, cerca de 10%, em que não há evidências de autoimunidade, ou seja, a diabetes não é acompanhado de insulite autoimune e é denominado DM1 idiopático (GILMAN, 2003; SBD, 2006). Insulite é definida como um infiltrado inflamatório contendo um grande número de células mononucleares e linfócitos T CD8 ocorrendo ao redor das ilhotas pancreáticas individuais (NOTKINS; LERNMARK, 2001). Esta atividade inflamatória é limitada às ilhotas que contém insulina e apresenta além dos linfócitos, proteínas do sistema complemento e anticorpos (NARENDRAN; ESTELLA; FOURLANOS, 2005). A descoberta de forte ligação entre DM1 e genes do sistema antígeno leucocitário humano (HLA), na década de 70, permitiu grande avanço no conhecimento da etiologia autoimune da doença, visto o papel desses genes na apresentação de antígenos (NOTKINS; LERNMARK, 2001). Os genes localizados na região HLA contribuem em cerca de 40% com o risco de

desenvolver a doença (NARENDRAN; ESTELLA; FOURLANOS, 2005), havendo alguns haplótipos pertencentes à região de classe II do HLA que se correlacionam com a susceptibilidade em desenvolver a doença enquanto outros apresentam forte associação negativa com a mesma (ATKINSON; EISENBARTH, 2001; NOTKINS; LERNMARK, 2001).

Outra descoberta importante da década de 70 também possibilitou a determinação de autoimunidade para a etiologia da doença. Foi a descoberta, no plasma de indivíduos diabéticos a presença de autoanticorpos, os quais foram denominados de anticorpos das ilhotas pancreáticas (NOTKINS; LERNMARK, 2001). Durante o desenvolvimento da DM1 três autoantígenos são extremamente importantes, são eles a insulina, descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) e antígeno associado à ilhota (IA-2), e são alvos do sistema imunitário humano (BRESSON; VON HERRATH, 2004).

Pode-se dividir a progressão da destruição autoimune das células β pancreáticas em três estágios: recrutamento de linfócitos T específicos às células das ilhotas pancreáticas; sua ativação pelas células apresentadoras de antígenos carregando peptídeos derivados dos autoantígenos e; o acúmulo de linfócitos T nas ilhotas pancreáticas. A efetiva destruição das células pode ocorrer através da produção de moléculas efetoras pelos linfócitos, tais como fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interferon γ (IFN- γ), ou perforinas (BRESSON; VON HERRATH, 2004).

Além da contribuição de fatores genéticos para o desenvolvimento da DM1, fatores ambientais também desempenham importante papel no aumento da incidência da doença (DEVENDRA; LIU; EISENBARTH, 2004). Determinantes de risco ambiental podem ser classificados em três grupos: infecções virais, dieta e toxinas (como derivados N-nitrosos) (ATKINSON; EISENBARTH, 2001). Com relação às viroses somente a síndrome da rubéola congênita tem sido conclusivamente associada à doença (EISENBARTH *et al.*, 2004) e, no mínimo 40% das crianças nascidas de mães infectadas no início da gestação desenvolverão anticorpos contra as ilhotas e cerca de metade delas terão DM1 (FOURLANOS *et al.*, 2005). A influência da dieta diz respeito à ingestão precoce de cereal ou gluten como promotores de DM1, podendo envolver um mecanismo de resposta imune aberrante à antígenos dos cereais em um sistema imune associado à mucosa intestinal imaturo em indivíduos susceptíveis (DEVENDRA;

LIU; EISENBARTH, 2004), bem como amamentação versus introdução precoce de leite de vaca (ATKINSON; EISENBARTH, 2001).

Assim, estudos que promovam melhor entedimento da imunopatogênese e imunogenética facilitarão a predição da doença e, conseqüentemente permitirão estudos focados na prevenção e tratamento, através da utilização de terapias imunomoduladoras ou que afetam, de alguma forma, as diversas vias envolvidas no complexo processo levando à destruição das células β (BRESSON; VON HERRATH, 2004; GIANANI; EISENBARTH, 2005).

1.1.2.1 Insulina no Tratamento da DM1

A descoberta da insulina, em 1921 atribuída à Frederick G. Banting e Charles H. Best, a qual permitiu o tratamento de uma condição até então fatal, foi uma das mais importantes descobertas médicas do século 20 (GILMAN, 2003; HIRSCH, 2005).

Insulina é hormônio anabólico que controla a homeostase da glicose e, também o crescimento e diferenciação celular (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). Sua secreção é feita pelas células β das ilhotas pancreáticas, através do estímulo por substâncias metabolizáveis pela mesma, como os aminoácidos, e sendo a glicose o secretagogo mais importante (HABER *et al.*, 2001; CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). Ela controla a homeostase da glicose através da gliconeogênese e glicogenólise hepática e por aumentar sua captação periférica (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

Insulina é sempre necessária no tratamento de indivíduos diabéticos do tipo 1 (SBD, 2006) e técnicas cada vez mais inovadoras nos processos de fabricação das insulinas comerciais geram produtos que atendem às necessidades de todos os tipos de usuários (MOORADIAN; BERNBAUM; ALBERT, 2006). Um dos problemas levantados em relação ao uso de insulina exógena era a não reprodução da rápida elevação e declínio normais da secreção de insulina feita fisiologicamente e a difusão da insulina diretamente na circulação sistêmica sem a passagem pela circulação porta (GILMAN, 2003). Entretanto, análogos de insulina cada vez mais mimetizam a secreção de insulina humana fisiológica através da modulação do início e duração de sua ação (DE WITT; HIRSCH, 2003). Assim, são produzidos análogos de insulina

considerados, de modo geral, em insulinas de ação rápida, intermediária e longa (GILMAN, 2003; HIRSCH, 2005).

Em termos farmacocinéticos, é considerado que insulinas de ação rápida, como as insulinas padrões regulares, apresentam picos 2-3 horas após injeção subcutânea e agem por 6-8 horas, tendo um início de ação em 0,5-1 hora após administração. Esse tipo de insulina tem como alvo redução de hiperglicemia pós-prandial. O ideal seria que essa insulina fosse aplicada 30-40 minutos antes das refeições, porém indivíduos diabéticos tendem aplicá-la no momento das refeições. Assim, análogos da insulina regular com início de ação mais rápido (12-30 minutos) e picos entre 0,5-1,5 horas após administração, e que agem por 3-4 horas foram produzidos. Entre eles estão a insulina lispro e aspart, que ampliam os picos pós-prandiais de insulina injetados subcutaneamente (GILMAN, 2003; MOORADIAN; BERNBAUM; ALBERT, 2006; SBD, 2006).

Dentre as insulinas de ação intermediária estão a insulina com protamina neutra de Hagedorn (NPH) e a insulina lenta. Estas insulinas apresentam dissolução mais gradual quando administradas subcutaneamente, portanto seu início de ação ocorre 2-4 horas após sua injeção, com seu pico entre 4-10 horas e duração da ação que pode ser maior que 15 horas. Por outro lado, insulinas de ação longa incluem insulina ultralenta e glargina. Estes tipos de insulinas apresentam início de ação muito lento (podendo chegar até 6 horas) e pico de ação tão prolongado que acabam por oferecer concentração basal de insulina durante todo o dia. Sua ação dura até 24 horas (GILMAN, 2003; MOORADIAN; BERNBAUM; ALBERT, 2006; SBD, 2006).

Através do estudo *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT, 1993) ficou clara a importância do controle glicêmico intensivo no indivíduo diabético tipo 1. Este estudo mostrou que, com mais de 2-3 doses de insulinas de diferentes ações, é possível reduzir a incidência das complicações crônicas do DM, com 76% de redução nos casos de retinopatia, 60% nos de neuropatia e 39% nos de nefropatia nos indivíduos tratados intensivamente. Enquanto outro estudo (DCCT, 2005) mostrou redução de 57% nos eventos clínicos severos, tais como infarto do miocárdio não-fatal ou morte por doença cardiovascular, e 42% de redução na ocorrência do primeiro evento cardiovascular nos indivíduos com tratamento intensivo.

1.1.3 Outros tipos de Diabetes *mellitus*

Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) compreende estado metabólico complexo, envolvendo resistência à insulina associada à insuficiente secreção deste hormônio (RENARD; OBBERGHEN, 2006). De modo geral, este tipo de diabetes compreende aproximadamente 90-95% dos casos (SBD, 2006) e está fortemente correlacionado à obesidade (POLONSKY, 2006). Sua alta prevalência é ligada à epidemia da obesidade associada à estilos de vida cada vez mais sedentários e a hábitos alimentares inadequados, como por exemplo alto teor de gordura saturada (ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001). Resistência à insulina é um quadro relacionado tanto à obesidade quanto à DM2, porém para um indivíduo obeso ser portador de DM2 é necessário que as células β deste paciente sejam incapazes de compensar completamente a diminuída sensibilidade à insulina dos tecidos (KHAN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006).

Hiperglicemia não é a única característica importante da DM2, a qual normalmente está acompanhada de outras anormalidades bioquímicas e fisiológicas que compreendem a Síndrome Metabólica (PICKUP; CROOK, 1998). Esta síndrome apresenta uma série de fatores de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular, que inclui o próprio quadro de DM2, além de dislipidemia, hipertensão, obesidade visceral, hipercoagulabilidade e microalbuminúria (ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001).

A DM gestacional é qualquer forma de intolerância à glicose com início ou diagnóstico durante a gestação, caracterizando-se por um quadro de resistência à insulina associada com disfunção de células β pancreáticas. Este tipo de DM é importante pois afeta 1-14% de todas as gestações e está associada com maior risco de mortalidade e morbidade perinatal (SBD, 2006). O fator causador da DM gestacional é desconhecido, entretanto considera-se que hormônios produzidos pela placenta e que auxiliam no desenvolvimento do bebê poderiam originar resistência à insulina na mãe (IDF, 2008). Considera-se que mulheres com DM gestacional tendem a ser obesas e apresentam resistência à insulina crônica, como mostrado pela presença de marcadores inflamatórios, tais como TNF- α e proteína C reativa, além de altas concentrações de leptina e reduzidas de adiponectina, fatores que conhecidamente ligam obesidade e resistência à insulina. Alterações nas vias de sinalização da insulina, localização subcelular

anormal de transportadores GLUT4 e reduzida expressão do receptor ativado por proliferador de peroxissomas (PPAR- γ) têm sido documentadas no músculo esquelético e tecido adiposo de mulheres portadoras de DM gestacional (BUCHANAN; XIANG, 2005).

Dentro da classe de outros tipos específicos de DM inclui-se apresentações clínicas relacionadas à defeitos genéticos na função das células β (como defeitos no gene da glicoquinase), defeitos genéticos na ação da insulina (como DM lipoatrófico), doenças do pâncreas exócrino (como neoplasia e fibrose cística) e outras condições (como endocrinopatias, DM induzida por medicamentos ou agentes químicos ou por infecções). O pré-diabetes aparece como um quadro clínico intermediário entre a homeostase normal da glicose e a DM. O indivíduo com pré-diabetes apresenta glicemia de jejum alterada e intolerância à glicose, com valores glicêmicos superiores aos de referência, porém inferiores ao critério diagnóstico de DM (SBD, 2006; ADA, 2008).

1.2 SISTEMA IMUNOLÓGICO

É reconhecido que indivíduos diabéticos apresentam elevada incidência de infecções como resultado de deficiências na capacidade de defesa do organismo. Se esta anormalidade é resultado da hiperglicemia, resistência à insulina ou hipoglicemia ainda não é claro (GUPTA *et al.*, 2007).

O sistema imunológico é definido como o conjunto de células, tecidos e moléculas que agem como intermediários na defesa do organismo contra as infecções, conferindo imunidade e sendo essa a sua função fisiológica (ABBAS; LICHTMAN, 2007). Componentes do sistema imunológico realizam suas funções através da geração de mecanismos de defesa diversos, que variam desde barreiras mecânicas, tais como desempenhada pela pele, até células possuindo moléculas de receptores capazes do reconhecimento de antígenos, além da capacidade de geração de memória imunológica por alguns tipos celulares (GENNERY; CANT, 2006). O sistema imunológico compreende duas divisões funcionalmente diferentes: imunidade inata e adaptativa (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000; CALDER; KEW, 2002). De maneira geral, a principal diferença entre estes dois componentes do sistema imunológico reside nos mecanismos e

receptores utilizados para o reconhecimento imunológico (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000).

Imunidade inata ocorre como primeira linha de defesa contra agentes infecciosos. Sua principal função é impedir a entrada de patógenos no organismo e, caso entrem, eliminá-los rapidamente. Barreira mecânica desempenhada pelo epitélio exerce excelente proteção contra a entrada de patógenos. Caso esta barreira seja sobrepujada, células fundamentais na imunidade inata, como macrófagos e neutrófilos, agem objetivando o controle do processo infeccioso. A imunidade inata age de duas maneiras principais: destruição direta do patógeno através das proteínas do sistema complemento ou por produtos tóxicos liberados pelas células e através do processo de fagocitose. Este reconhecimento dos patógenos pelos fagócitos causa a geração de diversos mediadores (como prostaglandinas e citocinas) que resultam em resposta inflamatória, promovendo acúmulo de fagócitos no local da infecção e objetivando conter a propagação do agente infeccioso (CALDER; KEW, 2002; JANEWAY *et al.*, 2007).

Macrófagos residem nos tecidos e são as primeiras células a encontrar os patógenos. Derivam de progenitores localizados na medula óssea, pertencentes à linhagem mielóide e representam a forma madura dos monócitos circulantes. São encontrados em grande número em vários tecidos, em associação com o trato gastrintestinal, pulmão, fígado e baço (ROITT; DELVES, 2000; JANEWAY *et al.*, 2007). Embora os macrófagos sejam os primeiros a encontrar o patógeno, rapidamente recrutam outro tipo de fagócito, os neutrófilos. Estas células representam a segunda maior família de fagócitos e são também denominados leucócitos neutrofílicos polimorfonucleares. Apresentam meia-vida curta e são abundantes no sangue, mas não estão presentes em tecidos de indivíduos saudáveis (JANEWAY *et al.*, 2007).

Fagócitos possuem receptores localizados em sua superfície celular que reconhecem estruturas padrões conservadas de patógenos e podem assim, discriminar o próprio do não-próprio. Dentre estes receptores incluem-se aqueles que reconhecem determinadas moléculas de açúcar encontradas na superfície dos patógenos, como o receptor de manose, que quando ativados são capazes de promover diretamente a fagocitose (GENNERY; CANT, 2006; JANEWAY *et al.*, 2007). Existem, também, alguns receptores de sinalização que são importantes na indução da imunidade adaptativa. Estes receptores são

semelhantes ao Toll, que foi descrito pela primeira vez na mosca-das-frutas, e são evolutivamente conservados. Agem como receptores de sinalização. Assim, são capazes de sinalizar em resposta aos proteoglicanos bacterianos ou lipopolissacarídeos, promovendo ativação do fator de transcrição nuclear κ B e indução de diversos genes, como aqueles para citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimuladoras, que são importantes para o início da resposta adaptativa (JANEWAY *et al.*, 2007).

Fagocitose é um processo complexo realizado por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas após a ligação dos receptores fagocíticos que estão na superfície dessas células com antígenos ou opsoninas, desencadeando vias de sinalização que resultam em morte do patógeno ou processamento para sua apresentação à outras células (NIEDERGANG; CHAVRIER, 2004). Entretanto, a destruição do patógeno não depende somente do seu englobamento, mas sim da formação de vesícula intracelular, denominada fagossoma e, posteriormente de sua maturação. Após a ativação dos receptores fagocíticos e desencadeamento de vias de sinalização, processos como remodelação de polímeros de actina e da membrana para formação de pseudópodos resultam no fagossoma. A posterior fusão deste com outras vesículas intracelulares resulta em sua maturação e capacita o fagossoma a destruir aquelas partículas englobadas através da atuação de enzimas líticas e do complexo NADPH oxidase do fagócito (SCOTT; BOTELHO; GRINSTEIN, 2003; NIEDERGANG; CHAVRIER, 2004; STUART; EZEKOWITZ, 2005; YEUNG *et al.*, 2006).

Indivíduos diabéticos apresentam alterações nas funções normais de neutrófilos, o que inclui quimiotaxia, aderência, fagocitose e morte intracelular. Estados hiperglicêmicos reduzem a capacidade fagocítica e podem atuar inibindo a geração de espécies reativas de oxigênio por inibir a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, enzima responsável pela formação de NADP (GUPTA *et al.*, 2007).

A capacidade de reconhecimento específico do antígeno e a geração de memória imunológica são mecanismos de defesa evoluídos, e representam características da imunidade adaptativa (LAROSA; ORANGE, 2008). Linfócitos são as principais células que executam as funções pertinentes a esse componente da resposta imunológica. Eles apresentam receptores de superfície de uma única especificidade gerados através de recombinação gênica,

garantindo grande diversidade no reconhecimento do antígeno (JANEWAY *et al.*, 2007; GENNERY; CANT, 2006). Podem ser classificados em linfócitos B, linfócitos T e células *natural killer* (NK). Após o encontro com antígeno ocorre o processo de proliferação ou expansão dos linfócitos, aumentando o número de células capazes de responder a um antígeno em particular (CALDER; KEW, 2002; JANEWAY *et al.*, 2007).

Imunidade humoral é aquela mediada por linfócitos B, os quais amadurecem, na medula óssea, para tornarem-se células produtoras de anticorpos. Anticorpos agem neutralizando patógenos e toxinas, promovendo opsonização e ativando o complemento (LAROSA; ORANGE, 2008). A formação de complexos entre antígeno/anticorpo e antígeno/complemento/anticorpo favorece o reconhecimento por fagócitos que, então iniciam o processo de fagocitose (DELVES; ROITT, 2000).

Linfócitos T são responsáveis pela imunidade mediada por células (CALDER; KEW, 2002). Estas células amadurecem no timo e podem se tornar células T citotóxicas (marcadas pela expressão da molécula de superfície celular CD8) ou células T auxiliares (marcadas pela expressão de CD4), estas últimas atuando principalmente na secreção de citocinas. Linfócitos T auxiliares dividem-se, ainda em células T auxiliares tipo 1 (Th1) que secretam interleucina 2 (IL2) e interferon- γ (IFN- γ), mas não interleucina 4, 5 ou 6, enquanto as células T auxiliares tipo 2 (Th2) secretam interleucina 4, 5, 6, e 10, mas não interleucina 2 (IL2) e interferon- γ (IFN- γ). De maneira resumida, células Th1 auxiliam na imunidade celular por ativar macrófagos e células T citotóxicas, enquanto células Th2 estimulam as células B a produzirem anticorpos (DELVES; ROITT, 2000).

É acreditado que indivíduos diabéticos, principalmente aqueles com pobre controle da doença, apresentam deficiências relacionadas com imunidade mediada por células. Assim, há menor capacidade proliferativa de linfócitos T de diabéticos, porém esta supressão não é claramente compreendida, embora menor produção de interleucina 2 tenha sido encontrada por monócitos destes indivíduos (LIU *et al.*, 2005).

1.3 ÁCIDOS GRAXOS

Lípídios constituem grupo heterogêneo de moléculas com a característica comum de hidrofobicidade e, assim podem ser extraídas dos tecidos por solventes apolares. Eles desempenham funções críticas para manutenção da homeostase do organismo, tais como funções regulatórias ou de coenzimas e aquelas desempenhadas pelas prostaglandinas e hormônios esteróides, além de manter sob condições normais as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão dos impulsos nervosos. Adicionalmente são a principal fonte de energia para o organismo (CHAMPE *et al.*, 2006; MARTIN *et al.*, 2006).

Ingestão de lipídios compreende 25-45% do total de energia consumida em muitos países industrializados (BENATTI *et al.*, 2004). Lipídios dietéticos incluem mono-, di- e triacilgliceróis, esfingolipídios, ácidos graxos livres, colesterol, esteróis de plantas, pigmentos e vitaminas lipossolúveis. Ácidos graxos representam um tipo de gordura ou lipídio (FRITSCHÉ, 2006). De forma geral, os ácidos graxos podem ser classificados em saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, dependendo da presença e número de insaturações na molécula (DEFILIPPIS; SPERLING, 2006). A maioria dos ácidos graxos ingeridos na dieta correspondem às gorduras saturadas, bem como monoinsaturadas e, quantidades modestas de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) (BENATTI *et al.*, 2004).

1.3.1 Ácidos Graxos Poliinsaturados Ômega 3

Ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) são moléculas que apresentam duas ou mais duplas ligações na configuração *cis*. Há duas famílias principais de AGPI: a família ômega 3 e ômega 6, onde os mais conhecidos componentes destas famílias são o ácido α -linolênico e ácido linoléico, respectivamente e são considerados ácidos graxos essenciais, pois só podem ser adquiridos através da dieta. A principal fonte de ácidos graxos ômega 6 (AGPI n6) são óleos vegetais (como óleo de soja), enquanto peixe e outros óleos vegetais (como óleo de linhaça) representam importante fonte de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 (AGPI n3) (BENATTI *et al.*, 2004).

Se, por um lado, fatores genéticos determinam a susceptibilidade de indivíduos desenvolverem alguma doença, fatores ambientais, dentre eles a dieta, determinam quais indivíduos susceptíveis desenvolverão certa doença (SIMOPOULOS, 2002). Dieta relaciona-se com desenvolvimento de doença cardiovascular, dislipidemias, obesidade, diabetes, doenças inflamatórias e câncer (BENATTI *et al.*, 2004). A dieta das sociedades modernas baseia-se em maior consumo de ácidos graxos saturados e um desequilíbrio na razão AGPI ômega6/ômega 3, com consumo maior de ácidos graxos AGPI n6 e declínio de AGPI n3. Nas populações que dependiam de caça e extrativismo (FIGURA 2) para sobrevivência, o consumo de AGPI n3 e n6 era praticamente o mesmo. Após a Revolução Industrial e, concomitantemente o aparecimento de técnicas industriais modernas, foram desenvolvidos óleos vegetais com menor proporção de AGPI n3 e maior de AGPI n6, pois a quantidade de ácido graxo α -linolênico (AGPI n3) presente teve problemas organolépticos (SIMOPOULOS, 1991). O maior consumo de grãos de cereais das sociedades atuais está associado para o aparecimento de condições como diabetes, obesidade, hipertensão, com maior risco de doença cardiovascular, visto a maior quantidade de carboidratos e n6 e menores concentrações de AGPI n3 e antioxidantes encontrados nestes grãos (SIMOPOULOS, 2002).

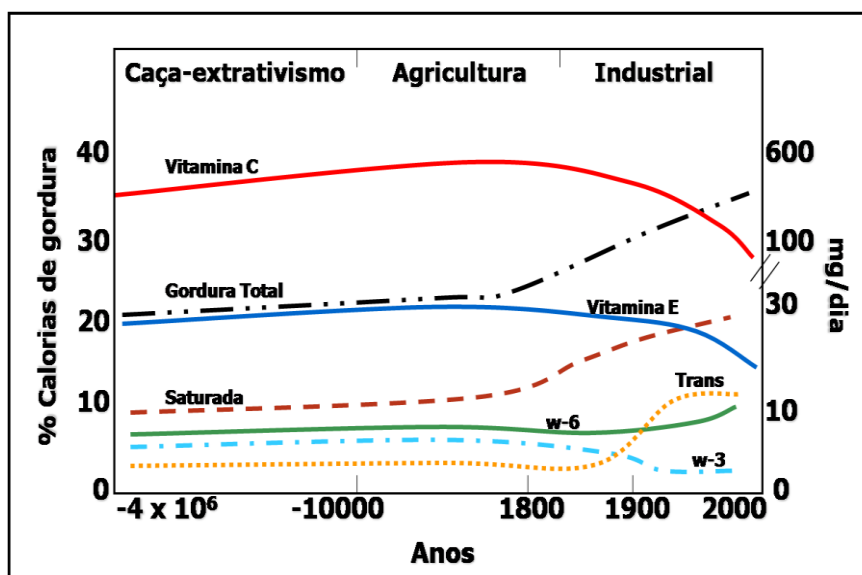


Figura 2 – Esquema ilustrando mudanças na dieta ao longo dos anos (adptado de SIMOPOULOS, 2002).

Enquanto ácidos graxos saturados são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), os óleos de peixe, ricos

em ácidos graxos ômega 3 (AGPI n3), estão associados com menor risco (DCV) (DAS, 2000). Ácidos graxos n3 dietéticos alteram a composição da membrana das células promovendo importantes efeitos em processos de sinalização e comunicação dentro e entre as células. São também precursores de certos eicosanóides. Estes ácidos graxos competem com os ácidos graxos n6, particularmente o ácido araquidônico (AA), pela incorporação na membrana e posterior metabolismo à eicosanóides, através da competição por enzimas envolvidas neste metabolismo (FIGURA 3) (SURETTE, 2008).

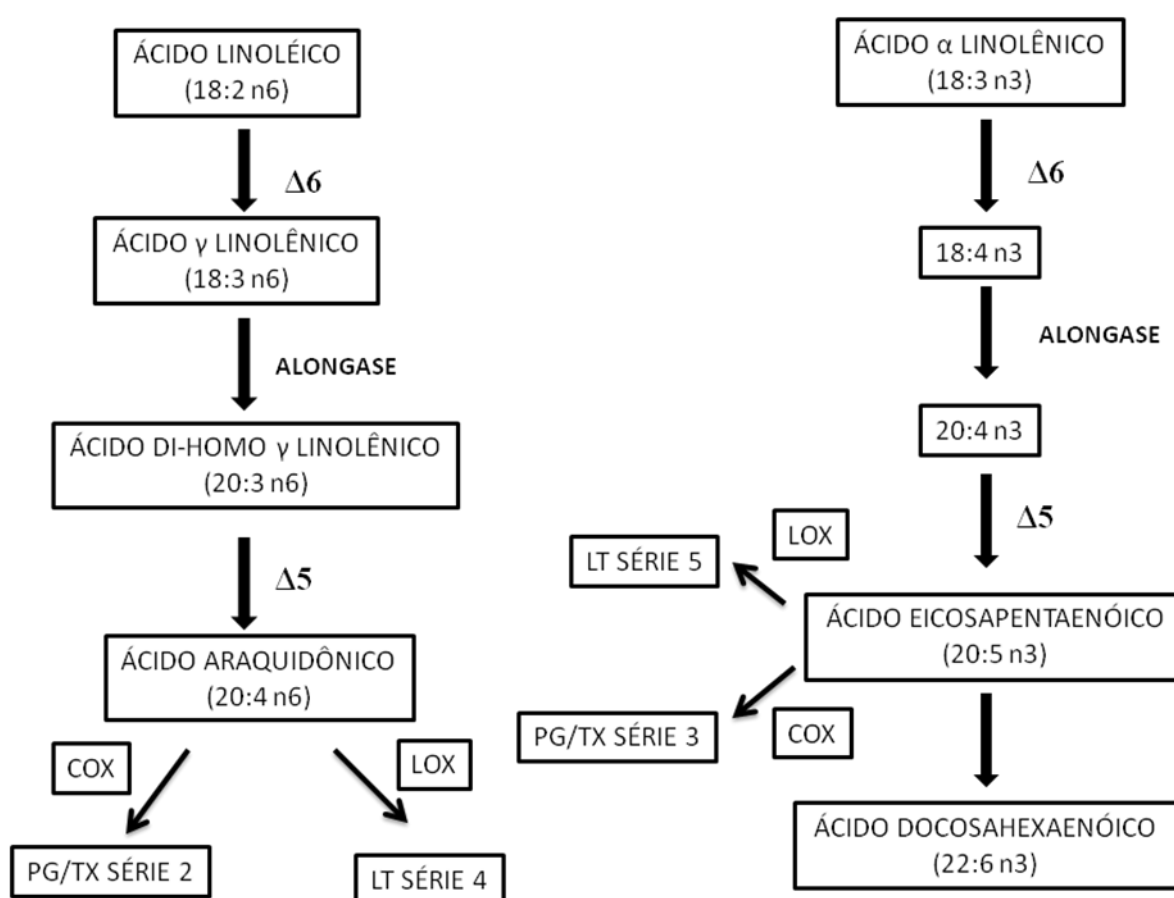


Figura 3 – Metabolismo dos ácidos graxos n3 e n6. (COX – ciclooxigenase; LOX – lipooxigenase; LT – leucotrieno; PG – prostaglandina; TX – tromboxano)

Eicosanóides é o nome dado a uma grande família de ácidos graxos de vinte carbonos oxigenados e que se divide em três grupos, os prostanóides (prostaglandinas e tromboxanos) gerados através da via da enzima ciclooxigenase (COX), os leucotrienos formados pela via da lipooxigenase (LOX) e os epóxidos gerados pela via do citocromo P450 (SMITH, 1989).

