

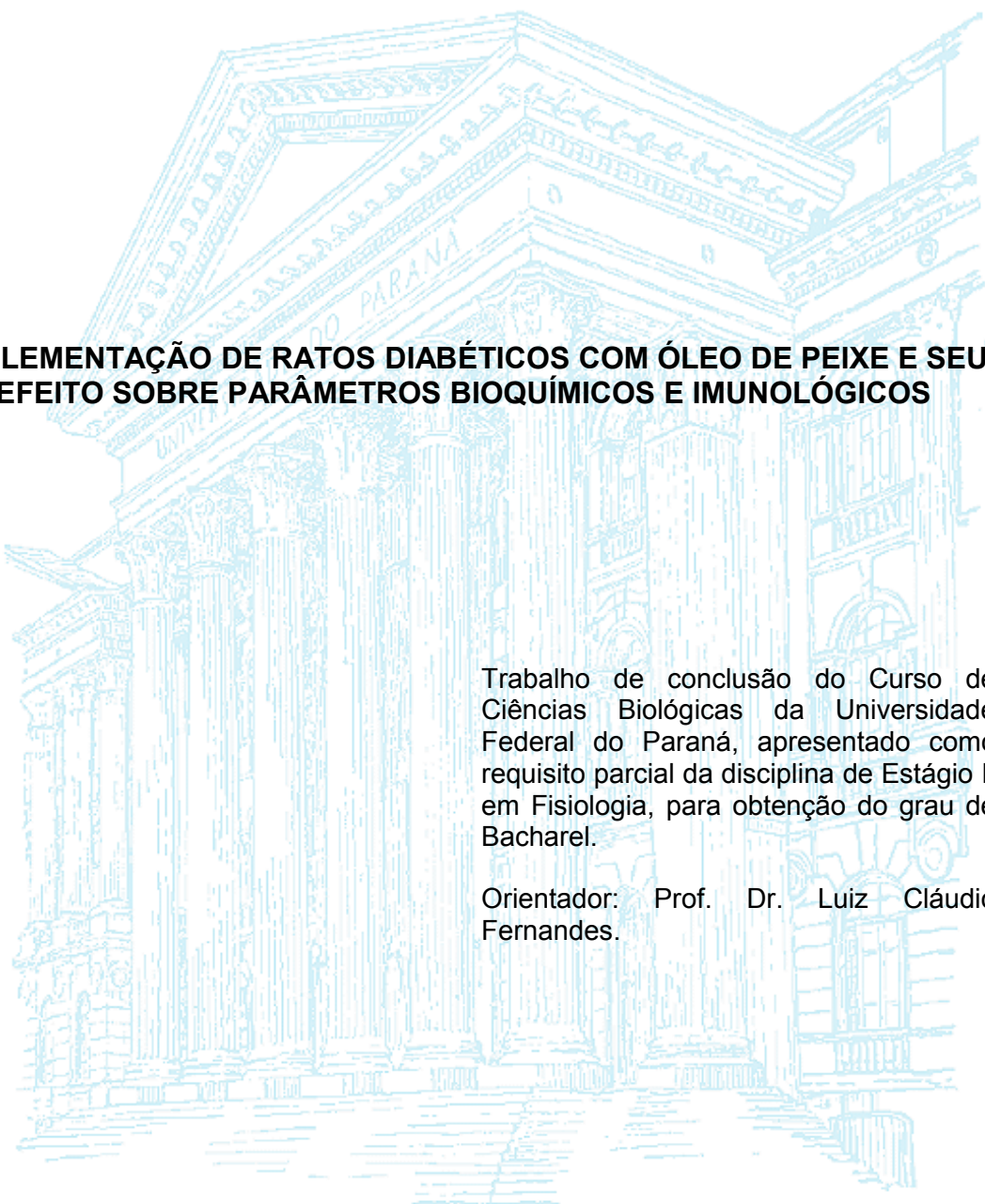
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANNE KAROLINE SCHREIBER

**SUPLEMENTAÇÃO DE RATOS DIABÉTICOS COM ÓLEO DE PEIXE E SEU
EFEITO SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS**

CURITIBA
2009

ANNE KAROLINE SCHREIBER



SUPLEMENTAÇÃO DE RATOS DIABÉTICOS COM ÓLEO DE PEIXE E SEU EFEITO SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS

Trabalho de conclusão do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, apresentado como requisito parcial da disciplina de Estágio II em Fisiologia, para obtenção do grau de Bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes.

