

ANDRESSA FRANZÓI MACHADO

ESTABELECIMENTO DE MODELO ANIMAL DE DIABETES TIPO II
Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a sensibilidade e
responsividade à insulina



CURITIBA

2008

ANDRESSA FRANZÓI MACHADO

**ESTABELECIMENTO DE MODELO ANIMAL DE DIABETES TIPO II.
Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a sensibilidade e
responsividade à insulina**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes.

CURITIBA

2008

**Aos meus pais pela confiança,
motivação e amor**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a meus pais pelo amor incondicional, por aceitar, apoiar e confiar nas minhas escolhas, mesmo não concordando tanto assim com elas, por nunca deixar de estar ao meu lado, pelos conselhos, por abdicar seus sonhos e minha a presença pra dar vida aos meus sonhos. Sem vocês eu nunca teria chegado até aqui, vocês são o alicerce da minha vida! Amo vocês!!

À toda a minha família, especialmente a minha vó Julieta que sempre perguntava como estava meus estudos, mesmo sem entender o que eu fazia, mas sempre me motivando e ao meu irmão Hálisson, pois sei exatamente que sua dedicação também contribuiu para minha formação, obrigada mesmo!

Ao meu chefe, Luiz Cláudio, pela orientação, por me aceitar no seu laboratório, sem nenhuma referência, por simplesmente acreditar que as pessoas são capazes de aprender e por dar essa chance a todos, agarre-a quem quiser e puder. Obrigada pelo maravilhoso ambiente de trabalho, por ensinar o que é um trabalho em equipe, pois não sei se algum dia encontrarei um lugar de trabalho tão bom quanto o “lab”, e se este é assim, com certeza é mérito seu que sabe cultivar e cuidar muito bem dele. Ah, e obrigada por me ajudar nos meus experimentos sempre que precisei.

À todos amigos que fiz no “lab”: Ana, Carina, Carine, César, Dalton. Dani Pequito, Diogo, Everson, Fabíola, Fernanda, Gleisson, Isabela, Jaisson, Kátia, Loli, Luciana, Luis Alexandre, Marcelo, Rica, Sandro, Sérgio, Paulo, Pedro. Obrigada por me auxiliar sempre e pelo agradável convívio todos os dias.

À Carine por ter me recebido no laboratório, pela paciência em me ensinar técnicas, pela conversas, pelo apoio, pelos puxões de orelha sempre que necessários, por me ajudar e ensinar a cuidar dos ratinhos, pela ajuda nos experimentos. Você sabe o quanto foi importante nessa etapa da minha vida! Obrigada.

Ao Gleisson e ao Rica pela ajuda em TODOS os experimentos, sem vocês nunca teria concluído este trabalho. Vocês foram essenciais, obrigada por me ensinar as técnicas, tirar minhas dúvidas, por tornar os vários dias de experimentos mais divertidos e menos cansativos pra mim. Gleisson, valeu pela disposição, por me ajudar

sábados, feriados, após chegar de viagem, apesar de tudo e de todas as “maizenadas” no final tudo se acerta e desculpe por ter pedido pra você sacrificar os ratinhos. Rica, valeu por toda ajuda nos experimentos e ainda por me ensinar a eletroforese e o western blotting, pelas discussões sobre diabetes, modelo de diabetes, óleo de peixe, etc, acho que fui até chata, mas com certeza você contribuiu para que eu entendesse melhor tudo isso. Vocês foram ótimos, sabem que podem contar comigo!

Às minhas amigas boregas Carina, Fabíola e Ana por estarem presentes diariamente comigo, pelas conversas, pelas risadas, por tirar minhas dúvidas sempre, pelo auxílio nos experimentos, pelos conselhos e pela motivação na hora certa. Vocês foram sensacionais, obrigada por tudo!

Ao Sandro e a Luciana também agradeço em especial pela ajuda, pelo convívio e pela disposição sempre que puderam.

À Kátia e Fabi pelo auxílio no HPLC. À Kátia pelas dicas de Western Blotting sempre bem-vindas. Ao Everson por estar disposto a ensinar, explicar e dividir o que sabe e por me ajudar a entender e calcular o tal ITT.

Ao Jaisson, Marcelo e Luis Alexandre pela amizade, pela companhia no café da manhã quase diário no R.U., por sempre estarem dispostos a ajudar. Valeu!!!

Ao estagiário e às ex-estagiárias (futuras mestres e boregas), César, Dani e a Isa pelo auxílio sempre que puderam. Espero ter conseguido ensinar alguma coisa pra vocês também e desculpe se deixei a desejar.

À Loli pela verdadeira amizade, pelos conselhos, pelas “causações” e pela motivação.

À todos os funcionários do Biotério, em especial, ao Luizão que fez o possível e o impossível pra que eu conseguisse conduzir meu trabalho de acordo com meu cronograma.

À Bruna e Gi, pelo convívio diário em casa, por ter sido uma segunda família, às vezes no papel de filhas, irmãs e até mesmo mães pra mim, rsrs. Obrigada por me ouvir e aconselhar em qualquer situação, pelas risadas, pelas causações e boreguisses. Bru, amiga querida, obrigada pela amizade sempre e por me ensinar a cultivar minha auto-estima. Gi, que conheci de repente pra simplesmente dividir um

apartamento e se tornou uma grande amiga, obrigada por tudo e por me agüentar até hoje. Adoro vocês!!

Às minhas amigas amadas da faculdade, Daia e Marina, valeu pelo apoio, pelos conselhos, pelas conversas e incentivo. Daia, amiga querida, sua presença e alegria fazem muita falta, obrigada por ter me acolhido no início do mestrado na sua casa, senão não teria teto.

Aos meus queridos amigos Curitibanos, ou quase Curitibanos da “Equipinteira”, valeu por todos os momentos de diversão, descontração, encontros, viagens. Saibam que todos são muito importantes pra mim e a alegria e a amizade de vocês fez com que resgatasse minhas forças pra iniciar cada semana de trabalho. Agradeço em especial todas princesas amadas. A Pri, que desde o início torceu por mim. À Malu, Juca, Fer, Ro, Marise, Vane pelos conselhos profissionais e pessoais. Ao Dan por me ajudar a formatar as figuras e também a sua família por me receber em São Paulo quando precisei ir até a USP em função dos experimentos. Sempre adoro, nunca detesto essa “equipe”!!!

Aos meus amigos Maringaenses (pé-vermelhos): Thaís, Giovana, Márcia, Aline, Paulo, Marcos, Cássius, Simone, Adriano, Emerson, Arieno, Lari e Maria Lígia que foram essenciais e participaram deste processo, pelo incentivo e motivação. Obrigada, adoro vocês!!

Também agradeço a Talita, Dani e Elen pelo convívio durante a faculdade, por ter participado desta escolha que fiz na minha vida e me incentivado a estudar pra prova do mestrado. À Elen por ter me aconselhado a procurar o Luiz como orientador.

Aos meus novos amigos do “Rio do Peixe”, Lari, Patrícia e João, obrigado pelas dicas profissionais, pelo incentivo e motivação pra que eu nunca desista e alcance meus objetivos. Lari, valeu por todas as conversas nas idas e vindas do Rio do Peixe!!

Aos professores que me incentivaram na graduação, principalmente a Dra. Elenice Murate por ter me orientado na iniciação científica, etapa que julgo essencial pra conquista do mestrado.

Ao programa de Pós-Graduação de Biologia Celular e Molecular pela oportunidade.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro

À Deus, pois sei que não teria alcançado nada sem Ele.

“Se as coisas são inatingíveis..ora! Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”

Mario Quintana

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo II.....	1
1.2 Resistência à Insulina.....	2
1.3 Modelo Animal Experimental de Diabetes Tipo II.....	7
1.4 ÁCIDOS GRAXOS.....	9
1.4.1 Estrutura e metabolismo dos ácidos graxos.....	9
1.4.2 Ácidos graxos e diabetes tipo II.....	12
2 JUSTIFICATIVA.....	16
3 OBJETIVOS.....	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1 Animais.....	18
4.2 Material.....	18
4.3 Indução do diabetes tipo II experimental.....	18
4.4 Protocolo experimental.....	19
4.5 Procedimentos Realizados para a Caracterização do Modelo Animal de Diabetes tipo II.....	19
4.5.1 Teste de tolerância intraperitoneal à glicose (IGTT).....	20
4.5.2 Determinação da insulina plasmática.....	20
4.5.3 Determinação da glicose plasmática.....	21
4.5.4 Teste de tolerância à insulina (ITT).....	21
4.6 Procedimentos Realizados para Avaliar o Efeito das Diferentes Suplementações.....	22
4.6.1 Determinação dos lipídeos plasmáticos.....	22
4.6.2 Isolamento e incubação do músculo sóleo	22
4.6.3 Quantificação protéica do músculo sóleo.....	23

4.6.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE).....	24
4.6.5 Separação eletroforética de proteína.....	24
4.6.6 Imunoblotting.....	24
4.7 Análise Estatística.....	25
5 RESULTADOS.....	26
5.1 Caracterização do Modelo de Diabetes.....	26
5.2 Efeito da Suplementação com Óleo de Peixe.....	30
5.2.1 Teste de tolerância intraperitoneal à glicose.....	30
5.2.2 Parâmetros bioquímicos.....	32
5.2.3 Metabolismo da glicose no músculo esquelético dos ratos.....	36
5.2.3.1 Produção de lactato pelo músculo esquelético.....	36
5.2.3.2 Síntese de [U- ¹⁴ C]-glicogênio a partir de [U- ¹⁴ C]-D-glicose pelo músculo esquelético.....	41
5.2.4 Expressão das proteínas IRβ e Akt no músculo sóleo.....	46
6 DISCUSSÃO.....	48
7 CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXO.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - Ácido araquidônico
Acetil-Coa - Acetil coenzima
AKT - Proteína quinase B
ALA - Ácido graxo α - Linolênico
AL - Ácido linoléico
ANOVA - Análise de variância
ATP - Adenosina Trifosfato
CoA - Coenzima A
COX - Ciclooxygenase
DHA - Ácido graxo docosahexaenóico
EPA - Ácido graxo eicosapentaenóico
EPM - Erro padrão da média
FFQ - Fosfofrutoquinase
G-6-F - Glicose-6-fosfato
GLUT-4 - Transportador de glicose 4
GSK-3 - Glicogênio sintase quinase 3
HDL - Lipoproteína de alta densidade
HK - Hexoquinase
HMG-CoA - 3-hidroxi-3-metil coenzima
IDL - Lipoproteína de densidade intermediária
IGTT - Teste de tolerância intraperitonal à glicose
IR β - Subunidade β do receptor da insulina
IRS - Substrato do receptor da insulina
IRS-1 - Substrato do receptor de insulina-1
IRS-2 - Substrato do receptor de insulina-2
i.p. - Intraperitonal
ITT - Teste de tolerância à insulina
LOX - Lipooxygenase

LT - Leucotrienos

Kitt - Queda da glicose expressa em porcentagem por minuto

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno

n-3 - Ômega 3

n-6 - Ômega 6

n-9 - Ômega 9

NAD⁺ - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Oxidada

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida

p.c. - Peso corporal

PDK-1 - Quinase dependente de fosfoinosítídeos-1

PDH - Piruvato desidrogenase

PG - Prostaglandinas

PI3K - Fosfatidilinositol-3-quinase

PP-1 - Fosfoproteína fosfatase-1

PPAR α - Receptor nuclear α ativado pelos proliferadores de peroxissomos

SH2- Domínio 2 homólogo a Src

Shc - proteína adaptadora de ligação a fosfotirosina contendo SH2

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio

SREBP-1c - Sterol regulatory element-binding proteins

STZ - Estreptozotocina

TX - Tromboxanas

VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Via da sinalização da insulina. Fonte SALTIER & KAHN (2001, adaptado).....4
- Figura 2** - Mecanismo de resistência à insulina induzido por ácidos graxos no músculo esquelético proposto por Randle. HK - hexoquinase; G-6-F - glicose-6-fosfato; FFQ - fosfofrutoquinase; PDH - piruvato desidrogenase; CoA - coenzima A. Fonte: SHULMAM (2000, adaptado).....7
- Figura 3** - Representação esquemática dos ácidos graxos poliinsaturados. Fonte: ROSE & CONOLLY (1999, adaptado).....10
- Figura 4** - Síntese e metabolismo dos ácidos graxos n-3 e n-6. Fonte: CALDER (2001, adaptado).....11
- Figura 5** - Perfil do consumo de ácidos graxos da espécie humana ao longo dos anos. Fonte: SIMOPOULOS (2002, adaptado).....13
- Figura 6** - Concentração plasmática de glicose dos ratos controle (C) e diabético (D) na 10ª semana de vida.....26
- Figura 7** - Glicemia dos ratos do grupo controle (C) e diabéticos (D) frente o teste de tolerância intraperitoneal à glicose.....27
- Figura 8** - Concentração plasmática de insulina (ng/mL) em jejum dos ratos controle (C) e diabético (D).....28
- Figura 9** - Concentração plasmática de insulina dos ratos dos grupos controle (C) e diabético (D) obtida durante o teste de tolerância intraperitoneal à glicose.....29
- Figura 10** - Porcentagem de variação da glicemia dos ratos controle (C), diabéticos (D), diabético suplementados com óleo de peixe (DOP) ou gordura de coco (DGC) após seis semanas de suplementação frente ao teste de tolerância intraperitoneal à glicose.....31
- Figura 11** - Concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL) em jejum dos grupos controle (C), suplementado com óleo de peixe (OP) ou suplementado com

- gordura de coco (GC), diabético (D), diabético suplementado com óleo de peixe e diabético suplementado com gordura de coco (DGC) após seis semanas de suplementação.....33
- Figura 12** - Concentrações plasmáticas de triacilglicerol (mg/dL) em jejum dos grupos controle (C), suplementado com óleo de peixe (OP), suplementado com gordura de coco (GC), diabético (D), diabético suplementado com óleo de peixe e diabético suplementado com gordura de coco (DGC) após seis semanas de suplementação.....34
- Figura 13** - Concentrações plasmáticas de colesterol (mg/dL), em jejum, dos grupos controle (C), suplementado com óleo de peixe (OP), suplementado com gordura de coco (GC), diabético (D), diabético suplementado com óleo de peixe (DOP) e diabético suplementado com gordura de coco (DGC).....35
- Figura 14** - Produção de lactato pelos músculos sóleos incubados dos ratos controle (C) e suplementado com óleo de peixe (OP) e suplementado com gordura de coco (GC) na ausência e presença de 100 μ U/mL, 10000 μ U/mL de insulina.....37
- Figura 15** - Produção de lactato pelos músculos sóleos incubados dos ratos controle (C) e diabético (D) na ausência e presença de 100 μ U/mL e 10000 μ U/mL de insulina.....38
- Figura 16** - Produção de lactato pelos músculos sóleos incubados dos ratos diabético (D), diabético suplementado com óleo de peixe (DOP) e diabético suplementado com gordura de coco (DGC) na ausência e presença de 100 μ U/mL e 10000 μ U/mL de insulina.....40
- Figura 17** - Síntese de glicogênio a partir de [U-¹⁴C]-D-glicose pelos músculos sóleos incubados dos ratos controle (C) e suplementado com óleo (OP) de peixe e suplementado com gordura de coco (GC) na ausência e na presença de 100 μ U/mL, 10000 μ U/mL de insulina.....42

- Figura 18** - Síntese de glicogênio a partir de [U-¹⁴C]-D-glicose pelos músculos sóleos incubados dos ratos controle (C) e diabético (D) na ausência e presença de 100 μU/mL, 10000 μU/mL de insulina.....43
- Figura 19** - Síntese de glicogênio a partir de [U-¹⁴C]-D-glicose pelos músculos sóleos incubados dos ratos diabético (D), diabético suplementado com óleo de peixe (DOP) e diabético suplementado com gordura de coco (DGC) na ausência e na presença de 100 μU/mL, 10000 μU/mL de insulina.....45
- Figura 20** - Expressão da proteína IRβ no músculo sóleo dos ratos dos grupos controle (C), suplementado com óleo de peixe (OP), suplementado com gordura de coco (GC), diabético (D), diabético suplementado com óleo de peixe (DOP) e diabético suplementado com gordura de coco (DGC).....46
- Figura 21** - Expressão da proteína AKT no músculo sóleo dos ratos dos grupos controle (C), suplementado com óleo de peixe (OP), suplementado com gordura de coco (GC), diabético (D), diabético suplementado com óleo de peixe e diabético suplementado com gordura de coco (DGC).....47

RESUMO

Diabetes tipo II é a forma mais prevalente de diabetes e depende de fatores genéticos e ambientais, tais como o consumo de dietas ricas em gordura, principalmente ácidos graxos saturados e sedentarismo. Pacientes com diabetes tipo II apresentam hiperglicemia e dislipidemia como resultado de deficiências na secreção e ação da insulina, ou seja, disfunção da célula β pancreática e resistência à insulina. Ácidos graxos poliinsaturados ω -3 são essenciais para o crescimento e desenvolvimento normais e podem ter papel importante na prevenção e tratamento do diabetes e resistência à insulina pelo aumento da fluidez da membrana e redução na concentração plasmática de triacilglicerol. A globalização tem contribuído para o aumento de dietas ricas em ácidos graxos saturados, trans e baixo consumo de ácidos graxos poliinsaturados e, conseqüentemente aumento da prevalência de obesidade e diabetes tipo II. Nosso estudo investigou o efeito da suplementação com óleo de peixe, rico em ácidos graxos poliinsaturados ω -3, sobre parâmetros bioquímicos, tolerância à glicose e sensibilidade e responsividade do músculo sóleo na ausência ou presença de insulina, pela determinação da produção de lactato e síntese de glicogênio de ratos diabéticos. Diabetes tipo II experimental foi induzido através de injeção intraperitoneal de estreptozotocina (100 mg/kg p.c.) em ratos wistar com dois dias de vida. Após 10 semanas, os ratos foram divididos em seis grupos: ratos controles ou diabéticos alimentados com ração regular e não suplementados (C ou D), alimentados com ração regular e suplementados com óleo de peixe (OP ou DOP), alimentados com ração regular e suplementados com gordura de coco (GC ou DGC). Após, os ratos foram suplementados diariamente com óleo de peixe ou gordura saturada (1g/kg p.c.) durante seis semanas. O diabetes experimental resultou em hiperglicemia, intolerância à glicose, baixa insulinemia basal, provável alteração na secreção de insulina na presença de glicose, resistência à insulina, hipertriacilglicerolemia, hipercolesterolemia e redução da produção de lactato e síntese de glicogênio na presença de insulina, o que significa menor sensibilidade e responsividade do músculo sóleo comparado com à dos animais não diabéticos. Gordura de coco aumentou a concentração plasmática de triacilglicerol e reduziu a sensibilidade e responsividade do músculo sóleo na presença de insulina para os animais não diabéticos. Óleo de peixe reduziu a concentração plasmática de colesterol para os animais não diabéticos e aumentou a produção de lactato na presença de insulina, ou seja, melhorou a sensibilidade do músculo sóleo, mas não alterou a síntese de glicogênio para os ratos diabéticos. Nossos dados sugerem que a suplementação com óleo de peixe reduz a lipidemia nos animais não diabéticos e aumenta a sensibilidade à insulina no diabetes tipo II.

ABSTRACT

Type II diabetes is the most prevalent form of diabetes and its development is associated to genetic and environmental factors, such as consumption of energy-dense diets high in fat, particularly saturated fatty acids and sedentary lifestyle. Patients with type 2 diabetes have hyperglycemia and dyslipidemia as a result of deficiencies in both insulin secretion and insulin action, due to β -cell dysfunction and insulin resistance. Polyunsaturated fatty acids ω - 3 are essential for normal growth and development and may play an important role in the prevention and treatment of diabetes and insulin resistance by increasing membrane fluidity and decreasing plasma triacylglycerol concentrations. Globalization have contribute to increased consumption of diets rich in saturated and trans fatty acids and low consumption of polyunsaturated fatty acids and which has been associated to obesity and prevalence of type II diabetes. The present study investigated the effect of supplementation with fish oil, rich in ω - 3 polyunsaturated fatty acids on blood biochemical parameters, glucose tolerance and sensitivity and responsivity of skeletal soleus muscle to insulin in diabetic rats. Experimental type II diabetes was induced by intravenous injection of streptozotocin (100 mg/kg b.c.) in 2 days old male Wistar rats .After 10 weeks, Wistar rats were divided into six groups: rats control or diabetic were fed with regular chow (C or D), fed regular chow and supplemented with coconut fat (GC or DGC) or fish oil (OP or DOP). Then, rats were daily supplemented with fish oil or coconut fat (1g/kg b.c.). Experimental diabetes resulted in hyperglycemia, glucose intolerance, lower plasma insulin concentrations, impaired of insulin secretion at presence of glucose, insulin resistance, hypertriacylglycerolemia, hypercholesterolemia and reduced lactate production and glycogen syntesis at presence of insulin meaning sensitivity and responsivity of skeletal soleus muscle decreased when compared to non-diabetic rats. Coconut fat increased plasma triacylglycerol concentrations and reduced sensitivity and responsivity of skeletal soleus muscle at presence of insulin to non-diabetic rats. Fish oil decreased plasma cholesterol concentrations in non-diabetic rats and increased the lactate production at presence of insulin which improved sensitivity of skeletal soleus muscle, but not altered the glycogen syntesis of diabetic rats. Our data suggest that FO supplementation reduced lipidemia to non-diabetic rats and increased insulin sensitivity in type II diabetes.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes *Mellitus* Tipo II

Atualmente, o diabetes tipo II é a maior causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo (PETERSEN & SHULMAN, 2006). Estima-se que aproximadamente 5% da população global é diabética, sendo 85% a 95% destes atribuídos ao diabetes *mellitus* não-insulino dependente ou diabetes tipo II (AVRAMOGLU et al., 2006). Em 2003, segundo a Federação Internacional do Diabetes, esta doença acometeu aproximadamente 194 milhões de pessoas e poderá aumentar para 200 a 300 milhões em 2025 (FUJIMOTO, 2000; PETERSEN & SHULMAN, 2006).

O diabetes tipo II é uma doença multifatorial, resultado da combinação de fatores ambientais e da predisposição genética, sendo algumas famílias e/ou etnias mais suscetíveis a esta doença. O sedentarismo e as dietas com alta proporção de carboidratos refinados e gorduras saturadas são os principais fatores ambientais responsáveis pelo aumento do sobrepeso e da obesidade e, conseqüentemente, do diabetes tipo II, uma vez que a gordura corporal, principalmente na região abdominal é o principal fator de risco para o diabetes tipo II (FUJIMOTO, 2000; LEAHY, 2005). Em função desses fatores, apesar de não ser considerada uma doença da infância, a incidência do diabetes tipo II aumentou na população pediátrica persistindo até a vida adulta, resultando em alta prevalência de diabetes tipo II e doenças cardiovasculares em adultos jovens (BAO et al., 1996; FREEDMAN et al., 2001; SINHA et al., 2002; AVRAMOGLU et al., 2006).

Existem várias classificações para o diabetes *mellitus*, sendo as principais: o diabetes mellitus tipo I e o diabetes *mellitus* tipo II. O tipo I é resultado da destruição das ilhotas de Langerhans do pâncreas e ocorre em 5 a 10% dos casos. Já o tipo II é a mais comum e resulta de defeitos da secreção e/ou ação da insulina. Ambos os tipos de diabetes *mellitus* apresentam complicações semelhantes, porém são diferentes em relação aos processos patogênicos (SALTIEL, 2001).

O diabetes tipo II também causa complicações crônicas como retinopatias, nefropatias e doenças do sistema circulatório. Além disso, o diabetes tipo II e a

resistência à insulina encontram-se freqüentemente associados com a hipertensão e as dislipidemias, aumentando a incidência da síndrome metabólica, os riscos para aterosclerose e doenças coronarianas (STOECKLI & KELLER, 2004; AVRAMOGLU et al., 2006).

Inicialmente, a fisiopatologia do diabetes tipo II envolve defeitos na sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos, especialmente no fígado, tecido adiposo e muscular, seguidos da redução na secreção de insulina, resultado da disfunção progressiva do pâncreas (PETERSEN & SHULMAN, 2002). Além disso, o fígado aumenta a produção de glicose (LEAHY, 2005). Assim, os indicadores do diabetes tipo II incluem menor tolerância à glicose, hiperglicemia, hiperinsulinemia, reservas de glicogênio reduzidas, conseqüência do comprometimento da captação da glicose (SALTIEL, 2001; AVRAMOGLU et al., 2006).

1.2 Resistência à Insulina

A insulina é um potente hormônio anabólico, secretado pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas em resposta ao aumento da concentração de glicose e aminoácidos no sangue após as refeições. É composta por duas cadeias polipeptídicas (cadeias A e B) ligadas entre si por pontes dissulfeto e promove a síntese e armazenamento de carboidratos, lipídeos e proteínas, e inibe a quebra e liberação destes para a corrente sangüínea (BELL et al, 1990; PESSIN & SALTIER, 2000; SALTIER & KAHN, 2001). O comprometimento da ação da insulina nos tecidos periféricos caracteriza a resistência ao hormônio (FUJIMOTO, 2000; PETERSEN & SHULMAN, 2002).