Os ácidos graxos n6 originam prostanóides da série 2 e leucotrienos da série 4 que apresentam características pró-inflamatórias, enquanto os ácidos graxos n3 dão origem a prostanóides da série 3 e leucotrienos da série 5 com propriedades anti-inflamatórias. Assim, o alto consumo de ácidos graxos n6 resulta em desordens imunológicas, doenças inflamatórias e cardiovasculares, sendo recomendável o maior consumo de ácidos graxos da família n3 (MARTIN *et al.*, 2006).

Além de seus efeitos anti-inflamatórios mediados pela menor produção de eicosanóides pró-inflamatórios, os ácidos graxos n3 também agem controlando o processo inflamatório por modular a expressão de moléculas de adesão, tais como selectinas e VCAM-1 (molécula de adesão célula - vasculatura 1), que participam nas interações dos neutrófilos com o endotélio vascular. Isto é conseguido através da modulação das vias de sinalização associadas com o fator de transcrição nuclear κ B (NF κ B). Ácidos graxos n3 podem agir também diretamente em receptores nucleares, como o receptor retinóide X, que opera como fator de transcrição. Ainda, monócitos cujas membranas são enriquecidas com AGPI n3 produz quantidades reduzidas de citocinas, tais como TNF- α e interleucina 1 β , que agem aumentando a resposta inflamatória (CALDER, 2002; SURETTE, 2008). Portanto, com relação aos efeitos antiinflamatórios dos ácidos graxos n3 podemos considerar que diminuem o conteúdo de ácido araquidônico das membranas resultando em síntese de eicosanóides derivados de n6 diminuída (GIUGLIANO; CERIELLO; ESPOSITO, 2006), pois a incorporação de ácidos graxos n3 na membrana celular ocorre com concomitante substituição de ácido araquidônico pelo ácido eicosapentaenóico (EPA) ou docosahexaenóico (DHA), portanto menos substrato está disponível para produção de eicosanóides (como PGE₂, Tromboxano A₂ e LTB₄), já que esses últimos são produzidos a partir do ácido araquidônico (AA) (BROWNING, 2003; LOMBARDO; CHICCO, 2006; CALDER, 2006). Dessa forma, ocorre uma competição entre EPA e AA para a síntese de leucotrienos e prostaglandinas em nível de COX e LOX (SIMOPOULOS, 1991).

Ácidos graxos n3 agem sobre a expressão gênica, atuando na via de sinalização do NF κ B, diminuindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, e sobre os PPAR's (receptor ativado pelo proliferador de peroxissomos) os quais

podem interferir e, até mesmo antagonizar a ativação de outros fatores de transcrição, tais como o próprio NFκB (CALDER, 2002). Podemos dizer que AGPI n3 suprimem genes lipogênicos e glicolíticos, como a glicoquinase, complexo da piruvato desidrogenase, acetilCoa carboxilase, piruvato quinase e ácido graxo sintase, enquanto também aumentam a codificação de genes relacionados à oxidação lipídica e termogênese ocasionando maior expressão de proteínas tais como carnitina-palmitoil-transferase, HMG-Coa sintase, transportadores de ácidos graxos e acilCoa sintase, incluindo o gene UCP-3 (CLARKE, 2000). Porém, o efeito de AGPI n3 na supressão de genes lipogênicos parece estar mais ligado com a expressão e localização nuclear de SREBP1 (proteína ligante do elemento regulatório esterol), fator de transcrição que é ligado por AGPI, os quais diminuem a estabilidade de seu RNAm (CLARKE, 2000). Entretanto, nem todos os genes de enzimas lipogênicas são suprimidos pela ligação de AGPI à SREBP-1, indicando que há outro fator de transcrição secundário controlado por SREBP-1 (CLARKE, 2000). Estudos mostram que esse fator secundário pode ser o HNF-4 (fator nuclear hepático 4), membro da superfamília de receptores esteróides que, liga-se à ésteres de acil Coa graxo, e possui elementos de resposta em genes de enzimas como FAS (ácido graxo sintase) e piruvato quinase (CLARKE, 2000).

Os ácidos graxos n3 têm demonstrado efeitos benéficos no que diz respeito a problemas cardiovasculares, o que pôde ser observado em estudos epidemiológicos, metabólicos e em animais (GIUGLIANO; CERIELLO; ESPOSITO, 2006) e um papel chave na prevenção e tratamento de dislipidemias, diabetes tipo 2, resistência à insulina e hipertensão (LOMBARDO; CHICCO, 2006), bem como apresentando atividade antiinflamatória (GIUGLIANO; CERIELLO; ESPOSITO., 2006; LOMBARDO; CHICCO, 2006), antitrombótica, antiarrítmica e propriedades vasodilatadoras (LOMBARDO; CHICCO, 2006).

O efeito de ácidos graxos n3 na dislipidemia pode ser observado pela redução das concentrações de triacilgliceróis (TG), através de redução na síntese de VLDL e de TG hepática. Isto pôde ser confirmado por uma revisão de estudos em humanos conduzida em 1997, mostrando que 4g de n3/dia reduziu em 25-30% as concentrações de TG séricos, aumentou em 5-10% as

concentrações de LDL e também aumentou em 1-3% às de HDL (ZATSICK; MAYKET, 2007).

A incorporação de ácidos graxos n3 na membrana de células imunitárias exerce importante papel na modulação do sistema imunológico exercida por n3. Assim, AGPI n3 pode afetar a capacidade fagocítica de neutrófilos e macrófagos, sinalização na célula T e capacidade de apresentação de antígenos de maneira dose-dependente (CALDER, 2008). É conhecido que AGPI n3 reduz a proliferação de linfócitos T e B estimulados por mitógenos, além de diminuir a produção de interleucina 2 por linfócitos e também reduzir a atividade das células NK. Ácidos graxos n3 também modulam a produção de citocinas por macrófagos, como dito anteriormente (SWEENEY; PURI; REEN, 2005).

Estudos demonstram que n3 mantém a atividade do receptor de insulina, do IRS-1 (substrato do receptor da insulina-1) e, conseqüentemente da PI-3-quinase e GLUT4, assim ocasionando um aumento de glicose-6-fosfato acompanhado por maior síntese de glicogênio (CORCORAN; LAMON-FAVA; FIELDING, 2007).

Sirtori *et al.* (1998) mostrou que o tratamento por um período de seis meses de pacientes diabéticos com AGPI n3 causou deterioração do controle glicêmico um ano após o tratamento. Sendo que outros estudos mostram efeitos adversos de AGPI n3 no controle glicêmico tais como aumento no requerimento de insulina, aumento de hemoglobina glicada e aumento da glicemia de jejum e pós-prandial em pacientes diabéticos do tipo 1 e do tipo 2 (DE CATERINA *et al.*, 2007). Estes efeitos indesejáveis ocorrem em altas doses de AGPI ne (1-16g/dia). Foi demonstrado que AGPI n3 pode ser benéfico para mulheres diabéticas em gestação, o qual auxilia a prevenir que seus filhos desenvolvam anormalidades metabólicas ligadas à macrossomia (BOURRE, 2007).

2 JUSTIFICATIVA

A incidência da DM1 vem aumentando de forma paralela à observada para a diabetes *mellitus* tipo 2 e, embora seja conhecida como doença da infância sua incidência é comparável em adultos (DEVENDRA; LIU; EISENBARTH, 2004). Como DM1 pode ser modulado por fatores dietéticos, genéticos e ambientais (NARENDRAN; ESTELLA; FOURLANOS, 2005), a influência da dieta pode ser considerado fator determinante.

Considerando-se que se trata de uma doença cuja patogênese implica em quadro inflamatório crônico (NARENDRAN; ESTELLA; FOURLANOS, 2005) além de um quadro sugestivo de imunossupressão (McMANUS *et al.*, 2001), e levando-se em conta a relativa tendência de indivíduos diabéticos apresentarem maior incidência de infecções, a suplementação dietética com nutrientes que apresentem atividade anti-inflamatória e possibilitem melhor atividade do sistema imunológico é essencial.

O óleo de peixe (rico em AGPI n3) têm demonstrado efeitos benéficos em processos inflamatórios, através de sua atividade antiinflamatória (GIUGLIANO; CERIELLO; ESPOSITO, 2006; LOMBARDO; CHICCO, 2006), além de sua capacidade de modular células do sistema imunológico (CALDER, 2008).

O efeito de AGPI n3 na DM pode ser demonstrado por estudos conduzidos pela suplementação com doses anti-inflamatórias de DHA *in utero* que bloqueiam eventos inflamatórios das ilhotas, prevenindo assim o desenvolvimento de DM1 em crianças de alto risco genético para a doença (NORRIS *et al.*, 2007). Da mesma forma, estudos em animais mostraram que AGPI n3 diminuiu insulite pancreática e hiperglicemia em animais com diabetes experimental induzido por estreptozotocina (DE CATERINA *et al.*, 2007). Além de melhorarem função de linfócitos, neutrófilos e macrófagos, alterando fatores como capacidade fagocítica, produção de EROS e proliferação linfocitária (SAKER, 2006; POMPÉIA *et al.*, 2000).

Assim, a suplementação com AGPI n3 pode trazer benefícios para indivíduos apresentando o quadro diabético tipo 1, podendo ocasionar melhoras tanto no aspecto bioquímico quanto imunológico.

3 OBJETIVOS

Avaliar o efeito da suplementação com óleo de peixe, rico em AGPI n3 sobre parâmetros bioquímicos plasmáticos e funcionalidade de células do sistema imunitário de ratos diabéticos.

Para alcançar estes objetivos investigaremos:

- Concentrações plasmáticas de glicose, triacilglicerol e colesterol total;
- Atividade fagocitária, volume lisossomal, produção de peróxido de hidrogênio e produção de ânion superóxido de macrófagos peritoneais e neutrófilos sanguíneos;
- Capacidade proliferativa de linfócitos mesentéricos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar com aproximadamente 70 dias de idade (peso aproximado de 200 g) obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas, Campus Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. Os mesmos foram mantidos em ciclo claro/escuro (22/10 h) e temperatura constante ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, aproximadamente) em gaiolas coletivas contendo 5 animais por grupo. Os animais foram divididos em 8 grupos: Controle alimentado com ração (C) ou suplementado com óleo de peixe (OP) ou gordura de coco (GC), diabetizado (D), diabetizado suplementado com óleo de peixe (D/OP) ou com gordura de coco (D/GC). Aos animais diabetizados e suplementados foram tratados mais dois grupos com insulina, a saber: D/OP mais insulina (D/OP/I) e D/GC mais insulina (D/GC/I). Durante todo o período experimental os animais receberam água e ração à vontade. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) (ANEXO).

4.2 INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL

Os animais pertencentes aos grupos diabetizados foram colocados em jejum de, no mínimo, 12 horas antes da administração intravenosa de estreptozotocina, na dose de 45 mg/kg peso corporal. A droga a ser administrada foi dissolvida em tampão citrato (ácido cítrico 18,2 mM; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 29,6 mM; pH 4,8) (JUNOD et al, 1969). Após o procedimento de indução, os animais foram mantidos ainda, 1 hora em jejum, a fim de se evitar a competição da estreptozotocina com a glucose pelo receptor GLUT2 na célula beta pancreática (SZKUDELSKI, 2001). Exatamente 1 semana após a indução, o diabetes experimental foi confirmado através da mensuração da glicose plasmática, coletada da cauda dos animais, por meio do glicosímetro *One Touch Ultra*[®] Johnson & Johnson, após um jejum de 12 horas dos animais. Os ratos com glicemia igual ou superior a 220 mg/dL foram considerados diabéticos.

4.3 SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE

O óleo de peixe foi obtido da Fundação Herbarium. As cápsulas contêm 1g de óleo de peixe, na proporção de 0,192 g de EPA e 0,124g DHA. Os animais foram suplementados, após a constatação do quadro diabético, durante 30 dias consecutivos. Os animais foram ortotanaziados, após o período de suplementação para as mensurações abaixo.

4.4 ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA

Insulina 70/30 Humulin foi administrada aos animais pertencentes a dois dos oito grupos, os quais receberam insulina, além de suplementação com óleo de peixe ou gordura de coco, via subcutânea e diariamente. A dose utilizada foi de 4U por rato, administradas sempre no mesmo horário.

4.5 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

4.5.1 Mensuração da Glicose Plasmática

Foi utilizado o método enzimático colorimétrico da glicose oxidase através do uso do kit Glicose-oxidase da Bioliquid. A leitura da absorbância em espectrofotômetro foi realizada com comprimento de onda de 505 nm e os resultados expressos em mg/dl.

4.5.2 Perfil Lipídico Plasmático

Foi utilizado o método enzimático colorimétrico para determinação de TG e colesterol total, utilizando os kits GPO-Trinder e colesterol total, respectivamente, da Bioliquid. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro a 500 nm e os resultados expressos em mg/dL.

4.6 ENSAIOS COM MACRÓFAGOS

4.6.1 Obtenção de macrófagos peritoneais

Após a remoção da pele da região abdominal, 20 mL de tampão fosfato-salina (PBS – estéril), pH 7,4, foram injetados na cavidade peritoneal dos animais. Trinta segundos após a administração, a cavidade peritoneal foi aberta e o fluido, contendo as células, aspirado com o auxílio de pipeta *Pasteur* de plástico, estéril. Em seguida, estas células foram centrifugadas (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) a 1200 rpm a 4 °C, durante 5 minutos. Os macrófagos então, após descarte do sobrenadante, foram ressuspensos em 3 mL de PBS.

4.6.2 Fagocitose de Zimosan

A capacidade fagocítica foi mensurada através do método descrito por Bonatto et al. (2004). Da solução peritoneal foram depositados 100 µL contendo 10^5 células em placa de 96 poços e adicionado 10 µL de zimosan corado com vermelho neutro e foi incubado por 30 minutos. Após, foram adicionados 100 µL de fixador. Após 30 minutos, a placa foi lavada com PBS e centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm. O vermelho neutro que está dentro dos fagossomos foi então solubilizado utilizando-se 100 µL de solução de extração e após 30 minutos foi feita a leitura a 550nm em leitor de microplacas (Microplate Reader Biorad - Benchmark®). Os dados foram expressos como média \pm EPM da porcentagem de cada grupo em relação ao grupo controle (C).

4.6.3 Volume Lisossomal

Foi utilizado o método proposto por Pipe, Cole e Farley (1995). Assim, em placas de 96 poços foi depositado 100 µL da solução contendo 10^5 células e 20 µL da solução estoque de vermelho neutro a 2%. Após um período de 30 minutos a placa foi centrifugada por 5 minutos por 1500 rpm. O sobrenadante foi então descartado e os poços lavados com PBS para se eliminar o vermelho neutro que não foi internalizado pelas células. Posteriormente, o vermelho neutro contido nos lisossomos foi solubilizado pela adição de 100 µL de solução de extração. Este

procedimento é viável pois o vermelho neutro é corante catiônico que se difunde através da membrana celular e se mantém no lisossomo pela mudança de pH que encontra neste compartimento, o qual é ácido, e isto ocasiona alteração de cargas neste corante. A leitura foi realizada após 30 minutos em 550 nm através de leitor de microplacas (Microplate Reader Biorad - Benchmark®). Os dados foram expressos como média \pm EPM da porcentagem de cada grupo em relação ao grupo controle (C).

4.6.4 Produção de Ânion Superóxido

Segundo Madhavi e Das (1994) *nitroblue tetrazolium* (NBT) é um composto amarelo lipossolúvel que se torna insolúvel e de cor azul quando reduzido. Assim, alíquotas de 100 μ L de solução contendo células do lavado peritoneal foram plaqueadas em microplaca de 96 poços, posteriormente 100 μ L de NBT 0,1% foram adicionados. Após uma incubação de 30 minutos a 37°C, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm, depois lavada com PBS e adicionado metanol 50% para fixar as células. A placa foi incubada por mais 10 minutos, centrifugada e o sobrenadante descartado. A adição de 120 μ L de Hidróxido de Potássio (KOH) e 140 μ L de DMSO será feita a fim de solubilizar o NBT reduzido presente no sedimento. Posteriormente procedeu-se a leitura a 550 nm em leitor de microplacas (Microplate reader Biorad - Benchmark®). Os dados foram expressos como média \pm EPM da porcentagem de cada grupo em relação ao grupo controle (C).

4.6.5 Produção de Peróxido de Hidrogênio

Foi realizada através de método descrito por Pick e Mizel (1981). Sendo assim, a produção de peróxido de hidrogênio pôde ser mensurada através da oxidação de vermelho fenol. Alíquotas de 100 μ L da solução peritoneal contendo macrófagos foi plaqueada em microplacas de 96 poços. Foram incubadas por 1 hora no escuro (para evitar foto-oxidação) e o sobrenadante descartado. 100 μ L de vermelho fenol contendo peroxidase (horseradish) e zymosan foram adicionados. A placa foi incubada por mais 30 minutos e a leitura feita a 620 nm em leitor de microplacas (Microplate reader Biorad - Benchmark®). Os dados

foram expressos como média \pm EPM da porcentagem de cada grupo em relação ao grupo controle (C).

4.6.6 Ensaio de adesão

Foi plaqueado, em microplacas de 96 poços 100 μ L de células na concentração de 2×10^5 . Incubou-se por 1 hora em estufa a 37 °C e submeteu-se a procedimentos de lavagem. Metanol 50% foi adicionado para fixação das células e incubado por 5 minutos. Giemsa 0,2% foi adicionado e a microplaca incubada por 40 minutos. Metanol foi adicionado para solubilizar o corante. Após 30 minutos de incubação, a leitura foi realizada a 550 nm (dados não mostrados). O resultado foi expresso como absorvância de 2×10^6 células/mL.

4.7 ENSAIOS COM NEUTRÓFILOS

4.7.1 Obtenção de neutrófilos sanguíneos

O isolamento dos neutrófilos foi baseado no método proposto por BØYUM (1976). O sangue coletado dos animais foi transferido para tubos Falcon[®] de 50 mL e diluídos (1:2) com PBS. A seguir, foi adicionado 3 mL de Ficoll-Paque Plus e em seguida 8 mL do sangue diluído. Logo, foram centrifugados durante 40 minutos a 1400 rpm. Após a separação das células, a camada superior constituída por células mononucleares e plaquetas foi descartada. A camada inferior composta pelos neutrófilos e eritrócitos foi incubada com solução hemolítica em banho-maria por 15 minutos. Depois, centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em PBS para posterior contagem em câmara de Neubauer.

4.7.2 Funcionalidade de Neutrófilos

Após seu isolamento, os neutrófilos sanguíneos foram submetidos a ensaios de capacidade fagocítica, retenção lisossomal, produção de ânion superóxido e produção de peróxido de hidrogênio, como descritos anteriormente

para os macrófagos. Os dados foram expressos como média \pm EPM da porcentagem de cada grupo em relação ao grupo controle (C).

4.8 PROLIFERAÇÃO LINFOCITÁRIA

4.8.1 Obtenção dos Linfócitos

Os linfonodos mesentéricos foram coletados e acondicionados em PBS. Após compressão destes órgãos em malha fina, os linfócitos foram obtidos. Depois da filtragem em papel filtro (Whatman nº 105) as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram lavadas com PBS estéril. Foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer.

4.8.2 Ensaio de Proliferação

Concentração de 2×10^6 células foram plaqueadas em microplacas de 96 poços e cultivadas a 37°C em atmosfera de 95% ar / 5% CO₂, mantidas em estufa (N TC2323-2E, Sheldon Manufacturing, Shel Lab USA) por 48 h em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com L-glutamina (13,5 mM) e NaHCO₃ (26,2 mM) e enriquecido com 10% (v/v) de soro fetal bovino e 0,1% (v/v) de antibióticos (penicilina G 10 mU e estreptomicina 10 mg/L). Os linfócitos T foram estimulados com 20 µL de Concanavalina A (Con A; 5 µg/mL) (LICASTRO; DAVIS; MORINI, 1993). Após um período de cultivo celular de 48 horas foi adicionado 20 µL de [2-¹⁴C]-timidina (0,02 µCi/poço) e o cultivo continuou por mais 18 horas, sob as mesmas condições citadas anteriormente. Logo após este período de 66 horas de cultivo celular, as células foram coletadas em coletor múltiplo em papel filtro nº 11731. Os discos de papel contendo a radioatividade incorporada ao DNA das células foram transferidos para flaconetes contendo 1 mL de líquido de cintilação e levados para posterior contagem em contador. Os dados foram expressos como média \pm EPM do índice de proliferação dos linfócitos.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) dos grupos experimentais e foram submetidos à análise de variância de duas vias com o pós teste de Bonferroni, tendo como fator a diabetes e a suplementação e à análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey, para populações com distribuição gaussiana. Para populações que não seguiram distribuições gaussianas, foi utilizada análise de variância não-paramétrica (teste de Kruskal-Wallis), seguido de pós-teste de Dunn. Teste “t” de Student foi utilizado quando indicado. $p < 0,05$ foi usado para indicar significância estatística. As análises e os gráficos foram realizados com o auxílio do software GraphPad Prism® (GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California EUA).

5 RESULTADOS

5.1 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SANGUÍNEOS

5.1.1 Glicemia

A constatação do quadro diabético foi feita sete dias após a indução. Glicemia de animais do grupo controle foi de 82,33 (\pm 3,48; n=15) e para animais diabéticos foi de 379,30 (\pm 9,11; n= 68). A glicemia do grupo diabético foi 360% maior que a do controle ($p < 0,0001$).

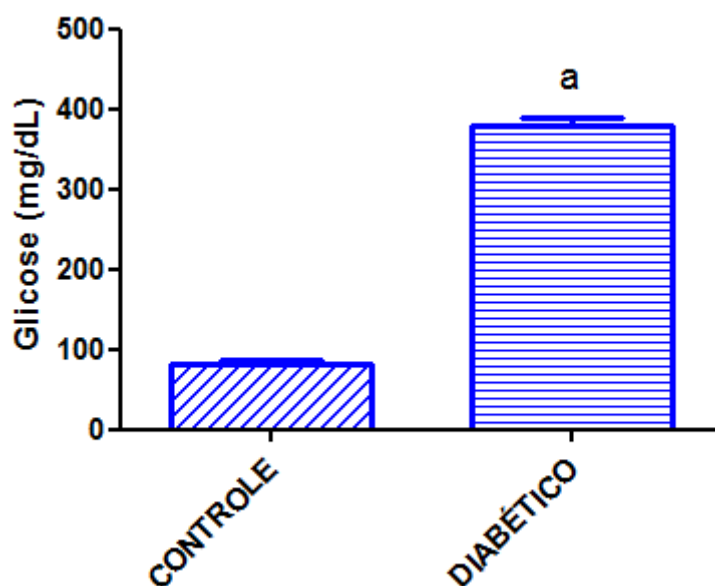


Figura 4 – Glicemia de jejum dos animais dos grupos controle e diabético. ^a $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle.

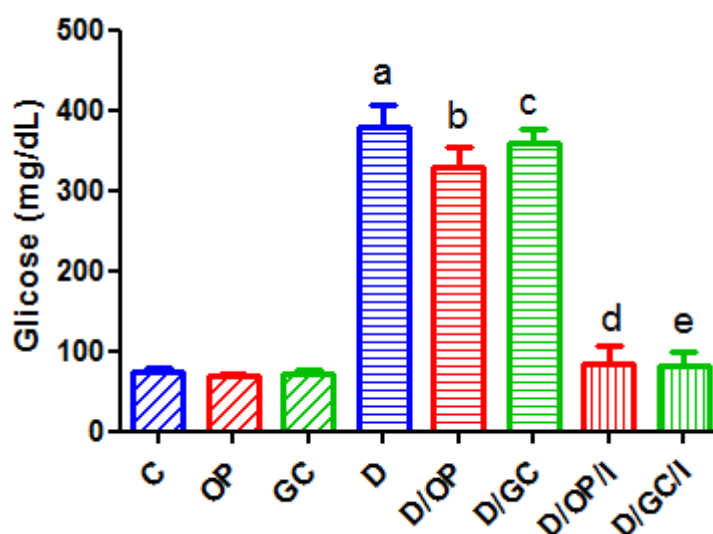


Figura 5 – Concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL) dos animais dos grupos controle (C), suplementado com óleo de peixe (OP) ou coco (GC). Diabético (D), diabético suplementado com óleo de peixe (D/OP) ou coco (D/GC). Diabético suplementado com óleo de peixe ou de coco, recebendo insulina, D/OP/I e D/GC/I, respectivamente. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo C. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo OP. ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo GC. ^d $p < 0,05$ comparado ao grupo D/OP. ^e $p < 0,05$ comparado ao grupo D/GC.