CURITIBA
2009

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pois é a Ele a quem devo ter chegado até aqui. Depois de muitas lágrimas e sorrisos, existem nossos segredos que só Ele ouviu baixinho.

À minha família: minha mãe, meu pai e meu irmão. Estivemos juntos nesse tempo todo, e apesar das minhas ausências e das impaciências, souberam entender, e por muitas vezes calar como forma de apoio. Vocês são a minha base e sem vocês isso tudo não faria sentido. Amo vocês.

Aos amigos, todos, os de infância, os de adolescência e os de faculdade. Sou hoje um pouco de cada um de vocês e vejo os puxões de orelha, as ligações, as brigas e colo, sempre tão necessários, como uma saudade que nunca vai passar... Espero tê-los retribuído da mesma forma. Vocês estão no meu coração, amo vocês.

Aos mestres, com carinho. Vocês não só mostraram o espírito que um biólogo deve ter, mas ensinaram a reconhecê-lo dentro de nós. Obrigada pelo apoio e pelo exemplo profissional e humano.

À turma do laboratório, pelas risadas nas horas de descontração, e pelas ajudas tão necessárias em vários momentos de dúvida e inexperiência. Se citar nomes, vou acabar esquecendo alguém, então aos muitos que de alguma forma ajudaram, muito obrigada.

À Dani e ao professor Luis Cláudio, pelo auxílio, pela paciência quando eu ia perguntar alguma coisa, pela disposição e por mostrar que por mais coisas que se tenha pra fazer, por mais pressa, por pior que possa parecer... Vai dar certo no final.

“Vencer sem dificuldades
É triunfar sem glória.”
(Sêneca)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VI
RESUMO.....	VII
1.0 INTRODUÇÃO.....	1
2.0 OBJETIVOS.....	12
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	16
5.0 RESULTADOS.....	16
6.0 DISCUSSÃO.....	24
7.0 CONCLUSÃO.....	33
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

AGPI.....	Ácido graxo poliinsaturado
AGPI n3.....	Ácido graxo poliinsaturado ômega 3
C.....	Grupo controle
C / GC.....	Grupo controle suplementado com gordura de côco
C / OP.....	Grupo controle suplementado com óleo de peixe
D.....	Grupo diabético
DM.....	Diabetes mellitus
DM1.....	Diabetes mellitus tipo 1
D / GC.....	Grupo diabético suplementado com gordura de côco
DHA.....	Ácido docosahexaenóico
D / OP.....	Grupo diabético suplementado com óleo de peixe
D / GC / I.....	Grupo diabético suplementado com gordura de côco e tratado com insulina
D / OP / I.....	Grupo diabético suplementado com óleo de peixe e tratado com insulina
EPA.....	Ácido eicosapentaenóico
EROs.....	Espécies reativas de oxigênio
GAD.....	Ácido glutâmico descarboxilase
GC.....	Gordura de côco
VLDL.....	Lipoproteína de muito baixa densidade
ICA.....	Anticorpos derivados das ilhotas
IL.....	Interleucina
IRS.....	Substrato do receptor da insulina
IAA.....	Anticorpos anti insulina
HDL.....	Lipoproteína de alta densidade
NADPH.....	Nicotinamida adenosina difosfato reduzida
OP.....	Óleo de peixe
SOD.....	Superóxido dismutase
TG.....	Triacilgliceróis
TNF α	Fator de Necrose Tumoral α

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Panorama mundial da prevalência do diabetes tipo I.....	3
Figura 2 Glicemia em mg/dL de todos os animais, 7 dias após a indução experimental do diabetes.....	17
Figura 3 Glicemia em mg/dL obtida ao final do período de 30 dias, diferenciado para cada grupo.....	18
Figura 4 Valores de triglicerídeos séricos em mg/dL obtidos ao final do período de 30 dias, diferenciado para cada grupo.....	19
Figura 5 Valores de colesterol total em mg/dL obtidos ao final de 30 dias, diferenciado para cada grupo.....	20
Figura 6 Valores de fagocitose expressos em porcentagem em relação ao grupo controle (C), diferenciado para cada grupo.....	21
Figura 7 Valores de retenção lisossomal, expressos em porcentagem em relação ao grupo controle (C), diferenciados para cada grupo.....	22
Figura 8 Valores de produção de ânion superóxido, expressos em porcentagem em relação ao grupo controle (C), diferenciados para cada grupo.....	23
Figura 9 Valores de produção de peróxido de hidrogênio, expressos em porcentagem em relação ao grupo controle (C), diferenciados para cada grupo.....	24
Figura 10 Esquema da estrutura do complexo enzimático NADPH oxidase.....	31