Geralmente, a resistência à insulina desenvolve-se como primeiro indicador do diabetes tipo II (AVRAMOGLU et al., 2006). No entanto, o pâncreas pode compensar a resposta reduzida à insulina pelo aumento da secreção deste hormônio, na tentativa de controlar a concentração de glicose no sangue. Se não houver tratamento, ocorre falência das células β do pâncreas, resultando na menor produção de insulina e a manifestação do diabetes tipo II (SALTIEL, 2001; PETERSEN &

SHULMAN, 2002; AVRAMOGLU et al., 2006). Ainda, a insensibilidade à insulina reduz a supressão da lipólise no tecido adiposo, aumentando o fluxo de ácidos graxos livres e aumento da secreção da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) hepática, causando hipertriacilglicerolemia e redução na concentração plasmática das lipoproteínas de alta densidade (HDL) (AVRAMOGLU et al., 2006). A desregulação dos lipídeos plasmáticos e o aumento no conteúdo de triacilglicerol intramuscular parecem estar diretamente relacionados com a resistência à insulina por alterar mecanismos da via de sinalização da insulina (PAN et al., 1997; MANCO et al., 2000; AVRAMOGLU et al., 2006; DEY et al., 2006).

Em condições metabólicas normais, a ação biológica da insulina inicia-se com a ligação do hormônio no receptor da insulina (Figura 1). Este receptor é uma proteína transmembrana heterodimérica que pertence à família dos receptores de fatores de crescimento e diferenciação celular (WHITE, 1997), com atividade intrínseca de tirosina quinase. É composto por duas subunidades α (extracelulares e responsáveis pela ligação da insulina) e duas subunidades β (intracelulares e responsáveis pela atividade tirosina quinase) (NYSTROM & QUON, 1999; SALTIER & KAHN, 2001; DEY et al., 2006;). A subunidade α inibe a atividade da tirosina quinase da subunidade β , sendo este efeito inibido com a ligação da insulina no receptor (BALLOTI et al., 1989; KUBAR & ROCHET, 1990). Com isso, ocorre autofosforilação dos resíduos de tirosina específicos na subunidade β do receptor da insulina ($IR\beta$), que alteram a conformação e permitem a fosforilação de proteínas intracelulares, como os substratos para o receptor da insulina-1,-2,-3,-4 (IRS-1,-2,-3,-4), proteína adaptadora de ligação a fosfotirosina contendo domínio 2 homólogo a Src (SH2) (Shc), entre outros, que ativam várias outras vias de sinalização (PRONK et al., 1993; SALTIER & KAHN, 2001; MUOIO & NEWGARD, 2008).

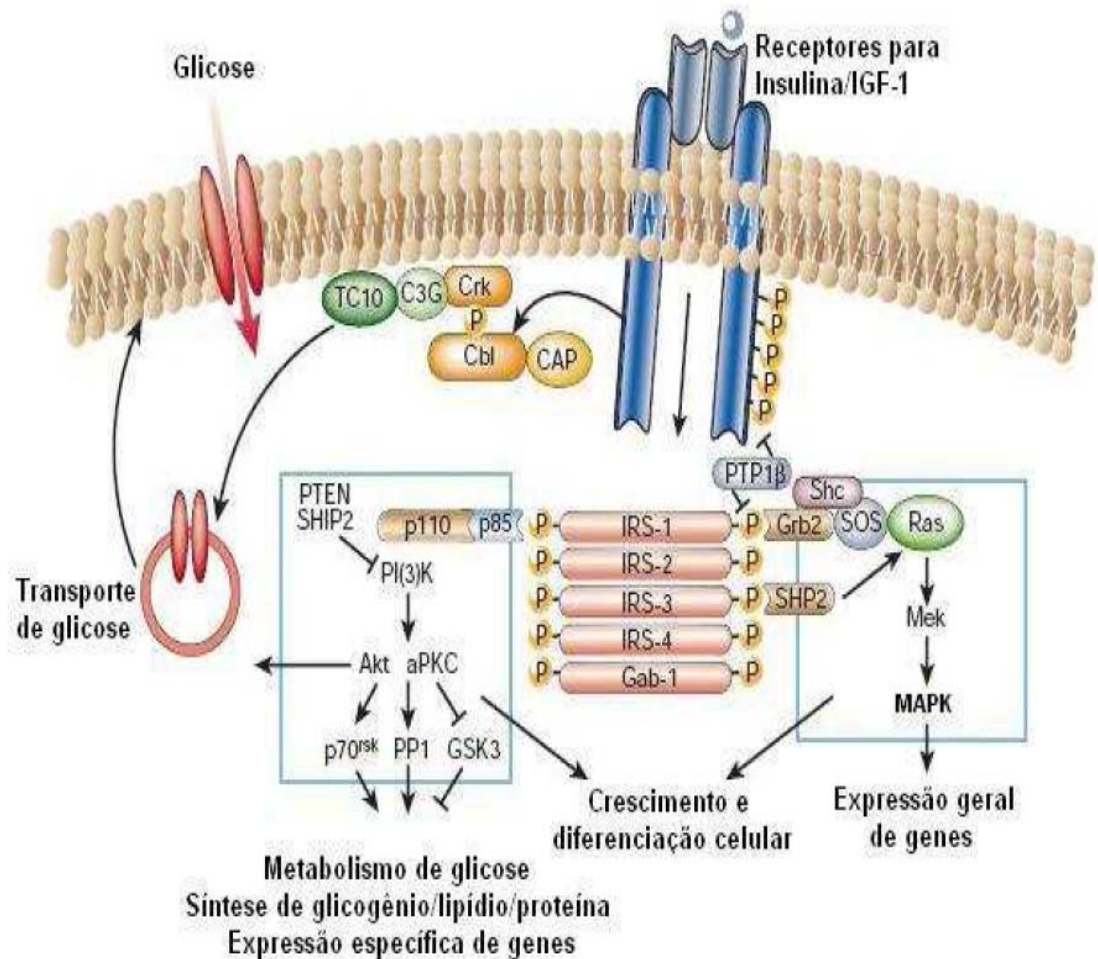


Figura 1 – Via da sinalização da insulina. Fonte: SALTIER & KAHN (2001, adaptado).

A família dos IRS parece ter um efeito particular no controle da homeostase metabólica, sendo o IRS-1 um mediador chave da captação de glicose estimulada pela insulina e ativação de vias anabólicas no músculo e tecido adiposo, no entanto no fígado estas ocorrem pelo IRS-2. A fosforilação do IRS-1 permite sua associação com a subunidade regulatória p85 da enzima fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K) e esta interação recruta a subunidade catalítica p110 da PI3K para a membrana plasmática, resultando na conversão do fosfatidil inositol-4, 5-bifosfato para fosfatidil

inositol -3, 4 ,5-trifosfato, o que permite a propagação de sinais mediados por esta enzima, como a ativação da quinase dependente de fosfoinosítídeos-1 (PDK-1) e da Akt (ou proteína quinase B) (KAPELLER & CANTLEY, 1994; SALTIER & KAHN, 2001; MUOIO & NEWGARD, 2008).

A fosforilação da Akt regula várias respostas fisiológicas da insulina como a translocação do transportador de glicose (GLUT)-4 para a membrana plasmática, a síntese de glicogênio e outros efeitos metabólicos (ASANO et al., 2000; MUOIO & NEWGARD, 2008). A AKT fosforila e inativa a glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3), responsável pela fosforilação e inativação da enzima glicogênio sintase (CROSS et al., 1995; MUOIO & NEWGARD, 2008) e também ativa a proteína ativadora guanosina trifosfatase (GTPase) AS160 Rab que facilita a translocação do GLUT-4 (MUOIO & NEWGARD, 2008).

Outra via ativada pelo IRS, através dos domínios homólogos ao Src-2 (SH2) é a cascata de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) responsável pela regulação da expressão de alguns genes, crescimento e diferenciação celular (SALTIER & KAHN, 2001). Alguns estudos sugerem que a via da MAPK contribua para a translocação do GLUT-4 para membrana plasmática (FURTADO et al., 2003; THONG et al., 2005) e para o aumento da síntese de glicogênio através da ativação da fosfoproteína fosfatase-1 (PP-1), responsável pela desfosforilação e ativação da enzima glicogênio sintase (YANO et al. 1993).

A alteração na ativação de qualquer proteína envolvida na sinalização necessária para as ações da insulina pode causar resistência ao hormônio. Concentrações elevadas de ácidos graxos livres no plasma estão relacionadas com o aumento do conteúdo de metabólitos lipídicos, como acil-CoA, diacilglicerol e ceramidas e alteração na composição fosfolipídica da membrana plasmática que parecem resultar em defeitos na via de sinalização da insulina (SHULMAN et al. 2000; PETERSEN et al., 2003; MUOIO & NEWGARD, 2008), envolvendo a redução da fosforilação do receptor da insulina, IRS-1, Akt e PI3K, alterando a translocação do GLUT-4, comprometendo a captação da glicose e ativação das vias anabólicas (DRESNER et al., 1999; AVRAMOGLU et al., 2006; DEY et al, 2006).

Em adição, o aumento dos ácidos graxos parece competir com a glicose, reduzindo o metabolismo dos carboidratos. Em 1963, Randle e colaboradores descreveram o ciclo ácido graxo-glicose (Figura 2), também conhecido como ciclo de Randle. Foi mostrado que o aumento do fluxo de ácidos graxos, em músculo cardíaco e diafragmático de ratos, elevava a produção de acetil-coenzima (Co)A e nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) mitocondrial pela β - oxidação, levando a inibição do complexo piruvato desidrogenase, resultando no aumento da concentração de citrato. Assim, a alta concentração de citrato e ATP inibiam a atividade da fosfofrutoquinase, levando redução na via glicolítica. Conseqüentemente, o conteúdo de glicose-6-fosfato elevava-se inibindo a hexoquinase, causando acúmulo de glicose intracelular, comprometendo a captação desta (RANDLE et al., 1963; RANDLE et al., 1994; SHULMAN, 2000).

É fato que a concentração elevada de ácidos graxos no plasma é responsável pela perda da sensibilidade à insulina, porém, ainda existem controvérsias sobre o mecanismo de ação envolvido nesta resposta. Alterações na via de sinalização da insulina e o ciclo de Randle parecem participar deste fenômeno (DEY et al, 2006).

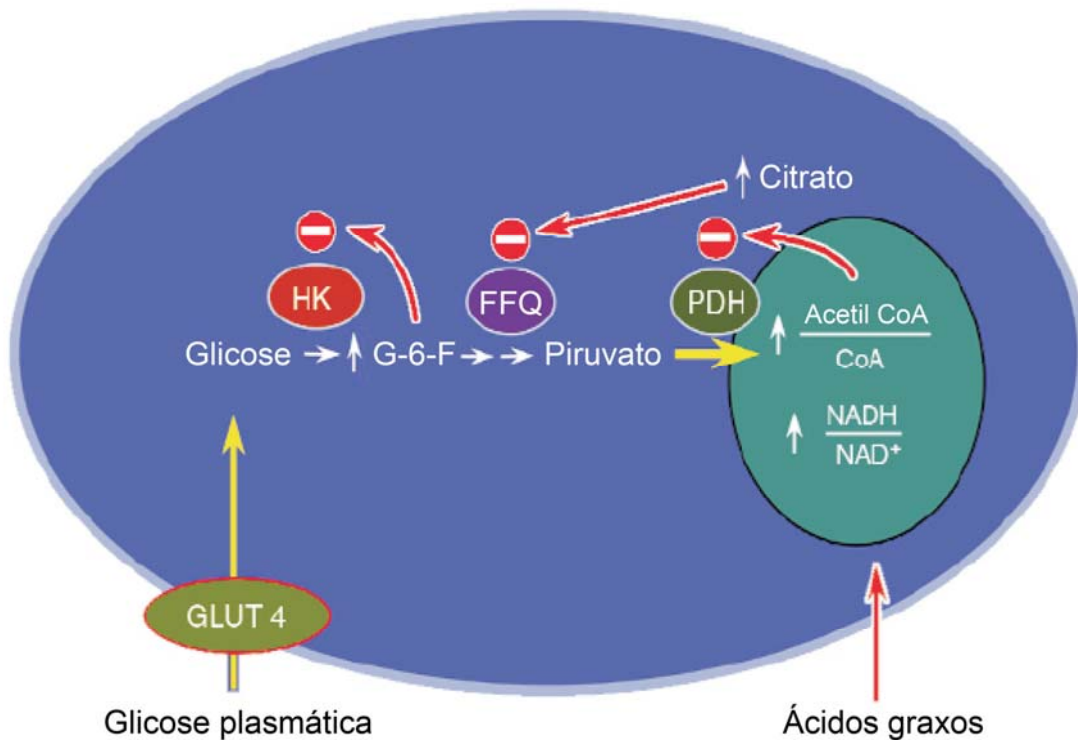


Figura 2 - Mecanismo de resistência à insulina induzido por ácidos graxos no músculo esquelético proposto por Randle. HK - hexoquinase; G-6-F - glicose-6-fosfato; FFQ - fosfofrutoquinase; PDH - piruvato desidrogenase; CoA - coenzima A. Fonte: SHULMAM (2000, adaptado).

1.3 Modelo Animal Experimental de Diabetes Tipo II

O modelo animal de diabetes tipo II induzido por estreptozotocina em rato neonatal foi descrito pela primeira vez na década de 80. Este modelo baseia-se na destruição das células β do pâncreas seguida pela regeneração destas células e intolerância à glicose (SARTORETTO et al., 2005).

A administração de estreptozotocina em ratos adultos causa uma rápida e irreversível destruição das células β pancreáticas resultando em severa síndrome diabética dependente de insulina. Todavia, quando a estreptozotocina é administrada no período neonatal via intraperitoneal, o efeito agudo da destruição das células β do

pâncreas é seguido pela regeneração espontânea destas células e a concentração de glicose retorna ao normal dentro de duas semanas. Porém, o distúrbio da resposta da insulina à glicose permanece, promovendo o modelo de diabetes tipo II (BACOVÁ et al., 2005).

As células β pancreáticas que não foram destruídas podem aumentar a secreção de insulina e manter o nível normal da glicemia, evitando a hiperglicemia. No entanto, estas células podem sofrer exaustão e conseqüentemente reduzir sua função, levando ao aumento dos níveis de glicose no sangue (TAKADA et al., 2007).

Este modelo induz a concentração de insulina no sangue levemente reduzida, assim como concentração de glicose plasmática um pouco elevada e menor conteúdo de insulina pancreática. O padrão de liberação de insulina encontrado nestes ratos é qualitativamente similar ao do rato Goto-Kakizaki, que é um modelo genético de diabetes tipo II não obeso (ARULMOZHI et al., 2004). Além disso, foi demonstrado que a injeção de estreptozotocina no período neonatal, induz, em ratos adultos, defeitos similares aos encontrados em humanos com diabetes tipo II, tais como redução na secreção de insulina induzida por glicose, aumento moderado na concentração de glicose de jejum, intolerância oral à glicose e resistência moderada à insulina (ANGEL et al., 1996).

Existem evidências de que a severa redução nas células β do pâncreas obtidas de pacientes com diabetes tipo II ou de animais, após a injeção de estreptozotocina, não está associada com resistência severa à insulina. Porém, alguns estudos com este modelo de diabetes II mostraram que a utilização da glicose, induzida por hiperinsulinemia, por toda a massa corporal foi significativamente reduzida e a produção hepática de glicose foi menos eficientemente suprimida por concentração máxima de insulina, indicando que a resistência à insulina estava presente *in vivo* nos tecidos periféricos e no fígado (ARULMOZHI et al., 2004). Em adição, TAKADA et al. (2007) mostraram que este modelo de diabetes apresenta um estado de resistência à insulina junto com dano à ilhota pancreática. Os animais neonatos, diabetizados com estreptozotocina apresentaram redução da ligação da insulina ao receptor, menor

captação e oxidação de glicose pelos adipócitos estimulados com insulina e menor conteúdo de insulina nas ilhotas pancreáticas.

Sabe-se que nenhum modelo animal de diabetes é idêntico à síndrome humana. Nem mesmo, os modelos animais de diabetes tipo II genéticos disponíveis simulam exatamente a doença nos humanos. No entanto, o modelo de diabetes tipo II induzido por estreptozotocina em rato neonatal tem muitas vantagens sobre os outros modelos e é considerado um modelo experimental adequado de diabetes mellitus tipo II (ARULMOZHI et al., 2004).

1.4 ÁCIDOS GRAXOS

1.4.1 Estrutura e metabolismo dos ácidos graxos

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos compostos por longa cadeia de hidrocarbonetos com um grupo carboxila numa extremidade e um metila na outra (CALDER, 2005). Estes podem ser saturados ou insaturados, dependendo do grau de saturação da molécula. Na ausência de duplas ligações são classificados como saturados e na presença de duplas ligações, insaturados (RUXTON et al, 2004). Os ácidos graxos são adquiridos da dieta, principalmente como triacilgliceróis, e são armazenados para reserva energética, transformados em hormônios, transportadores, mensageiros celulares e constituintes da membrana celular (ALBERTS et al, 1994).

Existem três importantes famílias de ácidos graxos poliinsaturados denominados de: ômega 3 (n-3), ômega 6 (n-6) e ômega 9 (n-9), sendo que a nomenclatura se refere à posição da primeira dupla ligação a partir do carbono ômega no terminal metila da cadeia de hidrocarboneto (Figura 3) (DOMMELS et al, 2002; CALDER, 2005).

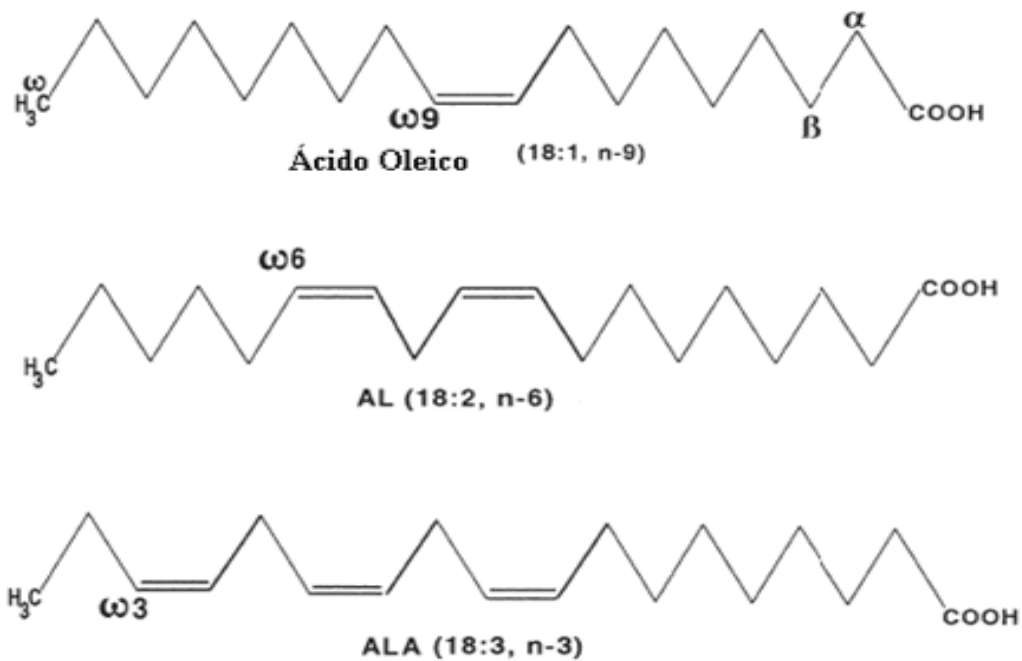


Figura 3 – Representação esquemática dos ácidos graxos poliinsaturados. Fonte: ROSE & CONOLLY (1999, adaptado).

O ácido graxo α -linolênico (ALA; 18:3n-3) é precursor do ácido eicosapentaenóico (EPA; 20:5n-3) e do docosahexaenóico (DHA 22:6n-3) e o ácido linoléico (AL;18:2n-6) é precursor do ácido araquidônico (AA; 20:4n-6). Os ALA e AL possuem efeitos opostos e são considerados essenciais para a dieta humana, pois não podem ser sintetizados pelo organismo humano e nem interconvertidos, devido a ausência das enzimas dessaturases $\Delta 12$ e $\Delta 15$ (TAPIERO et al, 2002; RUXTON, 2004;).

Na biossíntese dos ácidos graxos n-3 e n-6, estes compartilham a mesma enzima dessaturase (Δ -6-dessaturase), e portanto competem pela mesma via metabólica. A Δ -6- dessaturase tem preferência pelo ácido α -linolênico, todavia altas concentrações de ácido linoléico podem inibir a conversão do ALA em EPA e DHA, reduzindo a quantidade destes ácidos graxos (RUXTON, 2004). (Figura 4)

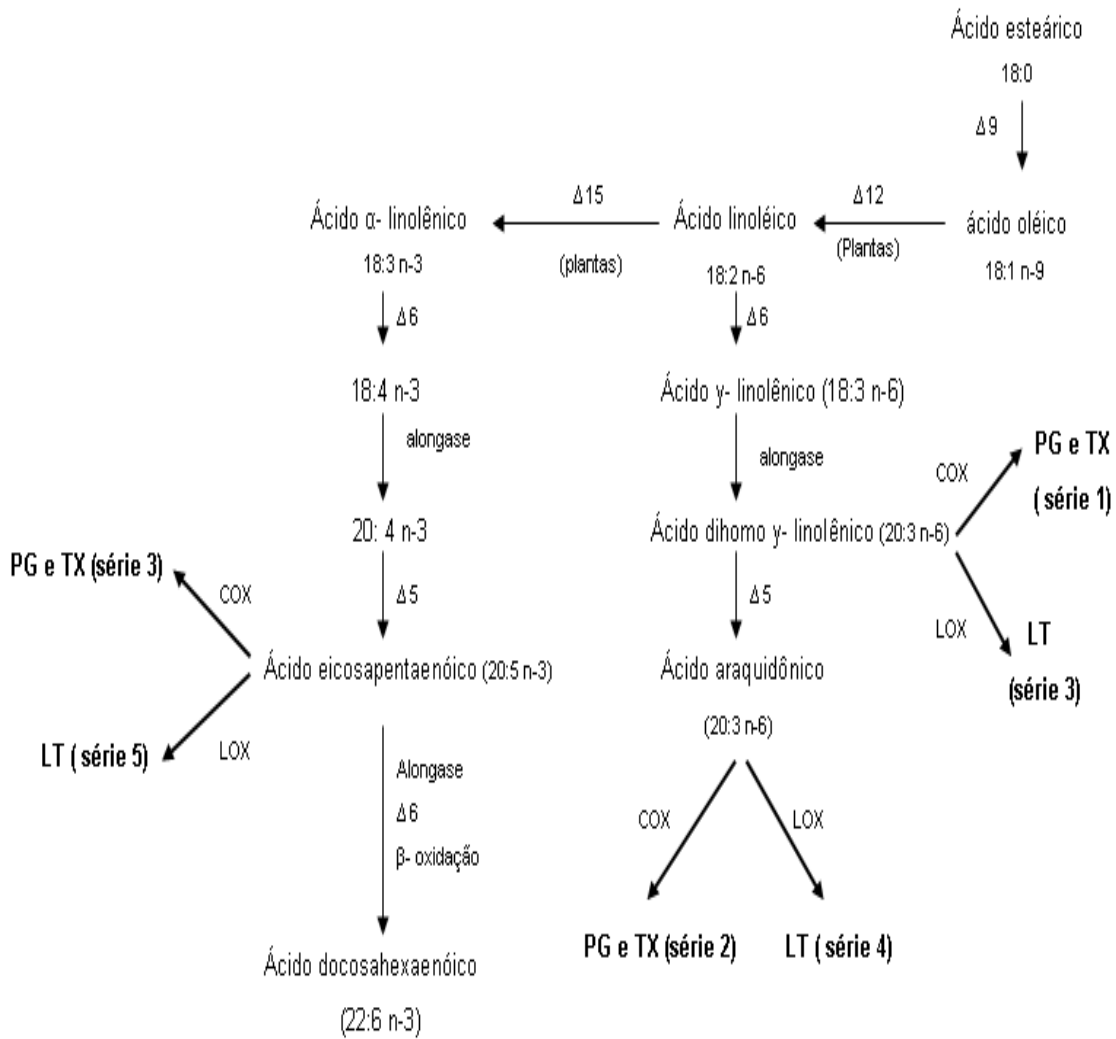


Figura 4 – Síntese e metabolismo dos ácidos graxos n-3 e n-6. Fonte: CALDER (2001, adaptado).