A glicemia dos animais diabéticos ou não, suplementados ou não e tratados ou não com insulina está apresentada na figura 5. A glicemia do grupo controle (mg/dL) foi de $74,33 \pm 3,77$ e no diabético de $379,10 \pm 28,58$, que representou um aumento de 409,8% ($p < 0,05$ vs C). No animal não diabético suplementado com óleo de peixe (OP) ou coco (GC) a glicemia não foi diferente da do controle ($p > 0,05$). Nos animais diabéticos suplementados com óleo de peixe (D/OP) ou coco (D/GC) a glicemia foi similar ao do grupo diabético ($p > 0,05$) contudo foi de $328 \pm 26,90$ no D/OP e de $358,10 \pm 19,32$ no D/GC, sendo 382% e 395,8% maior quando comparado à do OP e GC, respectivamente, elevação esta significativa ($p < 0,001$). A terapia com insulina fez com que a glicemia no grupo D/OP/I e D/GC/I fosse de $84,81 \pm 21,38$ e $81,77 \pm 17,88$, respectivamente, similar à dos não diabéticos (OP e GC) e, portanto significativamente menor à dos D/OP e D/GC ($p < 0,05$), respectivamente.

5.1.2 Lipídios Plasmáticos

5.1.2.1 Colesterol Total

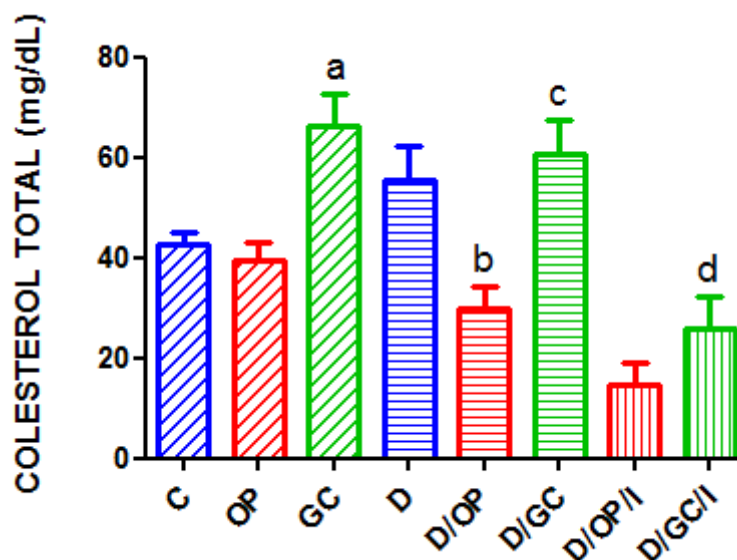


Figura 6 – Concentração de colesterol total (mg/dL) dos animais pertencentes aos grupos controle (C), controle suplementado com óleo de peixe (OP) e coco (GC). Diabético (D), diabético suplementado com óleo de peixe (D/OP) e coco (D/GC). Diabético suplementado com óleo de peixe ou de coco, recebendo insulina, D/OP/I e D/GC/I, respectivamente. ^a $p < 0,05$ comparado ao C. ^b $p < 0,01$ comparado ao D. ^c $p < 0,05$ comparado ao D/OP. ^d $p < 0,05$ comparado ao D/GC.

A concentração de colesterol total (mg/dL) dos animais diabéticos ou não, suplementados ou não e tratados ou não com insulina está apresentado na figura 6. A concentração de colesterol total do grupo controle foi de $42,79 \pm 2,46$ e do grupo diabético de $55,36 \pm 7,09$, sendo que estes valores não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$). No animal não diabético suplementado com óleo de peixe (OP) a concentração de colesterol total não foi diferente da do grupo controle ($p > 0,05$). Já a suplementação de animais não diabéticos com gordura de coco (GC) resultou em concentração de colesterol total de $66,24 \pm 6,43$, sendo 54,8% maior do que o grupo controle ($p < 0,05$). No caso de animais diabéticos suplementados com óleo de peixe (D/OP) ou coco (D/GC) a concentração de colesterol total foi de $29,90 \pm 4,50$ e $60,56 \pm 6,73$, respectivamente, sendo 46% menor e 9,4% maior que o grupo diabético

e D/OP, respectivamente ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente), respectivamente. A terapia com insulina de animais do grupo D/GC/I resultou em concentração de colesterol total de $25,90 \pm 6,23$, sendo 57,2% menor que o grupo D/GC ($p < 0,05$). A concentração de colesterol total dos animais do grupo D/OP/I foi similar ao do seu controle, D/OP ($p > 0,05$).

5.1.2.2 Triacilglicerol Plasmático

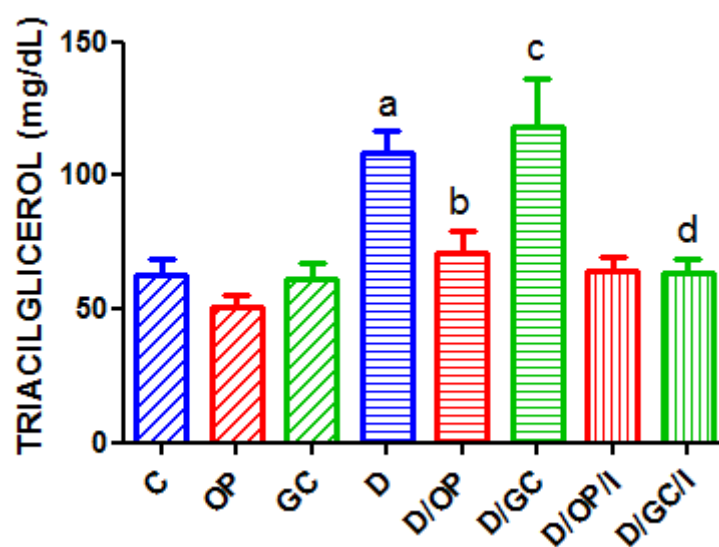


Figura 7 – Concentração de triacilglicerol plasmático (mg/dL) dos animais pertencentes aos grupos controle (C), controle suplementado com óleo de peixe (OP) e coco (GC). Diabético (D), diabético suplementado com óleo de peixe (D/OP) e coco (D/GC). Diabético suplementado com óleo de peixe ou de coco, recebendo insulina, D/OP/I e D/GC/I, respectivamente. ^a $p < 0,01$ comparado ao grupo C. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo D. ^c $p < 0,001$ comparado ao grupo GC. ^d $p < 0,05$ comparado ao grupo D/GC.

A concentração de triacilgliceróis dos animais diabetizados ou não, suplementados ou não e tratados ou não com insulina está apresentado na figura 7. A triacilglicerolemia do grupo controle (mg/dL) foi de $63,04 \pm 5,48$ e no diabético de $108,80 \pm 7,81$, que representou um aumento de 72,6% ($p < 0,01$ vs C). A suplementação de animais não diabéticos com óleo de peixe (OP) ou coco (GC) resultou em triacilglicerolemia similar ao do grupo controle ($p > 0,05$). Já a suplementação de animais diabéticos com óleo de peixe (D/OP) fez com que a concentração de triacilgliceróis fosse de $71,05 \pm 7,99$ sendo uma redução de 34,7%

quando comparado ao grupo diabético ($p < 0,05$), enquanto a suplementação de animais diabéticos com óleo de coco (D/GC) resultou em triacilglicerolemia de $118,50 \pm 17,41$ representando aumento de 8,9% ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo GC. A terapia com insulina de animais do grupo D/GC/I fez com que a concentração de triacilgliceróis fosse de $63,53 \pm 5,58$ resultando em redução de 46,4% quando comparado ao grupo D/GC ($p < 0,05$). Já a triacilglicerolemia de animais do grupo D/OP/I não foi diferente do grupo D/OP ($p > 0,05$).

QUADRO 1- Resumo dos dados funcionais de glicemia e perfil lipídico (mg/dL) dos grupos experimentais.

	Glicemia	Colesterolemia	Triacilglicerolemia
C	74,33±3,77 (n=24)	42,79±2,46 (n=10)	63,04±5,48 (n=11)
OP	68,06±4,06 (n=23)	39,65±3,57 (n=11)	51,04±4,37 (n=14)
GC	72,22±3,38 (n=23)	66,24±6,43 (n=11)	61,22±6,01 (n=16)
D	379,1±28,58 (n=20)	55,36±7,09 (n=17)	108,8±7,81 (n=12)
D/OP	328,0±26,90 (n=25)	29,90±4,50 (n=18)	71,05±7,99 (n=9)
D/GC	358,1±19,32 (n=22)	60,56±6,73 (n=17)	118,5±17,41 (n=14)
D/OP/I	84,81±21,38 (n=9)	14,82±4,01 (n=9)	64,46±5,05 (n=11)
D/GC/I	81,77±17,88 (n=9)	25,90±6,23 (n=9)	63,53±5,58 (n=14)

5.2 PARÂMETROS IMUNITÁRIOS

5.2.1 Macrófagos Peritoneais

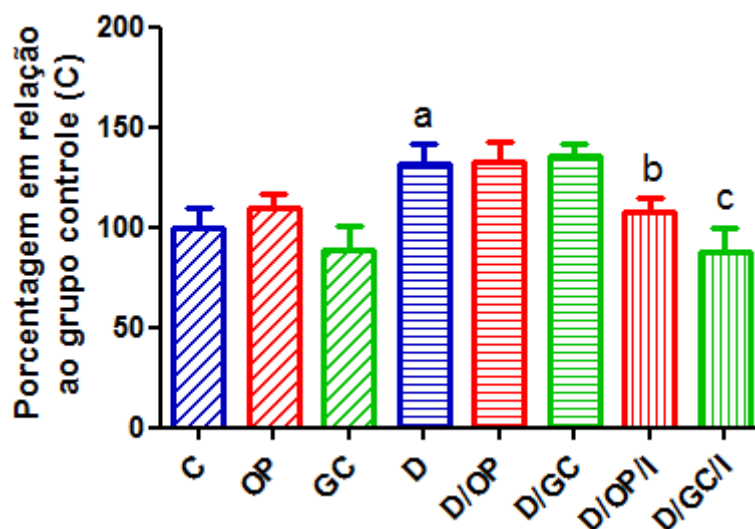


Figura – 8 Fagocitose de zimosan por macrófagos peritoneais obtidos de ratos controle (C), suplementado com óleo de peixe (OP) e coco (GC). Diabético (D), diabético suplementado com óleo de peixe (D/OP) e gordura de coco (D/GC). Diabético suplementado com óleo de peixe ou gordura de coco, recebendo insulina, D/OP/I e D/GC/I, respectivamente. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo C. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo D/OP. ^c $P < 0,001$ comparado ao grupo D/GC.

A fagocitose de zimosan realizada por macrófagos peritoneais obtidos dos animais diabetizados ou não, suplementados ou não e tratados ou não com insulina está apresentada na figura 8. A fagocitose de zimosan pelos macrófagos peritoneais obtidos do grupo não suplementado e não diabetizado (C) foi de $100,0 \pm 9,77$. A suplementação com óleo de peixe (OP) e gordura de coco (GC) não modificou a fagocitose quando comparada ao grupo C, sendo de $109,2 \pm 7,68$ e $88,5 \pm 11,69$, respectivamente. A indução de diabetes (D) elevou (31,4%) a fagocitose ($131,4 \pm 10,42$) comparada ao grupo controle ($p < 0,05$). A suplementação com óleo de peixe (D/OP) ou gordura de coco (D/GC) nos animais diabéticos não alterou a fagocitose quando comparada à dos animais não diabetizados ($p > 0,05$ vs OP ou GC) ou à do diabético ($p > 0,05$ vs D), sendo de $133,2 \pm 9,82$ e $135,7 \pm 5,96$,

respectivamente. O tratamento com insulina nos animais diabetizados e suplementados com óleo de peixe reduziu (19%) a fagocitose dos macrófagos peritoneais ($107,8 \pm 6,72$, D/OP/I), quando comparado ao dos animais não tratados ($p < 0,05$ vs D/OP). O mesmo sendo observado no grupo suplementado com gordura de coco e tratado com insulina ($87,9 \pm 11,74$, D/GC/I), a qual foi significativa (35,2%) quando comparado ao grupo D/GC ($p < 0,05$).

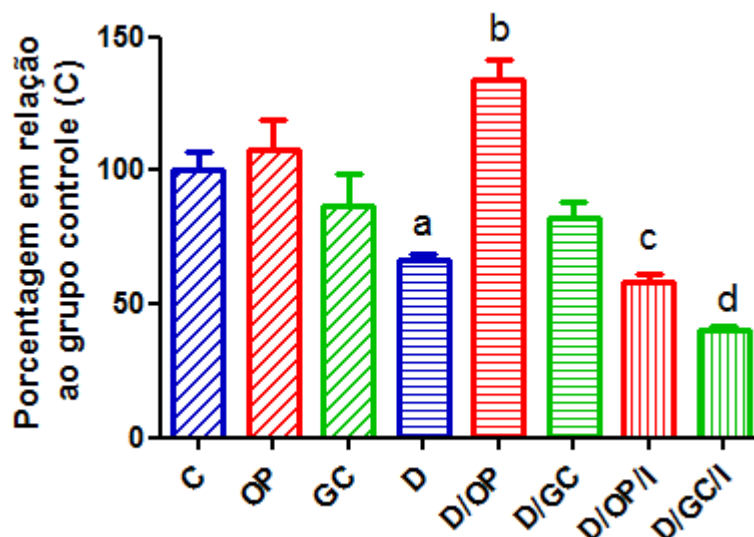


Figura 9 – Volume lisossomal dos macrófagos peritoneais de animais controle (C), suplementado com óleo de peixe (OP) e gordura de coco (GC). Diabético (D), diabético suplementado com óleo de peixe (D/OP) ou gordura de coco (D/GC). Diabético suplementado com óleo de peixe ou gordura de coco, recebendo insulina, D/OP/I e D/GC/I, respectivamente. ^a $p < 0,01$ comparado ao grupo C. ^b $p < 0,001$ comparado ao D. ^c $p < 0,0001$ comparado ao D/OP. ^d $p < 0,0001$ comparado ao grupo D/GC.

O volume lisossomal de macrófagos peritoneais obtidos dos animais diabetizados ou não, suplementados ou não e tratados ou não com insulina está apresentada na figura 9. O volume lisossomal dos macrófagos do grupo C foi de $100,0 \pm 7,26$. A suplementação com óleo de peixe (OP) ou gordura de coco (GC) resultou em volume lisossomal de $107,4 \pm 11,88$ e $86,6 \pm 11,79$, respectivamente, a qual não foi diferente do grupo C ou entre eles ($p > 0,05$). A indução do diabetes reduziu (33,7%) o volume lisossomal, sendo significativa quando comparada à do grupo C ($66,30 \pm 2,76$, $p < 0,01$ vs C). A suplementação com óleo de peixe no grupo

diabético (D/OP) elevou (102,7%) o volume lisossomal ($134,4 \pm 7,25$), comparada ao grupo D ($p < 0,001$). Já a suplementação com gordura de coco em animais diabéticos (D/GC, $82,5 \pm 5,47$) não modificou este parâmetro quando comparada ao grupo D ($p > 0,05$). No animal diabético suplementado com óleo de peixe ou gordura de coco, o tratamento com insulina (D/OP/I e D/GC/I) reduziu significativamente (56,8% e 51%, respectivamente) o volume lisossomal, sendo $57,94 \pm 3,17$ e $40,40 \pm 1,63$, respectivamente ($p < 0,0001$ vs D/OP e D/GC, respectivamente).

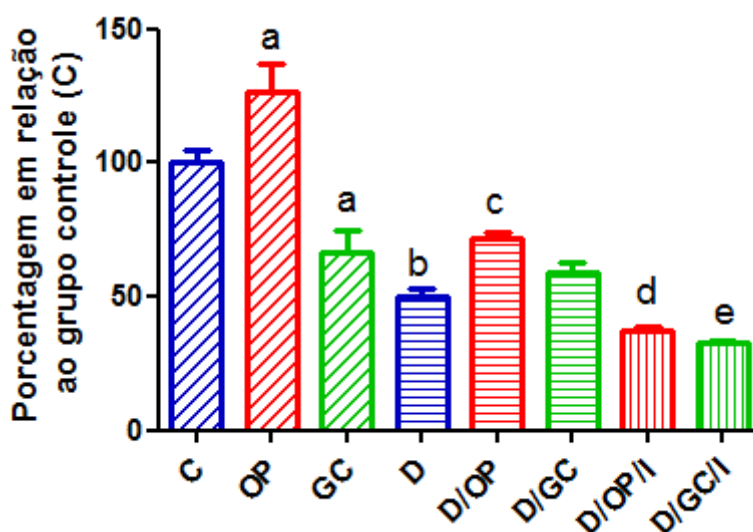


Figura 10 – Produção de ânion superóxido por macrófagos peritoneais obtidos dos animais controle (C), suplementado com óleo de peixe (OP) e gordura de coco (GC). Diabético (D), diabético suplementado com óleo de peixe (D/OP) ou gordura de coco (D/GC). Diabético suplementado com óleo de peixe ou gordura de coco, recebendo insulina, D/OP/I e D/GC/I, respectivamente. ^a $p < 0,01$ comparado ao grupo C. ^b $p < 0,001$ comparado ao C. ^c $p < 0,05$ comparado ao D. ^d $p < 0,0001$ comparado ao D/OP. ^e $p < 0,0001$ comparado ao D/GC.

A produção de ânion superóxido pelos macrófagos peritoneais obtidos dos animais diabetizados ou não, suplementados ou não e tratados ou não com insulina está apresentada na figura 10. Nos macrófagos dos animais controle (C) a produção de ânion superóxido foi de $100,0 \pm 5,10$. A suplementação com óleo de peixe (OP) elevou (26,1%) a produção ($126,1 \pm 11,12$) e a gordura de coco (GC) reduziu (33,7%) ($66,33 \pm 8,42$), quando comparadas à do controle ($p < 0,05$). A indução do diabetes

reduziu (49,8%) a produção de ânion quando comparou-se à dos macrófagos do grupo controle, sendo de $50,20 \pm 3,02$ ($p < 0,001$). Os macrófagos dos animais diabéticos e suplementados com óleo de peixe (D/OP) aumentaram (42,5%) a produção de ânion, sendo de $71,53 \pm 2,43$ ($p < 0,05$), enquanto a gordura de coco (D/GC) não modificou este parâmetro ($p > 0,05$), quando comparadas ao grupo D. O tratamento com insulina dos animais diabéticos suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco (D/OP/I e D/GC/I, respectivamente) reduziu (48,1% e 44,8%, respectivamente) a produção de ânion pelos macrófagos peritoneais ($37,1 \pm 2,01$ e $32,48 \pm 1,30$, respectivamente) significativamente quando comparado à do grupo não tratado ($p < 0,0001$ vs D/OP e D/GC, respectivamente).

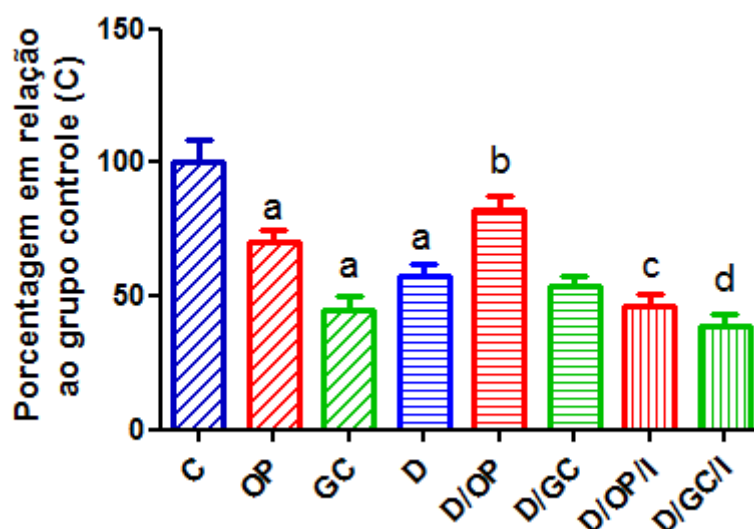


Figura 11 – Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais obtidos de animais controle (C), suplementado com óleo de peixe (OP) ou gordura de coco (GC). Diabético (D), diabético suplementado com óleo de peixe (D/OP) ou gordura de coco (D/GC). Diabético suplementado com óleo de peixe ou gordura de coco, recebendo insulina, D/OP/I e D/GC/I, respectivamente. ^a $p < 0,001$ comparado ao grupo C. ^b $p < 0,01$ comparado ao D. ^c $p < 0,0001$ comparado ao D/OP. ^d $p < 0,05$ comparado ao D/GC.

A produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais obtidos dos animais diabetizados ou não, suplementados ou não e tratados ou não com insulina está apresentada na figura 11. Macrófagos de animais do grupo controle produziram $100,0 \pm 8,39$. A suplementação com óleo de peixe (OP) e gordura de coco

(GC) reduziu (29,7% e 55,3%, respectivamente) a produção de peróxido, sendo de $70,3 \pm 4,59$ e $44,7 \pm 5,11$ respectivamente, comparada à encontrada no grupo controle ($p < 0,001$). A diabetes também reduziu (42,5%) a produção de peróxido quando comparado à dos macrófagos controle ($p < 0,001$), sendo de $57,5 \pm 4,58$. A suplementação com óleo de peixe nos animais diabéticos (D/OP), por outro lado elevou (43,1%) a produção de peróxido ($82,3 \pm 5,24$) comparado ao grupo diabético ($p < 0,01$). A suplementação com gordura de coco nos animais diabéticos (D/GC) ($53,5 \pm 3,71$) foi similar à do grupo diabético ($p > 0,05$). Nos animais diabéticos suplementados com óleo de peixe o tratamento com insulina (D/OP/I), reduziu (43,6%) a produção de peróxido, a qual foi significativamente menor ($46,4 \pm 4,28$) quando comparado à do grupo D/OP ($p < 0,0001$). Nos animais diabéticos suplementados com gordura de coco e tratados com insulina, a produção de peróxido pelos macrófagos peritoneais foi de $38,81 \pm 4,51$, menor (27,4%) que o grupo D/GC ($p < 0,05$).

QUADRO 2 – Resumo dos dados funcionais de macrófagos peritoneais, porcentagem em relação ao grupo controle (C) \pm erro padrão da média.

	Fagocitose	Volume Lisossomal	O ₂ ⁻	H ₂ O ₂
C	100,0 \pm 9,77 (n=15)	100,0 \pm 7,26 (n=15)	100,0 \pm 5,10 (n=21)	100,0 \pm 8,39 (n=17)
OP	109,2 \pm 7,67 (n=8)	107,4 \pm 11,88 (n=8)	126,1 \pm 11,12 (n=10)	70,3 \pm 4,59 (n=16)
GC	88,51 \pm 11,70 (n=9)	86,6 \pm 11,79 (n=11)	66,3 \pm 8,42 (n=17)	44,7 \pm 5,11 (n=14)
D	131,4 \pm 10,42 (n=13)	66,3 \pm 2,76 (n=11)	50,2 \pm 3,02 (n=14)	57,5 \pm 4,58 (n=18)
D/OP	133,2 \pm 9,82 (n=15)	134,4 \pm 7,25 (n=11)	71,5 \pm 2,43 (n=18)	82,3 \pm 5,24 (n=17)
D/GC	135,7 \pm 5,96 (n=16)	82,5 \pm 5,47 (n=12)	58,9 \pm 3,65 (n=16)	53,5 \pm 3,71 (n=17)
D/OP/I	107,8 \pm 6,72 (n=14)	57,9 \pm 3,17 (n=13)	37,1 \pm 2,01 (n=14)	46,4 \pm 4,28 (n=18)
D/GC/I	87,9 \pm 11,74 (n=14)	40,4 \pm 1,63 (n=10)	32,5 \pm 1,30 (n=12)	38,81 \pm 4,51 (n=17)

5.2.2 Neutr3filos Sangu3neos

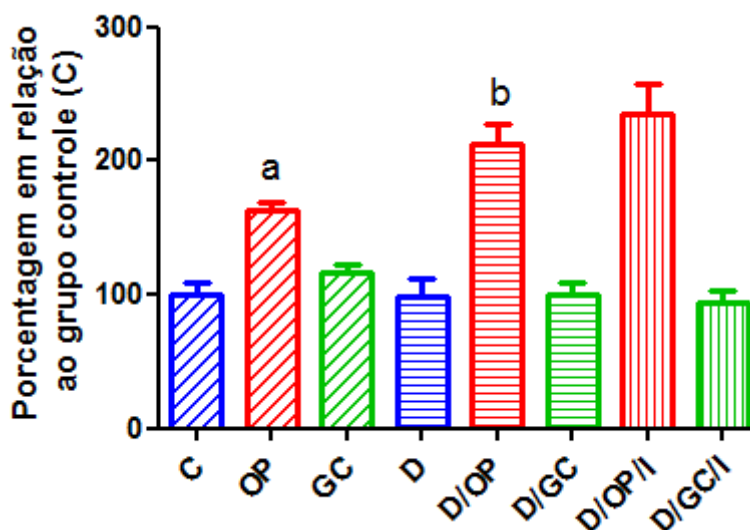


Figura 12 - Fagocitose de zimosan por neutr3filos obtidos de animais controle (C), suplementado com 3leo de peixe (OP) ou gordura de coco (GC). Diab3tico (D), diab3tico suplementado com 3leo de peixe (D/OP) ou gordura de coco (D/GC). Diab3tico suplementado com 3leo de peixe ou gordura de coco, recebendo insulina, D/OP/I e D/GC/I, respectivamente. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo C. ^b $p < 0,05$ comparado ao D.

A fagocitose de zimosan realizada pelos neutr3filos dos animais diabetizados ou n3o, suplementados ou n3o e tratados ou n3o com insulina est3 apresentada na figura 12. Animais n3o suplementados e n3o diabetizados (C) apresentaram fagocitose de 100,0 ± 9,52. A suplementa33o com 3leo de peixe (OP) provocou aumento (62,6%) na fagocitose (162,6 ± 6,06) quando comparado aos animais do grupo C ($p < 0,05$), enquanto a suplementa33o com gordura de coco (GC) foi similar ao grupo C (116,7 ± 5,59, $p > 0,05$). A indu33o da diabetes (D) (98,9 ± 13,80) n3o promoveu diferen3a na fagocitose quando comparado ao grupo C ($p > 0,05$). A suplementa33o de animais diab3ticos com 3leo de peixe (D/OP) elevou (115%) a fagocitose de zimosan realizada pelos neutr3filos (212,7 ± 15,37) quando comparada 3 de animais diab3ticos (D) ($p < 0,05$). O mesmo n3o foi observado pela suplementa33o dos animais diab3ticos com gordura de coco (D/GC) (99,8 ± 9,30) quando comparados aos animais do grupo D ($p > 0,05$). A terapia com insulina em animais diab3ticos suplementados com 3leo de peixe (D/OP/I) ou gordura de coco

(D/GC/I) não alterou a fagocitose quando comparado aos grupos não tratados (D/OP e D/GC, respectivamente) ($p>0,05$).