RESUMO

Devido ao grande número de portadores, cerca de 280 milhões de pessoas, a diabetes vem sendo estudada de forma cada vez maior nos últimos anos, não somente para determinar suas causas como também para investigar possíveis tratamentos que aumentem a qualidade de vida dos doentes. Causado pela destruição das células pancreáticas produtoras da insulina, o diabetes pode ser detectado principalmente por meio da hiperglicemia, ou seja, pelas elevadas concentrações séricas de glucose, além de elevadas taxas de lipídeos no sangue (hipertriacilglicerolemia). Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) ômega 3 são moléculas de hidrocarboneto com uma terminação carboxila (-COOH) e outra radical metila, e possuem mais de uma insaturação entre os carbonos da cadeia. São classificados através da posição da primeira dupla ligação a partir da extremidade metila na cadeia carbônica. Sua importância reside em serem mediadores de comunicação intercelular, através de seus metabólitos, os chamados eicosanóides, que podem ter efeitos pro ou antiinflamatórios, dependendo do ácido graxo que os deu origem. Este trabalho foi realizado a fim de obter mais conhecimento sobre os efeitos da suplementação com ácidos graxos ômega 3: EPA (ácido eicosapentaenóico) e DHA (ácido docosahexaenóico), no sistema imunitário e em parâmetros bioquímicos relevantes no quadro diabético em murinos (glicemia, triacilglicerol sérico, colesterol total, fagocitose, retenção lisossomal, produção de ânion superóxido e produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos). Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, suplementados com óleo de peixe e gordura de côco por 30 dias, em dose equivalente ao peso corpóreo de cada animal. O uso do óleo de peixe não mostrou resultados sobre os valores glicêmicos quando administrada isoladamente, entretanto, os triacilgliceróis foram reduzidos nos animais diabéticos, sendo possível também perceber efeito deletério da gordura saturada no grupo diabético em que foi utilizada. O colesterol, que apresentou aumento expressivo no grupo GC, não sofreu alteração no grupo OP, entretanto, foi reduzido no grupo D/OP. Não foi observada alteração na fagocitose entre os grupos controle e controle com suplementação, enquanto foi observado aumento neste parâmetro causado pelo quadro diabético. A retenção lisossomal, que foi menor nos animais diabéticos, se comparados com o grupo C, apresentou aumento no grupo D/OP, mas ambos os grupos tratados com hormônio apresentaram valores inferiores àqueles sem tal tratamento. A produção das espécies reativas de oxigênio possuiu diferenças entre os parâmetros analisados: o ânion superóxido sofreu aumento no grupo OP e queda no grupo GC, e a suplementação com n3 no grupo D/OP obteve aumento em relação ao grupo diabético (D). Já para o peróxido de hidrogênio, ambas as suplementações e o quadro diabético influenciaram da mesma forma, com queda em sua produção. Enquanto o grupo D/OP obteve valores superiores aos do grupo D, os grupos que foram tratados com insulina permaneceram na mesma faixa de valores, menor que os respectivos grupos D/OP e D/GC.

1.0 - INTRODUÇÃO

1.1 - INSULINA

Hormônio peptídico formado nas ilhotas de Langerhans no pâncreas pelas células β , que constituem grande parte da massa das ilhotas. Lá também encontramos outros tipos de células, principalmente as α e δ , responsáveis pela produção de glucagon e somatostatina, respectivamente (CONSTANZO, 2007; GUYTON & HALL, 2006).

A insulina consiste de duas cadeias (A e B) ligadas entre si por pontes dissulfeto. É formado primeiramente o pré-pró-hormônio, como resultado da tradução do RNAm no citoplasma, o qual é então enviado ao retículo endoplasmático para clivagem, liberando o pró-hormônio. Após nova clivagem, desta vez no Golgi, surge o hormônio funcional, juntamente com o chamado peptídeo C. Ambos são encaminhados para vesículas de secreção, e destas para os vasos que circundam as ilhotas quando há estímulo (CONSTANZO, 2007; GUYTON & HALL, 2006).

O controle do metabolismo das proteínas, dos lipídeos e carboidratos é o papel mais importante deste hormônio. As células são estimuladas a captar moléculas do sangue para formar proteínas, gordura e glicogênio, além de terem inibidas as reações de catálise (quebra) destes (CONSTANZO, 2007; GUYTON & HALL, 2006).