Tanto o ácido araquidônico (AA) quanto o eicosapentaenóico (EPA) são precursores de eicosanóides, que atuam como moduladores químicos em muitos processos biológicos, tais como a resposta inflamatória, agregação plaquetária,

permeabilidade vascular e formação de interleucinas. Porém, os eicosanóides das famílias n-6 e n-3 têm efeitos diferentes e opostos. Os ácidos graxos n-6 possuem papel inflamatório, capacidade de agregação plaquetária, atividade vasoconstritora e alta potência como agentes quimiotáxicos. Os ácidos graxos n-3 tendem a ter propriedades benéficas tais como antiinflamatórias, antiarrítmicas e de redução da concentração de lipídios no sangue (CALDER, 2001).

Além disso, os ácidos graxos poliinsaturados fazem parte dos fosfolipídeos das membranas biológicas (TAPIERO et al, 2002; RUXTON, 2004). As membranas celulares são bicamadas lipídicas que separam a célula do espaço extracelular das organelas intracelulares. Estas permitem a manutenção de gradientes iônicos, a diferença do potencial e modulam a passagem de hormônios, substratos, nutrientes e sinais intracelulares (PAN et al.,1995). O maior componente das membranas plasmáticas, representando aproximadamente 60%, são os fosfolipídeos e servem como mediadores importantes dos eventos nucleares regulando a expressão gênica e específica envolvida no metabolismo da glicose e dos lipídeos e adipogênese (PAN et al., 1995; HELGE, et al., 2001; LOMBARDO & CHICCO, 2006).

As principais fontes dos ácidos graxos ômega-3 são os peixes, óleo de peixe, canola, linhaça, nozes e as folhas verdes escuras. Já o ômega-6 compõe principalmente os óleos vegetais e sementes, como milho, girassol, soja, entre outros (MANCO et al, 2004; CALDER, 2005) e as gorduras saturadas são os ácidos palmíticos e esteáricos, encontrados principalmente nas carnes de porco, carneiro e boi, e os ácidos mirísticos e láuricos, presentes no coco (MANCO et al, 2004).

1.4.2 Ácidos graxos e diabetes tipo II

A globalização tem contribuído para o aumento do consumo de gorduras e de dietas com alta densidade energética, particularmente ricas em ácidos graxos saturados (MANCO et al, 2004). O estudo evolutivo da dieta humana (Figura 5) mostrou que nossos ancestrais, do período Paleolítico, consumiam grande quantidade de agentes antioxidantes, menor quantidade de ácidos graxos saturados e gordura trans e

a mesma razão de ácidos graxos n-6:n-3 quando comparado com as dietas atuais. Estimativas mostram que a razão n-6:n-3 está 20:1, sendo o recomendado 4:1 (SIMOPOULOS, 1999).

Após a revolução industrial, o consumo de ácidos graxos n-6 e gorduras saturadas aumentou, elevando o valor energético total das dietas ocidentais, e ainda houve decréscimo na ingestão de ácidos graxos n-3 e antioxidantes. A alta ingestão de ácidos graxos n-6 ocorreu devido ao aumento do consumo dos óleos vegetais de milho, sementes de girassol, algodão e soja, devido à recomendação indiscriminada de substituir ácidos graxos n-6 por gorduras saturadas, para reduzir o colesterol sérico e pelo desenvolvimento da tecnologia na extração de óleo vegetais (SIMOPOULOS, 1999).

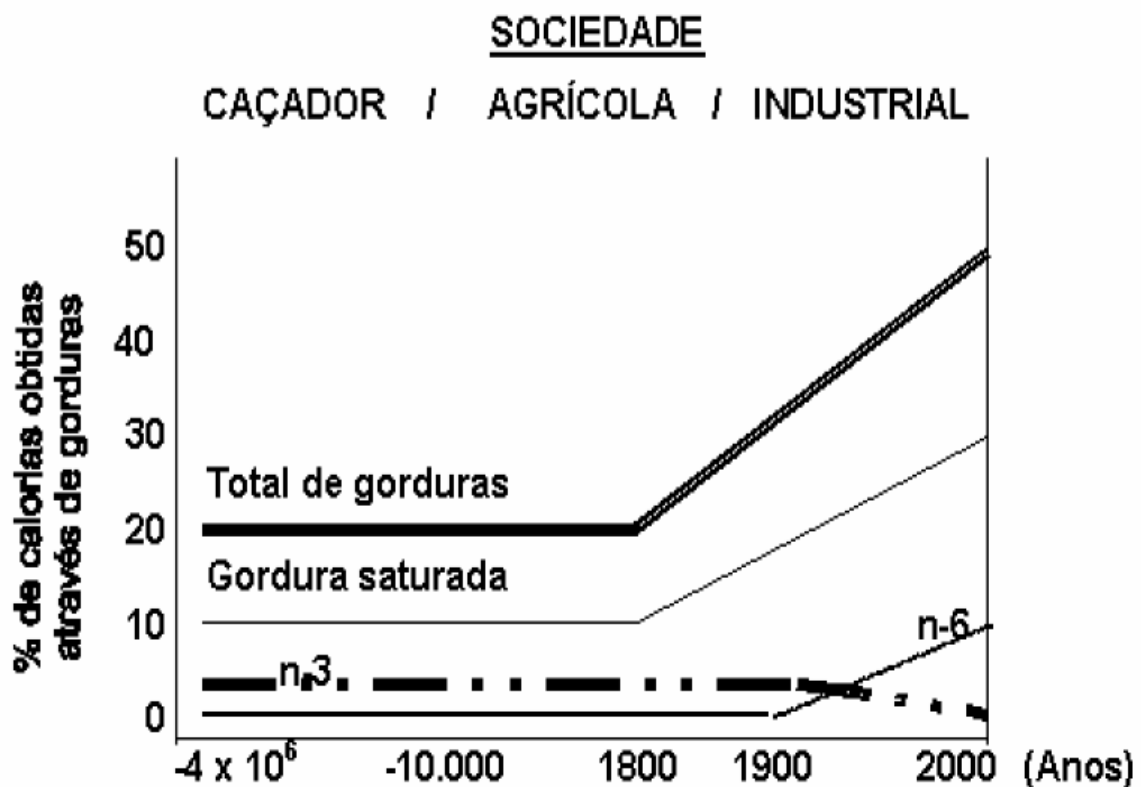


Figura 5 – Perfil do consumo de ácidos graxos da espécie humana ao longo dos anos.

Fonte: SIMOPOULOS (2002, adaptado).

Os ácidos graxos n-3 são essenciais para o crescimento e desenvolvimento normal e são importantes na prevenção e tratamento da doença arterial coronariana, hipertensão, diabetes, doenças inflamatórias, desordens auto imunes e câncer (JUMP, 2002; SIMOPOULOS, 2002). Estes benefícios são comprovados por estudos epidemiológicos que reportam a baixa prevalência da intolerância à glicose, diabetes tipo II, infarto do miocárdio, inflamação crônica, entre outras, em populações que consomem grandes quantidades de ácidos graxos ômega 3. Por outro lado, as dietas ricas em gorduras saturadas e com baixo teor de ácidos graxos n-3 estão associadas com o aumento da adiposidade, aumento do risco de diabetes tipo II, redução da sensibilidade à insulina no músculo esquelético e distúrbios no metabolismo da glicose (LICHTENSTEIN & SCHWAB, 2000; MANCO et al, 2004; NETTLETON & KATZ, 2005). Sendo assim, entre outros fatores, a gordura dietética tem importante papel na indução da resistência à insulina. Estudos experimentais têm mostrado que a quantidade e/ou o tipo de ácidos graxos ingeridos alteram a sensibilidade à insulina nos seus tecidos alvos (VESSBY, et al 2000; TAOUIS et al, 2002).

Dietas ricas em ácidos graxos modificaram a ação da insulina em ratos, porém quando os lipídeos provinham do óleo de peixe houve prevenção da resistência à insulina. (TAOUIS et al, 2002). Ainda, a substituição dos ácidos graxos saturados pelos poliinsaturados mudou o padrão característico dos lipídeos séricos encontrados no estado de resistência à insulina (VESSBY, et al 2000). No entanto, os mecanismos do efeito protetor dos ácidos graxos n-3 não estão totalmente esclarecidos. Estes efeitos dietéticos do ômega 3 podem ocorrer devido à incorporação dos ácidos graxos nos fosfolipídeos das membranas dos tecidos alvos da insulina e também por seu efeito hipolipidêmico, ou seja, redução do conteúdo de triacilgliceróis (THOMPSON et al., 2000; TAOUIS et al., 2002; LOMBARDO & CHICCO, 2006)..

As propriedades das membranas como a fluidez, permeabilidade e ancoragem das proteínas de membrana dependem da composição dos ácidos graxos dos fosfolipídeos (HELGE, et al., 2001; HULBERT et al., 2005). Borkman et al. (1993) mostraram pela primeira vez a associação entre a composição de ácido graxos dos

fosfolipídeos de membrana no músculo esquelético e a sensibilidade à insulina em humanos, ou seja, as proporções de ácidos graxos poliinsaturados nos fosfolipídeos de membrana do músculo estavam diretamente relacionado com a sensibilidade à insulina.

Quantidades menores de ácidos graxos poliinsaturados na membrana podem diminuir o processo de consumo de energia da célula através da redução do fluxo de íons e prótons, energia necessária para manter a homeostase iônica. Este processo contribui para o metabolismo basal da célula, assim membranas com menores proporções de ácidos graxos poliinsaturados reduzem o metabolismo celular. Isto pode contribuir para o aumento do estoque da gordura corporal, inclusive no fígado e no músculo esquelético, ambos críticos para a ação da insulina (HULBERT et al., 2005).

A composição dos ácidos graxos das membranas também pode influenciar a ação da insulina, alterando as proteínas intracelulares específicas da sinalização da insulina, através da modulação da afinidade do receptor e da translocação dos transportadores de glicose para a membrana (HULBERT et al., 2005). No músculo de rato, as alterações na composição da membrana causadas pelos ácidos graxos n-3 afetaram os receptores da insulina, o IRS-1 e a PI3K (LOMBARDO & CHICCO, 2006; TAOUIS et al, 2002). Em um modelo animal espontâneo de diabetes, a suplementação com óleo de peixe por aproximadamente 18 semanas preveniu o desenvolvimento da resistência à insulina, provavelmente pela maior expressão do RNAm para GLUT-4 mediado pela alteração na composição da membrana (LOMBARDO & CHICCO, 2006).

Além disso, segundo LICHTENSTEIN & SCHWAB (2000), o tipo de ácidos graxos da membrana pode modificar a atividade das enzimas associadas com o metabolismo da glicose.

2 JUSTIFICATIVA

O diabetes tipo II é uma doença metabólica associada a complicações crônicas como retinopatias, nefropatias e doenças do sistema circulatório (AVRAMOGLU et al., 2006). A fisiopatologia do diabetes envolve menor sensibilidade à insulina nos tecidos alvo, seguido da produção reduzida de insulina como resultado da disfunção progressiva da célula β pancreática (PETERSEN & SHULMAN, 2002).

Estudos epidemiológicos têm reportado baixa prevalência do diabetes tipo II e da intolerância à glicose em populações que consomem grandes quantidades de ácidos graxos n-3, encontrados principalmente no peixe e óleo de peixe (NETTLETON & KATZ, 2005). Estudos *in vivo* também apresentaram resultados positivos em relação à ação da insulina no músculo de ratos suplementados com óleo de peixe (TAOUI et al, 2002; LOMBARDO & CHICCO, 2006;).

A maioria dos estudos experimentais é realizada no músculo esquelético, o maior tecido alvo da insulina e mostram que a redução das insaturações nos fosfolipídeos da membrana está diretamente relacionada com a redução da ação da insulina (HULBERT et al., 2005). Contudo, o mecanismo pelo qual o ômega 3 melhora sensibilidade à insulina no músculo esquelético não está totalmente esclarecido, mas pode envolver mudanças no metabolismo da glicose e também dos ácidos graxos, interferência na sinalização da insulina, redução na concentração de ácidos graxos livres no plasma, entre outros.

De acordo com PETERSEN & SHULMAN (2002), o metabolismo da glicose está comprometido no indivíduo diabético. Danos na síntese de glicogênio, na atividade da hexoquinase e no transporte da glicose são características encontradas no diabetes tipo II.

Desta forma, torna-se necessário avaliar a ação dos ácidos graxos ômega 3 sobre a sensibilidade e responsividade à insulina no músculo sóleo de ratos com diabetes tipo II, em diferentes etapas do metabolismo da glicose e investigar o possível mecanismo de ação.

3 OBJETIVOS

Consolidar um modelo animal de diabetes tipo II e investigar o efeito da suplementação com óleo de peixe sobre parâmetros bioquímicos sanguíneos e a sensibilidade e responsividade à insulina do músculo sóleo de ratos diabéticos. Para alcançar estes objetivos foram determinados:

- A concentração de glicose plasmática em jejum antes e após a suplementação com óleo de peixe;
- O teste de tolerância intraperitoneal à glicose (IGTT) antes e após o período experimental;
- A concentração de insulina plasmática, em jejum, e durante o IGTT nos ratos antes da suplementação;
- O teste de tolerância à insulina (ITT) antes da suplementação;
- A concentrações de triacilglicerol e colesterol total após a suplementação;
- A síntese de [¹⁴C]- glicogênio e a produção de lactato em músculo sóleo isolado e incubado na ausência e presença de insulina;
- A expressão das proteínas IR β e AKT envolvida na via de sinalização da insulina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos albinos da linhagem Wistar com aproximadamente dois dias de vida obtidos do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em ciclo claro/ escuro (12h/12h), em ambiente com temperatura controlada de 22 ± 2 °C com ração (Nuvital CR-1, Nuvital Nutrientes Ltda., Curitiba, PR, BRA, composta por 66% de carboidratos, 23% de proteínas, 4% de lipídios, 6% de fibras e 1% de vitaminas e minerais (PIZATO et al., 2005)) e água à vontade.

Todos os procedimentos que envolvem os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná (Anexo).

4.2 Material

O óleo de peixe foi doado gentilmente pela Fundação Herbarium. Cada cápsula de óleo de peixe (1g/cápsula) contém 0,192 g de EPA e 0,124g DHA. A gordura de coco foi adquirida no Mercado Municipal da cidade de Curitiba –PR.

As enzimas e reagentes utilizados neste estudo foram obtidos da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, USA). Todos os componentes para a solução de Krebs-Ringer e a glicose foram obtidos da Reagen Quimbrás Indústria Brasileira S/A(Rio de Janeiro, RJ, BRA). A glicose radiomarcada foi adquirida da Amersham Bioscience (U.K.). Os anticorpos policlonais de coelho anti- IR β e anti-Akt foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology.

4.3 Indução do Diabetes Tipo II Experimental

No segundo dia após o nascimento dos animais, o diabetes tipo II foi induzido pela administração intraperitoneal (ip) de estreptozotocina (STZ) (100 mg/kg de massa corporal) diluída em tampão citrato pH 4,5 (ASHOKKUMAR & PARI, 2005).

4.4 Protocolo Experimental

Após a administração de estreptozotocina e o desmame, os ratos foram divididos em seis grupos: controle (C); diabetizado (D), animais suplementados com óleo de peixe (OP); animais suplementados com gordura de coco (GC); diabetizado suplementado com óleo de peixe (DOP) e diabetizado suplementado com gordura de coco (DGC). Os grupos denominados controle e diabético não receberam suplementação.

Após 10 semanas, a instalação do diabetes tipo II foi confirmada através do teste de tolerância intraperitoneal à glicose (IGTT). Então, os ratos foram suplementados com óleo de peixe (ácido graxo poliinsaturado n-3) e com gordura de coco (ácido graxo saturado) na dose de 1g/kg de massa corporal, com auxílio de micropipeta, diariamente por seis semanas consecutivas.

Os animais foram pesados três vezes por semana com auxílio de uma balança da marca Urano com precisão de 1 g para o controle do peso durante o experimento e para os ajustes na dose da suplementação. Após o período de suplementação, os animais foram anestesiados com éter e aproximadamente 1 ml de sangue coletado através de punção cardíaca e centrifugado a 290 g a 4°C por 10 min em centrífuga Eppendorf modelo 5810R (GER). O plasma foi separado para dosagem da glicemia, colesterolemia e triacilglicerolemia. Dois dias depois da coleta do sangue, os ratos foram ortotansados por deslocamento cervical para a rápida coleta do músculo sóleo e posterior incubação e análise das proteínas do tecido. Todos os procedimentos foram realizados após um período de jejum de aproximadamente 12 horas.

4.5 Procedimentos Realizados Para a Caracterização do Modelo Animal de Diabetes tipo II

Todos os testes e análises descritos abaixo foram realizados após a 10ª semana de indução do diabetes. A coleta do sangue e a separação do plasma para dosagem de insulina e glicose foram realizadas como descrito anteriormente.

4.5.1 Teste de tolerância intraperitoneal à glicose (IGTT)

O teste de tolerância à glicose é um método de referência para o diagnóstico do diabetes ou da intolerância à glicose, no caso da glicemia duas horas após administração de glicose não retornar próxima da concentração basal de glicose ou apresentar-se maior do que 200 mg/dL para humanos (GROSS et al., 2002).

O teste de tolerância intraperitoneal à glicose foi realizado mediante a injeção i.p. de uma solução de glicose (2g/kg de massa corporal). A glicemia foi determinada nos tempos zero (antes da ip), 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção, utilizando-se glicosímetro e fitas para glicemia da marca One Touch Ultra®. Este teste foi repetido após o período de suplementação, porém a glicemia foi mensurada até 90 minutos após a carga de glicose, pois o resultado não foi estatisticamente diferente após este tempo no teste anterior.

A concentração de insulina também foi mensurada nos tempos 0, 30 e 60 minutos através do método de radioimunoensaio descrito abaixo.

4.6.2 Determinação da insulina plasmática

A dosagem de insulina plasmática foi realizada no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP) pelo método de radioimunoensaio. Esse método é baseado na competição entre insulina porcina marcada com radioisótopo ^{125}I e a insulina de rato fria (não-marcada) pelo anticorpo anti-insulina produzido na cobaia. Mantendo-se constante a quantidade de hormônio radioativo e do anticorpo, a formação do complexo insulinamarcada-anticorpo depende da quantidade de insulina fria presente na solução padrão. O complexo antígeno-anticorpo pode ser facilmente precipitado pela adsorção do hormônio ao polietileno glicol. A concentração do hormônio na amostra foi determinada pela quantificação de radiação gama. Os resultados foram expressos em ng/mL.

4.5.3 Determinação da glicose plasmática

A concentração plasmática de glicose foi mensurada pelo método enzimático colorimétrico, utilizando um kit de glicose Bioliquid[®], de acordo com as instruções do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 505 nm da marca ULTROSPEC 2000 (Pharmacia Biotech). Os resultados foram expressos em mg/dL. Este parâmetro foi repetido após o período de suplementação.

4.5.4 Teste de tolerância à insulina (ITT)

O teste tolerância à insulina é usado para medir a resistência periférica à insulina. Este teste mensura a sensibilidade à insulina utilizando a constante do desaparecimento da glicose (Kitt) como índice do metabolismo da glicose mediado pela insulina. O Kitt corresponde à queda da glicose expressa em porcentagem por minuto, assim quanto maior o Kitt maior a sensibilidade à insulina. (FURUYA, et al, 2005; GELONEZE e TAMBASCIA, 2006; MURALI et al, 2002).

Para a realização do ITT, os ratos foram anestesiados com pentobarbital (50 mg/kg de massa corporal, i.p.) e em seguida, foi injetado na veia peniana 1U/kg de massa corporal de insulina Regular da marca Humulin[®]. A glicemia foi mensurada nos tempos 0,5,10,15,20,40 minutos utilizando –se um glicosímetro e fitas para glicemia da marca One Touch Ultra[®].

O Kitt foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Kitt} = 0,693 \times 100 / t_{1/2}$$

Onde, o $t_{1/2}$ representa a meia-vida do decaimento da glicose e foi determinado a partir do slope ou coeficiente angular da reta obtida pela regressão linear do logaritmo natural da glicose versus o tempo.

4.6 Procedimentos Realizados para Avaliar o Efeito das Diferentes Suplementações.

Todos os testes e análises foram realizados após a sexta semana de suplementação com óleo de peixe ou gordura de coco.

4.6.1 Determinação dos lipídeos plasmáticos

As concentrações plasmáticas de triacilglicerol e colesterol total foram determinadas por método enzimático colorimétrico, utilizando os kits triglicérides GPO-Trinder[®] e colesterol total Bioliquid[®], respectivamente, conforme especificações do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 500 nm e os resultados expressos em mg/dL.

4.6.2 Isolamento e incubação do músculo sóleo

Alguns ratos foram mortos por deslocamento cervical e os músculos sóleos foram cuidadosamente e rapidamente isolado, divididos longitudinalmente em duas ou três partes, pesados (25 a 35 mg) e pré-incubados em erlenmeyers, contendo 3 mL de tampão Krebs-Ringer (contendo albumina sérica bovina (BSA) a 1% e glicose a 56 mM) sob agitação constante com atmosfera de O₂/CO₂ (95%/5%) por período de 30 minutos. O restante do tecido foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para posterior análise das proteínas.

Após o período de pré-incubação os músculos foram transferidos para outros erlenmeyers contendo 3 mL de meio Krebs-Ringer, acrescidos de 0,1μCi/ml [U-¹⁴C] - D- glicose, com 100 e 10.000 μU/mL ou sem insulina (basal). Os músculos foram incubados por 1 hora, nas mesmas condições da pré-incubação, porém a gaseificação ocorreu somente durante os primeiros 15 minutos. No final da incubação, os músculos e o tampão de incubação foram utilizados para avaliação da síntese de glicogênio e produção de lactato, respectivamente, conforme ESPINAL et al. (1983) e ENGLE & JONES (1978).

4.6.3 Quantificação protéica do músculo sóleo

Amostras de aproximadamente 100 mg de músculo foram homogeneizadas em Tampão de lise na proporção 1:7 com auxílio de homogeneizador de tecidos, centrifugadas por 5 minutos a $17949 \times g$ a 4°C e o sobrenadante coletado para quantificação protéica.

A quantificação protéica foi realizada pelo método Bradford (BRADFORD, 1976). A concentração de proteínas das amostras foi calculada com base em curva padrão de proteína conhecida (BSA). As amostras foram diluídas vinte vezes para não extrapolar a curva padrão. Foram plaqueados 250 μL de solução de Bradford e 10 μL de cada um dos padrões ou das amostras (quatro réplicas) em placas de 96 poços, sendo a leitura realizada em leitor de microplaca a 595 nm.

O cálculo da concentração protéica das amostras foi realizado a partir da equação da reta ($y=ax+b$), sendo que y , a absorbância e x , a concentração de proteína. O valor de x encontrado foi multiplicado pela diluição da amostra (20 vezes) para se obter a concentração de proteína da amostra em $\mu\text{g/mL}$.

4.6.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

Após quantificação protéica, foi realizada diluição das amostras utilizando tampão Laemmli de forma a deixar a concentração final em 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína/amostra, ou seja, todas as amostras com a mesma concentração. O tampão Laemmli contém SDS (dodecil sulfato de sódio) para desnaturar a proteína e prover carga negativa constante de forma que todas fiquem com a mesma carga na amostra; glicerol para dar à amostra densidade maior do que o tampão de corrida e β -mercaptoetanol (agente redutor) para desfazer pontes dissulfeto da estrutura protéica, possibilitando a separação da amostra em subunidades.

4.6.5 Separação eletroforética de proteína

O método “SDS- PAGE” descrito por Laemmli em 1960 foi desenvolvido para que a proteína submetida a um campo elétrico migre unicamente pelo tamanho. O SDS é um detergente carregado negativamente que se liga a regiões hidrofóbicas das proteínas. O complexo formado SDS-proteína distribui carga negativa semelhante entre todas as proteínas que migrarão para o pólo positivo do campo elétrico. Portanto, a migração das proteínas no método “SDS-PAGE” depende principalmente das suas massas moleculares. O gel de empilhamento foi preparado a 4% permitindo que todas as proteínas migrem com a mesma velocidade no início da corrida. Após passarem pelo gel de empilhamento as amostras alcançam o gel de resolução onde as amostras começam a migrar de acordo com a massa molecular. Neste gel, a porcentagem de acrilamida foi de 10%, adequado para separar as proteínas alvos (AKT e IR β). Os géis foram preparados com uma solução de acrilamida:bisacrilamida (30:1). A polimerização desta mistura inicia-se pela adição de persulfato de amônio e TEMED.

Subsequentemente, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida “SDS-PAGE” por aproximadamente 2 horas (8V/cm de gel)

4.6.5 Imunoblotting

O método de Imunoblotting (ou “Western blotting) surgiu em 1979, descrito por Towbin e colaboradores e permite a identificação de proteínas específicas pelo uso de anticorpos mono ou policlonais, incluindo a detecção, a quantidade relativa e o peso molecular de proteínas, em uma mistura complexa. Após a separação das proteínas em gel de poliacrilamida “SDS-PAGE”, elas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada por duas horas em tampão de bloqueio, contendo 1,5% de leite desnatado para evitar ligações inespecíficas dos anticorpos. Após o bloqueio, a membrana foi incubada em tampão de incubação contendo 1,5% de BSA e o anticorpo primário contra a proteína AKT ou IR β . Para visualização da interação proteína-anticorpo foi utilizado anticorpo secundário contra o anticorpo

primário (anti-Akt ou anti- IR β), sendo este complexado com enzima horseradish peroxidase (HRP). Pela adição de substrato quimioluminescente pode-se observar em filme Kodak para radiografia uma imagem referente às proteínas AKT e IR β .