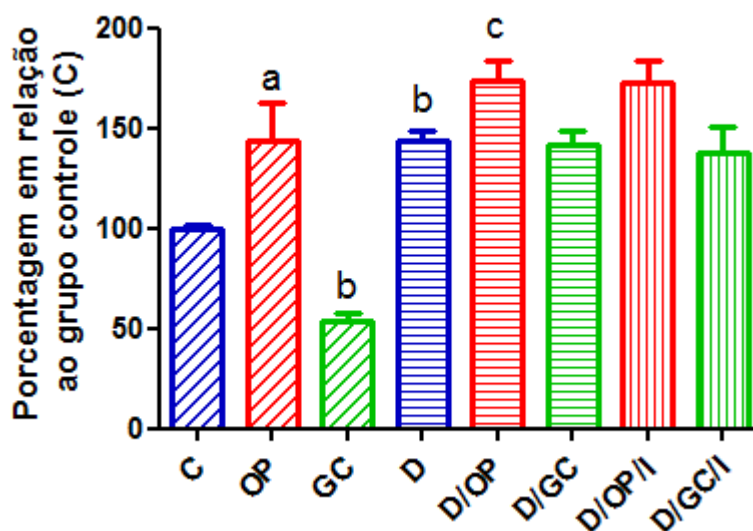


Figura 13 – Volume lisossomal em neutrófilos de animais controle (C), suplementado com óleo de peixe (OP) ou gordura de coco (GC). Diabético (D), diabético suplementado com óleo de peixe (D/OP) ou gordura de coco (D/GC). Diabético suplementado com óleo de peixe ou gordura de coco, recebendo insulina, D/OP/I e D/GC/I, respectivamente. ^a $p<0,01$ comparado ao grupo C. ^b $p<0,001$ comparado ao C. ^c $p<0,01$ comparado ao D.

O volume lisossomal dos neutrófilos obtidos dos animais diabetizados ou não, suplementados ou não e tratados ou não com insulina está apresentada na figura 13. O volume lisossomal em animais não suplementados e não diabetizados (C) foi de $100,0 \pm 2,08$. A suplementação de animais não diabéticos com óleo de peixe (OP) aumentou (43,9%) ($p<0,01$), enquanto com gordura de coco (GC) reduziu (46,1%) o volume lisossomal ($p<0,05$) quando comparadas ao grupo C, sendo de $143,9 \pm 19,06$ e $53,9 \pm 3,57$, respectivamente. A indução da diabetes (D; $143,7 \pm 4,82$) provocou aumento (43,7%) na retenção quando comparado ao grupo C ($p<0,05$). A suplementação de animais diabéticos com óleo de peixe (D/OP; $173,7 \pm 10,03$) aumentou (20,8%) ainda mais o volume lisossomal, em relação ao grupo D ($p<0,01$), já a suplementação de animais diabéticos com gordura de coco (D/GC; $142,1 \pm 6,49$) resultou em capacidade de reter vermelho neutro em vesículas de secreção similar

ao grupo diabético ($p>0,05$). A terapia com insulina nos animais diabéticos suplementados com óleo de peixe (D/OP/I) ou gordura de coco (D/GC/I) foi similar comparado ao grupo D/OP e D/GC, respectivamente ($p>0,05$), sendo de $172,9\pm 10,47$ e $137,8\pm 13,27$, respectivamente.

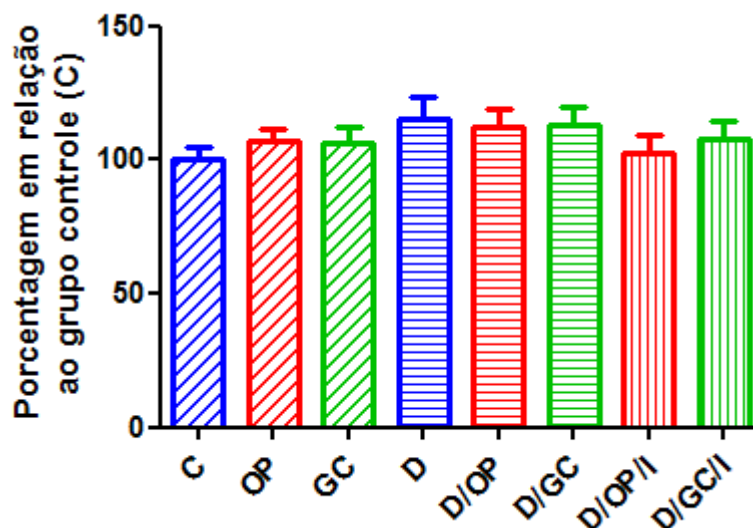


Figura 14 - Produção de ânion superóxido pelos neutrófilos dos animais controle (C), suplementado com óleo de peixe (OP) ou gordura de coco (GC). Diabético (D), diabético suplementado com óleo de peixe (D/OP) ou gordura de coco (D/GC). Diabético suplementado com óleo de peixe ou gordura de coco, recebendo insulina, D/OP/I e D/GC/I, respectivamente.

A produção de ânion superóxido pelos neutrófilos obtidos dos animais diabetizados ou não, suplementados ou não e tratados ou não com insulina está apresentada na figura 14. Neutrófilos dos animais não suplementados e não diabetizados (C) apresentaram produção de ânion de $100,0\pm 4,61$. A suplementação de animais não diabéticos com óleo de peixe (OP) e coco (GC) não resultou em produção de ânion diferente ($p>0,05$) quando comparados ao grupo C, sendo de $107,2\pm 4,46$ e $106,2\pm 6,11$, respectivamente. A indução da diabetes também não provocou alteração na produção de ânion quando comparado ao grupo C, sendo de $115,4\pm 7,81$ ($p>0,05$). A suplementação de animais diabéticos com óleo de peixe (D/OP) e de coco (D/GC) não resultou em diferença na produção de ânion quando comparada ao grupo D ($p>0,05$), sendo de $112,6\pm 6,40$ e $113,1\pm 6,29$, respectivamente. A terapia com insulina fez com que animais diabéticos

suplementados com óleo de peixe (D/OP/I) ou gordura de coco (D/GC/I) produzissem quantidades similares de ânion superóxido quando comparados aos grupos D/OP e D/GC, respectivamente.

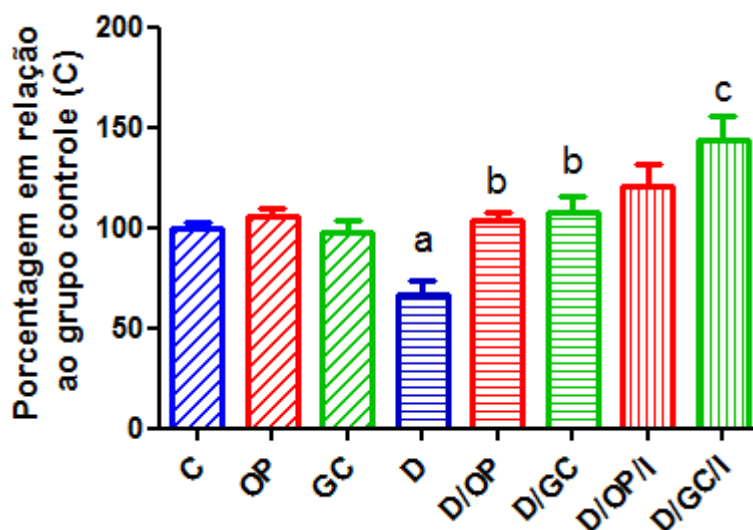


Figura 15 - Produção de peróxido de hidrogênio pelos neutrófilos obtidos de animais controle (C), suplementado com óleo de peixe (OP) ou gordura de coco (GC). Diabético (D), diabético suplementado com óleo de peixe (D/OP) ou gordura de coco (D/GC). Diabético suplementado com óleo de peixe ou gordura de coco, recebendo insulina, D/OP/I e D/GC/I, respectivamente. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo C. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo D. ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo D/GC.

A produção de peróxido de hidrogênio pelos neutrófilos obtidos dos animais diabetizados ou não, suplementados ou não e tratados ou não com insulina está apresentada na figura 15. Animais não suplementados e não diabetizados apresentaram produção de peróxido de $100,0 \pm 2,37$. A suplementação de animais não diabéticos com óleo de peixe (OP) e gordura de coco (GC) resultou em produção de peróxido similar ao grupo controle ($p > 0,05$), sendo de $105,3 \pm 4,62$ e $97,7 \pm 5,99$, respectivamente. A indução da diabetes (D) reduziu (33,7%) a produção de peróxido quando comparada ao grupo C ($p < 0,05$), a qual foi de $66,3 \pm 7,81$. A suplementação com óleo de peixe em animais diabéticos (D/OP) e gordura de coco (D/GC) resultou em maiores (56,4% e 62,3%) as quantidades de peróxido quando comparados ao grupo diabético ($p < 0,05$), sendo de $103,7 \pm 4,05$ e $107,6 \pm 7,68$,

respectivamente. A terapia com insulina nos animais diabéticos suplementados com óleo de peixe (D/OP/I; $121,0 \pm 11,10$) não modificou ($p > 0,05$), enquanto nos suplementados com gordura de coco (D/GC/I; $143,5 \pm 12,10$) aumentou (33,4%) ($p < 0,05$) a produção de peróxido comparadas aos grupos D/OP e D/GC, respectivamente.

QUADRO 3 – Resumo dos dados funcionais de neutrófilos sanguíneos, porcentagem em relação ao grupo controle (C) \pm erro padrão da média.

	Fagocitose	VOLUME Lisossomal	O_2^-	H_2O_2
C	$100,0 \pm 9,52$ (n=32)	$100,0 \pm 2,08$ (n=28)	$100,0 \pm 4,61$ (n=30)	$100,0 \pm 2,37$ (n=34)
OP	$162,6 \pm 6,06$ (n=17)	$143,9 \pm 19,06$ (n=10)	$107,2 \pm 4,46$ (n=15)	$105,3 \pm 4,62$ (n=18)
GC	$116,7 \pm 5,59$ (n=18)	$53,9 \pm 3,57$ (n=24)	$106,2 \pm 6,11$ (n=20)	$97,7 \pm 5,99$ (n=22)
D	$98,95 \pm 13,80$ (n=17)	$143,7 \pm 4,83$ (n=22)	$115,4 \pm 7,81$ (n=18)	$66,3 \pm 7,81$ (n=16)
D/OP	$212,7 \pm 15,37$ (n=16)	$173,7 \pm 10,03$ (n=13)	$112,6 \pm 6,40$ (n=17)	$103,7 \pm 4,05$ (n=22)
D/GC	$99,76 \pm 9,303$ (n=14)	$142,1 \pm 6,49$ (n=26)	$113,1 \pm 6,29$ (n=18)	$107,6 \pm 7,68$ (n=24)
D/OP/I	$234,9 \pm 23,23$ (n=18)	$172,9 \pm 10,47$ (n=24)	$102,3 \pm 6,70$ (n=20)	$121,0 \pm 11,10$ (n=22)
D/GC/I	$93,6 \pm 9,296$ (n=13)	$137,8 \pm 13,27$ (n=35)	$108,0 \pm 6,36$ (n=16)	$143,5 \pm 12,10$ (n=18)

5.2.3 Linfócitos Mesentéricos

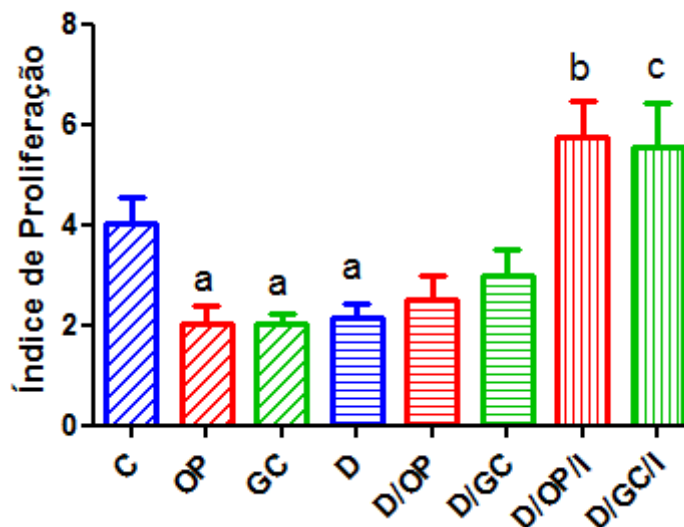


Figura 16 – Índice de Proliferação de linfócitos obtidos dos linfonodos mesentéricos de animais controle (C), suplementado com óleo de peixe (OP) ou gordura de coco (GC). Diabético (D), diabético suplementado com óleo de peixe (D/OP) ou gordura de coco (D/GC). Diabético suplementado com óleo de peixe ou gordura de coco, recebendo insulina, D/OP/I e D/GC/I, respectivamente. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (C); ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo D/OP; ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo D/GC.

Para análise da proliferação de linfócitos mesentéricos foi feito o índice de proliferação, uma vez que a taxa basal de proliferação foi a mesma entre os grupos. Assim, animais não suplementados e não diabetizados (C) apresentaram um índice de proliferação de $4,02 \pm 0,52$ e animais diabéticos (D) de $2,13 \pm 0,29$, representando uma redução de 50% comparado ao controle ($p < 0,05$). A suplementação de animais não diabéticos com óleo de peixe (OP) representou índice de $2,03 \pm 0,35$, sendo 49,5% menor que o grupo controle ($p < 0,05$), o mesmo ocorreu para animais não diabéticos suplementados com gordura de coco (GC) com um índice de $2,04 \pm 0,18$ e uma redução de 49,5% também comparado ao controle ($p < 0,05$). Animais diabéticos suplementados com óleo de peixe (D/OP) e gordura de coco (D/GC) não apresentaram índice de proliferação diferente do grupo diabético ($p > 0,05$), sendo de $2,5 \pm 0,48$ e $3,0 \pm 0,51$, respectivamente. A terapia com insulina em animais diabéticos suplementados com óleo de peixe (D/OP/I) resultou em aumento de 130% comparado ao grupo D/OP ($p < 0,05$) e em animais diabéticos suplementados com

gordura de coco (D/GC/I) ocorreu aumento de 85% ($p < 0,05$), quando comparado aos grupo D/GC.

QUADRO 4 – Dados da proliferação de linfócitos mesentéricos, como média \pm erro padrão da média.

	MÉDIA	EPM	AMOSTRA
GRUPO C	4,02	0,52	9
GRUPO OP	2,03	0,35	9
GRUPO GC	2,04	0,18	9
GRUPO D	2,13	0,29	13
GRUPO D/OP	2,50	0,48	8
GRUPO D/GC	3,00	0,51	14
GRUPO D/OP/I	5,75	0,70	14
GRUPO D/GC/I	5,55	0,86	14

6 DISCUSSÃO

6.1 ALTERAÇÕES METABÓLICAS CAUSADAS PELA DIABETES E EFEITO DOS ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3

Diabetes *mellitus* (DM) é uma condição de etiologia complexa e complicações diversas, sendo a hiperglicemia seu fator mais característico, resultante de deficiência parcial ou total da secreção de insulina e/ou na ação do hormônio em tecidos alvo (RIBEIRO; OLIVEIRA; MELLO, 2007). Há dois tipos principais de DM, o tipo 1 (DM1) e o tipo 2 (DM2). DM1 é caracterizada por destruição de células β produtoras de insulina, enquanto DM2 por deficiência parcial de insulina e/ou insensibilidade na ação do hormônio. No Brasil, em 2005, foi estimado que havia 8 milhões de indivíduos portadores de DM. Há variações geográficas na incidência da DM1, sendo de 38,4 (por 100 mil indivíduos) na Finlândia e de 7,6 (por 100 mil indivíduos) no Brasil (SBD, 2006; GILLESPIE, 2006).

Na pesquisa em DM utiliza-se, com grande frequência, modelos animais experimentais, sendo muito comum o uso de agentes químicos como aloxana ou estreptozotocina, os quais são tóxicos para as células β pancreáticas (DELFINO *et al.*, 2002). Estreptozotocina é isolada de *Streptomyces achromogenes* e apresenta atividade antibiótica e anti-neoplásica (REES; ALCOLADO, 2005). Esta droga destrói as células β pancreáticas reduzindo a secreção de insulina e portanto causa um quadro de diabetes dependente de insulina. Quimicamente, tem na sua estrutura uma porção N-metil-N-nitrosouréia a qual está ligada a uma hexose. Sua entrada nas células ocorre através do transportador de glicose 2 (GLUT2), presente em tecidos como pâncreas, rins e fígado. A toxicidade desta droga é resultado de sua atividade alquilante de DNA, através da transferência de seu grupo metila ao DNA. Disto resulta fragmentação do DNA e, conseqüentemente ativação da enzima poli (ADP-ribose)-polimerase na tentativa de reparo. A conseqüente redução do conteúdo celular de NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e depleção de ATP leva à necrose das células β . Portanto, utilização deste modelo animal de DM induzido por estreptozotocina é extremamente útil na reprodução do quadro metabólico desta doença (RAVI; RAJASEKARAN; SUBRAMANIAN, 2005; LENZEN, 2008).

Neste estudo foi utilizada a dose de 45 mg/kg peso corpóreo, via endovenosa, para indução de DM nos animais. Sabe-se que esta dose é suficiente para gerar quadro de deficiência de insulina e alterações metabólicas comuns desta doença (YAMAZAKI *et al.*, 2005).

Os animais foram deixados em jejum de, no mínimo, 12 horas antes da indução. Após o procedimento intravenoso, os mesmos foram mantidos mais 1 hora em jejum, a fim de evitar competição entre glicose e estreptozotocina pelo transportador GLUT2 (SZKULDESKI, 2001).

A glicemia dos animais sete dias após indução (FIGURA 4) confirmou hiperglicemia característica de DM. Estreptozotocina provoca inicialmente (2 horas após injeção) hiperglicemia e hipoinsulinemia. Algumas horas depois (6 horas) ocorre intensa hipoglicemia em virtude da destruição das células β pancreáticas e liberação da insulina armazenada nos grânulos de secreção. Finalmente, hiperglicemia se desenvolve e se mantém com redução da secreção de insulina de forma permanente (SZKULDESKI, 2001). No presente estudo, animais com glicemia superior a 200 mg/dL foram considerados diabéticos.

O início da DM1, em humanos, acontece de forma abrupta com sintomas clínicos bem caracterizados, que incluem polifagia, polidipsia e poliúria, além de fraqueza e perda de peso. Glicemia de jejum maior que 126 mg/dL confirma diagnóstico de DM (CHAMPE *et al.*, 2006). Além disso, presença de sintomas clínicos associados com glicemia casual acima de 200 mg/dL ou glicemia 2 horas após sobrecarga de 75g de glicose acima de 200mg/dL também permitem diagnóstico de DM (SBD, 2006). Além de hiperglicemia, os animais do presente estudo também demonstraram perda de peso e os sintomas clínicos clássicos (dados não mostrados).

Insulina é hormônio anabólico que regula homeostase da glicose, além do crescimento e diferenciação celular. Ela regula síntese de glicogênio por aumentar o transporte de glicose nos tecidos alvo e promover síntese de glicogênio no músculo e fígado. Ativação de Akt feita pela insulina promove fosforilação e inativação da GSK3 (glicogênio-sintase quinase 3), diminuindo a taxa de fosforilação da glicogênio-sintase e, em consequência aumento de sua atividade. Inibição de genes que codificam a enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), a qual descarboxila e fosforila o oxalacetato na via da gliconeogênese, bem como inibição da codificação da glicose-6-fosfatase e frutose-1,6-bifosfatase promovem inibição da

gliconeogênese. Além de aumento na transcrição de enzimas envolvidas na via glicolítica, como piruvato quinase e glicoquinase (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002; CHAMPE *et al.*, 2006).

Ao final do período experimental (5 semanas), animais diabéticos não tratados (grupo D) apresentaram hiperglicemia significativa (FIGURA 5), quando comparados a animais não diabéticos e não tratados (grupo C). Suplementação com óleo de peixe não provocou nenhum efeito sobre a glicemia. Revisão da literatura feita por De Caterina *et al.* (2007) demonstrou que óleo de peixe não afeta o controle glicêmico de indivíduos diabéticos tipo 1. Alguns estudos (SCHECTMAN; KAUL; KISSEBAH, 1988; GLAUBER *et al.*, 1988; ZAMBON *et al.*, 1993) mostraram deterioração do controle metabólico por AGPI n3. Puhakainen, Aloha e Yki-Jarvinen (1995) demonstraram que suplementação com AGPI n3 aumentaram a utilização de glicerol como substrato gliconeogênico. AGPI n3 reduzem incorporação de glicerol em triacilgliceróis (TG), além da diminuição da síntese de TG estar acompanhada de maior oxidação de ácidos graxos que também pode atuar estimulando a gliconeogênese hepática (WONG *et al.*, 1984; YAMAZAKI; SHEN; SCHADE, 1987; NURJHAN; CONSOLA; GERICH, 1992). Este último estudo mostrou também deterioração do controle glicêmico.

Administração de insulina à animais diabéticos suplementados com óleo de peixe (D/OP/I) e gordura de coco (D/OC/I) significativamente reduziu a glicemia destes animais (FIGURA 5), aproximando a de animais não diabéticos. Como suplementação sozinha, não alterou parâmetro de glicemia, assim pode-se considerar que o efeito foi unicamente da insulina administrada. Insulina escolhida foi Humulin 70/30, mistura de insulina NPH e regular, insulina considerada de ação intermediária. A porção regular garante início de ação até 1 hora após administração e picos entre 2-3 horas após. Enquanto a intermediária apresenta início de ação entre 2-4 horas após administração subcutânea e pico entre 4-10 horas, garantindo até 15-18 horas de ação. Isto permitiu a injeção de insulina uma única vez ao dia, sempre no mesmo horário, entre 9:00-10:00 da manhã, diariamente. Reposição de insulina à indivíduos com deficiência total deste hormônio permite restauração das suas funções biológicas, tais como inibição da gliconeogênese e glicogenólise, além de aumento da captação periférica da glicose e glicólise, resultando redução da hiperglicemia, ou seja, restaurando homeostasia da glicose. Sabe-se que o controle

glicêmico permite atraso ou, até mesmo evita, ocorrência de complicações da DM1 (DCCT, 1993; GALLEN, 2004; DCCT, 2005).

Lipídios dietéticos incluem triacilgliceróis, ésteres de colesterol, ácidos graxos livres (não-esterificados), colesterol livre e fosfolipídios. Após absorção pela mucosa intestinal, ácidos graxos de cadeia longa são convertidos novamente em triacilgliceróis e agrupados com proteínas, fosfolipídios e colesterol em quilomícron. O principal lipídio presente nos quilomícra são os triacilgliceróis, os quais são hidrolisados pela lipase de lipoproteínas nos capilares do músculo esquelético e tecido adiposo, originando quilomocra remanescentes, que serão endocitados pelas células hepáticas. Síntese *de novo* de triacilgliceróis hepática gera lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDLs). Após degradação dos triacilgliceróis pela lipase de lipoproteínas, VLDLs se tornam menores e mais densas e, através de uma reação de troca, VLDLs entregam triacilgliceróis para as lipoproteínas de alta densidade (HDLs) e recebem das mesmas estéres de colesterol. Forma-se VLDL remanescente e, posteriormente, lipoproteínas de baixa densidade (LDLs). Estas últimas são endocitadas no fígado e tecidos extra-hepáticos, provendo colesterol para estes tecidos. Ácidos graxos liberados para os tecidos pela lipase de lipoproteínas pode ser utilizado para obtenção de energia (via β -oxidação), armazenados como triacilgliceróis ou utilizados na síntese de membranas. Enquanto colesterol pode ser incorporado nas membranas celulares ou utilizado como precursor de ácidos biliares ou hormônios esteróides (ROCHE, 1999; CHAMPE *et al.*, 2006).

Alterações do metabolismo de lipoproteínas estão relacionadas ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Concentrações anormais de lipoproteínas plasmáticas podem resultar de mudanças na produção, conversão ou catabolismo das mesmas (PARHOFER; BARRETT, 2006). O papel da insulina no metabolismo lipídico parece ser mediado através de uma família de fatores de transcrição, chamadas SREBP (proteína ligante do elemento regulatório esterol). Estes fatores de transcrição, principalmente SREBP-1c, promovem expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídios. Assim, enzimas como acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintase, envolvidas na síntese de ácidos graxos, têm sua expressão aumentada. É sugerido que insulina aumenta SREBP-1c. Da mesma forma, animais diabéticos induzidos por estreptozotocina têm concentrações de RNAm de SREBP-1c diminuídos. Nos adipócitos, insulina reduz a lipólise por

diminuir a expressão da enzima lipase sensível à hormônio (LSH) (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

Deficiência de insulina, como observada nos animais diabéticos (grupo D), causa alterações no metabolismo lipídico pela ausência do efeito da insulina em promover lipogênese e inibir lipólise, de fato animais diabéticos sem tratamento (grupo D) mostraram aumento significativo de triacilgliceróis plasmáticos (FIGURA 7) quando comparados à de animais do grupo controle (C). Estes dados mostram, claramente, efeito da ausência de insulina sobre o metabolismo lipídico. Esta elevação de TG plasmático ocorre provavelmente como resultado da elevada síntese de triacilgliceróis à partir dos ácidos graxos que chegam ao fígado, em virtude de maior lipólise (pois a lipase sensível à hormônio está ativada na ausência de insulina) no tecido adiposo. O resultado é elevada síntese de VLDL hepática acompanhada de menor catabolismo da mesma pela menor atividade da lipase de lipoproteínas (a qual é ativada pela insulina). A combinação de aumentada produção com diminuído catabolismo de lipoproteínas ricas em triacilgliceróis acentua hipertriacilglicerolemia (KREISBERG, 1998). Jain, Rains e Croad (2007) encontraram concentrações mais elevadas de triacilgliceróis plasmáticos em animais diabéticos induzidos com estreptozotocina quando comparados à de animais controle. Já Ravi *et al.* (2005) encontraram elevadas concentrações de VLDL plasmática em ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina.

Por outro lado, óleo de peixe reduz as concentrações de triacilgliceróis plasmáticos. Suplementação de animais diabéticos com óleo de peixe (D/OP) causou redução nas concentrações tanto de colesterol total (FIGURA 6) quanto de triacilgliceróis plasmáticos (FIGURA 7). Meta-análise realizada por Eslick *et al.* (2008) demonstra que óleo de peixe, sozinho, foi capaz de reduzir em 0,34 mM as concentrações de triacilgliceróis em tempo médio de tratamento de 24 meses em indivíduos hipertriacilglicerolêmicos. Outros estudos (BALK *et al.*, 2006) mostraram redução nos triacilgliceróis plasmáticos de 8 mg/dL para cada aumento de 1g/dia de óleo de peixe. O mecanismo pelo qual óleo de peixe reduz triacilgliceróis plasmáticos tem sido descrito ser através de redução na síntese de VLDL hepática, embora aumento na taxa de catabolismo de VLDL tenha sido descrito (HARRIS, 1999). Efeito em reduzir lipogênese e aumentar β -oxidação de ácidos graxos também tem sido documentada (DE CATERINA *et al.*, 2007). Além disso, estudo realizado por Chan *et al.* (2003) mostrou que ácidos graxos poliinsaturados ômega-3

reduziram a produção de lipoproteínas contendo apolipoproteína B sem, no entanto diminuir o catabolismo destas lipoproteínas.