1.1.1 - Ação da Insulina

O principal estímulo para a liberação do hormônio é a ingestão de glucose. Quando a concentração sérica desta aumenta, ou seja, logo após refeições ricas em carboidratos, há o pico de secreção. Cerca de 80% das células do corpo aumentam sua captação de glucose, e o que não é estocado como glicogênio no fígado e no músculo é transformado em gordura e é enviado do fígado ao tecido adiposo (CONSTANZO, 2007; GUYTON & HALL, 2006).

Pode-se dizer que a principal função da insulina é a ativação de seu receptor (IR), uma glicoproteína tetramérica composta por quatro subunidades, duas α e duas β , havendo ligação daquelas entre si e a uma subunidade β por pontes dissulfeto. A ligação do hormônio ao receptor ocorre pelas porções α , que são extracelulares,

causando autofosforilação de uma parte das subunidades β , que são transmembrana. O receptor fosforilado desencadeia a fosforilação de várias proteínas intracelulares, chamadas de IRS (substratos do receptor de insulina), promovendo mudanças no metabolismo em cada tipo celular (CONSTANZO, 2007; GUYTON & HALL, 2006).

1.1.2 - Efeitos Imediatos e Tardios da Insulina

Como mencionado anteriormente, a captação de glucose é aumentada quase imediatamente pela maior parte dos tecidos, de forma potente: de 15 a 18 vezes mais glucose é interiorizada se comparadas às mesmas condições, na ausência de hormônio. Esse fato ocorre pelo maior número de vesículas contendo transportadores de glucose (GLUT) serem expostas à membrana (GUYTON & HALL, 2006).

A membrana fica também mais permeável a vários aminoácidos, ácidos graxos, K^+ , PO_4^{3-} e Mg^+ . Em escala de tempo mais lenta, ocorrem modificações no estado de fosforilação de diversas enzimas, causando alteração do metabolismo intracelular (CONSTANZO, 2007).

A velocidade de transcrição do DNA e tradução de ribossomos também são afetadas, mas em virtude de sua complexidade, os efeitos da ação da insulina no material genético demoram muito mais tempo para serem expressos (CONSTANZO, 2007; GUYTON & HALL, 2006).

1.2 - DIABETES

É doença que afeta o metabolismo pela ausência ou pela insensibilidade à insulina. Portanto, existem duas formas distintas da doença: a diabetes *mellitus* tipo I e II (DM I ou DM II), de acordo com classificação da American Diabetes Association (LAMBERT & BINGLEY, 2006).

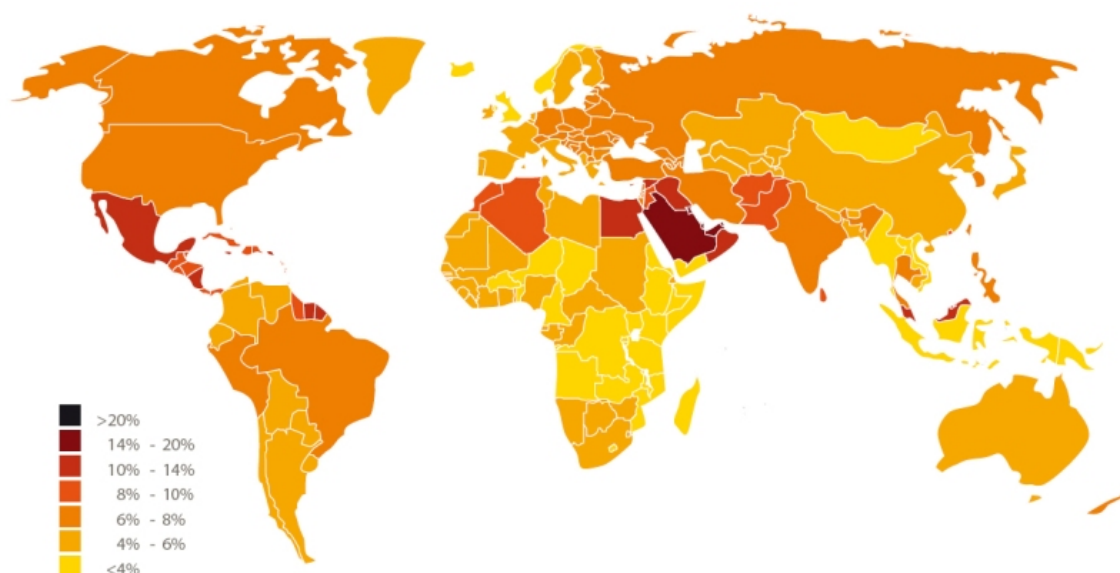
1.2.1 - Incidência e Prevalência

De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (2008) estima-se que mais de 280 milhões de pessoas possuam diabetes atualmente, e esse número vem aumentando, de acordo com dados europeus, principalmente a DM I entre crianças e adolescentes. De fato, a DM I é o tipo mais comum nesta faixa etária, apesar de ser a diabetes que menos ocorre no total de casos. De acordo com a terceira edição do