4.7 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) dos grupos experimentais e foram submetidos à análise de variância de duas vias (ANOVA) com o pós teste de Bonferroni, ou teste t de Student quando indicado para um nível de significância de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

5.1 Caracterização do Modelo de Diabetes

Na figura 6 está apresentada a glicemia (mg/dL) dos ratos controle (C) e induzidos à diabetes mensurada na décima semana de vida imediatamente antes do período da suplementação. Este parâmetro foi maior no grupo diabético (174 ± 5) quando comparado com o grupo controle (134 ± 6) ($p < 0,001$).

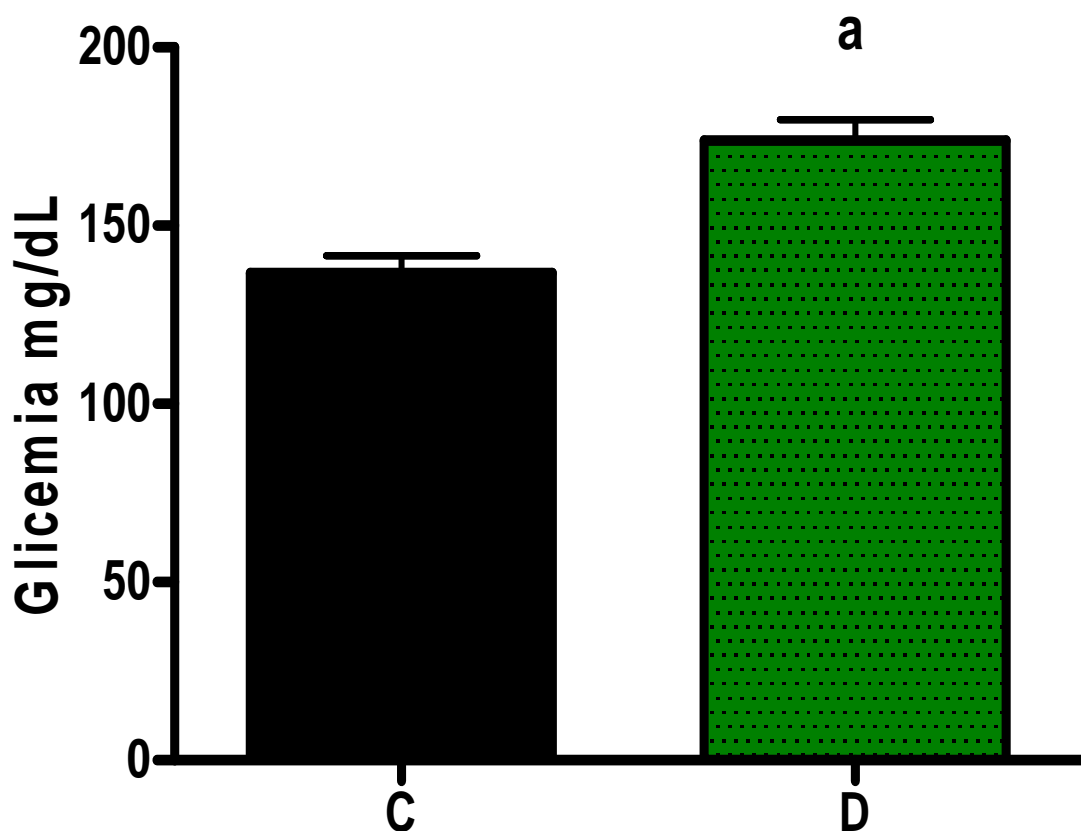


Figura 6 - Concentração plasmática de glicose dos ratos controle (C) ($n = 26$) e diabéticos (D) ($n = 37$) na décima semana de vida. Valores estão expressos como média \pm EPM de cinco experimentos.

^a $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle.

O IGTT está apresentado da Figura 7. A glicemia (mg/dL) dos ratos C e D, no tempo zero, foi respectivamente 103 ± 5 e 131 ± 3 ($p < 0,05$). Trinta minutos após a administração i.p. de glicose (2g/kg de massa corporal), a concentração de glicose plasmática do grupo C foi de 267 ± 26 e do grupo D de foi 345 ± 25 ($p < 0,05$). Aos 60, 90 e 120 minutos a glicemia retornou ao valor basal no grupo controle. Em contraposição, nestes tempos, a glicose plasmática no grupo diabético manteve-se similar à encontrada aos 30 minutos.

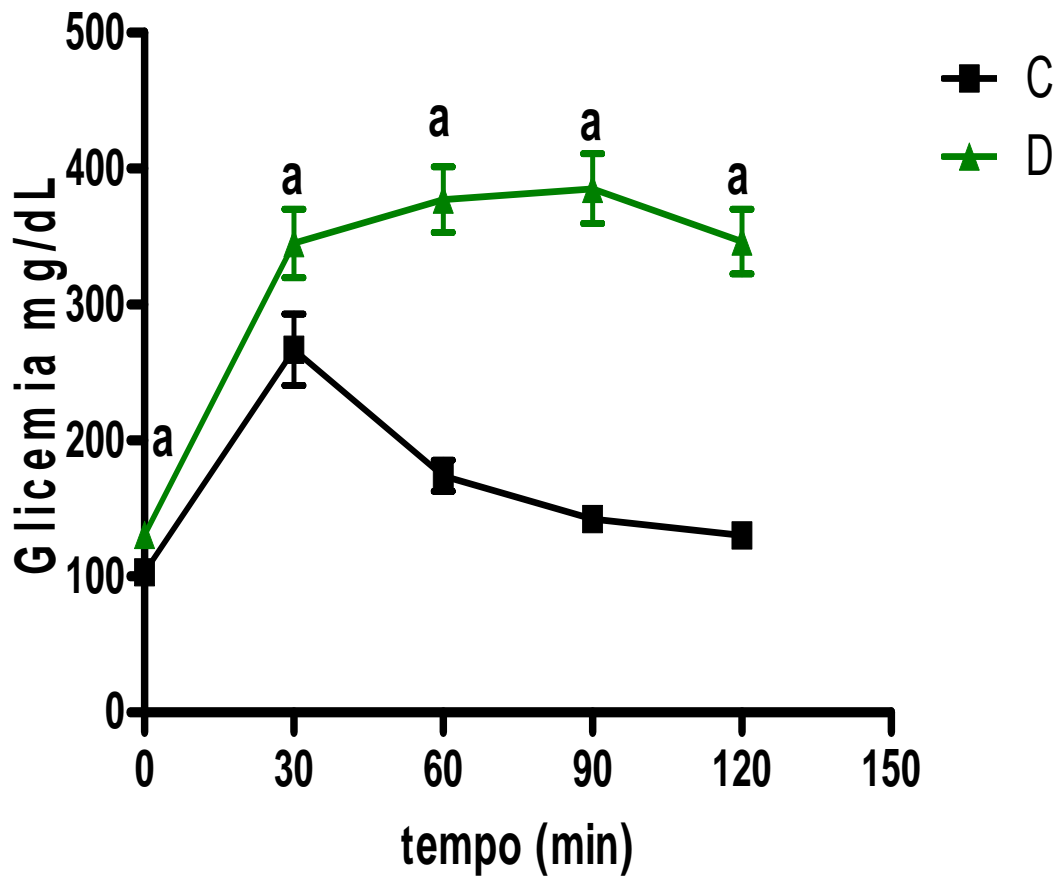


Figura 7 - Glicemia dos ratos do grupo controle (C) (n=9) e diabéticos (D) (n=17) frente o teste de tolerância intraperitoneal à glicose. Valores estão expressos como média \pm EPM de dois experimentos.

^a $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle.

A insulina plasmática (ng/mL) em jejum (Figura 8) do grupo controle foi de $1,9 \pm 0,2$, enquanto que no diabético foi de $1,3 \pm 0,1$, o qual foi significativamente menor ($p < 0,05$).

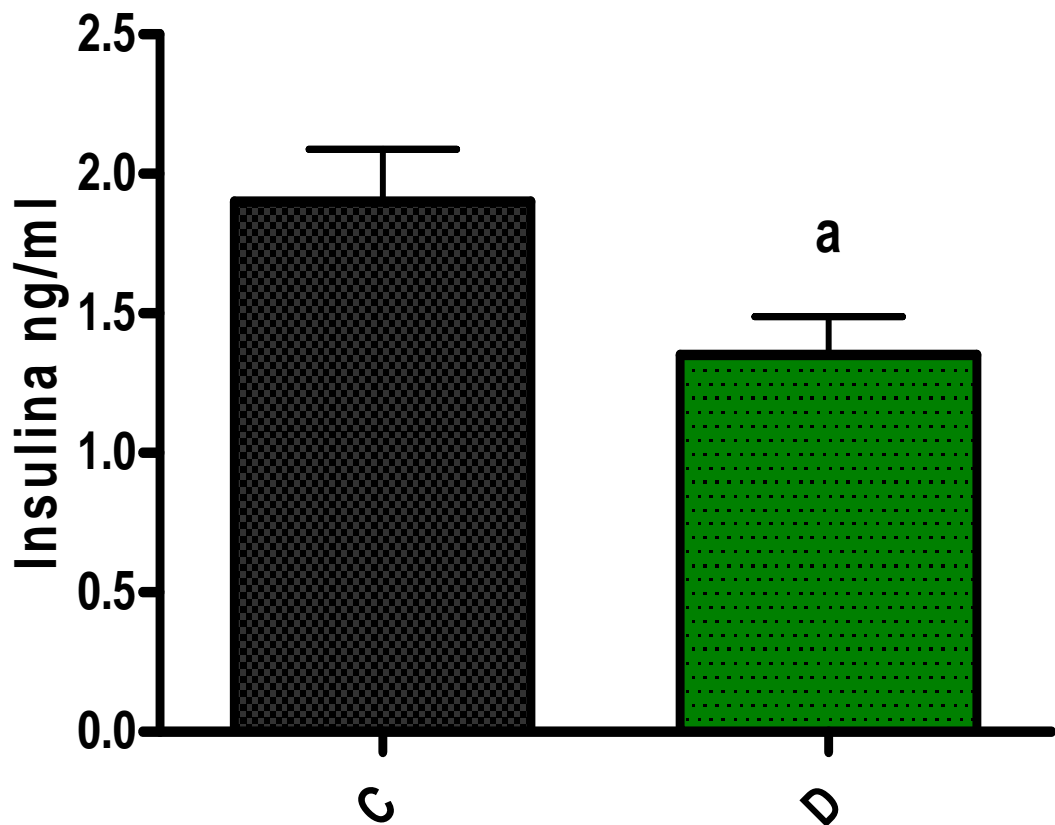


Figura 8 - Concentração plasmática de insulina (ng/mL) em jejum dos ratos controle (C) (n= 34) e diabético (D) (n=26). Valores estão expressos como média \pm EPM de dois experimentos.

^a $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

A concentração plasmática de insulina (ng/mL) durante o IGTT (Figura 9) no tempo zero nos ratos C e D foi de $2,2 \pm 0,3$ e $1,6 \pm 0,9$, respectivamente ($p > 0,05$). Aos 30 minutos, no grupo controle foi de $3,1 \pm 1,3$ e no diabético foi de $0,75 \pm 0,6$, que

foi significativamente menor ($p < 0,05$). Aos 60 minutos em ambos os grupos retornou aos valores próximos do tempo zero, mas no grupo diabético a concentração de insulina foi ainda significativamente menor quando comparada à do grupo controle ($p < 0,05$).

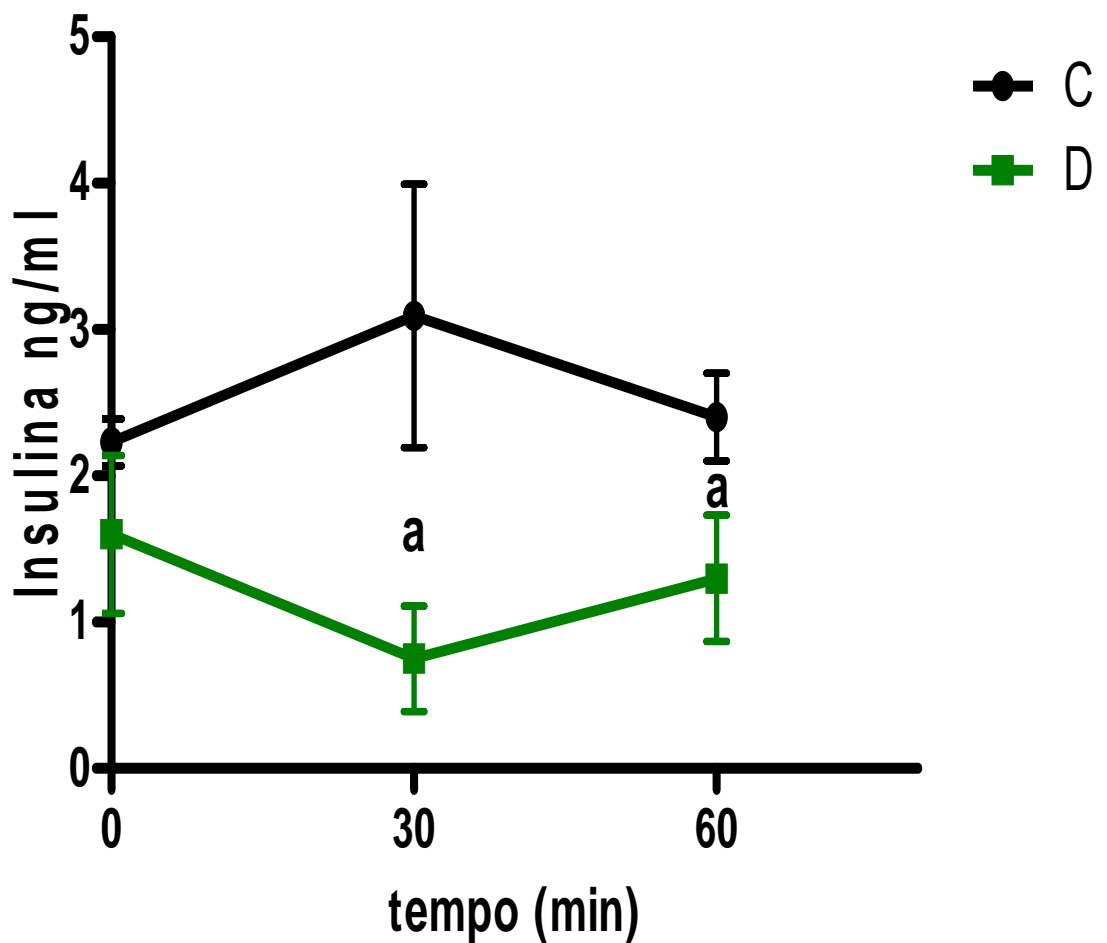


Figura 9 – Concentração plasmática de insulina dos ratos dos grupos controle (C) ($n = 3$) e diabético (D) ($n = 3$) obtida durante o teste de tolerância intraperitoneal à glicose. Valores estão expressos como média \pm DP de um experimento.

^a $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

O K_{itt} (%/min) encontrado para o grupo diabético foi de $3,4 \pm 0,9$ e para o grupo controle foi $7,4 \pm 0,5$. A elevação encontrada demonstra resistência à insulina.

5.2 Efeito da Suplementação com Óleo de Peixe

5.2.1 Teste de tolerância intraperitoneal à glicose

Na figura 10 estão apresentados os dados referentes ao comportamento da glicemia frente ao teste de tolerância intraperitoneal à glicose dos animais após seis semanas de suplementação.

No grupo C aos 30 minutos a % da variação da glicemia em relação ao tempo zero foi de 275 ± 31 , aos 60 e 90 minutos retornou próxima ao valor basal. Nos grupos D, DOP e DGC nestes mesmos tempos, esta variação foi de $390 \pm 32,7$, 324 ± 30 , 408 ± 37 , respectivamente, sendo estes valores para os grupos D e DGC significativamente maior quando comparados aos do grupo controle ($p < 0,05$). Em contrapartida, a diferença não foi significativa comparando-se os grupo C e DOP ($p > 0,05$).

Os grupos D, DOP e DGC não apresentaram diferença entre si na tolerância à glicose, nos tempos 60 e 90 minutos ($p > 0,05$), mas foram diferentes do grupo C ($p < 0,05$).

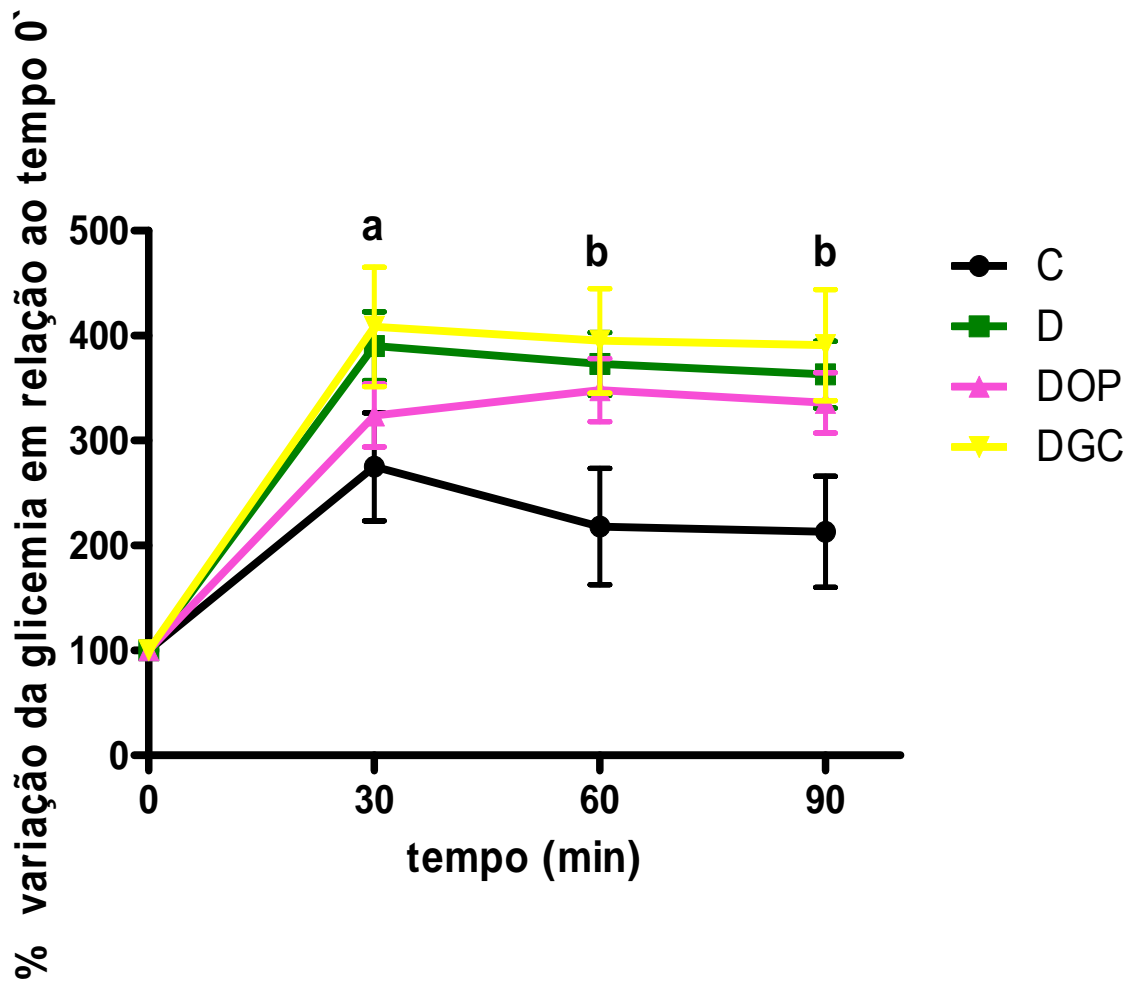


Figura 10 - Porcentagem de Variação da glicemia dos ratos controle (C) (n=8), diabéticos (D) (n=8), diabético suplementados com óleo de peixe (DOP) (n=8) ou gordura de coco (DGC) (n=8) após seis semanas de suplementação frente ao teste de tolerância intraperitoneal à glicose. Valores expressos como média \pm EPM de dois experimentos.

^a $p < 0,05$ quando comparado D e DGC em relação ao controle

^b $p < 0,05$ quando comparado D, DOP, DGC em relação ao controle.

5.2.2 Parâmetros bioquímicos

A glicemia (mg/dL), em jejum, dos ratos controle foi de 122 ± 5 . A suplementação com óleo de peixe (OP) ou gordura de coco (GC) não alterou a glicemia dos animais não diabéticos. Nos animais diabéticos (D), a glicemia de jejum foi de 136 ± 4 , o qual foi significativamente maior quando comparado à do controle ($p < 0,05$). A suplementação com óleo de peixe (DOP) ou gordura de coco (DGC) não tiveram efeito sobre a glicemia, a qual se manteve similar à do grupo diabético não suplementado (D), mas foram significativamente maiores quando comparadas às dos animais não diabéticos suplementados OP e GC, respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 11).

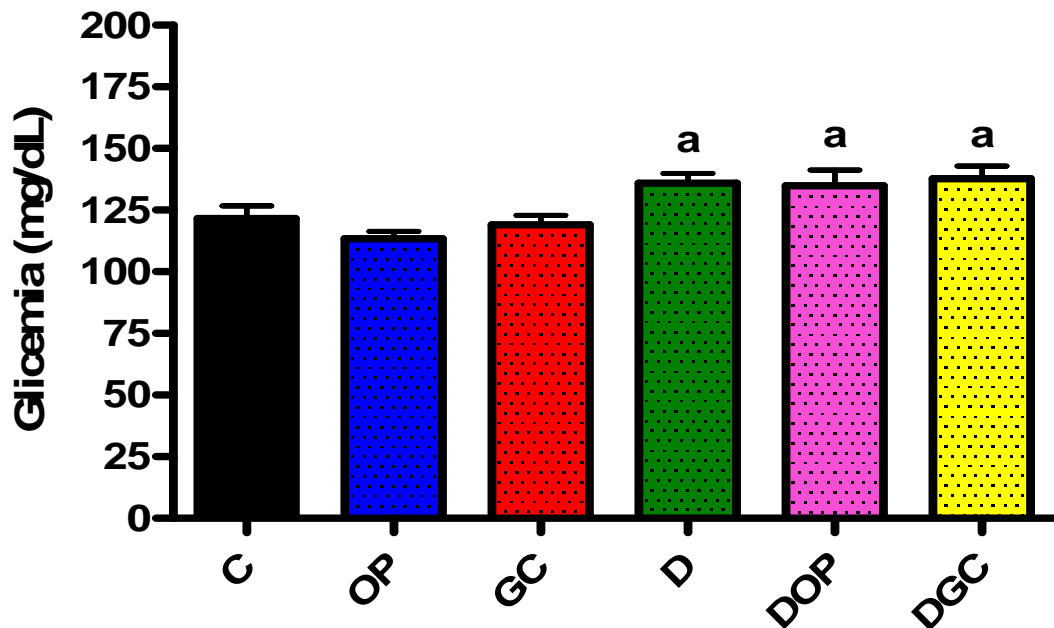


Figura 11 – Concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL) em jejum dos grupos controle (C) (n=22), suplementado com óleo de peixe (OP) (n= 23) ou suplementado com gordura de coco (GC) (n=20), diabético (D) (n=25), diabético suplementado com óleo de peixe (n=19) e diabético suplementado com gordura de coco (DGC) (n=21) após seis semanas de suplementação. Valores estão expressos como média ± EPM de cinco experimentos.