Administração de insulina à animais diabéticos suplementados com gordura de coco (D/GC/I) promoveu redução de colesterol total (FIGURA 6) e de triacilglicerol (FIGURA 7) quando comparado à de animais diabéticos que receberam só suplementação com gordura de coco (D/GC). Reposição de insulina promove restauração dos efeitos da insulina em aumentar lipogênese e inibir lipólise. Lopes-Virella *et al.* (1983) mostraram redução das concentrações de TG plasmáticos após administração de insulina pelo efeito desta última em restaurar a atividade da lipase de lipoproteínas.

Com relação à concentração de colesterol total plasmática, suplementação com gordura de coco aumentou sua concentração em animais não diabéticos (grupo GC) (FIGURA 6). Os mecanismos relacionados com a capacidade de ácidos graxos saturados ocasionarem hipercolesterolemia reside no fato de promoverem redução na captação de colesterol incorporado em LDL pelo fígado, por reduzir o número de receptores de LDL, através de efeitos na redução do RNA mensageiro do receptor de LDL (MUSTAD *et al.*, 1997; CASTRO *et al.*, 2004; LOTTENBERG, 2008). Mustad *et al.* (1997) mostraram que a quantidade de receptores para LDL aumentou 10,5% após ingestão de dieta pobre em gordura saturada.

No caso de animais diabéticos suplementados com óleo de peixe (D/OP) pôde ser observada redução nas concentrações de colesterol total plasmática (FIGURA 6). Das (2001) sugeriu que ácidos graxos poliinsaturados, especificamente EPA, agem como segundos mensageiros das ações das estatinas, visto seu efeito em reduzir a atividade da enzima HMG-CoA redutase, a enzima taxa limitante na síntese endógena do colesterol, e pelo fato das estatinas afetarem o metabolismo de ácidos graxos essenciais. Castillo *et al.* (2001) demonstraram redução das concentrações de colesterol total por óleo de peixe em frangos hipercolesterolêmicos e atribuiu este efeito à substituição de ácido araquidônico do plasma e lipoproteínas por AGPI n3. García-Pelayo, García-Peregrín e Martínez-Cayuela (2004) concluíram que EPA reduz a atividade da HMG-CoA redutase, porém sem afetar sua síntese protéica em células de hepatoma, desde que na presença de inibidor da síntese protéica (cicloheximide) a quantidade da enzima foi a mesma nas células tratadas com EPA em comparação àquelas sem inibidor.

6.2 ALTERAÇÕES EM CÉLULAS DO SISTEMA IMUNITÁRIO CAUSADAS PELA DIABETES E ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA 3

Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 apresentam a propriedade de modular a funcionalidade do sistema imunitário (BONATTO *et al.*, 2005). A alteração da composição de ácidos graxos na membrana das células, em especial daquelas imunitárias, proporciona modificações das respostas imunitárias. Após esta alteração da composição de fosfolipídios de membrana, mudanças na fluidez das mesmas e na produção de eicosanóides promovem a modulação de vias de transdução de sinal e da expressão gênica, ocasionando modificações nas respostas imunitárias (CALDER, 2007). Considerando-se que as modificações que ocorrem nas células imunitárias de indivíduos diabéticos, tais como reduzida resposta mediada por células T ou reduzida função de neutrófilos resulta em aumentada susceptibilidade à infecções nestes indivíduos (MULLER *et al.*, 2005), o estudo da funcionalidade das células imunitárias de animais experimentalmente diabetizados foi conduzido.

Macrófagos são fagócitos pertencentes à imunidade inata e responsáveis pelo reconhecimento e fagocitose de patógenos (DELVES; ROITT, 2000). Macrófagos peritoneais obtidos de animais diabéticos induzidos por estreptozotocina são células inflamatórias afetadas por alterações fisiológicas e patofisiológicas induzidas pela hiperglicemia (CHONG-JEH LO, 2005). Beyan *et al.* (2006) mostraram que monócitos de indivíduos diabéticos tipo 1 expressaram concentrações basais de RNAm da COX semelhantes às de indivíduos não diabéticos, porém após estímulo destas células com LPS há menor capacidade dos monócitos de diabéticos tipo 1 produzirem prostaglandina E₂. Já Spatz *et al.* (2003) demonstraram que monócitos de indivíduos diabéticos do tipo 1 estimulados com LPS secretaram maiores concentrações de interleucina 10 (IL10) do que indivíduos não diabéticos, sendo IL10 importante citocina envolvida na inibição das respostas de células T. Estes estudos mostraram que indivíduos diabéticos apresentam alterações nas respostas imunitárias, em parte causadas por modificações nas respostas induzidas por macrófagos.

Neutrófilos são também importantes células envolvidas na imunidade inata. Após o processo de migração celular para sítios de infecção durante o processo inflamatório, estas células promovem a morte de patógenos invasores através da fagocitose dos mesmos com posterior ação de enzimas líticas ou do complexo da

NADPH oxidase (APPELBERG, 2006). Diversas modificações ocorrem em neutrófilos de indivíduos diabéticos, tais como menor adesão ao endotélio e migração ao local da inflamação, menor quimiotaxia, capacidade fagocítica e produção de EROS (ALBA-LOUREIRO *et al.*, 2006).

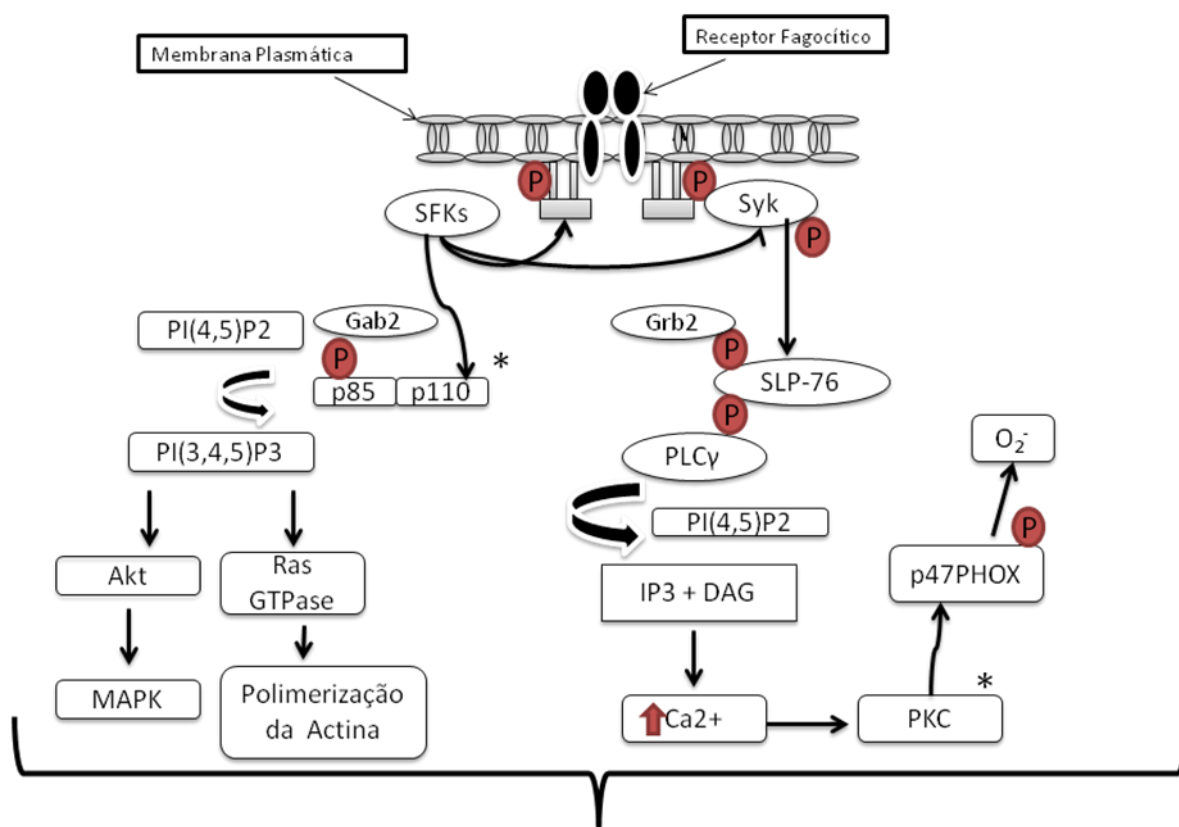
No tecido infectado ocorre o reconhecimento do patógeno por fagócitos e posterior englobamento do mesmo, no processo denominado fagocitose. Em seguida, um fagossomo é formado, o qual sofre uma série de etapas de maturação com aumentos sucessivos de acidez no seu interior e, resultando na sua fissão e fusão com outras organelas, inclusive lisossomos originando fagolisossomos, com posterior degradação do material ingerido (KINCHEN; RAVICHANDRAN, 2008).

A indução do quadro diabético provocou aumento na fagocitose de zimosan realizada por macrófagos peritoneais dos animais diabéticos (D) quando comparados à dos macrófagos obtidos de animais do grupo controle (C). A administração de insulina reduziu este mesmo parâmetro tanto em animais diabéticos suplementados com óleo de peixe (D/OP/I) quanto com gordura de coco (D/GC/I), quando comparados aos seus respectivos controles D/OP e D/GC (FIGURA 8). Por outro lado, neutrófilos sanguíneos de animais suplementados com óleo de peixe, tanto controles (OP) quanto diabéticos (D/OP), apresentaram aumento na fagocitose quando comparada à dos seus respectivos controles (FIGURA 12).

No presente estudo zimosan foi utilizado na promoção da fagocitose por fagócitos (macrófagos e neutrófilos). Zimosan é um carboidrato obtido da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, e é enriquecido em β -glucanas (UNDERHILL *et al.*, 2005). Zimosan é reconhecido pelo receptor Toll-like 2 (TLR2) e, principalmente por Dectina-1, receptor que reconhece β -glucana, estrutura que faz parte da molécula de zimosan.

Diversas vias de sinalização estão envolvidas na regulação de funções em fagócitos, incluindo a produção de TNF- α , tais como ERK $\frac{1}{2}$, p38 MAPK, Akt e isoformas de PKC (MARTINS *et al.*, 2008). Fagocitose é uma das mais importantes funções de macrófagos e neutrófilos. Este processo ocorre através de vias de sinalização envolvendo a ativação de tirosina-quinases das famílias Src e Syk, as quais recrutam uma série de proteínas adaptadoras, tais como Grb2 e Gab2, resultando na ativação de fosfolipase C, PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase), Akt e MAPK, com conseqüente polimerização de actina, formação de pseudópodes e

englobamento da partícula, além da produção de citocinas e do *burst* respiratório. Todas estas ações são acompanhadas de profundas alterações em fosfoinosítídeos de membrana, sendo que a dinâmica destes lipídios é importante nos processos de formação e maturação do fagossomo (BERTON; MÓCSAI; LOWELL, 2005). A figura abaixo mostra algumas vias de sinalização envolvidas no processo de fagocitose, bem como os lipídios envolvidos.



Fagocitose, produção de citocinas, desgranulação e *burst* respiratório

Figura 17 – Vias de sinalização envolvidas na fagocitose (ADAPTADO DE STRZELECKA-KILISZEK; KWIATKOWSKA; SOBOTA, 2002; BERTON; MÓCSAI; LOWELL, 2005). SFK (quinases da família Src), SLP-76 (fosfoproteína leucocitária de 76 kD contendo domínios de homologia 2 a Src). * pontos susceptíveis aos AGPI n3.

Receptores fagocíticos nesta via podem ser receptores FcγR (que reconhecem a porção Fc dos anticorpos que opsonizam os microorganismos) ou até mesmo o receptor Dectina-1, que reconhece β-glucanas. A ativação das proteínas tirosina quinases, representadas nesta via por SFK e Syk, ocorre por meio de ITAMs (*motifs* ativados pelo imunorreceptor tirosina quinase) no caso do receptor fagocítico ser FcγR ou receptores que reconhecem fragmentos do complemento (como CR3)

ou por meio de *motifs* semelhantes a ITAMs se os receptores fagocíticos reconhecem partículas não opsonizadas, como é o caso do receptor Dectina-1. Uma vez ativadas, as proteínas tirosina quinases iniciam vias de sinalização envolvendo a dinâmica de fosfoinosítídeos, que resultam na promoção da fagocitose, produção de citocinas, desgranulação e produção de EROS por meio do *burst* respiratório (BERTON; MÓCSAI; LOWELL, 2005; UNDERHILL *et al.*, 2005). Os fosfoinosítídeos mostrados nesta figura, como o fosfatidilinositol (4,5)bisfosfato (PI(4,5)P₂) e fosfatidilinositol (3,4,5)trifosfato (PI(3,4,5)P₃) são extremamente importantes nos processos iniciais de formação do fagossomo, acumulando-se nas regiões de membrana plasmática envolvidas neste processo (BERTON; MÓCSAI; LOWELL, 2005). Esta figura mostra pontos susceptíveis à atuação de AGPI n3, que poderia atuar em algumas enzimas importantes desta via, como PI3K, PKC, entre outras, assim modulando a capacidade das células promoverem a fagocitose e ativarem seus mecanismos microbicidas.

Insulina é um hormônio com propriedades conhecidamente anti-inflamatórias. Ela é capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , a formação de radicais livres de oxigênio, além da expressão de moléculas de adesão nos leucócitos e células endoteliais. Por este motivo, é utilizada como tratamento de pacientes criticamente doentes, além de indivíduos diabéticos para controle da glicemia e por seus efeitos imunomodulatórios (GROENEVELD; BEISHUIZEN; VISSER, 2002).

No presente estudo, a administração de insulina só obteve efeito em macrófagos peritoneais, nos quais retornou os valores de fagocitose similares aos dos animais não diabéticos, como observado pela figura 8. Já em neutrófilos, o hormônio não afetou a capacidade destas células fagocitarem zimosan, as quais permaneceram semelhantes aos animais diabéticos não tratados com insulina, como observado pela figura 12. Martins *et al.* (2008) utilizando macrófagos alveolares de ratos mostraram que insulina em doses mais altas que as fisiológicas inibe Akt, ERK1/2 e PKC, assim reduzindo a capacidade fagocítica destas células, bem como a liberação de TNF- α . Já Saiepour *et al.* (2006) ao utilizarem neutrófilos sanguíneos de indivíduos “normais” mostraram que insulina, em diferentes doses, aumentou a formação de actina F de modo dependente de PKC. A utilização de inibidores de PKC reverteu os efeitos inibitórios da insulina sobre a fagocitose, o que corroborou o achado. A dinâmica regulação da montagem de actina F é crucial para a efetiva

fagocitose e, neste estudo foi mostrado que insulina aumenta os níveis corticais de actina F sem aumentar os níveis celulares totais, gerando uma estrutura de membrana rígida e dificultando a dinâmica do citoesqueleto. Observa-se que insulina pode modular diversas enzimas importantes nas vias de sinalização que levam à fagocitose, como as que estão representadas na figura 17. Além disso, o efeito resultante da insulina dependerá da dose e, como observado no presente estudo, do tipo celular utilizado, mostrando que diferentes células respondem de formas diferentes. Sendo assim, os efeitos da insulina na fagocitose dependem da dose, tempo e tipo celular utilizado. Estudos envolvendo a análise da expressão e atividade de enzimas participantes das vias de sinalização, tanto da fagocitose quanto a própria via de transdução de sinal da insulina nos fagócitos, deveriam ser realizados para que pudesse ser entendida as diferenças encontradas nas respostas destes dois tipos celulares.

A análise das modificações feitas pela insulina observadas em macrófagos peritoneais requer um estudo mais completo da função destas células, uma vez que redução somente da fagocitose não indica uma ação antiinflamatória do hormônio nestas células. O mesmo pode ser dito para a situação de neutrófilos, nos quais a ausência de efeitos da insulina na fagocitose não pode gerar conclusões precipitadas.

A importância de adequado balanço nutricional há muito tempo vem sendo estudado. Importantes nutrientes são os AGPI n3 que tem sido mostrado serem benéficos em diversas situações, tais como doenças cardiovasculares, artrite reumatóide, asma, entre outras. Sua importância tem sido confirmada quando observou-se redução de seu consumo e ao mesmo tempo aumento no consumo de AGPI n6 nos últimos duzentos anos, o que foi correlacionado a maior incidência de casos de diabetes, obesidade e doenças cardiovasculares (SIMOPOULOS, 2003; OH, 2005). Além disso, determinados nutrientes apresentam efeitos desejáveis no sistema imunitário, em parte relacionados com a produção de eicosanóides (KELLEY, 2001). O oposto pode ser observado por ácidos graxos saturados, como demonstrado por Calder *et al.* (1990) que encontraram maior capacidade de adesão em macrófagos submetidos à cultura com ácidos graxos saturados e, em consequência apresentaram menor fagocitose. Assim, pode-se deduzir que células com mais ácidos graxos saturados na membrana mostram menor capacidade de emitirem pseudópodes.

6.2.1 Fagocitose e Ácidos Graxos Ômega-3

No presente estudo, óleo de peixe, rico em AGPI n3, foi capaz de aumentar a fagocitose de zimosan feita por neutrófilos sanguíneos (FIGURA 12). Animais de laboratório “normais” tipicamente contém 15-20% de ácido araquidônico (20:4 n6) como ácidos graxos nos fosfolipídios de membrana das células imunitárias (linfócitos dos linfonodos ou do baço ou macrófagos peritoneais) e, muito pouco de EPA (20:5 n3) e DHA (22:6 n3) (CALDER, 2008). Porém, sabe-se que ao aumentar o consumo de AGPI n3 haverá maior incorporação destes ácidos graxos na membrana das células (CALDER, 2007). A incorporação de AGPI n3 na membrana das células imunitárias pode influenciar a fluidez, estrutura e função de diversos receptores de membrana, transportadores, enzimas e canais iônicos, assim podendo modular as funções de leucócitos (DE NARDI *et al.*, 2008). Cukier *et al.* (1999) mostraram maior fagocitose em macrófagos do fígado e do pulmão de ratos após dieta parenteral rica em óleo de peixe. Estudos prévios de nosso laboratório também mostraram que AGPI n3 aumentam a fagocitose de zimosan em macrófagos peritoneais e neutrófilos sanguíneos (BONATTO *et al.*, 2005; FOLADOR *et al.*, 2006).

Como mostrado na figura 17, diversas proteínas (como as tirosina quinase já citadas) estão envolvidas no processo de fagocitose, bem como lipídios de membrana, como o PI(3,4,5)P₃ e PI(4,5)P₂ que são importantes na formação do fagossomo. Portanto, a alteração da composição de lipídios de membrana têm importantes efeitos na fagocitose. Sinalização mediada por lipídios desempenha papel crucial na formação e maturação do fagossomo. PI(4,5)P₂, normalmente acumulado nos pseudópodes, é hidrolisado pela fosfolipase C (PLC), gerando DAG e aumentando a concentração de cálcio citosólico. Também, o desaparecimento de PI(4,5)P₂ coincide temporalmente com o aparecimento de PI(3,4,5)P₃, provavelmente pela ação da PI3K recrutada por Syk ou por proteínas adaptadoras, como Gab2. Estas ações são importantes na geração do fagossomo e, consequente maturação do mesmo (YEUNG *et al.*, 2006). A geração de DAG contendo AGPI n3 pode ocasionar efeitos específicos dos metabólitos de DAG sobre vias como da ERK e da MAPK, que são importantes vias ativadoras da fagocitose. Além disso, a composição dos *rafts* lipídicos também pode ser alterada. Foi mostrado que a incorporação de AGPI n3 nos *rafts* diminui o conteúdo de esfingolipídios destes locais. A menor interação entre colesterol e EPA/DHA

causaria um distúrbio no equilíbrio entre colesterol e esfingomielina, podendo ocasionar modificações na localização de proteínas dentro dos *rafts* e, assim diversas vias de sinalização. Vale lembrar que vários receptores para fagocitose localizam-se em *rafts* lipídicos, bem como as enzimas tirosina quinases da família Src as quais são aciladas nos *rafts*, podendo ter sua função alterada caso modificações nesta composição aconteçam. Além do fato de que o aumento da fluidez da membrana facilitaria a formação de pseudópodes e conseqüentemente a fagocitose (SHAIKH; EDIDIN, 2006; LIMA *et al.*, 2007).

Comparando-se o processo fagocítico de macrófagos e neutrófilos, observa-se que nos últimos a presença de cálcio citosólico é crucial para a fusão de grânulos e vesículas com o fagossomo (LEE; HARRISON; GRINSTEIN, 2003). Além disso, para o neutrófilo, este aumento de cálcio citosólico é dependente de PI3K, o qual é ativado por Syk, uma tirosina quinase (MORAES; DOWNEY, 2003). Assim, a alteração da composição de lipídios de membrana pode afetar vários aspectos do fagócito, desde a capacidade de emitir pseudópodes se altas concentrações de ácidos graxos saturados existirem, até modificações nas complexas vias de sinalização envolvidas como consequência da modulação de proteínas ou localização das mesmas em microdomínios ou da geração de mensageiros lipídicos que podem possuir diferentes papéis na ativação de proteínas intracelulares.

Após a formação do fagossomo ocorre uma série de etapas de maturação do mesmo e posterior fusão com lisossomos, originando o fagolissomo e capacitando esta estrutura para a morte do microorganismo fagocitado pela ação de enzimas hidrolíticas ou da geração de EROS pela NADPH oxidase (KINCHEN; RAVICHANDRAN, 2008). Porém, este mecanismo é característico de macrófagos, enquanto neutrófilos apresentam uma série de vesículas e grânulos especializados originados da rede trans do Golgi e que apresentam enzimas hidrolíticas e a NADPH oxidase para a fusão com o fagossomo. A acidificação do fagossomo normalmente é realizada através de V-ATPases, proteína transmembrana que transporta prótons para o interior do lúmen (LEE; HARRISON; GRINSTEIN, 2003).

6.2.2 Sistema Lisossomal e Ácidos Graxos Ômega-3

O sistema lisossomal foi estudado através da avaliação da captação de vermelho neutro em vesículas de secreção. A instalação do quadro diabético fez com que macrófagos dos animais do grupo D reduzissem o volume lisossomal, enquanto em neutrófilos a resposta foi inversa. Hiperglicemia causa alterações nas funções de leucócitos, principalmente através da atuação dos produtos finais de glicação avançados (AGEs), os quais agem modificando a estrutura de diversas macromoléculas biológicas importantes. Foi mostrado (MASUDA *et al.*, 1990) que AGE diminui a fluidez de membrana dos leucócitos. A alteração da composição lipídica da membrana e, como consequência da fluidez da mesma, pode alterar a capacidade do lisossomo em reter vermelho neutro, além do ambiente de prótons que facilitam a retenção (GRUNDY *et al.*, 1996). Outra alteração importante da hiperglicemia resulta na ativação da via do poliol com concomitante geração de sorbitol, o qual modifica a osmolaridade intracelular, além de diminuir a disponibilidade de NADPH para a enzima NADPH oxidase (ALBA-LOUREIRO *et al.*, 2007). Assim, considerando a importância do ambiente de prótons para a retenção lisossomal, a alteração da osmolaridade intracelular pode resultar na modulação deste ambiente, resultando em alterada capacidade do lisossomo reter vermelho neutro. Desta forma supõe-se que a hiperglicemia seja o fator primordial na alteração do volume lisossomal de fagócitos de animais diabéticos. Já em neutrófilos obtidos de animais diabéticos (D) houve aumento quando comparado ao grupo C (FIGURA 13). Novamente, observa-se a resposta diferenciada entre macrófagos e neutrófilos. Entretanto, embora o grupo D tenha apresentado aumento na fagocitose realizada por macrófagos (FIGURA 8), com relação ao volume lisossomal mostrou redução, como observado pela figura 9. Isto poderia sugerir que, embora possam fagocitar mais, não conseguem processar o material ingerido adequadamente, como notado pelo menor volume lisossomal. Já a maior retenção apresentada pelos neutrófilos de animais diabéticos mostra a diferença na resposta da membrana celular destas células quando comparadas às dos macrófagos. Alexiewicz, Kumar e Smogorzewski (1995) mostraram uma relação direta entre a elevação das concentrações de cálcio intracelular e o grau de hiperglicemia, sugerindo uma situação causada pela ativação de PKC. Assim, considerando-se a importância do cálcio intracelular para adequada fusão de grânulos em neutrófilos, pode-se supor

que nestas células a hiperglicemia estaria auxiliando no aumento do volume lisossomal. Entretanto, deve-se destacar o fato da reduzida atividade das enzimas lisossomais em indivíduos diabéticos (ALBA-LOUREIRO *et al.*, 2006). Assim, um maior volume lisossomal não resulta em melhora na função microbicida da célula sem uma adequada atividade das enzimas responsáveis por isto.

Nos macrófagos de animais diabéticos suplementados com óleo de peixe (D/OP) houve aumento do volume lisossomal em relação ao encontrado no grupo D. A administração de insulina reduziu o volume lisossomal tanto no grupo D/OP/I quanto no D/GC/I (FIGURA 9). No caso de neutrófilos sanguíneos, a suplementação com óleo de peixe resultou em aumento no volume lisossomal tanto em animais não diabéticos suplementados (OP) quanto em animais diabéticos (D/OP). Já a suplementação de animais não diabéticos com gordura de coco (GC) houve redução do volume lisossomal quando comparado com o dos animais do grupo controle (C). Em macrófagos não observamos aumento na fagocitose após suplementação com óleo de peixe, porém encontramos maior volume lisossomal. Já o aumento da fagocitose em neutrófilos associado com maior volume lisossomal observado após suplementação com óleo de peixe, poderia sugerir um adequado processamento do material englobado por estas células. Entretanto, óleo de peixe poderia atuar melhorando a atividade das enzimas lisossomais também, o que não foi avaliado no presente estudo. Por isso se torna interessante, neste sentido, uma análise da produção das espécies reativas de oxigênio, as quais também representam uma via microbicida e serão discutidas adiante. O aumento na retenção de vermelho neutro por macrófagos peritoneais e neutrófilos sanguíneos de animais suplementados com óleo de peixe pode ser explicada pela alteração da membrana do complexo de golgi pela incorporação de AGPI n3, o qual como já foi dito diminui o conteúdo de esfingolípídios dos microdomínios. Assim, pode haver modificação na liberação de vesículas de secreção por esta organela (SHAIKH; EDIDIN, 2006).