Diabetes Atlas existem 246 milhões de pessoas entre 20 e 79 anos com diabetes, dividindo-se quase igualmente entre os sexos (e-ATLAS - INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2008).

Observando a figura abaixo, percebe-se que os casos estão concentrados em países nórdicos, mas um fato curioso é que cerca de 80% das mortes ocorrem nos países com média incidência de doentes, como o Brasil (OMS, 2008). Estudos realizados nas mesmas populações em vários períodos mostram que há um aumento na prevalência da diabetes, principalmente em países de renda baixa (ROGLIC, 2009).

Prevalence estimates of diabetes, 2007



SOURCE: DIABETES ATLAS THIRD EDITION, © INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2006

FIGURA 1- Prevalência mundial de pessoas com diabetes (Diabetes Atlas, 3ª edição, International Diabetes Federation, 2006).

1.2.1 - Diabetes *mellitus* tipo I

Nesta forma de síndrome, o hormônio não é secretado pelas células responsáveis por sua produção, porque sofrem ataque autoimune (RABINOVITCH; SUAREZ-PINZON, 1998), o qual pode estar associado a patógenos virais e à hereditariedade. Atualmente, não se sabe ao certo o que torna essas células suscetíveis ao ataque do sistema de defesa do corpo, mas sabe-se que a enfermidade

é resultado de predisposição genética associada a fatores ambientais (LAMBERT, BINGLEY, 2006; RABINOVITCH; SUAREZ-PINZON, 1998).

A maioria dos casos apresenta um desenvolvimento repentino, em geral na adolescência, com alguns sintomas típicos: glicemia acima do limite; utilização de lipídeos para suprir a demanda energética; formação de colesterol pelo fígado e nível de proteínas diminuído (hipoproteinemia). Chama-se insulite a fase inicial da doença, caracterizada pela infiltração de células mononucleares nas ilhotas, provocando sua destruição (LAMBERT & BINGLEY, 2006).

1.2.1.1 - Sintomas

A grande quantidade de glucose sanguínea, causada pela má absorção das células, acaba sendo excretada pela urina, pois os túbulos renais não conseguem recaptá-la; ocorre desidratação, já que a pressão osmótica gerada pela diferença de concentração mobiliza água das células para seu exterior, assim como pela perda nos túbulos renais que são incapazes de reabsorvê-la. Como resultado, há grande volume de urina, desidratação intra e extracelular; sede e perda de K^+ , este último ocorrendo já que a insulina promove sua captação. Pode ser assim comparada ao jejum, já que em ambos há estado de hipoinsulinemia (CONSTANZO, 2007; GUYTON & HALL, 2006.).

A alta taxa de morte por doenças cardiovasculares entre a população diabética é associada ao perfil lipídico desfavorável destes pacientes. Esse perfil é caracterizado por concentrações aumentadas de lipídeos na corrente sanguínea, principalmente lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), e baixa quantidade de lipoproteína de alta densidade (HDL). A maior causa de morte nesses pacientes são doenças macrovasculares, particularmente ataque cardíaco, e aterosclerose das extremidades. Além disso, a incidência destas complicações é várias vezes maior em pessoas diabéticas que em indivíduos saudáveis (CONNOR, 1995).

1.3 – ÁCIDOS GRAXOS

1.3.1 - Composição e Classificação

Os ácidos graxos são moléculas orgânicas formadas por cadeias de hidrocarbonetos que têm um radical metil ($-\text{CH}_3$) em uma ponta e um radical carboxil ($-\text{COOH}$) na oposta. Dividem-se entre os saturados e os insaturados, sendo que estes podem ser mono ou poliinsaturados. Em outras palavras, os ácidos graxos podem apresentar ou não duplas ligações entre os átomos de carbono em suas cadeias alifáticas (CURI, 2002).