^a $p < 0,05$ quando comparado com os animais não diabéticos

C	OP	GC	D	DOP	DGC
122 ± 5	113 ± 3	119 ± 4	136 ± 4 ^a	134 ± 6 ^a	138 ± 5 ^a

A concentração plasmática de triacilglicerol (mg/dL) está apresentada na figura 12. No grupo controle foi de $39,9 \pm 3,6$. A suplementação com óleo de peixe não alterou este parâmetro ($p > 0,05$ vs C), contudo a gordura de coco elevou a triacilglicerolemia para $50 \pm 3,4$, o qual foi significativamente maior quando comparada com à do C e OP ($p < 0,05$). O diabetes elevou a triacilglicerolemia para 54 ± 4 , valor

próximo ao encontrado no grupo suplementado com gordura de coco, o qual foi maior que o do grupo controle ($p < 0,05$). A suplementação com óleo de peixe no grupo diabético reduziu o triacilglicerol plasmático, porém este valor não foi significativamente diferente quando comparado com os dos grupos OP e D ($p > 0,05$). Interessantemente, o mesmo foi observado com a suplementação com gordura de coco ($p > 0,05$ vs GC e D)

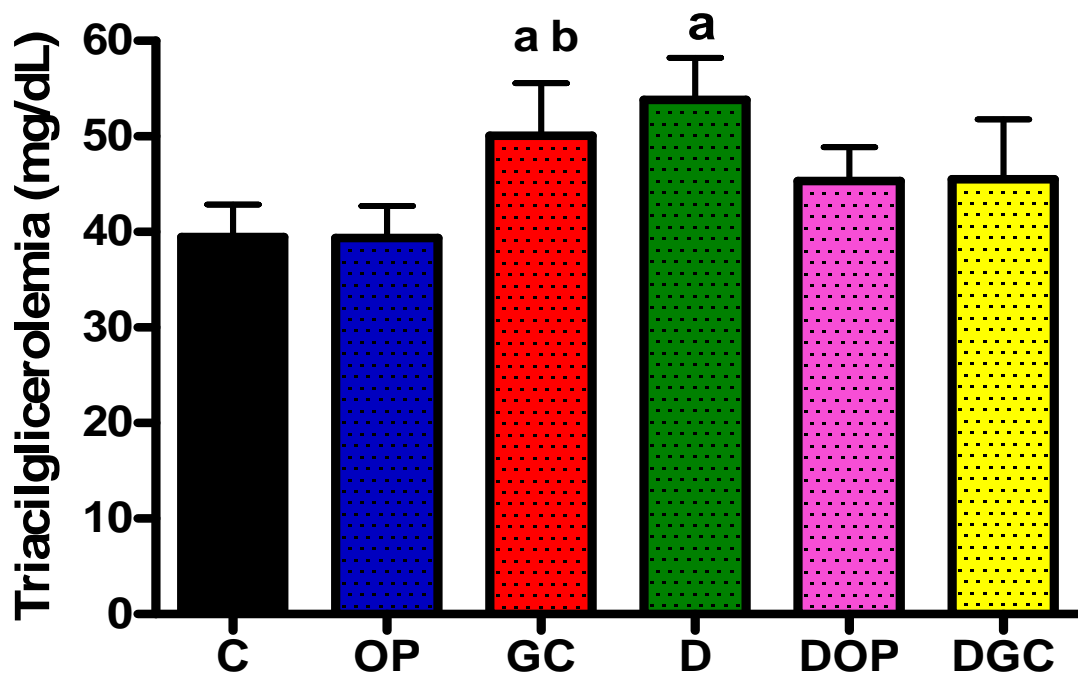


Figura 12 – Concentrações plasmáticas de triacilglicerol (mg/dL) em jejum dos grupos controle (C) (n=17), suplementado com óleo de peixe (OP) (n= 18), suplementado com gordura de coco (GC) (n=18), diabético (D) (n=16), diabético suplementado com óleo de peixe (n=13) e diabético suplementado com gordura de coco (DGC) (n=16) após seis semanas de suplementação. Valores estão expressos como média \pm EPM de cinco experimentos.

^a $p < 0,05$ quando comparado ao C.

^b $p < 0,05$ quando comparado ao OP.

C	OP	GC	D	DOP	DGC
39,9 \pm 3,6	39,4 \pm 3,3	50 \pm 3,4 ^{ab}	54 \pm 4,4 ^a	45,3 \pm 3,6	45,5 \pm 6,3

A concentração de colesterol (mg/dL) no grupo controle foi de $49,5 \pm 1,9$. A suplementação com óleo de peixe (OP) reduziu a colesterolemia para $41,5 \pm 2,7$, a qual foi menor significativamente ($p < 0,05$). Por outro lado, a suplementação com gordura de coco (GC) não alterou este parâmetro, sendo similar à do grupo C ($p > 0,05$). A indução do diabetes elevou a colesterolemia para $58,8 \pm 3,6$, valor significativo quando comparado ao do grupo C ($p < 0,05$). Nem a suplementação com óleo de peixe (DOP) ou gordura de coco (DGC) foi capaz de reduzir a maior colesterolemia induzida pelo diabetes, sendo similares à do grupo D ($p < 0,05$) (Figura 13).

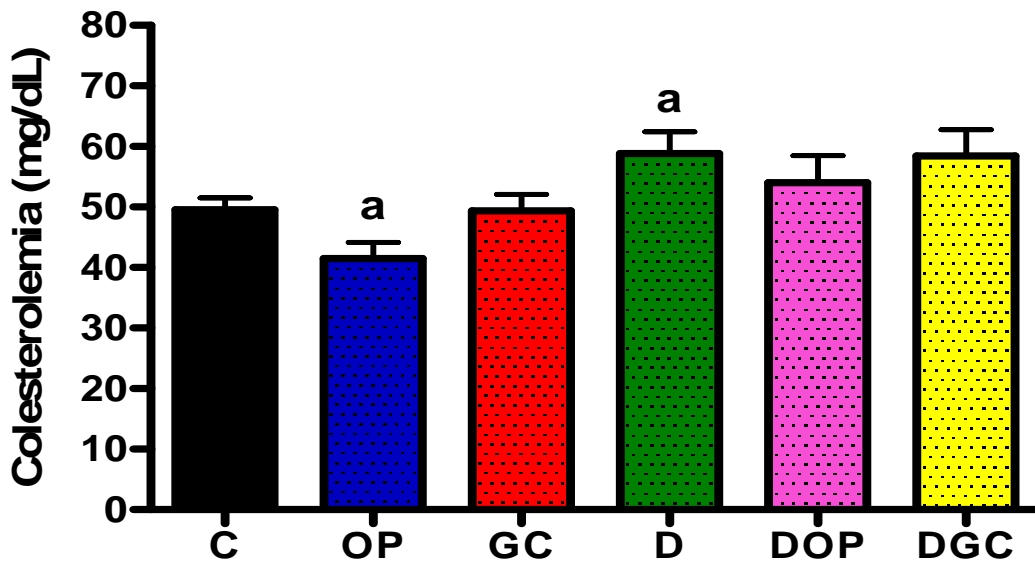


Figura 13 – Concentrações plasmáticas de colesterol (mg/dL), em jejum, dos grupos controle (C) (n=12), suplementado com óleo de peixe (OP) (n= 15), suplementado com gordura de coco (GC) (n=13), diabético (D) (n=11), diabético suplementado com óleo de peixe (DOP) (n=9) e diabético suplementado com gordura de coco (DGC) (n=7). Valores estão expressos como média ± EPM de três experimentos.

^a $p < 0,05$ quando comparado ao C

C	OP	GC	D	DOP	DGC
49,5 ± 1,9	41,5 ± 2,7 ^a	49,4 ± 2,6	58,8 ± 3,6 ^a	54 ± 4,5	58,4 ± 4,3

5.2.5 Metabolismo da glicose no músculo esquelético dos ratos

5.2.5.1 Produção de lactato pelo músculo esquelético

Na Figura 14 estão apresentados os resultados da produção de lactato pelos músculos sóleos incubados na ausência e presença de insulina (100 $\mu\text{U}/\text{mL}$ ou 10000 $\mu\text{U}/\text{mL}$) dos grupos não diabéticos.

Na ausência de insulina (basal), a produção de lactato a partir da glicose, foi aproximadamente 15 $\mu\text{mol}/\text{h}/\text{g}$ de tecido ($p>0,05$) nos grupos C, OP e GC. A adição de 100 $\mu\text{U}/\text{mL}$ de insulina, aumentou a produção para aproximadamente 20 $\mu\text{mol}/\text{h}/\text{g}$ de tecido ($p>0,05$) nos três grupos. Na resposta máxima à insulina (10.000 $\mu\text{U}/\text{mL}$), a produção de lactato foi de 31, 28 e 26 $\mu\text{mol}/\text{h}/\text{g}$ de tecido, respectivamente para o grupos C, OP e GC. A produção de lactato pelo músculo sóleo foi significativamente menor quando comparado ao do grupo C ($p<0,01$).

A produção de lactato pelos músculos sóleos incubados na ausência e presença de insulina dos grupos C e D está apresentada na Figura 15. A produção basal foi de 14 $\mu\text{mol}/\text{h}/\text{g}$ de tecido para ambos os grupos ($p>0,05$). O estímulo com 100 $\mu\text{U}/\text{mL}$ de insulina aumentou a produção de lactato para 21 e 15 $\mu\text{mol}/\text{h}/\text{g}$ de tecido ($p<0,05$) e a adição de 10.000 $\mu\text{U}/\text{mL}$ de insulina incrementou a produção de lactato para 31 e 24 $\mu\text{mol}/\text{h}/\text{g}$ de tecido ($p<0,05$), respectivamente. Os músculos do grupo D apresentaram menor produção de lactato em relação à do controle ($p<0,05$), quando estimulados com insulina.

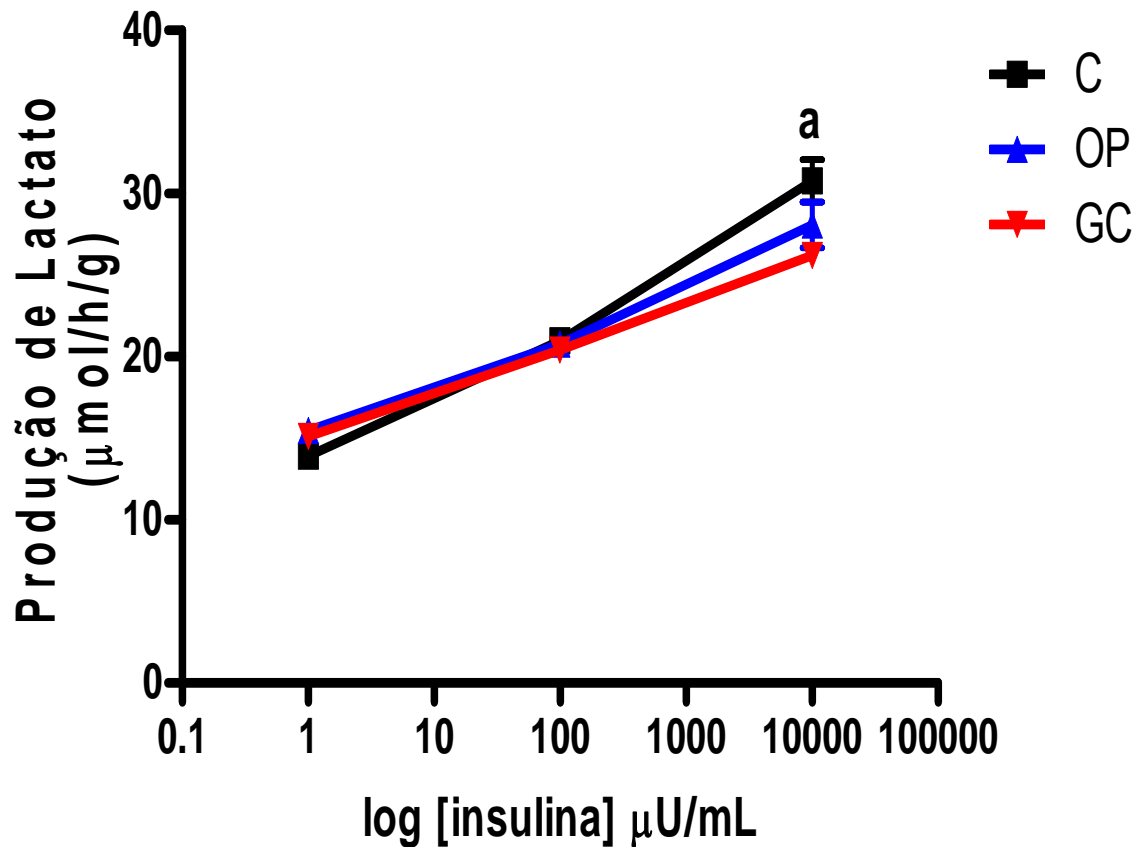


Figura 14 - Produção de lactato pelos músculos sóleos incubados dos ratos controle (C) e suplementado com óleo de peixe (OP) e suplementado com gordura de coco (GC) na ausência e presença de 100 $\mu\text{U/mL}$, 10000 $\mu\text{U/mL}$ de insulina. Valores estão expressos como média \pm EPM de oito experimentos.

^a $p < 0,01$ quando comparado ao C

Grupos	Insulina		
	Ausência	100 $\mu\text{U/mL}$	10000 $\mu\text{U/mL}$
C	14 \pm 0,56 (n=16)	21 \pm 0,45 (n=10)	31 \pm 1,3 (n=8)
OP	15 \pm 0,55 (n=14)	21 \pm 0,35 (n=9)	28 \pm 1,4 (n=11)
GC	15 \pm 0,74 (n=7)	20 \pm 0,51 (n=11)	26 \pm 0,66 (n=7) ^a

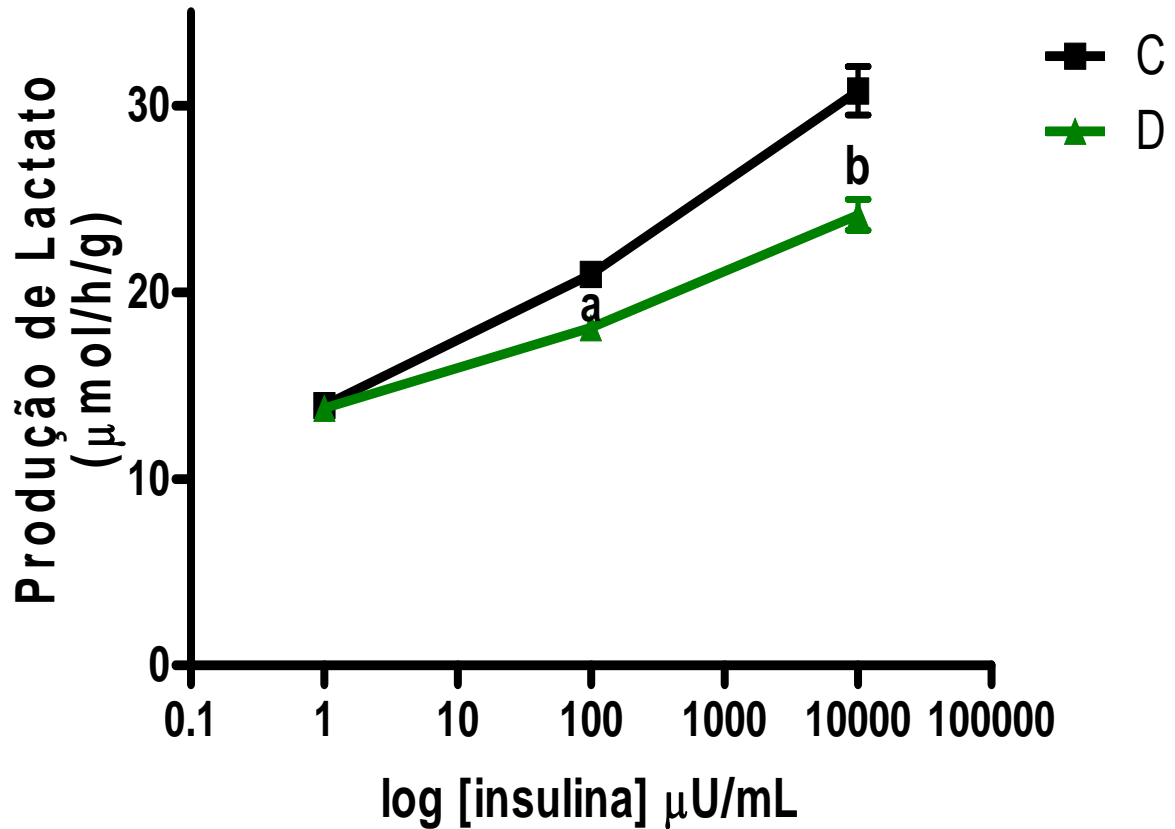


Figura 15 - Produção de lactato pelos músculos sóleos incubados dos ratos controle (C) e diabético (D) na ausência e presença de 100 µU/mL e 10000 µU/mL de insulina. Valores estão expressos como média ± EPM de oito experimentos.

^a $p < 0,05$ quando comparado ao C

^b $p < 0,01$ quando comparado ao C

Grupos	Insulina		
	Ausência	100 µU/mL	10000µU/mL
C	14 ± 0.56 (n=16)	21 ± 0,45 (n=10)	31 ± 1,3 (n=8)
D	14 ± 0,62 (n=11)	18 ± 0,25 (n=7) ^a	24 ± 0,83 (n=9) ^b

Os resultados da produção de lactato pelos músculos dos grupos D, DOP e DGC encontram-se na Figura 16. A produção basal de lactato nos grupos D, DOP e DGC foi aproximadamente 15 $\mu\text{mol/h/g}$ de tecido ($p>0,05$). Os músculos sóleos estimulados com 100 $\mu\text{U/mL}$ de insulina produziram mais lactato quando comparados com o estímulo basal. O músculo do grupo D produziu 18 $\mu\text{mol/h/g}$ de tecido e do grupo DGC aumentou a produção para 19 $\mu\text{mol/h/g}$, valor não diferente do grupo D ($p>0,05$). Os músculos do grupo DOP incrementaram a produção para 21 $\mu\text{mol/h/g}$ de tecido, valor significativamente maior quando comparado com o do D e DGC ($p<0,05$). Com o estímulo máximo de insulina (10000 $\mu\text{U/mL}$), não houve diferença na produção de lactato entre os grupos D, DOP e DGC ($p<0,05$), sendo os valores, respectivamente, 24, 26 e 24 $\mu\text{mol/h/g}$ de tecido.

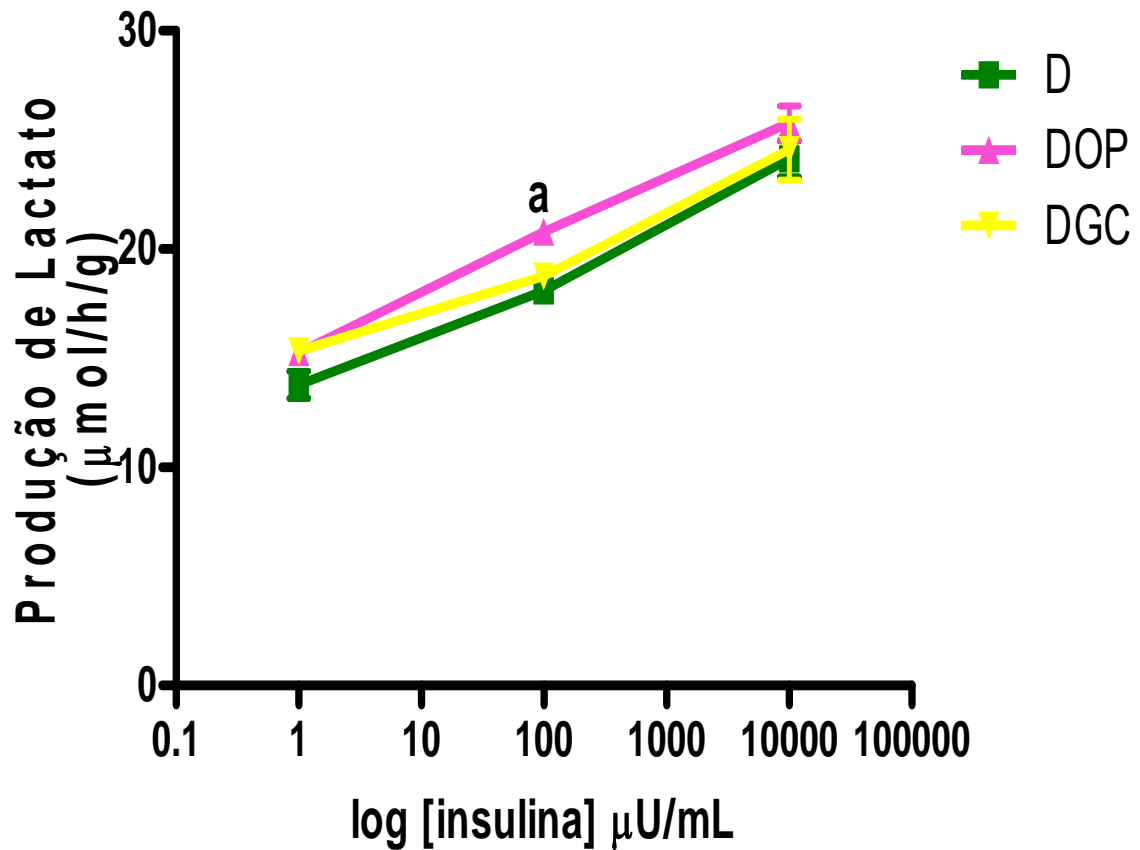


Figura 16 - Produção de lactato pelos músculos sóleos incubados dos ratos diabético (D), diabético suplementado com óleo de peixe (DOP) e diabético suplementado com gordura de coco (DGC) na ausência e presença de 100 µU/mL e 10000 µU/mL de insulina. Valores estão expressos como média ± EPM de oito experimentos.

^a $p < 0,05$ quando comparado ao D e DGC

Grupos	Insulina		
	Ausência	100 µU/mL	10000µU/mL
D	14 ± 0,62 (n=11)	18 ± 0,25 (n=7)	24 ± 0,83 (n=9)
DOP	15 ± 0,48 (n=14)	21 ± 0,59 (n=9) ^a	26 ± 0,78 (n=13)
DGC	15 ± 0,52 (n=12)	19 ± 0,44 (n=13)	24 ± 1,4 (n=8)

5.2.3.2 Síntese de [U-¹⁴C]-glicogênio a partir de [U-¹⁴C]-D-glicose pelo músculo esquelético

Na Figura 17 estão os resultados da síntese de [U-¹⁴C]-glicogênio ($\mu\text{mol/h/g}$ tecido) a partir de [U-¹⁴C]-D-glicose pelos músculos sóleos incubados na ausência ou presença de insulina (100 $\mu\text{U/mL}$ ou 10000 $\mu\text{U/mL}$), dos grupos não diabéticos.

Na ausência de insulina, a síntese de [U-¹⁴C]-glicogênio a partir de [U-¹⁴C]-D-glicose nos grupos C, OP e GC foi aproximadamente de 0,14 $\mu\text{mol/h/g}$ de tecido ($p>0,05$), respectivamente. A adição de 100 $\mu\text{U/mL}$ de insulina, aumentou a produção dos grupos C e OP para 0,33 e 0,29 $\mu\text{mol/h/g}$ de tecido ($p>0,05$). Para o grupo GC, a produção foi incrementada para 0,20 $\mu\text{mol/h/g}$ de tecido, sendo esta significativamente menor em relação à dos grupos C e OP ($p<0,05$). Na resposta máxima à insulina (10.000 $\mu\text{U/mL}$), a síntese de [U-¹⁴C]-glicogênio foi 0,67, 0,63 e 0,5 $\mu\text{mol/h/g}$ de tecido, respectivamente para o grupos C, OP e GC. O resultado encontrado no grupo GC foi significativamente menor quando comparado ao do grupo C ($p<0,05$).

A síntese de [U-¹⁴C]-glicogênio dos músculos sóleos incubados na ausência ou presença de insulina dos grupos C e D está apresentada na Figura 18. A síntese de [U-¹⁴C]-glicogênio basal foi de 0,14 e 0,12 $\mu\text{mol/h/g}$ de tecido para os grupos C e D, respectivamente ($p>0,05$). O estímulo com 100 $\mu\text{U/mL}$ de insulina aumentou a produção de glicogênio para ambos os grupos. Para o C, a síntese de glicogênio foi de 0,33 $\mu\text{mol/h/g}$ de tecido e no grupo D 0,18 $\mu\text{mol/h/g}$ de tecido, valor significativamente menor comparado com o grupo C ($p<0,05$). A presença de 10.000 $\mu\text{U/mL}$ de insulina incrementou a síntese de [U-¹⁴C]-glicogênio para 0,67 e 0,58 $\mu\text{mol/h/g}$ de tecido, respectivamente para os grupos C e D, sem diferença significativa ($p>0,05$).