Insulina apresentou a propriedade de reduzir a fagocitose de zimosan, como já mostrado e, como consequência reduziu também o volume lisossomal em macrófagos de animais suplementados com óleo de peixe e gordura de coco. O mecanismo para este evento pode residir na modulação que insulina provoca em proteínas como Akt, ERK e PKC, as quais são importantes nas vias de sinalização que levam à fagocitose. O processo fagocítico é o fator desencadeante para início do *burst* oxidativo, que inclui destruição do patógeno por produção de EROS ou por

enzimas hidrolíticas, sendo as últimas envolvidas com os lisossomos. Se fagócitos de animais recebendo insulina não conseguem efetivar a fagocitose, logo terão dificuldade no processamento e destruição do patógeno. Neste sentido, a insulina por atuar reduzindo e controlando a glicemia dos animais (FIGURA 5) pode fazer com que eles adquiram um fenótipo semelhante ao dos animais não diabéticos, desempenhando um papel anti-inflamatório nestas células.

6.2.3 Produção de espécies reativas de oxigênio e Ácidos Graxos Ômega-3

O encontro com o patógeno além de ativar o processo de fagocitose e posterior formação do fagolisossomo, também ativa uma enzima localizada na membrana plasmática ou na membrana do fagossomo, a NADPH oxidase (BABIOR; LAMBETH; NAUSEEF, 2002). A função básica desta enzima, pertencente à família NOX, é a geração de ânion superóxido (O_2^-), uma molécula reativa de oxigênio, através da transferência de elétron oriundo do NADPH à molécula de oxigênio (O_2) (BEDARD; KRAUSE, 2007). Como mostra a figura 18, a estrutura desta enzima é complexa, consistindo de duas subunidades ligadas à membrana, gp91^{PHOX} e p22^{PHOX}, três componentes citosólicos, p67^{PHOX}, p47^{PHOX} e p40^{PHOX}, além de uma proteína de baixo peso molecular, Rac1 ou Rac2, trocadora de GTP. A ativação da enzima resulta na montagem da mesma através da translocação das subunidades citosólicas, através da fosforilação de p47^{PHOX}, para a membrana fagossomal (BABIOR, 2004). Cabe ressaltar que em macrófagos, gp91^{PHOX} se localiza tanto na membrana plasmática quanto em membranas intracelulares, enquanto em neutrófilos não estimulados, a maior parte das subunidades se localiza na membrana dos grânulos secundários e terciários, os quais fundem após estimulação, com a membrana fagossomal (BEDARD; KRAUSE, 2007).

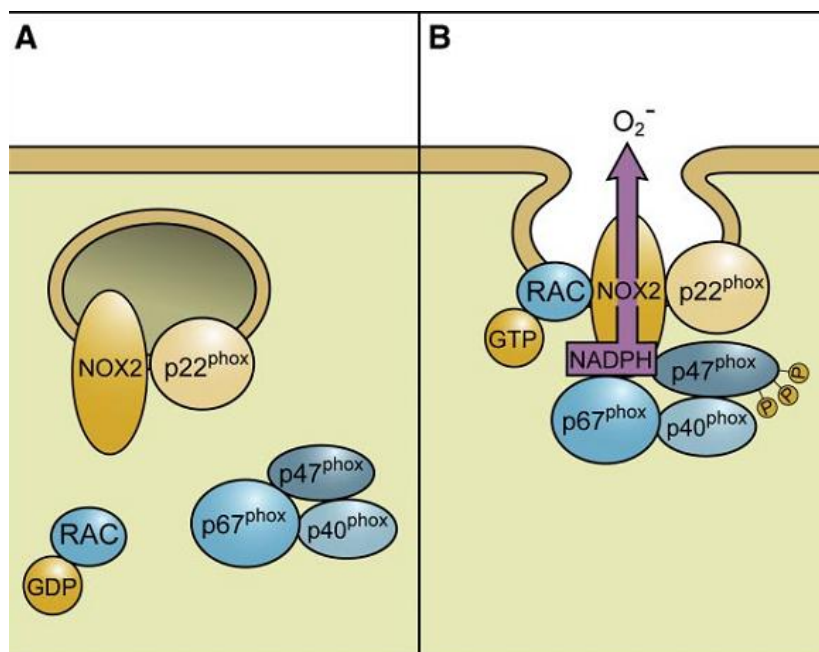


Figura - 18 – Ativação da NADPH oxidase (BEDARD; KRAUSE, 2007).

Ácidos graxos poliinsaturados araquidônico e eicosapentaenóico têm sido mostrados serem capazes de aumentar o estresse oxidativo, via maior produção de ânion superóxido, avaliado no plasma e urina humanas, da mesma forma que induzem a produção de EROS tanto por macrófagos quanto por neutrófilos obtidos de humanos e de animais (LIMA *et al.*, 2007). Estes AGPIs podem modular a atividade da NADPH oxidase através da atuação nas diferentes subunidades da enzima. Assim, estes AGPIs podem agir alterando a estrutura conformacional de p47^{PHOX} facilitando sua interação com p22^{PHOX}, apresentando também afinidade por Rac ou pelo citocromo b₅₅₈ (gp91^{PHOX} e p22^{PHOX}). Na figura 19 estão mostrados os possíveis locais de atuação de AGPI sobre a enzima (SCHONFELD; WOJTCZAK, 2008).

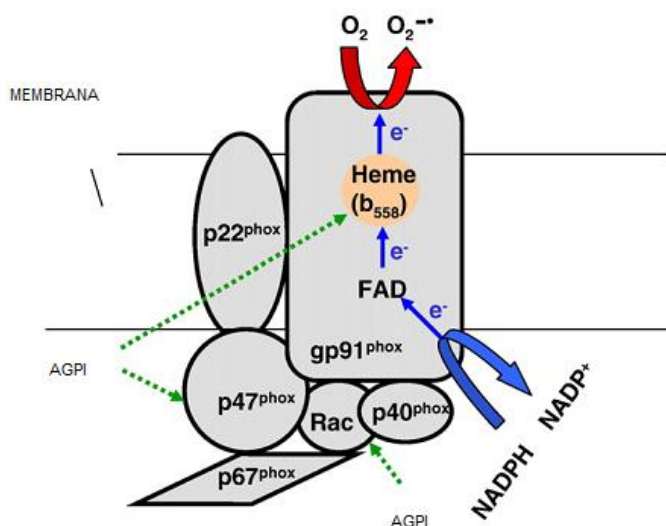


Figura – 19 – Interação dos AGPIs com a NADPH oxidase (ADAPTADO DE SCHONFELD; WOJTCZAK, 2008).

No presente estudo, com relação à produção das EROS, a suplementação com óleo de peixe aumentou a produção de O_2^- por macrófagos peritoneais de animais não diabéticos (OP) e diabéticos (D/OP), enquanto gordura de coco promoveu redução em animais não diabéticos (GC). Já em animais diabéticos (D) houve reduzida produção de ânion superóxido e, a administração de insulina reduziu tanto no grupo D/OP/I quanto no D/GC/I (FIGURA 10). Óleo de peixe pode modular diversos fatores envolvidos com a produção de EROS, como a concentração de citocinas e a produção de eicosanóides, assim podendo modular vias de transdução de sinal, como a da PKC (GORJÃO *et al.*, 2006). É conhecido que as subunidades $p47^{PHOX}$ e $p40^{PHOX}$ interagem com fosfoinosítídeos específicos, normalmente aqueles gerados pela PI3K, na montagem da enzima NADPH oxidase na membrana fagossomal. Além do fato da fosforilação de $p47^{PHOX}$ ser mediada pela PKC, como mostrado também na figura 17. Pode-se dizer que a modificação da composição de fosfolipídios da membrana é capaz de modular diversas vias de transdução de sinal, como à da PKC e/ou da PI3K (GORJÃO *et al.*, 2006). Foi mostrado também que a suplementação com AGPI n3 pode provocar inibição da sinalização mediada por PKC (LIMA *et al.*, 2007). Por outro lado, AGPI n3 mantém a atividade da PI3K via IRS (CORCORAN; LAMON-FAVA; FIELDING, 2007). Assim, AGPI n3 pode modular a via da PI3K e PKC, podendo ativar PI3K nestas células, a qual gera certos metabólitos, tais como PI(3)P e PI(3,4)P, que são específicos para ligação de $p40^{PHOX}$ e $p47^{PHOX}$, respectivamente. Outro fator importante é o fato de AGPI n3

competirem, metabolicamente, com ácido araquidônico promovendo redução da produção de PGE₂, a qual apresenta atividade redutora do metabolismo oxidativo de leucócitos (ANDRADE; CARMO, 2006).

Houve redução na produção de H₂O₂ por macrófagos peritoneais (FIGURA 11) obtidos de animais não diabéticos suplementados com óleo de peixe (OP), gordura de coco (GC) e de animais diabéticos (D). Entretanto, a suplementação de animais diabéticos com óleo de peixe (D/OP) resultou em aumento na produção de H₂O₂ quando comparado à do grupo D e, a administração de insulina reduziu tanto no grupo D/OP/I quanto D/GC/I. Também nos neutrófilos sanguíneos, observamos que animais diabéticos (D) mostraram reduzida produção de H₂O₂, enquanto a suplementação com óleo de peixe (D/OP) aumentou esta produção. O mesmo foi observado para a suplementação com gordura de coco (D/GC). A administração de insulina resultou aumento na produção de H₂O₂ no grupo D/GC/I (FIGURA 15). Cabe ressaltar que, embora O₂⁻ seja o principal produto da enzima NADPH oxidase, ele pode ser rapidamente convertido à H₂O₂ pela enzima superóxido dismutase ou espontaneamente em situações de baixo pH, sendo H₂O₂ um dos responsáveis pela atividade antimicrobiana da NADPH oxidase (BEDARD; KRAUSE, 2007). Omori *et al.* (2008) mostraram que a subunidade da NADPH oxidase, p47^{PHOX}, é translocada precocemente para a membrana celular de neutrófilos de indivíduos diabéticos, supondo que estas células já estão em um estado ativado. Estes mesmos autores sugeriram um fenótipo hiper-responsivo para a geração de ânion superóxido em neutrófilos e macrófagos, como um resultado de produtos finais de glicação avançados (AGEs) e, utilizando um ligante específico do receptor de AGE definiram que a via da ERK é a principal envolvida neste mecanismo. Nossos dados não corroboram os de Omori *et al.* (2008). Talvez esta discrepância seja explicada pelo protocolo utilizado.

Hiperglicemia promove peroxidação lipídica de LDL de modo dependente de ânion superóxido originando as células espumosas, ponto inicial na aterogênese (MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003).

Concentrações adequadas de EROS são importantes na promoção da defesa do indivíduo contra infecções. O problema é quando estas concentrações de EROS se tornam críticas, acima do desejado para a eliminação de patógenos, instala-se assim, uma situação de estresse oxidativo. Normalmente, indivíduos saudáveis controlam suas concentrações de EROS através de sistemas antioxidantes.

Indivíduos diabéticos apresentam reduzida capacidade antioxidante, assim elevada taxa de formação destas espécies reativas pode resultar em estresse oxidativo e dano celular (MARITIM *et al.*, 2003).

A reduzida capacidade de macrófagos e neutrófilos de indivíduos diabéticos produzirem EROS após o encontro com o patógeno se correlaciona com a menor atividade microbiciada encontrada nos fagócitos destes indivíduos, resultando em maior susceptibilidade à doenças. Assim, reduções nas funções de quimiotaxia, morte bacteriana, produção de ânion superóxido, liberação de leucotrienos e secreção de enzimas lisossomais foram observadas em fagócitos de diabéticos e, isto é proporcional à extensão da hiperglicemia dos mesmos (McMANUS *et al.*, 2001). Assim, foi mostrado que o controle metabólico de diabéticos resulta em melhora das funções das células imunitárias, em parte pela correção de vias metabólicas da glicose dentro das células e não por uma facilitação da entrada de glicose nestas células. Por exemplo, foi encontrada uma redução de 50% na utilização da glicose e glicólise por neutrófilos de diabéticos, sendo que a adequada produção energética acarreta melhora da funcionalidade do sistema imunológico (WALRAND *et al.*, 2004).

Embora essenciais para a defesa do hospedeiro contra as infecções, um excesso de EROS pode ser maléfico para as células. Aumentada produção de EROS está correlacionada ao desenvolvimento de complicações diabéticas, em parte pela ativação do fator de transcrição κ B (NF κ B), ocasionando aumento na produção de mediadores pró-inflamatórios. Ainda, hiperglicemia correlaciona-se à diminuição das defesas antioxidantes (MARTÍN-GALLAN *et al.*, 2003). Nefropatia tem sido ligada à geração de EROS nas células mesangiais de forma dependente de PKC e, o uso de inibidores da NADPH oxidase bloqueia a geração de EROS por estas células. É também aceito que a geração de ânion superóxido pelo metabolismo mitocondrial tenha efeito mais significativo na geração de EROS, como observado em células endoteliais aórticas, cuja normalização da superprodução de EROS mitocondrial por estas células, foi capaz de inibir a ativação de PKC (LEE *et al.*, 2003). Geração de ânion superóxido por macrófagos através da NADPH oxidase, aumenta a oxidação de LDL e posterior captação do mesmo por macrófagos via receptores scavenger, iniciando o processo aterogênico (HAYEK *et al.*, 2007). Assim, aumentada geração de EROS por fagócitos e demais células de indivíduos

diabéticos apresenta efeitos críticos na geração de estresse oxidativo e, conseqüentemente complicações diabéticas.

Neste estudo, foi observado que a administração de insulina reduziu a fagocitose e o volume lisossomal de macrófagos peritoneais, além da produção de EROS. Isto poderia sugerir um efeito anti-inflamatório do hormônio nesta célula. Insulina pode agir inibindo algumas etapas das vias de sinalização, como as mostradas na figura 17, inclusive ao inibir a PKC, a qual está envolvida não só com a fagocitose, mas também com a ativação da NADPH oxidase, através da fosforilação da subunidade p47^{PHOX}. Por outro lado, insulina promoveu aumento na produção de peróxido de hidrogênio por neutrófilos. Novamente, mostra-se as diferenças encontradas entre os dois tipos celulares. Insulina pode regular a função de neutrófilos em indivíduos diabéticos por normalizar o uso de glicose e a glicólise, promovendo a síntese de glicogênio e de lactato, importantes quando se considera que as diversas funções dos leucócitos na defesa do hospedeiro requerem glicose como fonte de energia (WALRAND *et al.*, 2004). Porém, em macrófagos, embora possa-se supor que o controle metabólico estivesse adequado após a administração de insulina, o mesmo não foi observado. Insulina pode estimular a produção de O_2^- - dependente de NADPH oxidase em monócitos humanos e macrófagos murinos e, segundo San José *et al.* (2009) este processo de ativação foi dependente da ativação das vias de sinalização da PI3K e PKC. Por outro lado, Dandona *et al.* (2001) encontraram redução na produção de O_2^- por monócitos humanos após infusão de insulina em indivíduos obesos não-diabéticos. As diferenças encontradas pelos dois trabalhos podem estar relacionadas à metodologia empregada, já que San José *et al.* (2009) utilizou monócitos humanos e macrófagos murinos colocados em cultura com adição de insulina. Assim, análises das vias de transdução de sinal da insulina e da fagocitose envolvidas deveriam ser estudadas, separadamente, nos dois tipos celulares e comparadas, para que se possa inferir algo à respeito.

Macrófagos de animais diabéticos suplementados com óleo de peixe mostraram aumentada produção de O_2^- (FIGURA 10), enquanto também aumentaram a produção de H_2O_2 (FIGURA 11). O_2^- pode ser convertido à H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase, enquanto H_2O_2 pode ser eliminado pela ação da mieloperoxidase originando ácido hipocloroso, um poderoso microbicida (RIBEIRO *et al.*, 2005). Como foi dito anteriormente, o estado de diabetes por si só produz um fenótipo ativado de fagócitos, com montagem precoce da NADPH oxidase na

membrana celular (OMORI *et al.*, 2008). O óleo de peixe é capaz de modular vias de sinalização envolvidas com a produção de EROS. Classicamente, uma das explicações para os efeitos de AGPI n3 sobre células é através da produção de eicosanóides, porém o bloqueio da produção de eicosanóides (por inibidores da COX) não afetou o *burst* oxidativo em neutrófilos (POMPÉIA *et al.*, 2000). Outro aspecto importante é o fato da montagem da NADPH oxidase ocorrer nos *rafts* lipídicos das membranas e, considerando a incorporação que normalmente ocorre de EPA/DHA após consumo de AGPI n3 nas membranas, pode ser que isto altere a montagem da enzima. Portanto, a suplementação com óleo de peixe provocou aumento na geração de EROS em animais diabéticos. Isto pode contribuir para o desenvolvimento de complicações arterioscleróticas em indivíduos diabéticos, pois a geração de EROS se correlaciona com dano celular, como no caso de oxidação de partículas de LDL, facilitando o desenvolvimento de lesão arteriosclerótica (HAYEK *et al.*, 2007). Porém, como indivíduos diabéticos normalmente apresentam pobre atividade de enzimas antioxidantes associada à maiores concentrações de EROS, isto resultaria em um quadro de estresse oxidativo (NICOLLS; HASKINS; FLORES, 2007). Ácidos graxos ômega 3 têm conhecido efeito em promover aumento da atividade de enzimas antioxidantes (ARMAH *et al.*, 2008), assim a suplementação com AGPI n3 traria efeitos benéficos importantes em indivíduos portadores de DM, em parte por reduzir o estresse oxidativo e, como consequência a ocorrência de complicações vasculares. Estudos relacionados à atividade de enzimas antioxidantes comprovariam esta hipótese.

Outra explicação é que AGPI n3 estariam aumentando a capacidade de defesa destes indivíduos, através da maior produção de EROS. Porém, indivíduos diabéticos normalmente apresentam reduzida atividade de enzimas lisossomais (ALBA-LOUREIRO *et al.*, 2006) e, no presente estudo a atividade destas enzimas não foi avaliada. Embora possam produzir mais EROS, podem estar com reduzida atividade das enzimas líticas, sendo incapazes de promover eficiente morte microbiana. Óleo de peixe pode aumentar a produção de EROS e também poderia melhorar a atividade destas enzimas, assim promovendo maior capacidade de defesa contra as infecções. Podemos supor que, neste caso, óleo de peixe estaria melhorando o quadro do indivíduo diabético, por ser capaz de reduzir o estresse oxidativo e por aumentar EROS e, talvez a atividade de enzimas lisossomais, assim capacitando o leucócito a destruir o patógeno.

Óleo de peixe, assim pode exercer diversos efeitos benéficos em indivíduos portadores de diabetes tipo 1, particularmente no que diz respeito ao sistema imunitário inato. No sentido em que promove aumento da fagocitose por fagócitos e melhora o *burst* oxidativo dos mesmos, ao mesmo tempo em que é capaz de auxiliar nas defesas antioxidantes destes indivíduos normalmente acometidos por complicações decorrentes do estresse oxidativo, assim capacitando o sistema imunitário inato dos mesmos na defesa contra infecções. Deve-se considerar que indivíduos diabéticos apresentam defeitos na imunidade inata, como já citado, portanto n3 traria inúmeros benefícios.

6.2.4 Linfócitos e Ácidos Graxos ômega-3

Modulações são também observadas em relação à resposta imunológica adaptativa. Linfócitos fazem parte desta resposta imunológica adquirida e são caracterizados pelo reconhecimento específico de diversos determinantes antigênicos e pela capacidade em gerar células de memória. Estas células são ativadas por diferentes estímulos, tais como o reconhecimento do antígeno e citocinas, e sofrem o processo de expansão clonal caracterizado por extensa proliferação celular, originando um clone de células portando receptores com a mesma especificidade do antígeno que originou a expansão. Os principais combustíveis utilizados pelos linfócitos durante a proliferação são a glicose e a glutamina, que permitem a geração de ATP, DNA, RNA e fosfolipídios. Assim, é provável que indivíduos portadores de Diabetes *mellitus* (DM) mostrem profundas alterações no metabolismo de linfócitos, particularmente em vias como a glicólise e a glutaminólise (OTTON; MENDONÇA; CURI, 2002; LIU *et al.*, 2005).

Após esta ativação de linfócitos há a diferenciação em células efetadoras. Assim, linfócitos são diferenciados em células B produtoras de anticorpos ou em células T efetoras, ou seja, células T CD4 e T CD8. Existe uma cooperação entre os componentes do sistema imunológico durante uma infecção. Resumidamente, células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos e células dendríticas, reconhecem o antígeno nos locais da infecção ou nos órgãos linfóides periféricos e apresentam peptídeos derivados dos antígenos aos linfócitos. APCs ativadas expressam moléculas co-estimulatórias como CD86 que são reconhecidas

por outras moléculas, como CD28, dos linfócitos. Estas APCs também produzem citocinas como IL12 que estimulam a diferenciação de linfócitos em efetadores, como os linfócitos T CD4 que reconhecem peptídeos montados em moléculas MHC de classe II. Estes linfócitos T CD4 auxiliam a diferenciação de linfócitos T CD8 através da secreção de IL2. A liberação de IL12 por macrófagos e células dendríticas ativa a transcrição de citocinas características de linfócitos Th1. Já IL4 estimula a diferenciação de linfócitos Th2, os quais secretam mais IL4 e também IL10 que inibe a ativação de macrófagos e a ativação de Th1, porém estimula a produção de anticorpos por linfócitos B. Por outro lado, Th1 secreta IFN- γ que age nos macrófagos aumentando a fagocitose e a destruição de microorganismos e nos linfócitos B aumentando a produção de anticorpos como IgG, que podem atuar facilitando a fagocitose por opsonização. Secreção de TNF e linfotóxina por Th1 também ativa neutrófilos e acentua o processo inflamatório. Por outro lado, IFN de Th1 inibe células Th2, enquanto IL4 de Th2 inibe a diferenciação de células Th1. Deste modo, existe grande interrelação entre os componentes da imunidade inata e adaptativa, como mostrado pela figura 20 (CALDER *et al.*, 2002; ABBAS; LICHTMAN,

2007).

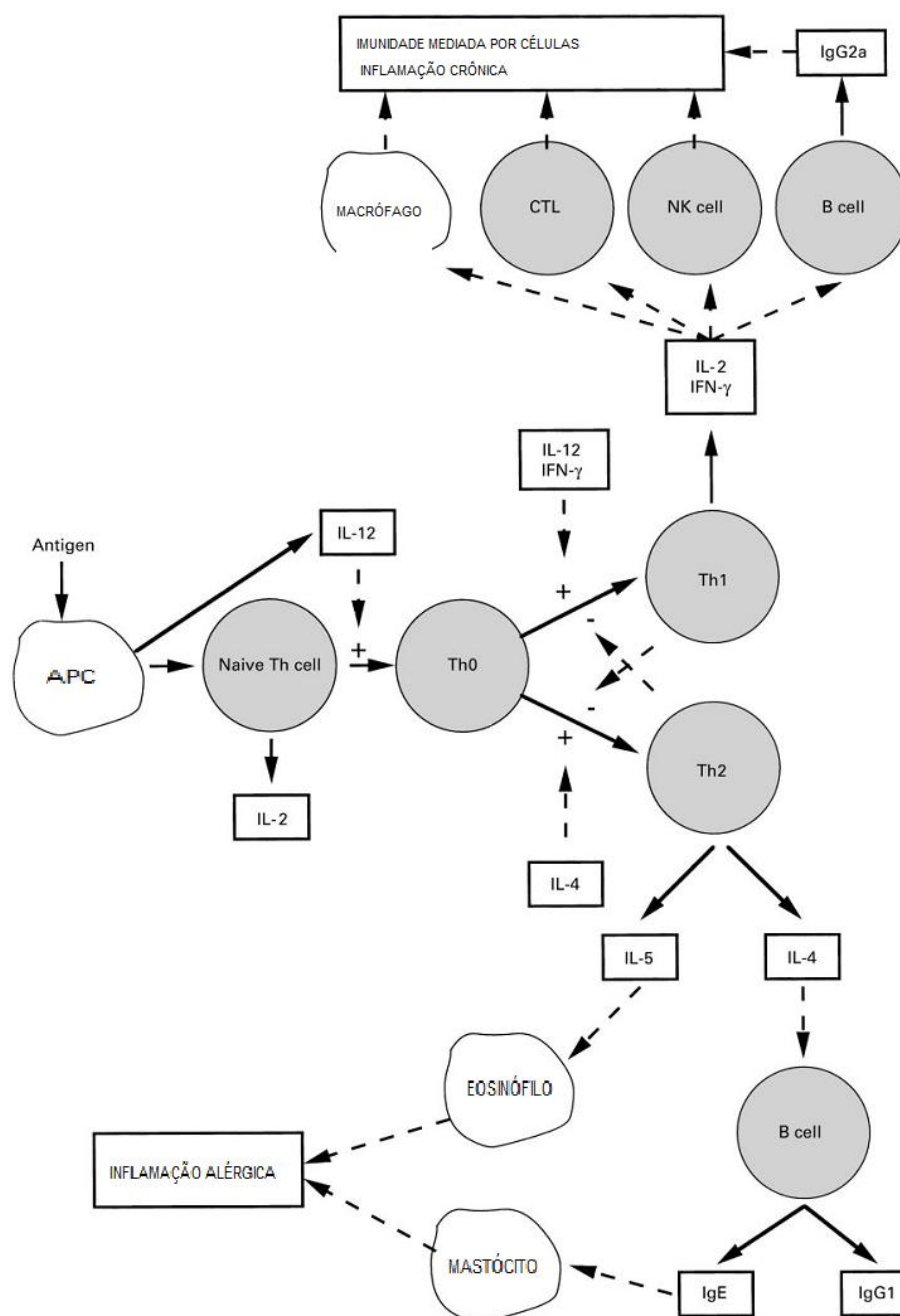


Figura - 20 – Diferenciação e papéis de linfócitos Th1 e Th2 (ADAPTADO DE CALDER et al, 2002).

É reconhecido que indivíduos diabéticos apresentam deficiências nas respostas imunitárias com consequente aumento na incidência de certas doenças, como tuberculose. Imunidade mediada por células representa importante fator prejudicado nestes indivíduos e, a habilidade dos linfócitos T em proliferar após

ativação têm papel fundamental na imunidade celular (LIU *et al.*, 2005). Otton *et al.* (2004) encontraram leucocitose em ratos diabéticos induzidos por aloxana (40mg/kg), porém com redução nos níveis de linfócitos, sendo que estes autores relacionaram este achado com a reduzida resposta imunológica e maior incidência de infecções no DM.

Por outro lado, ácidos graxos têm reconhecidos efeitos na ativação e proliferação de linfócitos, sendo que dietas ricas em AGPI n3 podem inibir esta proliferação. Os mecanismos envolvidos podem estar relacionados com a produção de eicosanóides, citocinas, habilidade de células apresentadoras de antígenos em ativar linfócitos, além da produção de outros mediadores lipídicos e da atuação em fatores de transcrição (POMPÉIA *et al.*, 2000).

Uma das principais causas de morbidade e mortalidade em países desenvolvidos são relacionadas à doenças com causa inflamatória, seja pela produção de eicosanóides ou de citocinas pró-inflamatórias, como acontece no diabetes tipo 1 e 2. Sendo que muitas têm sido ligadas ao baixo consumo de n3 (SIJBEN; CALDER, 2007).