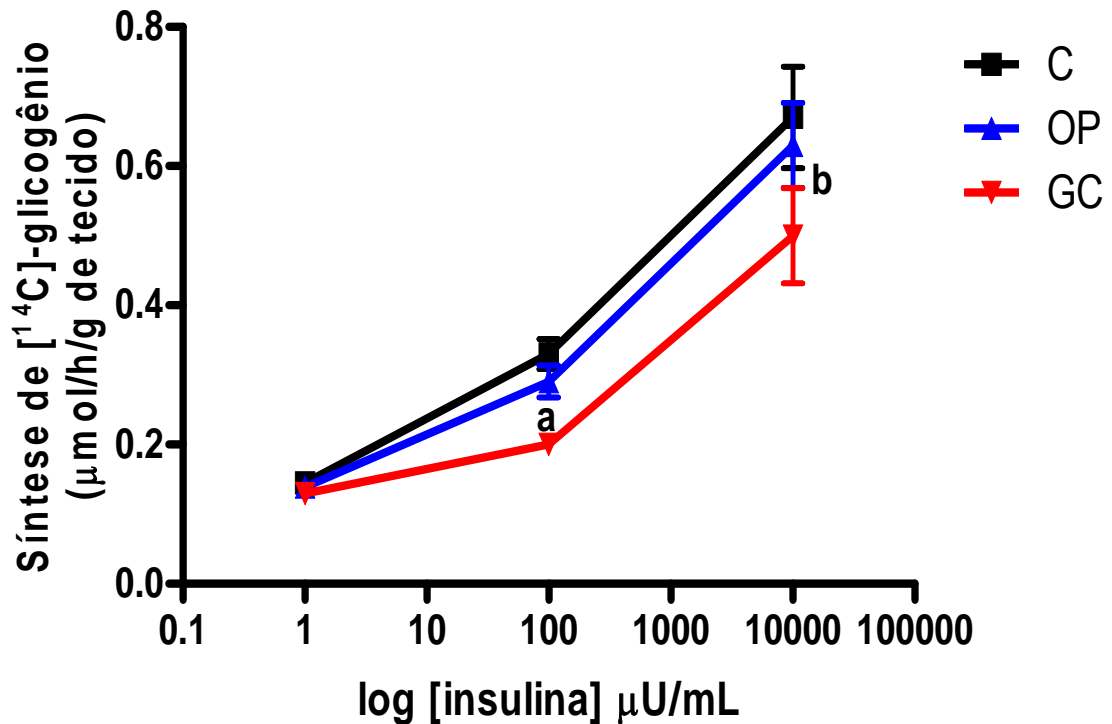


Figura 17 - Síntese de glicogênio a partir de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -D-glicose pelos músculos sóleos incubados dos ratos controle (C) e suplementado com óleo (OP) de peixe e suplementado com gordura de coco (GC) na ausência e na presença de 100 $\mu\text{U/mL}$, 10000 $\mu\text{U/mL}$ de insulina. Valores estão expressos como média \pm EPM de oito experimentos.

^a $p < 0,05$ quando comparado ao C e OP

^b $p < 0,05$ quando comparado ao C

Grupos	Ausência	insulina	
		100 $\mu\text{U/mL}$	10000 $\mu\text{U/mL}$
C	0.14 \pm 0.01 (n=17)	0.33 \pm 0.02 (n=8)	0.67 \pm 0.07 (n=13)
OP	0.14 \pm 0.01 (n=12)	0.29 \pm 0.02 (n=9)	0.63 \pm 0.06 (n=13)
GC	0.13 \pm 0.011 (n=8)	0.20 \pm 0.015 (n=7) ^a	0.5 \pm 0,07 (n=14) ^b

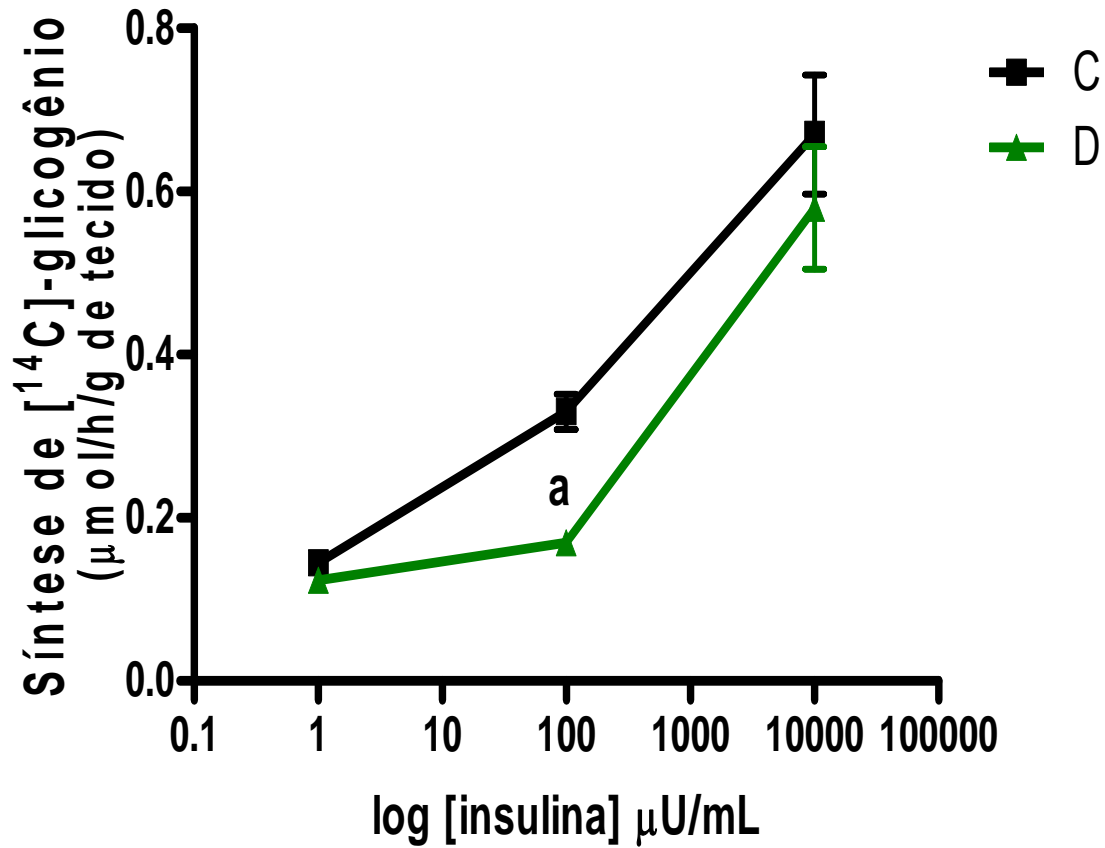


Figura 18 - Síntese de glicogênio a partir de $[U\text{-}^{14}\text{C}]$ -D-glicose pelos músculos sóleos incubados dos ratos controle (C) e diabético (D) na ausência e presença de 100 $\mu\text{U/mL}$, 10000 $\mu\text{U/mL}$ de insulina. Valores expressos como média \pm EPM de oito experimentos.

^a $p < 0,001$ quando comparado ao C

Grupos	insulina		
	Ausência	100 $\mu\text{U/mL}$	10000 $\mu\text{U/mL}$
C	0.14 \pm 0.01 (n=17)	0.33 \pm 0.02 (n=8)	0.67 \pm 0.07 (n=13)
D	0.12 \pm 0.01 (n=12)	0.18 \pm 0.01 (n=13) ^a	0.58 \pm 0.07 (n=16)

Na figura 19 estão os resultados da síntese de glicogênio a partir de [U-¹⁴C]-D-glicose pelos músculos sóleos dos ratos dos grupos D, DOP e DGC.

A síntese basal de glicogênio pelo músculos sóleos dos ratos dos grupos D, DOP e DGC foi respectivamente, 0,12, 0,13, 0,13 $\mu\text{mol/h/g}$ de tecido ($p>0,05$). Os músculos sóleos estimulados com 100 $\mu\text{U/mL}$ de insulina incrementaram a produção de glicogênio para 0,18, 0,20 e 0,21 $\mu\text{mol/h/g}$ de tecido, respectivamente ($p>0,05$). Com o estímulo máximo de insulina (10.000 $\mu\text{U/mL}$), os músculos incubados produziram 0,58, 0,59, 0,54 $\mu\text{mol/h/g}$ de tecido, para os mesmos grupos. A síntese de glicogênio não foi significativamente diferente em ambas concentrações de insulina investigadas ($p>0,05$).

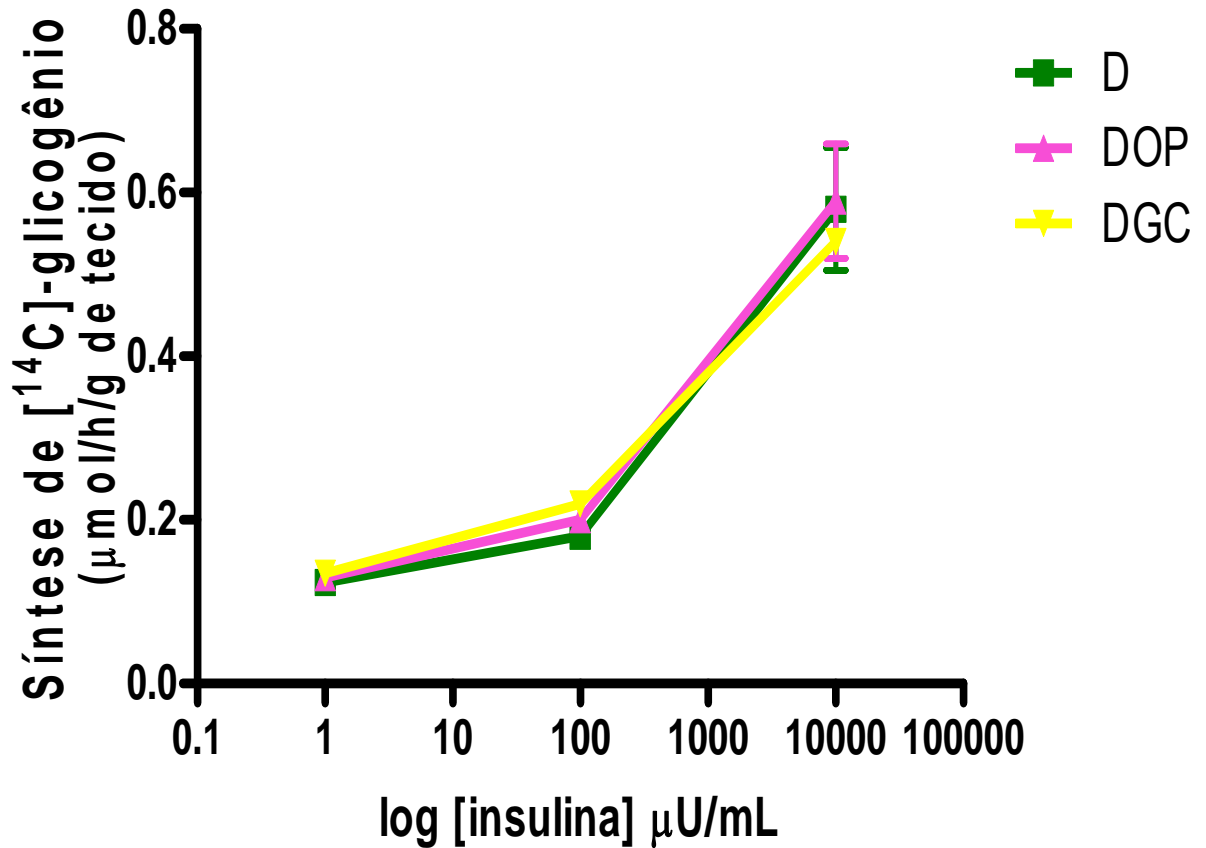


Figura 19 - Síntese de glicogênio a partir de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -D-glicose pelos músculos sóleos incubados dos ratos diabético (D), diabético suplementado com óleo de peixe (DOP) e diabético suplementado com gordura de coco (DGC) na ausência e na presença de 100 $\mu\text{U/mL}$, 10000 $\mu\text{U/mL}$ de insulina. Valores estão expressos como média \pm EPM de oito experimentos.

Grupos	insulina		
	Ausência	100 $\mu\text{U/mL}$	10000 $\mu\text{U/mL}$
D	0.12 \pm 0.008 (n=12)	0.18 \pm 0.01 (n=13)	0.58 \pm 0.075 (n=16)
DOP	0.13 \pm 0.006 (n=11)	0.20 \pm 0.012 (n=8)	0.59 \pm 0.07 (n=10)
DGC	0.13 \pm 0.006 (n=13)	0.21 \pm 0.01 (n=9)	0.54 \pm 0.005 (n=14)

5.2.4 Expressão das proteínas IR β e Akt no músculo sóleo

Na figura 20 está apresentada a expressão da proteína IR β do músculo sóleo dos animais controles e diabéticos que receberam ou não a suplementação com óleo de peixe ou gordura de coco. Não houve diferença estatística na expressão da proteína IR β entre os grupos ($p > 0,05$).

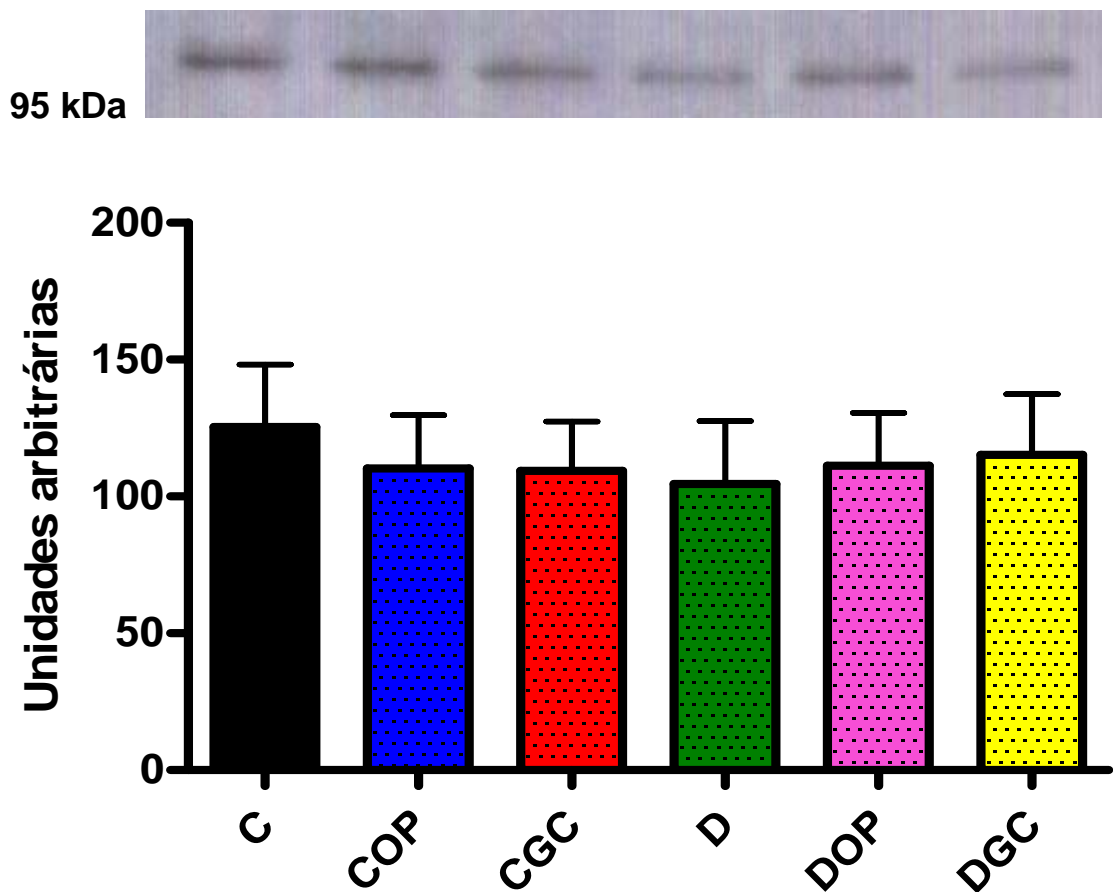


Figura 20 – Expressão da proteína IR β no músculo sóleo dos ratos dos grupos controle (C), suplementado com óleo de peixe (OP), suplementado com gordura de coco (GC), diabético (D), diabético suplementado com óleo de peixe (DOP) e diabético suplementado com gordura de coco (DGC). Os valores estão apresentados em unidades arbitrárias da média \pm EPM de 3 experimentos.

A expressão da proteína Akt no músculo sóleo de todos os grupos está apresentada na figura 21.

A expressão desta proteína não foi diferente no grupo não diabético suplementado com óleo de peixe (OP) quando comparado com o controle ($p > 0,05$). Em contrapartida, a gordura de coco reduziu em 26,9% a expressão da Akt nos ratos não diabéticos, sendo significativamente menor que a do controle e suplementados com óleo de peixe ($p < 0,05$). O quadro diabético também reduziu significativamente a expressão da Akt (34,3%) quando comparado à do grupo C ($p < 0,05$). A suplementação com óleo de peixe e gordura de coco não alterou a redução da expressão da Akt induzida pelo diabetes.

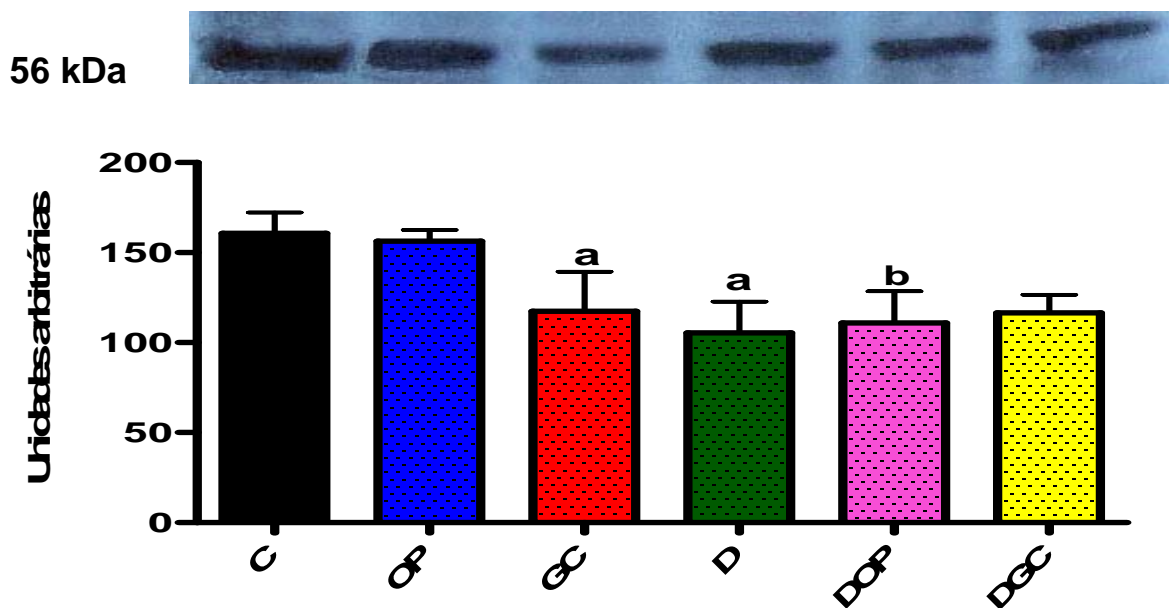


Figura 21 – Expressão da proteína Akt no músculo sóleo dos ratos dos grupos controle (C), suplementado com óleo de peixe (OP), suplementado com gordura de coco (GC), diabético (D), diabético suplementado com óleo de peixe e diabético suplementado com gordura de coco (DGC). Os dados estão apresentados em unidades arbitrárias como média \pm EPM de 3 experimentos.

^a $p < 0,05$ quando comparado com o grupo C

^b $p < 0,05$ quando comparado com o grupo OP

6 DISCUSSÃO

O diabetes mellitus é um problema de saúde mundial, sendo a forma mais prevalente da doença o diabetes tipo II (ASHOKKUMAR & PARI, 2005).

Entre os vários modelos animais de diabetes tipo II, existem os genéticos, induzidos por drogas ou pela alteração da dieta, contudo nenhum destes simula, exatamente, o quadro de diabetes tipo II encontrado nos humanos (ARULMOZHI et al, 2004).

A indução do quadro de diabetes pela STZ é amplamente utilizada para se estudar a fisiopatologia desta síndrome. Em animais adultos, a estreptozotocina induz o quadro severo do diabetes com a necessidade da administração de insulina para que o animal sobreviva por um longo tempo. Quando a indução do diabetes pela estreptozotocina ocorre na fase neonatal, o processo é lento, inicialmente com poucos sintomas e é considerado um bom modelo de diabetes tipo II (TAKADA et al, 2007).

Em nosso estudo, o diabetes mellitus experimental utilizado foi o modelo de diabetes tipo II. A indução foi realizada pela injeção intraperitoneal de estreptozotocina em ratos wistar no período neonatal (ASHOKKUMAR & PARI, 2005) e após a 10^o semana da indução do diabetes tipo II, a instalação da doença foi testada. Os ratos do grupo diabético apresentaram hiperglicemia em relação ao grupo controle (Figura 6). Vários estudos mostraram que ratos que receberam injeção i.p. de estreptozotocina apresentam hiperglicemia moderada (ANGEL et al., 1996; ARULMOZHI et al, 2004). O IGTT confirmou o estado de intolerância à glicose no grupo D, indicando a instalação do quadro diabético nestes animais, uma vez que a glicemia do grupo diabético não retornou a concentração basal como observado no grupo controle (Figura 7). A falta de insulina ou a resistência periférica à insulina poderia justificar o resultado encontrado no IGTT e a hiperglicemia. Desta forma, a mensuração da insulinemia em jejum e durante o IGTT e o ITT foram realizados.

Sabe-se que a exposição das células β -pancreáticas à glicose resulta em padrão bifásico da secreção de insulina. A resposta inicial à glicose é caracterizada pelo aumento na secreção de insulina seguida do declínio próxima da concentração

basal. A fase inicial rápida da secreção de insulina parece ocorrer pela liberação do conteúdo nos grânulos secretórios próximos da membrana plasmática da célula β . Já a exposição prolongada à glicose provoca a produção de nova insulina para controlar a glicemia (PRATLEY & WEYER, 2001).

Os ratos diabéticos apresentaram baixa insulinemia em jejum (Figura 8). Quando injetado glicose via i.p, estes animais apresentaram menor concentração plasmática de insulina em relação ao grupo controle nos tempos trinta e sessenta minutos e ainda após trinta minutos da i.p, a insulinemia dos diabéticos foi menor quando comparado com o tempo zero e após uma hora tendeu a retornar a concentração basal (Figura 9). Com isso, podemos sugerir que a primeira fase da secreção de insulina pelas células β pancreáticas dos ratos diabéticos estava reduzida trinta minutos após a i.p de glicose (Figura 9), contribuindo para a alta glicemia encontrada no IGTT (Figura 7) e após uma hora da carga de glicose, a insulina começou a ser produzida, mas a glicemia no IGTT não retornou à concentração de glicose próxima à basal como observado no grupo controle (Figura 7).

Tanto a baixa insulinemia quanto a possível alteração da secreção e produção da insulina pelas células β pancreáticas na presença de glicose podem ter contribuído para a hiperglicemia e para a redução na tolerância à glicose no grupo diabético, no entanto para confirmar a alteração na secreção de insulina seria necessário mensurar diretamente este parâmetro frente à glicose nas células β pancreáticas.

O ITT é um método simples, razoavelmente exato e rápido para determinação da resistência à insulina (MURALI et al., 2002). A injeção em bolo, de insulina via intravenosa, promove a queda da glicose, devido à supressão da produção hepática de glicose e pelo estímulo à captação de glicose pelos tecidos sensíveis à insulina (GELONEZE & TAMBASCIA, 2006). Neste teste, a sensibilidade à insulina é calculada usando a constante do desaparecimento da glicose (K_{itt}). O K_{itt} é calculado a partir dos valores de glicemia do ITT e corresponde à queda da glicose expressa em porcentagem por minuto, assim quanto maior o K_{itt} maior a sensibilidade à insulina. (FURUYA et al, 2005; GELONEZE e TAMBASCIA, 2006; MURALI et al, 2002).

Em nosso estudo, o K_{itt} mostrou que o grupo diabético estava resistente à insulina quando comparado com o grupo controle. Murali (2002) mostrou que ratos diabetizados com STZ, no período neonatal, apresentavam K_{itt} menor que os animais não diabetizados, ou seja, resistência à insulina. Em resumo, nossos dados mostraram que os ratos apresentaram hiperglicemia, menor tolerância à glicose, secreção reduzida da insulina na presença de glicose, baixa insulinemia e menor K_{itt} em relação ao grupo controle, confirmando então o quadro diabético. A injeção de STZ, em ratos neonatos, foi mostrada ser capaz de induzir a redução da secreção de insulina induzida pela glicose, hiperglicemia moderada em jejum, intolerância oral à glicose e resistência moderada à insulina (ANGEL et al., 1996). Nossos achados corroboram aos encontrados neste estudo.

O lento processo do desenvolvimento da hiperglicemia, da intolerância à glicose e moderada hipoinsulinemia são características que podem se assemelhar ao diabetes mellitus tipo II em humanos. A indução do diabetes no período neonatal pode destruir progressivamente, mas não totalmente, as células β pancreáticas, mimetizando a situação encontrada em pacientes diabéticos. Neste modelo animal de diabetes, os ratos apresentaram redução no conteúdo de insulina pancreática, provavelmente em decorrência da exaustão das células β pancreáticas pelo aumento inicial da secreção de insulina na tentativa de superar a resistência periférica à insulina. Os autores relataram também hiperinsulinemia nos ratos diabéticos, mas sugeriram ser um estado transitório que levaria a incapacidade das células β pancreáticas em secretar insulina (TAKADA et al., 2007). Outros estudos divergem em relação à insulinemia basal. Nossos resultados corroboram com os de Angel (1996) e Ashokkumar & Pari (2005) que relataram insulinemia, em ratos diabéticos, significativamente menor que a dos não diabéticos. Murali (2002) também relatou que ratos diabéticos estavam hiperinsulinêmicos em relação aos não diabéticos. A possível explicação para estes achados deve-se a abordagem utilizada, como por exemplo a dose de STZ e o dia escolhido após o nascimento para a indução. Dependendo da dose de STZ e do dia da injeção i.p., o modelo de diabetes neonatal, induzido por STZ, exibe vários estágios do

diabetes tipo II, como alteração na tolerância à glicose e aumento moderado ou severo da glicemia (ARULMOZHI, 2004).

Geralmente, a resistência à insulina é forte indicador do diabetes tipo II e pode ser acompanhada por concentrações elevadas de insulina no plasma (AVRAMOGLU et al., 2006). Atualmente, está cada vez mais claro que tanto o diabetes tipo I quanto o diabetes tipo II são desordens heterogêneas. Defeitos na secreção e ação da insulina estão presentes em ambos os diabetes, tipo I e II (ASHOKKUMAR & PARI, 2005). Sendo assim, o diabetes tipo II é uma doença crônica heterogênea caracterizada por hiperglicemia, resultado da resistência à insulina e da deficiência secundária à insulina pela falência das células β pancreáticas (TAKADA et al., 2007). Portanto, as características encontradas nos animais deste estudo mostram um quadro típico de diabetes tipo II.

Após caracterizar a instalação do quadro de diabetes nos ratos Wistar, os animais foram suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco por seis semanas consecutivas. O aumento da incidência do diabetes tipo II está diretamente relacionado com mudanças no estilo de vida, como o sedentarismo e dietas com alta proporção de carboidratos refinados e gorduras, principalmente saturadas e trans. Em contradição, é observado que em populações que consomem grande quantidade de gordura poliinsaturada do tipo ômega 3, a prevalência de doenças cardiovasculares, diabetes tipo II e intolerância à glicose é pequena. Além disso, muitos estudos mostram o efeito preventivo e protetivo dos ácidos graxo n-3 no distúrbio do diabetes. Com isso, investigamos se a suplementação com óleo peixe e gordura saturada alterava o quadro diabético descrito acima.

Os ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico são os dois principais ácidos graxos ômega 3 encontrados no óleo peixe e possuem efeitos sobre os lipídeos séricos e lipoproteínas (GRIMSGAARD et al., 1997; MORI et al., 2000A), glicose sérica, pressão arterial (MORI et al. 1999; GRIMSGAARD et al., 1998) e função endotelial (MORI et al., 2000B).

Estudos experimentais em humanos apresentaram resultados controversos em relação ao efeito dos ácidos graxos n-3 sobre a glicemia (MORI et al.,

1999), sendo que alguns autores mostraram efeitos deletérios sobre o controle glicêmico (BORKMAN et al. 1989; FRIDAY et al., 1989; MOSTAD et al. 2006; WOODMAN et al., 2007), porém estes efeitos foram atribuídos à alta (acima 4g/dia) dose de ácidos graxos n-3 (FRIDAY et al., 1989; BORKMAN et al. 1989; MOSTAD et al. 2006). Em contrapartida, outros estudos mostraram que a suplementação com ácidos graxos n-3 em doses moderadas (2 à 3 g/dia) não modificaram a glicemia dos indivíduos (MORGAN et al.,1995, SIRTORI et al.,1998, LUO et al., 1998; FRIEDBERG et al., 1998; MONTORI et al.,2000; KABIR et al., 2007) e foram efetivas em reduzir a concentração de triacilglicerol, ou seja, o efeito sobre os lipídeos foi positivo sem nenhum efeito adverso sobre o controle da glicemia (FRIEDBERG et al., 1998; MONTORI et al.,2000; KABIR et al., 2007). No nosso estudo, corroborando estes autores, a glicose plasmática em jejum obtida após o período experimental não mostrou diferença estatística entre os grupos diabéticos (Figura 11). Porém, estes dados mostraram hiperglicemia após o período de suplementação, confirmando a manutenção do quadro de diabetes encontrado inicialmente.

O IGTT (Figura 10), realizado após seis semanas de suplementação, mostrou que a glicemia, trinta minutos após a carga de glicose, dos grupos D e DGC foi significativamente maior do que a do controle ($p < 0,05$), porém os ratos diabéticos que receberam óleo de peixe não apresentaram aumento significativo na concentração plasmática de glicose comparada à do controle ($p > 0,05$). No entanto, após 60 e 90 minutos do i.p. de glicose a glicemia de todos os diabéticos suplementados ou não ficou significativamente elevada em relação ao controle ($p < 0,05$). Com isso, a secreção inicial da glicose nos ratos diabéticos suplementados com óleo de peixe parece mais eficiente do que nos ratos diabéticos que receberam ou não gordura de coco. É fato que os ácidos graxos n-3 presentes no óleo se incorporam na membrana plasmática das células, alterando a fluidez, podendo modificar a função de proteínas inseridas na membrana, como os transportadores de glicose, neste caso o GLUT-2 ou proteínas canais envolvidas na secreção de insulina. Assim, estes animais podem ter secretado insulina presente nos grânulos mais rapidamente do que os animais não tratados ou suplementados com gordura de coco. Ao analisarmos o que aconteceu aos sessenta e

noventa minutos após a injeção i.p. de glicose, a produção de nova insulina no grupo DOP não foi modificada em relação aos grupos D e DGC, uma vez que as células β -pancreáticas estavam parcialmente destruídas em todos os animais diabéticos. Assim, parece que temos um efeito facilitador na primeira fase de secreção da insulina, mas não na segunda fase.

Além da hiperglicemia e intolerância à glicose, o diabetes mellitus tipo II está frequentemente associado com o metabolismo anormal de lipídeos com elevação de triacilgliceróis e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), fatores de alto risco para doenças cardiovasculares nos pacientes diabéticos (PATTI, et al., 1999). O diabetes provoca aumento da lipólise contribuindo para hiperlipidemia (BAKER & GIBBONS, 2000; PARI & ASHOKKUMAR, 2005). Em geral, as alterações no metabolismo das lipoproteínas contendo apo B-100, incluindo VLDL, IDL (lipoproteína de densidade intermediária) e LDL são anormalidades encontradas no diabetes (BAKER & GIBBONS, 2000).

A maior concentração dos lipídeos plasmáticos é influenciada pelo aumento do triacilglicerol na lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) secretada pelo fígado. O efeito inibitório da insulina *in vivo* sobre a VLDL rica em triacilglicerol é em parte pela supressão do fluxo de ácidos graxos não esterificados do tecido adiposo para o fígado, reduzindo a disponibilidade do substrato para a produção do triacilglicerol e também foi mostrado um efeito inibitório direto sobre a secreção de VLDL e ApoB, independente da quantidade de precursores do triacilglicerol no fígado (BAKER & GIBBONS, 2000). Ainda, a resistência à insulina reduz a atividade e a expressão do receptor de LDL e aumenta a via da biossíntese de colesterol hepático (CHAN et al., 2002). Esta via possui uma enzima limitante chamada 3-hidroxi-3-metil coenzima (HMG-CoA) redutase que está fortemente associada com a taxa de síntese do colesterol no fígado (SMIT et al., 1994; PARI & ASHOKKUMAR, 2005). MATSUZAWA et al (1991) mostraram que a atividade desta enzima estava aumentada em ratos geneticamente diabéticos não insulino dependente e PARI & ASHOKKUMAR (2005) também encontraram aumento significativo da HMG-CoA redutase no modelo animal de diabetes induzido por STZ, no período neonatal. Sendo assim, as maiores

concentrações de triacilglicerol (Figura 12) e colesterol total (Figura 13) encontrados nos ratos diabéticos refletem a baixa insulinemia e o quadro de resistência à insulina, características deste distúrbio e concorda com MURALI et al. (2002) e ASHOKKUMAR & PARI (2005) que mostraram no mesmo modelo de diabetes, hipertriacilglicerolemia e hipercolesterolemia. Em adição, baseados nos dados da literatura, é possível inferir que os ratos diabéticos avaliados neste estudo também apresentavam maior atividade da enzima HMG-CoA redutase.

O óleo de peixe rico em EPA e DHA regulam o metabolismo lipídico. As diversas subclasses de lipídeos dietéticos possuem efeitos diferentes na lipogênese (CATERINA et al., 2007, CHAN et al., 2002).

Os ácidos graxos n-3 reduzem a concentração de triacilgliceróis circulantes. Os mecanismos de ação do ômega 3 sugeridos para a redução dos triacilgliceróis são a redução da síntese hepática da VLDL, alguns estudos relatam aumento da taxa catabólica da VLDL (CATERINA et al., 2007) e a redução da lipogênese hepática e o aumento parcial da β -oxidação, em ratos (HARRIS & BULCHANDANI, 2006). A inibição das enzimas da via de síntese de triacilgliceróis hepáticos, principalmente a diacilglicerol aciltransferase e a supressão da transcrição do gene lipogênico SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein), são mecanismos dos ácidos graxos n-3 que resultam na inibição da síntese de novos ácidos graxos e triacilgliceróis (CHAN et al., 2002; CARPENTIER et al., 2006). Isto limita a quantidade de triacilglicerol disponível para o empacotamento na VLDL, levando a produção de partículas de VLDL pequenas com menos triacilglicerol (CHAN et al., 2002, GRIFFIN, 2001). O aumento na β -oxidação dos ácidos graxos parece ocorrer pela habilidade dos ácidos graxos n-3 em ativar o receptor nuclear α ativado pelos proliferadores de peroxissomos (PPAR α) que aumentam a expressão gênica de enzimas envolvidas na via de oxidação dos ácidos graxos (GRIFFIN, 2001; CHAN et al., 2002, WOODMAN et al., 2002; PIGHIN et al., 2003; CARPENTIER et al., 2006).

No entanto, neste estudo, a suplementação com óleo de peixe, tanto para os ratos diabéticos quanto não diabéticos, não alterou significativamente a triacilglicerolemia, encontramos somente uma tendência à redução do triacilglicerol

plasmático no grupo DOP e também no DGC em relação ao D (Figura 12). Em contrapartida, a gordura de coco, para os ratos não diabéticos, aumentou significativamente a concentração plasmática de triacilglicerol em relação aos ratos não suplementados (Figura 12) e ainda foi similar ao grupo diabético.

Dietas ricas em lipídeos, principalmente quando a maior porcentagem destes lipídeos são ácidos graxos saturados, aumentam o acúmulo de gordura visceral e as concentrações plasmáticas de colesterol e triacilglicerol (LOMBARDO & CHICCO, 2006). Foi encontrado que a atividade e os níveis de RNAm da enzima ácido graxo sintase no tecido adiposo branco apresenta regulação diminuída pelo aumento do conteúdo de gordura saturada na dieta, comprometendo assim a síntese de ácidos graxos neste tecido. O óleo de peixe foi menos efetivo em reduzir estas variáveis (BENHIZIA et al., 1994, LOMBARDO & CHICCO, 2006). Desta forma, os efeitos das gorduras saturadas são diferentes e muitas vezes opostos aos dos ácidos graxos n-3 relatados anteriormente. No nosso estudo, a gordura coco, por ser saturada, aumentou o triacilglicerol plasmático nos ratos não-diabéticos e assim pode ter contribuído para alterações na sensibilidade à insulina observadas nestes animais. Em contradição, a tendência desta gordura em reduzir a triacilglicerolemia nos ratos diabéticos foi um achado interessante. Os lipídeos nos ratos Wistar variam muito e talvez isto tenha interferido no resultado final.

Estudos mostram que o ácido graxo n-3 também é capaz de reduzir o colesterol plasmático em ratos, provavelmente por ações inibitórias sobre a HMG-CoA redutase e sobre a produção de VLDL (AL-SHURBAJI et al., 1991, SMIT et al., 1994). Porém, a suplementação com óleo de peixe não foi capaz de melhorar este perfil nos ratos diabéticos. Em contrapartida, o óleo de peixe reduziu a colesterolemia nos ratos não diabéticos comparado com o grupo controle, mostrando o efeito dos ácidos graxos n-3 em reduzir o colesterol plasmático (Figura 13). Os efeitos do EPA e DHA dependem da dose administrada. Assim a dose, o tempo de suplementação e o modelo de diabetes podem ter interferido na ação do óleo peixe sobre metabolismo dos lipídeos nos ratos (CATERINA et al., 2007).

A tolerância normal à glicose é mantida pelo preciso balanço entre secreção de insulina das células β pancreáticas e sua ação sobre os tecidos sensíveis ao hormônio, principalmente músculo e tecido adiposo (PRATLEY & WEYER, 2001). Ainda, a homeostase da glicose envolve a regulação coordenada de várias vias metabólicas, incluindo gliconeogênese e glicólise. (ASHOKKUMAR & PARI, 2005).

A insulina promove o transporte de glicose, a glicólise e a síntese de glicogênio no músculo esquelético, maior local de captação da glicose estimulada por este hormônio (D`ALESSANDRO et al., 2000). O músculo esquelético parece ser o principal sítio de resistência à insulina e o tecido periférico de maior interesse para avaliar esta característica no diabetes tipo II (BONADONNA et al., 1993; DELARUE et al., 2004).

Para avaliar a completa ação da insulina, é necessário obter uma curva dose-resposta, onde o termo sensibilidade à insulina está ligado a propriedades da curva dose-resposta da ação da insulina sobre a queda da glicose (MIKINES, 1992). Uma definição mais prática de sensibilidade foi usada em inúmeros estudos *in vivo* e *in vitro*, em que a resposta de um dado processo metabólico (como o transporte, síntese de glicogênio, glicólise, síntese protéica) é medida na presença de concentrações basais e máximas do hormônio. A concentração de insulina que causa 50% da resposta máxima pode ser usada como índice de sensibilidade à insulina (GREEN & NEWSHOLME, 1979; RIZZA et AL., 1981; ESPINAL et al., 1983; GOODMAN et al., 1983; KRAEGEN et al., 1985; STIREWALT et al., 1985; FERNANDES, L. C., 1989). Já a relação dose-resposta do efeito biológico máximo da insulina caracteriza a responsividade ao hormônio (MIKINES, 1992).

Para investigar o efeito do óleo de peixe e da gordura de coco sobre a sensibilidade e responsividade à insulina do músculo sóleo, avaliamos a produção de lactato e a síntese de glicogênio, destinos celulares da glicose, no músculo sóleo de ratos diabéticos e não diabéticos, estimulados ou não com insulina. Diferentes doses de insulina foram utilizadas com o objetivo de avaliar a resposta do músculo em condições fisiológicas (100 μ U/mL) (FRYER, 1995) ou sob concentração máxima de insulina

(10000 $\mu\text{U/mL}$) (HIRABARA, 2005), investigando-se a sensibilidade e a responsividade do músculo sóleo à insulina, respectivamente.

A taxa de formação de lactato representa um índice do transporte de glicose e da atividade da via glicolítica (FERNANDES, L.C., 1989). Considerando a gordura dietética como um fator para a resistência à insulina, muitos estudos apontam que o excesso de lipídeos dietéticos, principalmente os saturados, predispõe a menor ação da insulina nos tecidos (LOMBARDO & CHICCO, 2006). Estudos em modelos animais mostram que tanto a quantidade como a qualidade da gordura podem determinar o aumento ou a redução da sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos (DELARUE et al., 2004).

Atualmente, vários modelos animais utilizados para o estudo da resistência à insulina e do diabetes tipo II são obtidos pelo aumento da gordura dietética, composta principalmente por ácidos graxos saturados. Dieta hiperlipídica com gordura saturada em ratos levou a alteração da ação da insulina, como menor captação e fosforilação da glicose nos músculos esqueléticos oxidativos (FRYER, 1995).

Além disso, o ciclo ácido graxo-glicose, proposto por Randle e colaboradores (1963), explica a interação entre estes dois substratos, sendo que o aumento dos ácidos graxos plasmáticos é capaz de reduzir o metabolismo de carboidratos. O aumento na oxidação destes lipídeos, resulta em maior concentração de intermediários metabólicos das vias aeróbias, inibindo enzimas chave da via glicolítica. Sabe-se que situações de resistência à insulina, como diabetes tipo II e obesidade, aumentam a concentração de ácidos graxos (SHULMAN et al. 2000; PETERSEN et al., 2003). Ainda, o aumento dos ácidos graxos parece reduzir a ativação das proteínas da via de sinalização da insulina, como IRS, PI3K, Akt, comprometendo a captação, oxidação e armazenamento da glicose (CURI et al., 2002; DRESNER et al., 1999).

Neste estudo, os ratos suplementados com gordura de coco produziram menos lactato pelo músculo sóleo incubado quando adicionado 10000 $\mu\text{U/mL}$ de insulina, isto mostra que este tecido sofreu alterações na responsividade à insulina (Figura 14). Este fato pode ter ocorrido pela alteração na via de sinalização da insulina,

comprometendo a captação da glicose, uma vez que foi observado menor expressão na proteína Akt no músculo destes ratos. A Akt participa da via de sinalização deste hormônio fosforilando alvos como a GSK-3 e facilita a translocação de vesículas contendo GLUT-4 para a superfície da célula, promovendo entre outras ações a síntese de glicogênio e a captação da glicose (CEFALU, 2001; MORINO et al., 2006). Apesar da ativação desta proteína não ter sido estudada, a redução da expressão pode ter comprometido a sinalização do hormônio e conseqüentemente a translocação do GLUT-4 para a membrana. Em adição, devido a alteração na triacilglicerolemia nestes ratos, o ciclo de Randle também pode ter participado neste processo através da redução na metabolização da glicose, no entanto para confirmar esta hipótese enzimas da via glicolítica devem ser analisadas.

Sabe-se que o controle da via glicolítica pela insulina ocorre na regulação da entrada de glicose na célula e na posterior fosforilação, pela hexoquinase levando a continuação do fluxo deste metabólito. Esta enzima tem papel importante na manutenção da homeostase da glicose em todas as células que metabolizam glicose para produção de ATP (KLEIN et al., 1991; MARSHALL et al., 1995; ASHOKKUMAR & PARI, 2005). Deficiências em algumas enzimas do metabolismo da glicose parecem estar presentes no distúrbio do diabetes (BEUTLER, 1988; ASHOKKUMAR & PARI, 2005, HIGUCHI et al., 2007). A enzima hexoquinase estava reduzida em ratos diabéticos induzidos por STZ, no período neonatal (ASHOKKUMAR & PARI, 2005). Ainda, a baixa insulinemia dos ratos diabetizados com estreptozotocina não tratados afetou o sistema de transporte de glicose no músculo esquelético, reduzindo a captação estimulada por doses basal ou máxima de insulina (D'ALESSANDRO et al., 2000). Os músculos sóleos dos animais diabéticos apresentaram menor produção de lactato na presença de insulina (100 μ U/mL e 10000 μ U/mL), ou seja, redução na sensibilidade e responsividade ao hormônio (Figura 15). O comprometimento no metabolismo da glicose pode ter ocorrido por alterações na via glicolítica ou na via de sinalização da insulina, reduzindo a captação da glicose.

Pela análise das proteínas da via de sinalização da insulina, possivelmente a redução significativa na expressão da proteína Akt no músculo pode

ter contribuído para a menor ação da insulina e captação da glicose (Figura 21). No entanto o mesmo não foi observado em relação à proteína IR β (Figura 20), sendo a expressão desta similar em todos os grupos experimentais. Com isso, podemos sugerir que neste modelo de diabetes tipo II, a alteração na sinalização da insulina não ocorre na ligação do hormônio com o receptor e sim esta deve ocorrer em um evento pós-receptor. Apesar de termos analisado somente as expressões destas proteínas nos músculos esqueléticos dos ratos diabéticos, estas poderiam justificar parte do quadro de resistência à insulina. Por outro lado, baseado em dados apresentados por outros autores, os ratos provavelmente apresentavam quantidades reduzidas das enzimas do metabolismo da glicose, como a hexoquinase. Em adição, a alteração encontrada nos lipídeos plasmáticos dos animais diabéticos pode sugerir a competição dos metabólitos ácido graxo-glicose pelas vias metabólicas, através do ciclo de Randle, comprometendo o metabolismo da glicose. Sendo assim, pode-se sugerir que tanto alterações na via de sinalização da insulina, quanto na via glicolítica contribuíram para menor produção de lactato pelo músculo dos ratos diabéticos. Ainda, estes resultados contribuem para a caracterização deste modelo animal de diabetes tipo II.

Sabe-se que os ácidos graxos n-3 possuem ação benéfica sobre a ação da insulina, porém os mecanismos envolvidos neste efeito não estão totalmente esclarecidos. A normalização dos triacilgliceróis plasmáticos, dos ácidos graxos livres e também do conteúdo de triacilglicerol no tecido podem contribuir para a restauração da homeostase da glicose e sensibilidade à insulina no músculo esquelético. Além disso, o consumo de ácidos graxos n-3 induz mudanças na estrutura e fluidez das membranas das células o que pode afetar a ação da insulina, através de alterações na via de sinalização do hormônio (D'ALESSANDRO et al., 2000).

A suplementação com óleo de peixe nos animais diabéticos alterou a produção de lactato pelo músculo sóleo estimulado por 100 μ U/mL de insulina, aumentando a sensibilidade do tecido ao hormônio (Figura 16). Porém, a dose máxima de insulina não alterou a responsividade do tecido quando comparado aos grupos diabéticos e diabéticos suplementados com gordura de coco. Os possíveis mecanismos de ação do óleo de peixe em aumentar a sensibilidade à insulina, não foram

identificados através dos parâmetros analisados neste estudo. Ao investigar as proteínas IR β e Akt, observamos que não houve alteração na expressão destas em relação ao grupo diabético não suplementado e suplementado com gordura de coco. No entanto, não podemos descartar a hipótese que a suplementação com óleo de peixe melhora a ativação das proteínas da via de sinalização da insulina, contribuindo para captação da glicose, uma vez que não analisamos a ativação das proteínas estudadas e também de outras proteínas da via. Contudo, a maior ativação desta via pode ser um dos mecanismos, porém precisa ser investigado.

O estoque de glicogênio está intimamente ligado com ação da insulina e homeostase da glicose. Grande parte da glicose captada nas fibras musculares em resposta a insulina é depositada como glicogênio (BOUCHÉ et al., 2004). No nosso estudo, foi encontrado redução na síntese de glicogênio no músculo dos animais suplementados com gordura de coco, quando adicionado 100 μ U/mL e 10000 μ U/mL de insulina (Figura 17). Os músculos dos animais que receberam gordura de coco podem ter apresentado menor taxa de síntese de glicogênio durante a incubação pela redução na captação de glicose e/ou também por alteração na via metabólica, menor expressão da proteína Akt, envolvida na via de sinalização da síntese de glicogênio, e/ou pela competição metabólica entre ácido graxo-glicose, como discutido anteriormente para a produção de lactato do mesmo.

Em estudo conduzido por PETERSEN & SHULMAN (2002), avaliou-se o destino da glicose após sua captação pelo músculo em sujeitos saudáveis e com diabetes tipo II, através de uma técnica não invasiva, a ressonância magnética nuclear por espectros de carbono 13. Os resultados mostraram que a síntese de glicogênio representa a maior via não oxidativa do metabolismo da glicose em indivíduos normais. Ainda, a formação de glicogênio em sujeitos com diabetes foi 60% menor comparado com sujeitos saudáveis, evidenciando que a síntese de glicogênio foi profundamente comprometida em pessoas com diabetes tipo II. Este estudo concluiu que a síntese de glicogênio foi o maior defeito metabólico responsável pela resistência à insulina nestes indivíduos. O menor conteúdo de glicogênio foi atribuído à redução no transporte da glicose e na enzima hexoquinase, pois a concentração intracelular de glicose-6-fosfato

estava reduzida nos pacientes diabéticos. Caso a enzima glicogênio-sintase fosse a etapa limitante desta via nos diabéticos, o conteúdo de glicose-6-fosfato estaria maior ou inalterado (PETERSEN & SHULMAN, 2002).

A glicogênio sintase é a enzima limitante da síntese de glicogênio e sua atividade é modulada pela fosforilação e desfosforilação. Porém, o mecanismo pelo qual a insulina ativa a síntese de glicogênio ainda é controverso. A ativação da enzima pode envolver fosfatases, como a proteína fosfatase-1 (PP1), via MAPK ou também via proteína Akt. A fosforilação pela Akt inativa a GSK-3, o que desfosforila e aumenta a atividade da glicogênio sintase (BOUCHÉ et al, 2004). Adicionalmente, a redução no transporte da glicose como etapa limitante da síntese de glicogênio, a atividade da glicogênio sintase encontra-se alterada no diabetes tipo II, porém existem dúvidas se é um defeito primário ou consequência da hiperglicemia. A expressão da glicogênio sintase é normal, sugerindo que a regulação da enzima encontra-se alterada (BOUCHÉ et al, 2004).