No presente estudo, linfócitos T estimulados por concanavalina A de animais não diabéticos suplementados com óleo de peixe e de coco mostraram reduzida proliferação (FIGURA 16). Uma das explicações para os efeitos de n3 sobre a função das células T é através da atuação sobre *rafts* lipídicos. Estes microdomínios de membrana que apresentam regiões de co-localização de proteínas envolvidas em vias de sinalização, estão envolvidos com a função das células T. Por exemplo, a tirosina quinase Ick e a molécula ligadora de célula T ativada (LAT) ficam retidas nos *rafts* por acilação, enquanto outras como a fosfolipase Cy1 se translocam à estes locais após ativação das células T. Sabe-se que após suplementação com n3 há a substituição destas proteínas aciladas que ficam ancoradas na membrana plasmática, com redução do conteúdo de esfingomiélinina destes microdomínios. Assim, AGPI n3, de alguma forma promovem alteração da composição destes *rafts*, principalmente no que diz respeito à localização de proteínas importantes em vias de sinalização. Também, é considerado que a inibição da fosforilação de LAT por n3 pode explicar a inibição da função de células T, pois pode ocorrer redução na interação de LAT com o receptor de célula T (TCR) e com o receptor co-estimulatório CD28. Além disso AGPI n3 podem modular a atividade da fosfolipase Cy1 e reduzir a produção de IL2, a redução na concentração de receptores de IL2,

alterando a atividade da via de sinalização de IL2. Isto pode explicar a reduzida proliferação de linfócitos, já que IL2 está envolvida na ativação da imunidade celular (CALDER, 2007; LIMA *et al.*, 2007).

Um mecanismo que tem-se mostrado importante na ação imunomodulatória de AGPI n3, é seu papel na produção de citocinas inflamatórias (SIJBEN; CALDER, 2007). Normalmente, estes efeitos são dependentes da dose de óleo de peixe (EPA+DHA) utilizada. Assim, Trebble *et al.* (2003) encontraram aumento na produção de IFN- γ na dose de 2g EPA+DHA/dia, em linfócitos. Estes mesmos autores propuseram uma relação dose-resposta na ingestão de EPA+DHA e a produção de citocinas derivadas de células Th1, mostrando que doses menores que 2g/dia por um período menor que 4 semanas se relacionam com aumentada produção destas citocinas, enquanto doses maiores por um período de tempo maior causam efeito inibitório na produção de IFN- γ e IL2. Não há estudos mostrando efeitos significantes de n3 sobre a produção de IL10 por linfócitos (SIJBEN; CALDER, 2007).

A mesma equipe que dosou IFN- γ (TREBBLE *et al.*, 2003) também avaliou a proliferação de linfócitos em diferentes doses (0,3, 1,0 e 2,0g/dia), sendo observado aumento na proliferação de linfócitos na dose de 2g/dia, acompanhada por aumento na produção de IFN- γ e redução na de PGE₂. Por outro lado, uma série de estudos utilizando doses que variam de 0,2-7,0g/dia de EPA+DHA encontraram reduzida proliferação de linfócitos, produção de IL2 e atividade de NK (CALDER *et al.*, 2002; SIJBEN; CALDER, 2007). PGE₂ e LTB₄ são produzidas pela atuação da enzima COX sobre o ácido araquidônico (ARA), sendo que PGE₂ inibe a proliferação de linfócitos, atividade das células NK e de citocinas derivadas de Th1, enquanto LTB₄ aumenta a produção de TNF- α , IL1 e IL6 por monócitos e macrófagos, aumenta produção de citocinas derivadas de Th1 e aumenta atividade das células NK. Diversos efeitos de AGPI n3 sobre linfócitos são atribuídos à reduzida produção de eicosanóides derivados de ácido araquidônico e à produção de eicosanóides derivados de AGPI n3, que possuem menor potência que aqueles de ARA (CALDER *et al.*, 2002). Foi mostrado por ZHANG; FRITSCH (2004) que AGPI n3 reduzem a produção de IL12 por macrófagos murinos. Portanto, diversos estudos mostram redução por AGPI n3 na produção de citocinas como IL2 e IL12, as quais são importantes na ativação da diferenciação e proliferação de linfócitos.

Assim, pode-se considerar que grande parte dos efeitos de AGPI n3 sobre as células de um modo geral são associados às alterações na composição lipídica destas células. O mesmo pode ser extrapolado para células T. Por exemplo, a incorporação de AGPI n3 nos fosfolipídios da membrana resulta na geração de mediadores lipídicos, como DAG que pode atuar modulando as vias de sinalização nestas células. Portanto, foi observado (DENYS; HICHAMI; KHAN, 2002) que metabólitos de DAG obtidos de fosfolipídios ricos em AGPI n3 alterou a sinalização de MAPK, através da inibição de ERK em células Jurkat (linhagem de linfócitos T humanos), proteínas estas que estão envolvidas na proliferação e diferenciação celular. Estes ácidos graxos inibiram também a translocação de PKC para a membrana plasmática induzida por PMA e NFκB. Gorjão *et al.* (2006) também encontraram reduzida expressão de MAPK, PKC e PKA em nível traducional em linfócitos de indivíduos suplementados com AGPI n3 (rico em DHA), porém encontraram aumento na proliferação estimulada por ConA. Ao mesmo tempo, também foi encontrado aumento na atividade de ERK em células Jurkat (Hill *et al.*, 1998). Estas discrepâncias podem ser explicadas por diferenças nos tratamentos utilizados, bem como uso de modelos animais versus linfócitos humanos, bem como diferentes proporções de EPA e DHA nas suplementações ou no meio de cultura. Através destes estudos, pode-se concluir que n3 altera vias de sinalização envolvidas com a ativação de linfócitos T. Gorjão *et al.* (2007) encontraram reduzida proliferação de linfócitos humanos estimulados por ConA. Estes autores avaliaram as fases do ciclo celular e observaram que EPA e DHA param a progressão do ciclo na fase G0/G1, sendo que DHA na concentração de 40μM aumenta a porcentagem de células na fase G1 através de aumento na fosforilação de p53. Além disso, eles encontraram que ácido palmítico e esteárico reduziram a proliferação estimulada por IL2 e propuseram ser através de atuação sobre as vias de sinalização de IL2, como ERK.

E, por fim, AGPI n3 pode atuar por meio de fatores de transcrição, como PPAR (receptor ativado pelo proliferador de peroxissomos) e NFκB (fator nuclear κB). Isoformas α e γ de PPAR podem ser ativadas por AGPI, tais como EPA, e em diversas linhagens celulares pode promover redução na produção de citocinas inflamatórias, tais como TNF-α e IL1. Da mesma forma que o rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio vascular foi reduzida por EPA de modo dependente de PPAR-α. Porém, a inibição da secreção de IL12 por macrófagos murinos foi

mostrado ser independente da ativação de PPAR- γ (ZHANG; FRITSCHE, 2004; LIMA *et al.*, 2007).

Óleo de peixe foi fornecido à animais diabéticos, com a finalidade de se estudar o seu efeito sobre seus linfócitos. Porém, não foi encontrada diferença provocada pela suplementação, a animais diabéticos, com óleo de peixe ou gordura de coco. Entretanto, como era esperado, animais diabéticos demonstraram redução na capacidade proliferativa.

Da mesma forma observada nos animais não diabéticos, também houve redução da proliferação linfocitária dos linfócitos obtidos de animais do grupo D não suplementados. Sakowicz-Burkiewicz *et al.* (2006) utilizando modelo de diabetes induzido por estreptozotocina em ratos da linhagem Wistar encontraram reduzida capacidade proliferativa de linfócitos T estimulados com ConA, de forma dependente de adenosina. Sendo que os linfócitos destes ratos liberaram maiores quantidades de adenosina, a qual agindo sobre seu receptor A_{2A} , produziram mais AMPcíclico, o qual ativou a via de sinalização de PKA, resultando nesta reduzida proliferação. Estudo anterior (GAULTON; SCHWARTZ; EARDLEY, 1985) de modelo animal de diabetes induzido por estreptozotocina ou usando células em cultura incubadas na presença de estreptozotocina resultou em células com muitas anormalidades cromossômicas, indicando possíveis quebras na dupla fita de DNA. Assim os efeitos desta droga poderiam resultar em linfócitos com menor capacidade proliferativa. Porém, Sakowicz-Burkiewicz *et al.* (2006) também incubaram linfócitos de ratos não tratados com estreptozotocina mas com adição de glicose e sem insulina ao meio para mimetizar um quadro diabético. A redução na capacidade de proliferação destes linfócitos foi similar àquela encontrada para animais tratados com estreptozotocina. Isto poderia indicar efeito importante da hiperglicemia e/ou ausência de insulina, mais do que um papel da estreptozotocina.

Eibl *et al.* (2002) encontraram reduzida proliferação de linfócitos T de pacientes diabéticos do tipo 1. Estes linfócitos foram colocados em cultura com adição de células dendríticas anteriormente incubadas com antígenos. E, ao mesmo tempo que encontraram menor proliferação destes linfócitos em cultura, também foi observada reduzida produção de anticorpos anti-vírus da hepatite A em pacientes diabéticos tipo 1 após vacinação para hepatite A. A intenção destes autores foi estabelecer uma correlação entre a menor capacidade de produção de anticorpos com reduzida ativação de linfócitos T, os quais seriam importantes na ativação das

células B. Assim, foi também avaliada a produção de IL13 e IFN- γ por linfócitos destes pacientes diabéticos após estímulo com antígenos utilizados na vacinação, que também foi encontrada ser reduzida. Estes autores concluíram que a reduzida capacidade de produção de anticorpos após vacinação é em decorrência de reduzida ativação de linfócitos de diabéticos tipo 1. Outros autores (NERVI *et al.*, 1999) encontraram reduzida ativação de linfócitos T de pacientes diabéticos tipo 1 através de alteração em vias de sinalização de ativação de células T e, que isto poderia ser revertido pela administração de sinais co-estimulatórios. Enquanto Angelini *et al.* (2005) encontraram reduzida expressão de moléculas co-estimulatórias em células dendríticas de crianças diabéticas tipo 1. Também, Yamashiro *et al.* (2005) avaliaram a resposta de linfócitos de camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina, através da produção de citocinas características de células Th1 (IFN- γ e IL12) e de Th2 (IL4), além da expressão da NOSi (óxido nítrico sintase induzível) após a infecção destes camundongos com *Mycobacterium tuberculosis*. Estes autores encontraram reduzida produção das citocinas Th1 e, conseqüentemente de NOSi e aumento da citocina Th2, IL4. Isto pode explicar a menor resistência de indivíduos diabéticos à infecções como a tuberculose que são comuns nestes pacientes, já que a resposta Th1 auxilia na ativação da imunidade celular, importante na defesa contra esta e demais bactérias. Assim, a associação de reduzida ativação de células T (relacionada com menor produção de citocinas e menor proliferação) com reduzida expressão de sinais co-estimulatórios, além de estarem profundamente interligados podem explicar porque indivíduos diabéticos são mais susceptíveis à uma série de infecções.

Indivíduos diabéticos apresentam, no início desta doença auto-imune, grande atividade de células T contra antígenos próprios com conseqüente aumento na produção de auto-anticorpos e causando destruição das células β produtoras de insulina. Como no início da doença as células β ainda produzem insulina, podemos considerar que a função dos linfócitos e demais células imunitárias é “normal”, porém após a destruição destas células extingue-se a produção do hormônio e o resultado é um desequilíbrio metabólico geral, inclusive em linfócitos, os quais podem apresentar reduzida atividade, como observado neste estudo através de menor capacidade proliferativa dos mesmos. Podemos supor que AGPI n3 possa ser útil principalmente como forma de prevenção do início da doença, através de sua capacidade em reduzir atividade de linfócitos Th1. De fato, na Groenlândia e na

população de esquimós há baixa incidência de diabetes, sendo estas populações com alto consumo de AGPI n3. Sendo também mostrado que com a incubação de células de insulinoma de ratos com EPA, DHA e ácido- α -linolênico houve prevenção da citotoxicidade induzida por aloxana (DE CATERINA *et al.*, 2007).

A administração de insulina à animais diabéticos suplementados com óleo de peixe e de coco (D/OP/I e D/OC/I, respectivamente) aumentou o índice de proliferação dos linfócitos mesentéricos (FIGURA 16). Provavelmente, isto ocorre em decorrência da melhora na utilização da glicose, incluindo sua melhor captação. Glicose é uma das mais importantes fontes de energia do linfócito, sendo que em linfócitos ativados a maior parte da energia para proliferação é obtida da glicólise. Vias de sinalização incluindo da PI3K e Akt são importantes no tráfico do transportador de glicose GLUT1 utilizado pelos linfócitos para a membrana plasmática, portanto a insulina pode atuar modulando estas vias. Células em repouso não expressam receptores de insulina, porém após sua ativação por mitógenos ou antígenos ocorre uma regulação positiva deste receptor. Assim, modulação de vias de sinalização induzidas por insulina causa aumento na captação da glicose, transporte de aminoácidos, metabolismo lipídico, síntese protéica e ativação da célula T (MACLVER *et al.*, 2008).

Merzouk *et al.* (2008) ao estudar linfócitos obtidos do sangue de pacientes diabéticos tipo 1 encontraram menor proliferação (utilizando ConA) ao incubá-los na presença de EPA e DHA, incluindo diminuição na produção de IL2. Linfócitos de pacientes diabéticos incubados na ausência de AGPI n3 também mostrou reduzida proliferação e produção de IL2. A presença de insulina no meio de incubação resultou em aumento na proliferação sem afetar concentrações de IL2, porém aumentando a de IL4. Incubação de linfócitos T com insulina e AGPI n3, ao mesmo tempo, resultou em efeito aditivo na produção de IL4. Estes mesmos autores mensuraram a captação da glicose (subtraindo a concentração de glicose do meio após 48 horas de cultivo com aquela do meio pré-cultura) e encontraram reduzida captação de glicose por linfócitos diabéticos comparados ao controle. A adição de AGPI n3 não afetou a captação, porém a presença de insulina mais AGPI n3 resultou em captação de glicose igual à do controle em pacientes diabéticos. Em conclusão, eles encontraram que insulina potencializa a proliferação de linfócitos T estimulados por ConA e a produção de IL4, sugerindo que a deficiência de insulina pode ser responsável pela imunossupressão encontrada no diabetes. Ainda, que

AGPI n3 promovem inibição da proliferação de linfócitos T e secreção de IL2, enquanto aumentam à de IL4. Tanto insulina quanto AGPI n3 geram um quadro em favor de Th2. A avaliação da atividade dos mecanismos antioxidantes e da produção de hidroperóxidos, mostraram que AGPI n3 na presença de insulina melhoram o estado oxidante/antioxidante, sendo este considerado um dos principais efeitos benéficos de AGPI n3.

A figura abaixo mostra um resumo dos efeitos de n3 sobre células imunitárias.

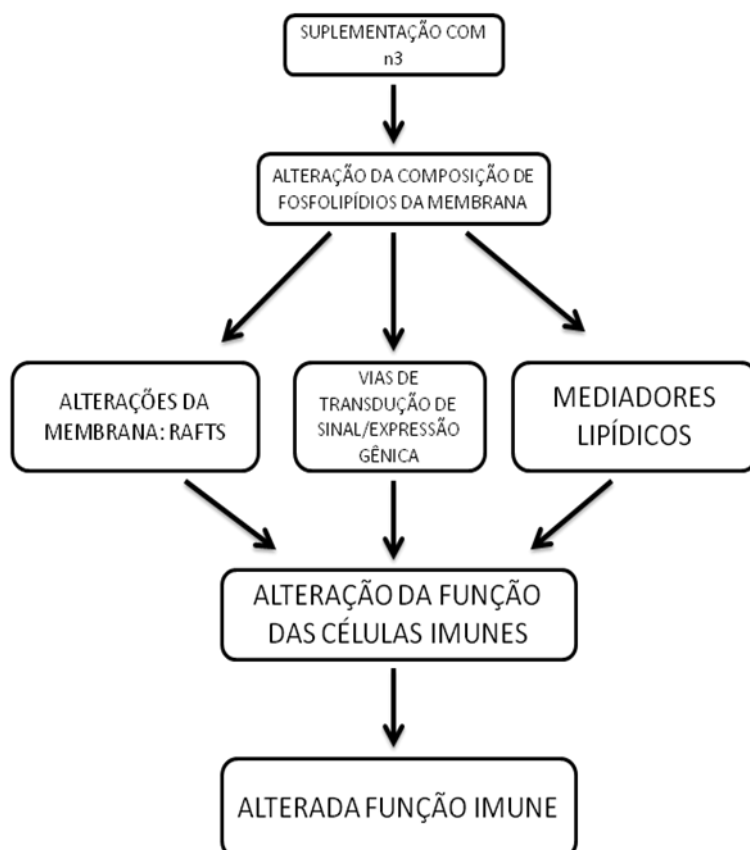


Figura – 21 – Papel dos AGPI n3 sobre as células imunitárias (ADAPTADO DE CALDER, 2007).

7 CONCLUSÃO

Com relação aos parâmetros bioquímicos sanguíneos, o quadro diabético resultou em hiperglicemia e hipertriacilglicerolemia. A suplementação da dieta com gordura de coco provocou hipercolesterolemia em animais não diabéticos. Por outro lado, a suplementação da dieta com óleo de peixe, rico em ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, foi capaz de reduzir a colesterolemia e triacilglicerolemia nos animais diabéticos. A administração de insulina foi capaz de reduzir a glicemia tanto em animais suplementados com óleo de peixe quanto gordura de coco, a colesterolemia e a triacilglicerolemia em animais suplementados com gordura de coco. Assim, pode-se observar que os ácidos graxos ômega-3 exercem um importante papel no controle metabólico, como observado por seus efeitos nos parâmetros de glicemia, colesterolemia e triacilglicerolemia, sendo importante, principalmente para manutenção de concentrações adequadas de glicose e lipídios plasmáticos, principalmente em indivíduos diabéticos.

Em macrófagos obtidos da cavidade peritoneal, a instalação do quadro diabético provocou aumento na fagocitose de zimosan, porém reduziu o volume lisossomal e a produção das espécies reativas de oxigênio (EROS). Gordura de coco foi capaz de reduzir a produção das EROS. Já a suplementação da dieta com óleo de peixe resultou em aumento do volume lisossomal em animais diabéticos, na produção de ânion superóxido em animais não diabéticos e diabéticos e na produção de peróxido de hidrogênio em animais diabéticos. A terapia com insulina reduziu todos os parâmetros avaliados da funcionalidade dos macrófagos peritoneais, tanto em animais suplementados com óleo de peixe quanto gordura de coco.

Em neutrófilos sanguíneos, o quadro diabético promoveu aumento no volume lisossomal e redução na produção de peróxido de hidrogênio. Gordura de coco reduziu ao volume lisossomal em animais não diabéticos. Enquanto o óleo de peixe foi capaz de aumentar a fagocitose de zimosan e o volume lisossomal de animais não diabéticos e diabéticos e de aumentar a produção de peróxido de hidrogênio em animais diabéticos. A administração de insulina somente aumentou a produção de peróxido de hidrogênio em animais suplementados com gordura de coco.

Com relação à imunidade inata, os ácidos graxos ômega-3 desenvolveram importante papel na melhora das capacidades fagocíticas e retenção lisossomal,

bem como produção de EROS, podendo resultar ao animal diabético melhor defesa contra possíveis infecções, já que pode acarretar maior fagocitose, com posterior retenção do material em vesículas de secreção e ataque do material englobado por maior produção de espécies reativas capazes de degradá-lo.

O índice de proliferação de linfócitos mesentéricos foi reduzido em animais diabéticos e não diabéticos suplementados com óleo de peixe e gordura de coco. A terapia com insulina foi capaz de aumentar a proliferação dos linfócitos de animais suplementados com óleo de peixe e gordura de coco. A redução da proliferação linfocitária em indivíduos diabéticos poderia reduzir o ataque auto-imune às ilhotas de Langerhans produtoras de insulina, o que retardaria o início de doença auto-imune. Logo, o consumo de ácidos graxos ômega-3 poderia auxiliar na prevenção de doença auto-imune, particularmente a diabetes tipo 1.

Nossos dados mostram que AGPI n3 pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares e melhorar alguns parâmetros funcionais das células imunitárias em indivíduos diabéticos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. *Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico*. Elsevier, 2007.
- ABOU-SEIF, M. A.; YOUSSEF, A.-A. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 346, p. 161-170, 2004.
- ALBA-LOUREIRO, T. C.; HIRABARA, S. M.; MENDONÇA, J. R.; CURI, R.; PITHON-CURI, T. C. Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophil. **Journal of Endocrinology**, v. 188, p. 295-303, 2006.
- ALBA-LOUREIRO, T. C.; MUNHOZ, C. D.; MARTINS, J. O.; CERCHIARO, C. A.; SCAVONE, C.; CURI, R.; SANNOMIYA, P. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 1037-1044, 2007.
- ALEXIEWICZ, J. M.; KUMAR, D.; SMOGORZEWSKI, M. et al: Polymorphonuclear leukocytes in non-insulin-dependent diabetes mellitus: Abnormalities in metabolism and function. **Annals of Internal Medicine**, v. 123, p. 919-924, 1995.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). The Expert Committee on the diagnosis and classification of Diabetes *mellitus*. **Diabetes Care**, v. 25, p. 5-20, 2002.
- ANDRADE, P. M. M.; CARMO, M. G. T. Ácidos graxos n3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. **MN-Metabólica**, v. 8, n. 3, p. 135-143, 2006.
- ANGELINI, F.; DEL DUCA, E.; PICCININI, S.; PACCIANI, V.; ROSSI, P.; BITTI, M. L. M. Altered phenotype and function of dendritic cells in children with type 1 diabetes. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 142, p. 341-346, 2005.
- APPELBERG, R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. **TRENDS in Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 87-92, 2006.
- ARMAH, C. K.; JACKSON, K. G.; DOMAN, I.; JAMES, L.; CHEGHANI, F.; MINIHANE, A. M. Fish oil fatty acids improve postprandial vascular reactivity in healthy men. **Clinical Science**, v. 114, p. 679-686, 2008.
- ATKINSON, M. A; EISENBARTH, G. S. Type 1 Diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet**, v. 358, p. 221-229, 2001.
- BABIOR, B. M.; LAMBETH, J. D.; NAUSEEF, W. The neutrophil NADPH oxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 397, n. 2, p. 342-344, 2002.
- BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, p. 42-47, 2004.

BALK, E. M.; LICHTENSTEIN, A. H.; CHUNG, M.; KUPELNICK, B.; CHEW, P.; LAU, J. Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review. **Atherosclerosis**, v. 189, p. 19-30, 2006.

BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications. **Diabetes**, v. 48, p. 1-9, 1999.

BEDARD, K.; KRAUSE, K. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. **Physiological Review**, v. 87, p. 245-313, 2007.

BENATTI, P.; PELUSO, G.; NICOLAI, R.; CALVANI, M. Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 4, p. 281-302, 2004.

BERTON, G.; MÓCSAI, A.; LOWELL, C. A. Src and Syk kinases: key regulators of phagocytic cell activation. **TRENDS in Immunology**, v. 26, n. 4, p. 208-214, 2005.

BEYAN, H.; GOODIER, M. R.; NAWROLY, N. S.; HAWA, M. I.; BUSTIN, S. A.; OGUNKOLADE, W. B.; LONDEI, M.; YOUSAF, N.; LESLIE, D. G. Altered monocyte cyclooxygenase response to lipopolysaccharide in type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 55, p. 3439-3445, 2006.

BONATTO, S. J. R. et al. Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cellular Immunology**, v.231, p.56-62, 2004.

BOURRE, J. M. Dietary omega-3 fatty acids for women. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 61, p. 105-112, 2007.

BRESSON, D; VON HERRATH, M. Mechanisms underlying type 1 diabetes. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 1, n. 3, p. 321-327, 2004.

BROWNING L.; M. n3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation and obesity-related disease. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, p. 447-453, 2003.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p. 813-820, 2001.

BUCHANAN, T.A.; XIANG, A. H. Gestational diabetes mellitus. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 3, p. 485-491, 2005.

BØYUM, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. **Scandinavian Journal of Immunology**, suppl. 5, p. 9-15, 1976.

CALDER, P. C.; BOND, J. A.; HARVEY, D. J.; GORDON, S.; NEWSHOLME, E. A. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids in macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. **Biochemistry Journal**, v. 269, p. 807-814, 1990.

- CALDER, P. C. Dietary modification of inflammation with lipids. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 61, p. 345-358, 2002.
- CALDER, P. C.; YAQOUB, P.; THIES, F.; WALLACE, F. A.; MILES, E. A. Fatty acids and lymphocyte functions. **British Journal of Nutrition**, v. 87, p. 31-48, 2002.
- CALDER, P. C.; KEW, S. The immune system: a target for functional foods. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 165-176, 2002.
- CALDER, P. C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. **Prostaglandines, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 77, p. 327-335, 2007.
- CALDER, P. C. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. **Prostaglandines, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 79, p. 101-108, 2008.
- CARVALHEIRA J. B. C.; ZECCHIN. H. G.; M. J. A. SAAD. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiros de Metabologia e Endocrinologia**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.
- CASTILLO, M.; AMALIK, F.; LINARES, A.; PEREGRÍN-GARCÍA, E. FISH OIL REDUCES CHOLESTEROL AND ARACHIDONIC ACID LEVELS IN PLASMA AND LIPOPROTEINS FROM HYPERCHOLESTEROLEMIC CHICKS. MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY, V. 210, P. 212-130, 2001.**
- CASTRO, L. C. V.; FRANCESCHINI, S. C. C.; PRIORE, S. E.; PELUZIO, M. C. G. Nutrição e doenças cardiovasculares: os marcadores de risco em adultos. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 3, p. 369-377, 2004.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. Bioquímica Ilustrada. **Artmed**, 3 ed.; 2006.
- CHAN, D. C.; WATTS, G. F.; MORI, T. A.; BARRETT, P. H.; REDGRAVE, T. G.; BEILIN, L. J. Randomized controlled trial of the effect of n-3 fatty acid supplementation on the metabolism of the apolipoprotein B-100 and chylomicron remnants in men with visceral obesity. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, p. 300-307, 2003.
- CHONG-JEH LO. Upregulation of Cyclooxygenase-II gene and PGE2 production of peritoneal macrophages in diabetic rats. **Journal of Surgical Research**, v. 125, p. 121-127, 2005.
- CLARKE S. D. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. **British Journal of Nutrition**, v. 83, Suppl. 1, p. S59–S66, 2000.
- CORCORAN M. P.; LAMON-FAVA S.; FIELDING R. A. Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance: effect of dietary fatty acids and exercise. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, p. 662-77, 2007.