Nossos resultados mostram que os músculos dos animais diabéticos sintetizaram menos glicogênio, quando adicionado 100 μ U/mL de insulina, quando comparado com os ratos não diabéticos (Figura 18), corroborando os de PETERSEN & SHULMAN (2002), que mostraram grande comprometimento desta via metabólica em pacientes com diabetes tipo II.

Não podemos afirmar qual etapa limitante desta via estava comprometida no músculo dos ratos diabéticos deste estudo. No entanto, da mesma forma como já foi discutido, a redução da expressão da Akt, o ciclo de Randle e alteração na enzima hexokinase podem ter comprometido a captação e metabolização da glicose e desta forma a via da síntese de glicogênio estava reduzida, corroborando com achados em humanos encontrados na literatura, onde esta via foi alterada pela menor captação da glicose e redução da enzima hexoquinase. Em contrapartida, nosso estudo também sugere alteração na regulação da via de sinalização da síntese de glicogênio, pelo perfil da expressão da Akt no músculo destes ratos, uma vez que esta participa da ativação da glicogênio sintase, enzima limitante da síntese de glicogênio. No entanto, a análise

da ativação da Akt, da expressão da GSK-3, da glicogênio sintase e/ou do conteúdo de glicose-6-fosfato poderiam justificar esta hipótese.

As suplementações com óleo de peixe e gordura de coco não modificaram os mecanismos da síntese de glicogênio nos músculos dos ratos diabéticos (Figura 19). Apesar da suplementação com óleo de peixe nestes ratos ter aumentado a captação e/ou metabolização da glicose, justificada pela maior produção de lactato, isto não contribui para o aumento da síntese de glicogênio. Com isso, neste modelo de diabetes tipo II, pode-se sugerir que esta via não dependa exclusivamente da captação ou metabolização da glicose, talvez as alterações na via de sinalização da insulina em especial na atividade da Akt, GSK-3 e assim na regulação e conteúdo da glicogênio-sintase estejam realmente alterados e não foram modificados pelos ácidos graxos n-3.

Em resumo, nossos resultados mostram que a suplementação com gordura de coco e o quadro diabético foram capazes de reduzir a sensibilidade e a responsividade à insulina dos músculos sóleos dos ratos, possivelmente por alterações na via de sinalização da insulina, pela competição entre os substratos ácido-graxo-glicose pelas vias metabólicas ou ainda redução ou desregulação de enzimas da via glicolítica ou da síntese de glicogênio. A suplementação com óleo de peixe aumentou a produção de lactato pelos músculos dos ratos diabéticos, porém não mostrou nenhum efeito na síntese de glicogênio e também não modificou a ação da insulina nos ratos não diabéticos.

7 CONCLUSÃO

- O quadro diabético nos animais foi confirmado com a presença de hiperglicemia, intolerância à glicose, baixa insulinemia basal, secreção reduzida de insulina na presença de glicose e resistência à insulina;

- Após o período experimental, os ratos diabéticos apresentaram hiperglicemia, hipertriacilglicerolemia e hipercolesterolemia. O óleo de peixe não alterou nenhum destes parâmetros, mas parece melhorar a primeira fase de secreção da insulina nestes animais;

- Para os animais não diabéticos, a gordura de coco foi capaz de aumentar a concentração plasmática de triacilglicerol e reduzir a sensibilidade e responsividade do músculo sóleo à insulina, possivelmente por alterações na via de sinalização do hormônio e pelo ciclo de Randle. A suplementação com óleo de peixe foi capaz de reduzir a colesterolemia destes ratos;

- Os animais diabéticos apresentaram redução da sensibilidade e responsividade à insulina no músculo sóleo, possivelmente por alterações na via de sinalização do hormônio, envolvendo eventos pós-receptores e provavelmente a proteína Akt participou deste processo. Ainda a competição entre ácido graxo-glicose e alterações nas enzimas das vias metabólicas da glicose, como a hexoquinase e glicogênio-sintase podem ter contribuído para esta característica.

- A suplementação com óleo de peixe para os diabéticos aumentou a sensibilidade à insulina dos músculos sóleos, quando analisada a produção de lactato, sugerindo aumento na captação da glicose e da glicólise, porém não foi capaz de melhorar a síntese de glicogênio. Desta forma podemos sugerir que esta via metabólica neste ratos não depende somente da captação e metabolização da glicose, mas também da ativação de proteínas, como a Akt e GS3-K e também da enzima glicogênio-sintase.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**, 3ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

AL-SHURBAJI, A. et al. Effect of n-3 fatty acids on the key enzymes involved in cholesterol and triglyceride turnover in rat liver. **Lipids**, v.26, n.5, p.385-389, 1991.

ANGEL et al. Normalization of insulin secretion by a selective alfa 2-adrenoceptor antagonist restores glut -4 glucose transporter expression in adipose tissue of type II diabetic rats. **Endocrinology**, v.137, n.5, 1996

ARULMOZHI, D.K; VEERANJANEYULU A.; BODHANKAR, S.L. Neonatal streptozotocin-induced rat model f type 2 diabetes mellitus : A glance. **Indian Journal of Pharmacology**, v.36, n.4, p.217-221, 2004.

ASANO, T. et al. p110beta is up-regulated during differentiation of 3T3-L1 cells and contributes to the highly insulin-responsive glucose transport activity. **Journal Biological Chemistry**, v. 275, n.23, p.17671-17676, 2000.

ASHOKKUMAR,N.; PARI, L. Effect of N-benzoyl-D- phenylalanine and metformin on carbohydrate metabolic enzymes in neonatal streptozotocin diabetic rats. **Clinica Chimica Acta**, v.351, v.105-113, 2005.

AVRAMOGLU, K.R.; BASCIANO, H.; ADELI, K. Lipid and a lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. **Clinica Chimica Acta**, v. 368, p.1-19, 2006.

BELL, G.I. et al. Molecular biology of mammalian glucose transporters. **Diabetes Care**, v. 13, p. 198 – 208, 1990.

BEYER, R.S.; JENSEN,L.S. Overestimation of the cholesterol content of eggs. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**., v.37, n.4, p.917-920, 1989.

BACOVÁ, Z. et al. Effect of neonatal streptozotocin and thyrotropina-releasing hormone treatments on insulin secretion in adult rats. **General Physiology. Biophysics**, v.24, p. 181-197, 2005.

BAKER, P.W; GIBBONS, G.F. Effect of dietary fish oil on the sensitivity of hepatic lipid metabolism to regulation by insulin. **The journal of Lipid Research**, v.41, p.719-726, 2000.

BALLOTTI, R. et al. Antiphosphotyrosine antibodies modulate insulin receptor kinase activity and insulin action. **Cellular Signalling**, v.1, n.2, p.195-204, 1989.

BAO, W. et al. Persistent elevation of plasma insulin levels is associated with increased cardiovascular risk in children and young adults. The Bogalusa Heart study. **Circulation**, v. 93, p.54-59, 1996.

BENHIZIA, F. et al. Effects of a fish oil-lard diet on rat plasma lipoproteins, liver FAS, and lipolytic enzymes. **American Journal of Physiology**, v. 267, p. E975-982, 1994.

BEUTLER E. The relationship of red cell enzymes to red cell lifespan. *Blood Cells*, v. 14, n.1, p. 69-91, 1988.

BONADONNA, R.C. et al. Transmembrane glucose transport in skeletal muscle of patients with non-insulin-dependent diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, p. 486-494, 1993.

BORKMAN, M. et al. Effects of fish oil supplementation on glucose and lipid metabolism in NIDDM. **Diabetes**, v.38, p. 1314-1319,1989.

BORKMAN, M. et al. The relationship between insulin sensitivity and fatty acid composition of skeletal-muscle phospholipids. **New England Journal of Medicine**, v.328, p.238-244, 1993.

BOUCHÉ, C. et al. The cellular fate of glucose and its relevance in type 2 diabetes. **Endocrine Reviews**, v.25, n.5, p.807-830, 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, **72**: 248-254, 1976.

CALDER, P.C. N-3 polynsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fish tale? **Nutrition Research**, v. 21, p. 309-341, 2001

CALDER, P.C . Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **Biochemical Society transactions**, v.33, n. 2, p. 424-427, 2005.

CARPENTIER, Y.A.; PORTOIS, L.; MALAISSE, W.J. N-3 fatty acids and the metabolic syndrome. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n.6, p.S1499-1504, 2005.

CATERINA, R. de et al. N-3 fatty acids in the treatment of diabetic patients- Biological rationale and clinical data. **Diabetes Care**, v. 30, n.4, 2007.

CEFALU, W.T. Insulin resistance: Cellular and Clinical Concepts. *Experimental Biology and Medicine*, v. 226, p.13-26, 2001.

CHAN, D.C. et al. Regulatory effects of HMG CoA reductase inhibitor and fish oil on Apolipoprotein B-100 Kinetics in Insulin-resistant obese male subjects with dyslipidemia. **Diabetes**, v.51, 2002.

CROSS, D.A. et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v.378, n.6559, p.785-789, 1995.

CURI, R., PERES, C.M. Ácidos graxos como moduladores intercelulares. In: CURI, R., POMPÉIA, C., MIYASAKA, M.I.Y., PROCÓPIO, J., **Entendendo as gorduras: os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002.p.201-214.

D' ALESSANDRO M.E., et al. Role of skeletal muscle on impaired insulin sensitivity in rats fed a sucrose-rich diet: effect of moderate levels of dietary fish oil. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.11, p.273-280,2000.

DELARUE J. et al. n-3 long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity? **Reprod. Nutr.Dev**, v.44, p.289-299.

DEY, D. et al. Involvement of novel PKC isoforms in FFA induced defects in insulin signaling. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.246, p.60-64, 2006.

DOMMELS, Y.E.M. et al. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and colorectal carcinogenesis: results from cultured colon cells, animal models and human studies. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 12, p. 233-244, 2002.

DRESNER, A. et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1 associated phosphatidylinositol 3- kinase activity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n.2, p.253-259, 1999.

ENGEL, P.C.; JONES, J.B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD⁺ in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. **Analytical Biochemistry**, v.88, n.2, p.475-484, 1978.

ESPINAL, J.; DOHN, NEWSHOLME, E. A. Sensitivity to insulin of glycolysis and glycogen synthesis of isolated soleus-muscle strips from sedentary, exercised and exercised-trained rats. **Biochemical Journal**, v.212, n.2, p.453-458, 1983.

FERNANDES, L.C. Papel da insulina na caquexia e no crescimento do tumor de Walker 256 in vivo. Dissertação. USP. 2005

FREEDMAN, D. S. et al. Relationship of childhood obesity to coronary heart disease risk factors in adulthood: the Bogalusa Heart Study. **Pediatrics**, v.108, p. 712-718, 2001.

FRIDAY, K.E. et al. Elevated plasma glucose and lowered triglyceride levels from omega-3 fatty acid supplementation in type II diabetes. **Diabetes Care**, v. 12, p. 276-281, 1989.

FRIEDBERG, C. et al. Fish oil and glycemic control in diabetes. A meta-analysis. **Diabetes care**, v.21, p. 494-500, 1998.

FRYER, G.D. et al. The long-term regulation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase kinase by dietary lipid is dependent on fatty acid composition. **Eur.J.Biochem**, v.229, p.741-748, 1995.

FUJIMOTO, Y.W. The Importance of Insulin Resistance in the Pathogenesis of type 2 diabetes Mellitus. **American Journal of Medicine**, v.108, n.6A, p.9S-14S, 2000.

FURUYA, D.T. et al. Low ethanol consumption induces enhancement of insulin sensitivity in liver of normal rats. **Life Sciences**, v. 77, p.1813-1824, 2005.

FURTADO, L.M. et al. GLUT-4 activation: thoughts on possible mechanisms. **Acta Physiologica Scandinavia**, v.178, n.4, p.287-296, 2003.

GELONEZE, B.; TAMBASCIA, M.A. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabolismo**, v. 50, n.2, 2006.

GREEN, A.; NEWSHOLME, E. A. Sensitivity of glucose uptake and lipolysis of white adipocytes of rat to insulin and effects of some metabolites. **Biochemical Journal**, v. 180, p.365-370, 1979.

GRIFFIN, B.A. The effect of n-3 fatty acids on low density lipoprotein subfractions. **Lipids**, v.36, 2001.

GRIMSGAARD, S. et al. Highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in humans have similar triacylglycerol-lowering effects but divergent effects on serum fatty acids. **American Journal of Nutrition**, v. 66, p.649-659, 1997.

GRIMSGAARD, S. et al. Effects of highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on hemodynamics in humans. **American Journal of Nutrition**, v. 68, p.52-59, 1998.

GROSS, J.L. Diabetes Mellito: Diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v.46, n.1, 2002.

HARRIS, W.S.; BULCHANDANI, D. Why do omega-3 fatty acids serum triglycerides? **Current Opinion Lipidology**, v.17, p.387-393, 2006.

HELGE, J.W. et al. Training affects muscle phospholipids fatty acid composition in humans. **Journal of Applied Physiology**, v.90, p.670-677, 2001.

HIGUCHI, T. et al. Levels of plasma insulin, leptin and adiponectin, and activities of key enzymes in carbohydrate metabolism in skeletal muscle and liver in fasted ICR mice fed dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. **Journal of Nutritional Biochemistry**, *in press*, 2007.

HIRABARA, S.M. Efeito agudo de ácidos graxos no metabolismo de glicose em músculo esquelético. Tese de Doutorado. USP. 2005.

HULBERT, A.J. et al. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. **Biological Reviews**, v.80, p.155-169, 2005.

JUMP, B.D. The Biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277,n.11, p.8755-8758, 2002.

KABIR, M. Treatment for 2 month with n-3 polyunsaturated fatty acids reduces adiposity and some atherogenic factors but does not improve insulin sensitivity in women with type 2 diabetes: a randomized controlled study. **American Journal of Nutrition**, v.86, p. 1670-1679, 2007.

KANG,S.; DAVIS, R.A. Cholesterol and hepatic lipoprotein assembly and secretion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1592, p.223-230, 2000.

KAPELLER, R.; CANTLEY, L.C. Phosphatidylinositol 3-Kinase. **Bioessays**, v.16,n.8, p.565-576, 1994.

KLEIN, H.H. et al. The relationship between insulin binding, insulin activation of insulin-receptor tyrosine kinase, and insulin stimulation of glucose uptake in isolated rat adipocytes. Effect of isoprenaline. **Biochemical Journal**, v. 274, p. 787-792, 1991.

KRAEGEN, E.W. et al. Dose-response curves for in vivo insulin sensitivity individual tissues in rats. **American Journal of Physiology**, v. 248, p.E353-E362, 1985.

KUBAR, J.; ROCHET, N. Basal autophosphorylation of insulin receptor occurs preferentially on the receptor conformation exhibiting high affinity for insulin and stabilizes this conformation. **Cellular Signalling**, v.2, n.6, p.587-594, 1990.

LEAHY, J. L. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. **Archives of Medical Research**, v.36, p.197-209, 2005.

- LICHTENSTEIN, A. H.; SCHWAB, U.S. Relationship of dietary fat to glucose metabolism. **Atherosclerosis**, v.150, p 227-243, 2000.
- LOMBARDO, B.Y.; CHICCO, A.G. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. **Journal of Nutritional biochemistry**, v.17, p.1-13, 2006.
- LUO, J. et al. Moderate intake of n-3 fatty acids for 2 months has no detrimental effect on glucose metabolism and could ameliorate the lipid profile in type 2 diabetic men: results of a controlled study. **Diabetes care**, v.21, p. 717-724, 1998.
- MANCO, M. et al. Insulin resistance directly correlates with increased saturated fatty acids in skeletal muscle triglycerides. **Metabolism**, v.49, n.2, p.220-224, 2000.
- MANCO, M.; CALVANI, M.; MINGRONE, G. Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.6, p.402-413, 2004.
- MARSHALL, C.J. et al. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling transient vs sustained extra cellular signal-regulating kinase. **Cell**, v. 80, n.2, p. 179-185, 1995.
- MATSUZAWA, J.S. et al. Abnormalities of plasma lipoproteins in a new genetically obese rat with non-insulin-dependent diabetes mellitus (Wistar fatty rat). **International Journal of Obesity**, v. 15, n.7, p.487-495, 1991.
- MIKINES, K.J. The influence of physical activity and inactivity on insulin action and secretion in man. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.146, suppl.609, 1992.
- MONTORI, V. Fish oil supplementation in type 2 diabetes: a quantitative systematic review. **Diabetes Care**, v. 23, p.1407-1415, 2000.
- MORGAN, W.A.; RASKIN, P.; ROSENSTOCK, J. A comparison of fish oil or corn oil supplements in hyperlipidemic subjects with NIDDM. **Diabetes Care**, v.18, p.83-86, 1995.
- MORI T.A. et al. Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid lowers ambulatory blood pressure and heart rate in humans. **Hypertension**, v. 34, p. 253-260, 1999.
- MORI T.A. et al. . Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects on serum lipids and lipoproteins, LDL particle size, glucose, and insulin in mildly hyperlipidemic men. **American Journal of Nutrition**, v.71, p.1085-1094, 2000 A.
- MORI, T.A. et al. Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on vascular reactivity of the forearm microcirculation in hyperlipidemic, overweight men. **Circulation**, v. 102, p.1264, 2000 B.

MORINO, K. et al. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. **Diabetes**, v. 55, p.S9-S15, 2006.

MOSTAD, I.L. et al. Effects of n-3 fatty acids in subjects with type 2 diabetes: reduction of insulin sensitivity and time-dependent alteration from carbohydrate to fat oxidation. **American Journal of Nutrition**, v. 84, p.540-550, 2006.

MUOIO, D.M.; NEWGARD, C.B. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and [beta] - cell failure in type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, p.193-205, 2008.

MURALI, B. et al. Effect of chronic treatment with *Enicostemma littorale* in non-insulindependent diabetic (NIDDM) rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p.199-204, 2002.

NETTLETON, J.A.; KATZ, R. n-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Type 2 Diabetes: A review. **Journal of American Dietetic Association**, v.105, p.428-440, 2005.

NYSTROM, H.F.; QUON, J.M. Insulin Signalling: Metabolic Pathways and Mechanisms for Specificity. **Cellular Signalling**, v.11,n.8, 563-574, 1999.

PAN, D.A. et al. Skeletal Muscle Membrane Lipid Composition is Related to Adiposity and Insulin Action. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, p.2802-2808, dez.1995.

PAN, D.A. et al. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. **Diabetes**, v.46, n.6,p.983-988, 1997.

PARI, L.; ASHOKKUMAR, N. Effect of N-benzoyl-d-phenylalanine on lipid profile in liver of neonatal streptozotocin diabetic rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 19, p.563-568, 2005.

PATTY, L. et al. Long-term effects of fish oil on lipoprotein subfractions and low density lipoprotein size in non-insulin-dependent diabetic patients with hypertriglyceridemia. **Atherosclerosis**, v. 146, p.361-367, 1999.

PESSIN, E.J.; SALTIEL, R.A. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **The journal of Clinical Investigation**, v.106,n.2, jul.2000.

PETERSEN F.K; SHULMAN, I.G. Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. **The American Journal of Cardiology**, v.90, p. 11G-18G, 2002.

PETERSEN, K. et al. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. **Science**, v.300, n. 5622, p. 1140-1142, 2003.

PETERSEN F.K; SHULMAN, I.G. Etiology of insulin Resistance. **The American Journal of Medicine**, v.119, p.10S-16S, 2006.

PIZATO,N. et al. Ratio OF n-6 to n-3 fatty acids en the diet affects tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **Nutrition and Cancer**, v. 53, n.2, p.194-201, 2005.

PIGHIN D. et al. Fish oil affects pancreatic fat storage, pyruvate dehydrogenase complex activity and insulin secretion in rats fed a sucrose-rich diet. **Journal of Nutrition**, v.133, p.4095-4101, 2003.

PRATLEY, R.E; WEYER, C. The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of type II diabetes mellitus. **Diabetologia**, v.44, p.929-945, 2001.

PRONK, G.L. et al. Insulin-induced phosphorylation of the 46- and 52 kDa Shc proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v.268, n.8, p.5748-5753, 1993.

RANDLE, P.J. et al. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, v.1, p.785-789, 1963.

RANDLE, P. J. et al. Glucose fatty acid interactions and the regulation of glucose disposal. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.55, p.1 – 11, 1994.

RIZZA, R.A.; MANDARINO, L.J.; GERICH, J.E. Dose response characteristics for effects of insulin on production and utilization of glucose in man. **American Journal of Physiology**, v.240, p. E630- 639, 1981.

ROSE, D.P.; CONNOLY, J.M.. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 83, p. 217-244, 1999.

RUXTON, S.H.C.; REED, S.C.; SIMPSON,M.J.A.; MILLINGTON. K.J. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. **Journal of Human Nutrition Dietetics**, v.17, p 449-459, 2004

SALTIER, A.R. New perspectives into the molecular Pathogenesis and Treatment of type 2 Diabetes. **Cell**, v. n.23, p.517-529, fev.2001.

SALTIER, A. R.; KAHN,R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v..414, p. 799 – 812, dez. 2001.

SARTORETTO, J.L. Metformin treatment restores the altered microvascular reactivity in neonatal streptozotocin-induced diabetic rats increasing NOS activity, but not NOS expression. **Life Sciences**, v. 77, p. 2676-2689, 2005.

SHULMAN, G.I. Cellular mechanisms of insulin resistance. **The journal of Clinical Investigation**, v. 106, n.2, p.171-176, 2000.

SMIT, M.J. et al. Dietary fish oil potentiates bile acid-induced cholesterol secretion into bile in rats. **Journal of Lipid Research**, v.35, 1994.

SIMOPOULOS, P.A. Essential fatty acids in health and chronic disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, 560S-569S, 1999.

SIMOPOULOS, P.A. Omega-3 fatty acids in Inflammation and Autoimmune Diseases. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n.6, p.495-505, 2002.

SINHA, R. Prevalence of impaired glucose tolerance among children and adolescents with marked obesity. **The New England Journal of Medicine**, v.346, p.802-810, 2002.

SIRTORI, C.R. et al. One year treatment with ethyl esters of n-3 fatty acids in patients with hipertriglyceridemia and glucose intolerance: reduced triglyceridemia total cholesterol and increased HDL-C without glycemic alterations. **Atherosclerosis**, v.137, p.419-427, 1998.

STIREWALT, D.S. et al. Insulin sensitivity and responsiveness of epitrochlearis and soleus muscles from fed and starved rats. **Biochemical Journal**, v.227, p. 355-362, 1985.

STOECKLI, R.; KELLER, U. Nutritional fats and risk of type 2 diabetes and cancer. **Physiology & Behavior**, v. 83,n. 4, p.611-615, 2004.

TAOUI, M. et al. N-3 Polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle. **American Journal of Physiology- Endocrinology Metabolism**, v. 282, p.E664-E671, 2002.

TAKADA, J. et al. Neonatal streptozotocin-induces diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. **Metabolism Clinical and Experimental**, v.56, p. 997-984, 2007

TAPIERO, H.; NGUYEN BA, G.; COUVREUR, P.; TEW, K.D. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v.56, p. 215-222, 2002.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 6, 1969.

THOMPSON, et al. Effects of individual fatty acids on glucose uptake and glycogen synthesis in soleus muscle in vitro. **American Journal of Physiology- Endocrinology Metabolism**, v.279, p.E577-E584, 2000.

THONG, F.S. et al. Turning Signals on and off: GLUT4 traffic in the insulin-signalling highway. **Physiology (Bethesda)**, v.20, n.4, p.271-284, 2005.

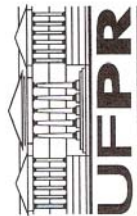
VESSBY, B. Dietary fat and insulin action in humans. **British Journal of Nutrition**, v.83, suppl.1, p.S91-S96, 2000.

WHITE, M.F. The insulin signaling system and the IRS proteins. **Diabetologia**, v.40, suppl.2, p.S2-17, 1997

WOODMAN, R.J. et al. Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on glycemic control, blood pressure, and serum lipids in type 2 diabetic patients with treated hypertension¹⁻³. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.76, p.1007-1015, 2002

YANO, Y. et al. Primary sites of actions of staurosporine and H-7 in the cascade of insulin action to glucose transport in rat adipocytes. **Biochemistry and Biophysical Acta**, v.1176, n.3, p.327-332, 1993.

**ANEXO – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**



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



CERTIFICADO

N.º 198

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIAN.º 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO N.º 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos que utilizam 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)".

APROVADO.

PROCESSO: 23075.045082/2006-47

RO 11/2006 - 21/11/2006

TÍTULO: Sensibilidade e responsividade à insulina do músculo sóleo de ratos neonatos diabéticos com estreptozotocina suplementados com óleo de peixe

AUTORES: Luiz Claudio Fernandes, Andressa Franzói Machado, Luciana Alves, Isabela Coelho, Carina de Lima

DEPARTAMENTO: Fisiologia

Curitiba, 23 de novembro de 2006.

Prof.ª Ana Maria Caliman Filadelfi
Coordenadora do CEEA