CUKIER, C. WAITZBERG, D. L.; LOGULLO, A. F.; BACCHI, C. E.; TRAVASSOS, V. H.; TORRINHAS, R. S. M.; SOARES, S. R. C.; SALDIVA, P. H.; OLIVEIRA, T. S.; HEYMSFIELD, S. Lipid and lipid-free total parenteral nutrition: differential effects on macrophage phagocytosis in rats. **Nutrition**, v. 15, p. 885-889, 1999.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; MOHANTY, P.; GHANIM, H.; HAMOUDA, W.; ASSIAN, E.; AHMAD, S. Insulin inhibits intranuclear factor κ B and stimulates I κ B in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effects? **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 7, p. 3257-3265, 2001.

DAS, U. N. Beneficial effects of n3 fatty acids in cardiovascular diseases: but, why and how? **Prostaglandines, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 63, n. 6, p. 351-362, 2000.

DAS, U. N. Essential fatty acids as possible mediators of the actions of statins. **Prostaglandines, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 65, p. 37-40, 2001

DE CATERINA, R.; MADONNA, R.; BERTOLOTTO, A.; SCHMIDT, E. R. N3 fatty acids in the treatment of diabetics patients. **Diabetes Care**, v. 30, n. 4, p. 1012-1026, 2007.

DE NARDI, L.; BELLINATI-PIRES, R.; TORRINHAS, R. S.; BACCHI, C. E. ARIAS, V.; WAITZBERG, V. L. Effect of fish oil containing parenteral lipid emulsions on neutrophil chemotaxis and resident-macrophages phagocytosis in rats. **Clinical Nutrition**, v. 27, p. 283-288, 2008.

DE WITT, D. E; HIRSCH, I. B. Outpatient Insulin Therapy in Type 1 and Type 2 Diabetes. **The Journal of The American Medical Association**, v. 289, n. 17, p. 2254-2264, 2003.

DEFILIPPIS, A. P.; SPERLING, L. S. Understanding omega-3's. **American Heart Journal**, v. 151, p. 564-570, 2006.

DELFINO, V. D. A.; FIGUEIREDO, J. F.; MATSUO, T.; FAVERO, M. E.; MATNI, A. M.; MOCELIN, A. J. Diabetes *mellitus* induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 24, n. 1, p. 31-36, 2002.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The Immune System. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 1, p. 37-50, 2000.

DENYS, A.; HICHAMI, A.; KHAN, N. A. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid modulate MAP kinase enzyme activity in human T-cells. **Molecular Cell Biochemistry**, v. 232, p. 1374-1377, 2002.

DEVENDRA, D; LIU, E.; EISENBARTH, G. S. Type 1 Diabetes: recent developments. **The British Medical Journal**, v. 328, p. 750-754, 2004.

DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL (DCCT). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 14, p. 977-986, 1993.

DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL (DCCT). Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 25, p. 2643-2653, 2005.

EIBL, N.; SPATZ, M.; FISCHER, G. F.; MAYR, W. R.; SAMSTAG, A.; WOLF, H. M.; SCHERNTHANER, G.; EIBL, M. Impaired Primary Immune Response in Type-1 Diabetes: Results from a Controlled Vaccination Study. **Clinical Immunology**, v. 103, p. 249-259, 2002.

ESLICK, G. D.; HOWE, P. R. C.; SMITH, C.; PRIEST, R.; BENSOUSSAN, A. Benefits of fish oil supplementation in hyperlipidemia: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Cardiology**, p. 1-13, 2008.

FOLADOR, A. HIRABARA, S. M.; BONATTO, S. J. R.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R. K.; CURI, R.; FERNANDES, L. C. Effect of fish oil supplementation for 2 generations on changes in macrophage function induced by Walker 256 cancer cachexia in rats. **International Journal of Cancer**, v. 120, p. 344-350, 2006.

FRITSCHKE, K. Fatty acids as modulators of the immune response. **Annual Reviews of Nutrition**, v. 26, p. 45-73, 2006.

GALLEN, I. The evolution of insulin treatment in type 1 diabetes: the advent of analogues. **The British Journal of Diabetes and Vascular Disease**, v. 4, p. 378-381, 2004.

GARCÍA-PELAYO, M. C.; GARCÍA-PEREGRÍN, E.; MARTÍNEZ-CAYUELA, M. Differential translational effects of myristic acid and eicosapentaenoic acid on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase from Reuber H35 hepatoma cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, p. 781-786, 2004.

GAULTON, G. N.; SCHWARTZ, J. L.; EARDLEY, D. D. Assessment of the diabetogenic drugs alloxan and streptozotocin as models for the study of immune defects in diabetic mice. **Diabetologia**, v. 28, p. 769-775, 1985.

GENNERY, A. R.; CANT, A. J. Applied physiology: immune competence. **Current Paediatrics**, v.16, p. 447-452, 2006.

GIANANI, R; EISENBARTH, G. S. The Stages of Type 1A Diabetes: 2005. **Immunological Reviews**, v.204, p. 232-249, 2005.

GILMAN, A. G. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. **The McGraw-Hill Companies**, 10.ed, p. 1263-1290, Rio de Janeiro, 2003.

GILLESPIE, K. M. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. **Canadian Medical Association Journal**, v. 175, n. 2, p. 165-170, 2006.

GIUGLIANO D.; CERIELLO A.; ESPOSITO K. The effects of diet on inflammation. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 48, n. 4, p. 677-85, 2006.

GLAUBER, H.; WALLACE, P.; GRIVER, K.; BRECHTEL, G. Adverse metabolic effect of omega-3 fatty acids in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Annals of Internal Medicine**, v. 108, p. 663-668, 1988.

GORJÃO, R.; VERLENGIA, R.; LIMA, T. M.; SORIANO, F. G.; BOAVENTURA, M. F. C.; KANUNFRE, C. C.; PERES, C. M.; SAMPAIO, S. C.; OTTON, R.; FOLADOR, A.; MARTINS, E. F.; CURI, T. C. P.; PORTIOLLI, E. P.; NEWSHOLME, P.; CURI, R. Effect of docosahexaenoic acid-rich fish oil supplementation on human leukocyte function. **Clinical Nutrition**, v. 25, p. 923-938, 2006.

GORJÃO, R.; CURY-BOAVENTURA, M. F.; LIMA, T. M.; CURI, R. Regulation of human lymphocyte proliferation by fatty acids. **Cell Biochemistry and Function**, v. 25, p. 305-315, 2007.

GROENEVELD, A. B. J.; BEISHUIZEN, A.; VISSER, F. C. Insulin: a wonder drug in the critically ill? **Critical Care**, v. 6, n. 2, p. 102-105, 2002.

GRUNDY, M. M.; MOORE, M. N.; HOWELL, S. M.; RATCLIFFE, N. A. Phagocytic reduction and effects on lysosomal membranes by polycyclic aromatic hydrocarbons, in haemocytes of *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology**, v. 34, p. 273-290, 1996.

GUPTA, S.; KOIRALA, J.; KHANDORI, R.; KHANDORI, N. Infections in Diabetes Mellitus and hyperglycemia. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 21, p. 617-638, 2007.

HABER E. P.; CURI R.; CARVALHO C. R. O.; CARPINELLI A. R. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Metabologia e Endocrinologia**, v. 45, n. 3, p. 219-227, 2001.

HARRIS, W. S. N-3 fatty acids and human lipoproteins metabolism: an update. **Lipids**, v. 34, p. 257-258, 1999.

HAYEK, T.; KAPLAN, M.; KERRY, R.; AVIRAM, M. Macrophage NADPH activation, impaired cholesterol fluxes, and increased cholesterol biosynthesis in diabetic mice: a stimulatory role for D-glucose. **Atherosclerosis**, v. 195, p. 277-286, 2007.

HOMANN, D; EISENBARTH, G. S. An Immunologic Homunculus for Type 1 Diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 5, p. 1212-1215, 2006.

HIL, C. S.; HUANG, Z. H.; BILNEY, A.; COSTABILE, M.; MURRAY, A. W.; RATHJEN, D. A.; DER, C. J.; FERRANTE, A. Stimulation of p38 phosphorylation and activity by arachidonic acid in HeLa cells, HL60 promyelocytic leukemic cells, and human neutrophils. Evidence for cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 19277-19282, 1998.

HIRSCH, I. B. Insulin Analogues. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 174-183, 2005.

HUIJBERTS, M. S. P.; SCHAPER, N. C.; SCHALKWIJK, C. G. Advanced glycation end products and diabetic foot disease. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 24, p. 19-24, 2008.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes atlas. Disponível em: <<http://www.eatlas.idf.org>> acesso em: 23 dez. 2008.

JAIN, S. K.; RAINS, J. L.; CROAD, J. L. Effect of chromium niacinate and chromium picolinate supplementation on lipid peroxidation, TNF- α , IL-6, CRP, glycated hemoglobin, triglycerides and cholesterol levels in blood of streptozotocin-treated diabetic rats. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, p. 1124-1131, 2007.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P. ; WALPORT, M.; CAPRA, J. D. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul. 2007.

JAY, D.; HITOMI, H.; GRIENDLING, K. K. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, p. 183-192, 2006.

JUNOD, A.; LAMBERT, A. E.; STAUFFACHER, W.; RENOLD, A. E. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 48, p. 2129-2139, 1969.

KELLEY, D. S. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. **Nutrition**, v. 17, p. 669-673, 2001.

KHAN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, p. 840-846, 2006.

KINCHEN, J. M.; RAVICHANDRAN, K. S. Phagosome maturation: going through the acid test. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 781-795, 2008.

KREISBERG, R. A. Diabetic Dyslipidemia. **American Journal of Cardiology**, v. 82, p. 67-73, 1998.

LAROSA, D. F.; ORANGE, J. S. Lymphocytes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, p. 364-369, 2008.

LEE, W. R.; HARRISON, R. E.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1299-1306, 2003.

LEE, H. B.; YU, M.; YANG, Y.; JIANG, Z.; HA, H. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, p. 241-245, 2003.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, p. 216-226, 2008.

LICASTRO, F.; DAVIS, L. J.; MORINI, M. C. Lectins and superantigens: membrane interaction of these compounds with T lymphocytes affect immune responses. **International Journal of Biochemistry**, v. 25, n. 6, p. 845-852, 1993.

LIMA, T.; GORJÃO, R.; HATANAKA, E.; CURY-BOAVENTURA, M. F.; SILVA, E. P. P.; PROCOPIO, J.; CURI, R. Mechanisms by which fatty acids regulate leukocyte function. **Clinical Science**, v. 113, p. 65-77, 2007.

LIU, C.; PHIL, D.; CHEN, K.; LEE, S.; TSAI, L. Effect of supplemental l-arginine on the function of T lymphocytes and the formation of advanced glycosylated end products in rats with streptozotocin-diabetes induced. **Nutrition**, v. 21, p. 615-623, 2005.

LOMBARDO Y. B; CHICCO A. G. Effects of dietary polyunsaturated n3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodentes and humans. A review. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, p.1-13, 2006.

LOPES-VIRELLA, M.F., WHITMANN, H.J., MAYFIELD, P.K., LOADHOTT, C.B., COLWELL, J.A., 1983. Effect of metabolic control on lipid, lipoprotein and apolipoprotein levels in 55 insulin-dependent diabetic patients: a longitudinal study. **Diabetes**, v. 32, p. 20–25, 1983.

LOTTENBERG, A. M. P. Características da dieta nas diferentes fases da evolução do diabetes melito tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 2, p. 250-259, 2008.

MADHAVI, N., DAS, V. N. Effects of n-3 and n-6 fatty acids on the survival of vineristine sensitive and resistant human cervical carcinoma cells, in vitro. **Cancer Letters**, v.84, p.31-41, 1994.

MACLVER, N. J.; JACOBS, S. R.; WIEMAN, H. L.; WOFFORD, J. A.; COLOFF, J. L.; RATHMELL, J. C. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, p. 948-957, 2008.

MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS, J. B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology**, v. 17, p. 24-38, 2003.

MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos Graxos Poliinsaturados ômega 3 e ômega 6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19, n, 6, p. 761-770, 2006.

MARTINS, J. O.; FERRACINI, M.; RAVANELLI, N.; LANDGRAF, R. G.; JANCAR, S. Insulin inhibits LPS-induced signaling pathways in alveolar macrophages. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 21, p. 297-304, 2008.

MARTÍN-GALLÁN, P.; CARRASCOSA, A.; GUSSINYÉ, M.; DOMÍNGUEZ, C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young

diabetic patients with or without subclinical complications. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 12, p. 1563-1574, 2003.

MASUDA, M.; MURAKAMI, T.; EGAWA, H.; MURATA, K. Decreased fluidity of polymorphonuclear leukocyte membrane in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes**, v. 39, p. 466-470, 1990.

MCMANUS, L. M.; BLOODWORTH, R. C.; PRIHODA, T. J.; BLODGETT, J. L.; PINCKARD, R. N. Agonist-dependent failure of neutrophil function in diabetes correlates with extent of hyperglycemia. **Journal of leukocyte biology**, v. 70, p. 395-404, 2001.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Jr. Innate immunity. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 5, p. 338-344, 2000.

MERZOUK, S. A.; SAKER, M.; REGUIG, K. B.; SOULIMANE, N.; MERZOUK, H.; GUERMOUCHE, B.; BERROUIGUET, A. Y.; HICHAMI, A.; NARCE, M.; KHAN, N. A. n3 polyunsaturated fatty acids modulate in vitro T cell function in type 1 diabetic patients. **Lipids**, v. 43, p. 485-497, 2008.

MOORADIAN, A. D; BERNBAUM, M; ALBERT, S. G. Narrative Review: A Rational Approach to starting Insulin Therapy. **Annals of Internal Medicine**, v.145, p. 125-134, 2006.

MORAES, T. J.; DOWNEY, G. P. Neutrophil cell signaling in infection: role of phosphatidylinositide -3- kinase. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1293-1298, 2003.

MULLER, L. M. A. J.; GORTER, K. J.; HAK, E.; GOUDZWAARD, W. L.; SCHELLEVIS, F. G.; HOPELMAN, A. I. M.; RUTTEN, G. E. H. M. Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes. **Diabetes and Increased Risk of Infections**, v. 41, p. 281-288, 2005.

MUSTAD, V. A.; ETHERTON, T. D.; COOPER, A. D.; MASTRO, A. M.; PEARSON, T. A.; JONNALAGRADDA, S. S.; KRIS-ETHERTON, P. M. Reducing saturated fat intake is associated with increased levels of LDL receptors on mononuclear cells in healthy men and women. **Journal of Lipid Research**, v. 38, p. 459-468, 1997.

NARENDRAN, P. ; ESTELLA, E. ; FOURLANOS, S.;. Immunology of Type 1 Diabetes. **QJM: International Journal of Medicine**, v. 98, p. 547-556, 2005.

NERVI, S., ATLAN-GEPNER, C., FOSSAT, C., AND VIALETTES, B. Constitutive impaired TCR/CD3-mediated activation of T cells in IDDM patients coexist with normal co-stimulation pathways. **Journal of Autoimmunity**, v. 13, p. 247–255, 1999.

NICOLLS, M. R.; HASKINS, K.; FLORES, S. C. Oxidative stress, immune dysregulation, and vascular function in type 1 diabetes. **Antioxidant and Redox Signaling**, v. 9, p. 879-889, 2007.

NIEDERGANG, F.; CHAVRIER, P. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagosome. **Current opinion in cell biology**, v. 16, p. 422-428, 2004.

NORRIS, J. M. et al. Omega 3 polyunsaturated fatty acid intake and islet autoimmunity in children at increased risk for type 1 diabetes. **Journal of the American Medical Association**, v. 298, n. 12, p. 1420-1428, 2007.

NOTKINS, A. L.; LERNMARK, A.; Autoimmune Type 1 Diabetes: resolved and unresolved issues. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, p. 1247-1252, 2001.

NURJHAN, N.; CONSOLI, A.; GERICH, J. Increased lipolysis and its consequences on gluconeogenesis in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of Clinical Investigation**, v. 89, p. 169-175, 1992.

RENARD, C; OBERGHEN, E. V. Role of diabetes in atherosclerotic pathogenesis. What have we learned from animal models? **Diabetes Metabolism**, v. 32, p. 15-29, 2006.

OH, R. Practical applications of fish oil (omega 3 fatty acids) in primary care. **The Journal of the American Board of Family Practice**, v. 18, p. 28-36, 2005.

OMORI, K.; OHIRA, T.; UCHIDA, Y.; AYILAVARAPU, S.; BATISTA, E. L.; YAGI, M.; IWATA, T.; LIU, H.; HASTURK, H.; KANTARCI, A.; DYKE, T. E. V. Priming of neutrophil oxidative burst in diabetes requires preassembly of the NADPH oxidase. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, p. 292-303, 2008.

OTTON, R.; MENDONÇA, J. R.; CURI, R. Diabetes causes marked changes in lymphocyte metabolism. **Journal of Endocrinology**, v. 174, p. 55-61, 2002.

OTTON, R.; SORIANO, F. G.; VERLENGIA, R.; CURI, R. Diabetes induces apoptosis in lymphocytes. **Journal of Endocrinology**, v. 182, p. 145-156, 2004.

PARHOFER, K. G.; BARRETT, P. H. R. What we have learned about VLDL and LDL metabolism from human kinetics studies. **Journal of Lipid Research**, v. 47, p. 1620-1630, 2006.

PICK, E.; MIZEL, M. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Methods**, **46**: 211-226, 1981.

PICKUP, J. C; CROOK, M. A. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? **Diabetologia**, v. 41, p. 1241-1248, 1998.

PIPE, R. K.; COLES, J. A.; FARLEY, S. R. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. Techniques in Fish **Immunology**. v. 4, p.93-100, 1995.

POLONSKY, K. S. Retinol-binding protein 4, insulin resistance and type 2 diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 24, p. 2596-2597, 2006.

POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C. K.; SANNOMIYA, P.; LOPES, L. R.; PROCÓPIO, J.; CURI, R. Effect of fatty acids on leukocyte function. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 1255-1268, 2000.

PUHAKAINEN, I.; AHOLA, I.; YKI-JARVINEN. Dietary supplementation with n-3 fatty acids increases gluconeogenesis from glycerol but not hepatic glucose production in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, p. 121-126, 1995.

RAVI, K.; RAJASEKARAN, S.; SUBRAMANIAN, S. Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 1433-1439, 2005.

REES, D. A.; ALCOLADO, J. C. Animal models of diabetes *mellitus*. **Diabetic Medicine**, v. 22, p. 359-370, 2005.

RIBEIRO, S. M. R.; QUIEROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, p. 133-149, 2005.

RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, C. A. M.; MELLO, M. A. R. Exercício e prevenção do diabetes *mellitus*: importância do modelo experimental utilizando ratos. **Motriz**, v. 13, n. 1, p. 72-77, 2007.

ROCHE, H. M. Dietary carbohydrates and triacylglycerol metabolism. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 58, p. 201-207, 1999.

ROITT, I. M.; DELVES, P. J. Roitt's essential immunology. **Blackwell Science**, 10th ed. 2000.

ROLO, A. P., PALMEIRA, C. M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 212, p. 167-178, 2006.

SAIEPOUR, D.; SEHLIN, J.; OLDENBORG, P.-A. Insulin inhibits phagocytosis in normal humans neutrophils via PKC α/β -dependent priming of F-actin assembly. **Inflammation Research**, v. 55, p. 85-91, 2006.

SAKER, K. E. Nutrition and immune function. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 36, p. 1199-1224, 2006.

SAN JOSÉ, G.; BIDEGAIN, J.; ROBADOR, P. A.; DÍEZ, J.; FORTUÑO, A.; ZALBA, G. Insulin-induced NADPH-oxidase activation promotes proliferation and matrix metalloproteinase activation in monocytes/macrophages. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, p. 1058-1067, 2009.

SAKOWICZ-BURKIEWICZ, M.; KOCBUCH, K.; GRDEN, M.; SZUTOWICZ, A.; PAWELCZYK, T. Diabetes-induced decrease of adenosine kinase expression impairs the proliferation potential of diabetic rat T lymphocytes. **Immunology**, v. 118, p. 402-412, 2006.

SCHECTMAN, G.; KAUL, S.; KISSEBAH, A. H. Effect of fish oil concentrate on lipoprotein composition in NIDDM. **Diabetes**, v. 37, p. 1567-1573, 1988.

SCHONFELD, P.; WOJTCZAK, L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, p. 231-241, 2008.

SCOTT, C. C.; BOTELHO, R. J.; GRINSTEIN, S. Phagosome maturation: a few bugs in the system. **The Journal of Membrane Biology**, v. 193, p. 137-152, 2003.
Strzelecka-Kiliszek, A.; Kwiatkowska, K.; Sobota, A. LYN AND SYK KINASES ARE SEQUENTIALLY ENGAGED IN PHAGOCYTOSIS MEDIATED BY FC γ R. THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, V. 169, P. 6787-6794, 2002.

SHAIKH, S. R.; EDIDIN, M. Polyunsaturated fatty acids, membrane organization, T cell antigen presentation. **Clinical Nutrition**, v. 84, p. 1277-1289, 2006.

SIJBEN, J. W. C.; CALDER, P. C. Differential immunomodulation with long-chain n-3 PUFA in health and chronic disease. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 66, p. 237-259, 2007.

SPATZ, M.; EIBL, N.; HINK, S.; WOLF, H. M.; FISCHER, G. F.; MAYR, W. R.; SCHERNTHANER, G.; EIBL, M. M. Impaired primary immune response in type-1 diabetes. Functional impairment at the level of APCs and T-cells. **Cellular Immunology**, v. 221, p. 15-26, 2003.

SIMOPOULOS, A. P. Ω 3 fatty acids in health and disease and in growth and development. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, p. 438-463, 1991.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of ω 6/ ω 3 essential fatty acids. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 56, p. 365-379, 2002.

SIRTORI, C. R.; CREPALDI, G.; MANZATO, E.; MANCINI, M.; RIVELLESE, A.; PAOLETTI, R.; PAZZUCCONI, F.; PAMPARANA, F.; STRAGLIOTTO, E. One year treatment with ethyl esters of n3 fatty acids in patients with hypertriglyceridemia, total cholesterol and increased HDL-C without glycemical alterations. **Atherosclerosis**, v. 137, p. 419-427, 1998.

SMITH, W. L. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. **Biochemistry Journal**, v. 259, p. 315-324, 1989.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Tratamento e acompanhamento do *Diabetes mellitus*. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2006.

STUART, L. M.; EZEKOWITZ, R. A. B. Phagocytosis: elegant complexity. **Immunity**, v. 22, p. 539-550, 2005.

SURETTE, M. E. The science behind dietary omega 3 fatty acids. **Canadian Medical Association Journal**, v. 178, n. 2, p. 177-180, 2008.

SWEENEY, B.; PURI, P.; REEN, D. J. Modulation of the immune cell function by polyunsaturated fatty acids. **Pediatric Surgical International**, v. 21, p. 335-340, 2005.

SZKULDESKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, v. 50, p. 536-546, 2001.

TREBBLE, T. M.; WOOTTON, S. A.; MILES, E. A.; MULLEE, M.; ARDEN, N. K.; BALLINGER, A. B.; STROUD, M. A.; BURDGE, G. C.; CALDER, P. C. Prostaglandin E₂ production and T cell function after fish oil supplementation: response to antioxidant cosupplementation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, p. 376-382, 2003.

UNDERHILL, D. M.; ROSSNAGLE, E.; LOWELL, C. A.; SIMMONS, R. M. Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. **Blood**, v. 106, p. 2543-2550, 2005.

VON HERRATH, M.; SANDA, S.; HEROLD, K. Type 1 Diabetes as a relapsing-remitting disease? **Nature**, v. 7, p. 988-994, 2007.

WALRAND, S.; GUILLET, C.; BOIRIE, Y.; VASSON, M. P. *In vivo* evidences that insulin regulates human polymorphonuclear neutrophil functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, p. 1104-1110, 2004.

WAUTIER, J.; SCHIMIDT, M. A. Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. **Circulation Research**, v. 95, p. 233-238, 2004.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

WONG, S. H.; NESTEL, P. J.; TRIMBLE, R. P.; STORER, G. B.; ILLMAN, R. J.; TOPPING, D. L. The adaptative effects of dietary fish and safflower oil on lipid and lipoprotein metabolism in perfused rat liver. **Biochemical Biophysical Acta**, v. 792, p. 103-109, 1984.

YAMASHIRO, S.; KAWAKAMI, K.; UEZU, K.; KINJO, T.; MIYAGI, K.; NAKAMURA, K.; SAITO, A. Lower expression of Th1 related cytokines and inducible nitric oxide synthase in mice with streptozotocin-induced diabetes mellitus infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 139, p. 57-64, 2005.

YAMAZAKI, R. K.; HIRABARA, S. M.; TCHAIKOVSKI, O.; LOPES, M. C. P.; NOGATA, C.; AIKAWA, J.; NUNES, E. A.; TANHOFFER, R. A.; LISSA, M. D.; FERNANDES, L. C. The effects of peroxovanadate and peroxovanadyl on glucose

metabolism *in vivo* and identification of signal transduction proteins involved in the mechanism of action in isolated soleus muscle. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 273, p. 145-150, 2005.

YAMAZAKI, R. K.; SHEN, T.; SCHADE, G. B. A diet rich in omega -3 fatty acids increases peroxisomal β -oxidation activity and lowers plasma triacylglycerols without inhibiting glutathione-dependent detoxification activities in the rat liver. **Biochemical Biophysical Acta**, v. 920, p. 62-67, 1987.

YEUNG, T.; OZDAMAR, B.; PAROUTIS, P. GRINSTEIN, S. Lipid metabolism and dynamics during phagocytosis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 18, p. 429-437, 2006.

ZAMBON, A.; AUSTIN, M. A.; BROWN, B. G.; HOKANSON, J. E.; BRUNZELL, J. D. Effect of hepatic lipase on LDL in normal men and those with coronary artery disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 13, p. 147-153, 1993.

ZATSICK, N. M.; MAYKET, P. Fish oil: getting to the heart of it. **The Journal for nurse practitioners**, v. 3, p. 104-109, 2007.

ZHANG, M.; FRITSCHKE, K. L. Fatty acid-mediated inhibition of IL12 production by murine macrophage is independent of PPAR- γ . **British Journal of Nutrition**, v. 91, p. 733-739, 2004.

ZIMMET, P; ALBERTI, K. G. M. M; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, p. 782-787, 2001.

ANEXO



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 330

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.035308/2008-63

APROVADO:

09/09/2008 – R.O. 08/2008

TÍTULO:

Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre parâmetros bioquímicos e sua ação imunomoduladora em ratos diabéticos

AUTORES:

Luiz Claudio Fernandes, Danielle Cristina Tonello Pequito,
Jaisson Bordignon, Fabíola Iagher, Marcelo Kryczyk, Isabela Coelho

DEPARTAMENTO: Fisiologia

Prof.ª Dr.ª Ana Maria C. Filadelfi
Coordenadora do CEEA