Os ácidos graxos ômega 3 ($n3$) são aqueles que possuem a primeira insaturação na 3ª posição a partir da extremidade metil, ao passo que os da família ômega 6 ($n6$) têm essa insaturação no 6º carbono (DREVON, BAKASAAS, KROKAN, 1993; CURI, 2002).

1.3.2 – Importância

Esses ácidos graxos são considerados nutrientes essenciais, porque o organismo só tem acesso a eles através da alimentação e porque possuem diversas atividades biológicas, como influência na atividade plaquetária, na composição de membranas, regulação de atividade e crescimento de tipos celulares, imunorreações, comunicação celular, dentre outras. Dietas pobres em um ou ambos ácidos acarretam várias complicações (DE CATERINA, 2007; CURI, 2002).

Suas propriedades biológicas dependem do comprimento da cadeia alifática, número de insaturações, as posições onde estas se inserem e sua configuração *cis* ou *trans*. AGPI's se dividem em duas famílias ou séries: a do ômega 6, derivando do ácido linoléico (LA) como precursor; e a do ômega 3, tendo o ácido α linolênico (α LNA) como precursor. O LA é amplamente encontrado em diversos óleos de origem vegetal, ao passo que o α LNA em óleos de sementes, como canola, amendoim, e linhaça (DE CATERINA, 2007).

Quanto à comunicação celular, os derivados dos ácidos graxos são nomeados de eicosanóides, que diferem entre si dependendo do ácido que os deu origem. Normalmente aqueles vindos da série AGPI $n6$ são mais potentes que os da série AGPI $n3$, quanto à produção de citocinas pró inflamatórias, sendo que ambas competem pelas mesmas enzimas para a produção de tais citocinas (KELLEY, 2001).

Das várias fontes alimentares em que estão disponíveis, o ômega 6 é encontrado especialmente em grãos e óleos vegetais. Já os ácidos graxos do outro grupo, os de 18 carbonos, estão presentes em alimentos vegetais e os de cadeia longa (com 20 ou 22 carbonos) existem em frutos do mar (KRIS-ETHERTON, HARRIS, APPEL, 2009-ETHERTON, 2002; KELLEY, 2001).

Leucotrienos, prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina e lipoxinas são diferentes tipos de eicosanóides, moléculas de sinalização derivadas de ácidos graxos compostos de 20 carbonos. Cada tipo celular produz diferentes tipos de eicosanóides, responsáveis por funções distintas (CURI, 2002).

Os ácidos graxos n3 e n6 são constituintes importantes da estrutura das membranas das células. Podem ser gerados principalmente pela ação da fosfolipase A₂, e posteriormente metabolizados por ciclooxigenases (COX) e lipooxigenases em seus produtos de comunicação celular. A ingestão de óleo de peixe, rico em AGPI n3, altera a fluidez da membrana graças à incorporação de DHA e EPA nos fosfolípidos de membrana, diminuindo a proporção de ácido araquidônico (AA) nela. Essa mudança também muda a atividade de proteínas inseridas na bicamada, além das interações hidrofóbicas locais. A sinalização intracelular também pode ser alterada pela ingestão de AGPI n3, por meio da modulação da fluidez de membrana, composição de "lipid rafts" e produção de segundos mensageiros (LIMA *et al.* 2007). A viscosidade do plasma é também alterada, não só pela incorporação de ácidos graxos de cadeia longa nas proteínas plasmáticas, como pela conseqüente mudança nas propriedades físicas do LDL (DE CATERINA, 2007; DREVON, BAKASAAS, KROKAN, 1993).

1.4 - SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imunológico constitui as barreiras químicas, físicas e biológicas que o corpo já possui ou desenvolve quando apresentado a um patógeno ou mesmo para evitar a entrada deste (JANEWAY *et al.*, 2007).

As respostas do corpo em reação ao microorganismo ou parasita são, em geral, divididas em resposta imune inata e resposta imune adaptativa. Aquela é composta de agentes presentes desde antes da infecção, assim, não é necessária uma exposição ou sensibilização prévia para que os componentes desta resposta entrem em atividade (JANEWAY *et al.*, 2007).

A partir do momento em que as primeiras barreiras impostas pela imunidade inata não são suficientes para eliminar a fonte de infecção, vai sendo moldada uma resposta mais específica e potente – a resposta adaptativa, que compreende a formação de anticorpos e que pode permanecer ativa durante anos, ou até pelo resto da vida do indivíduo. Entretanto, sabe-se que a formação desta resposta mais eficaz só ocorre após sua ativação por componentes da imunidade inata (JANEWAY *et al.*, 2007).

1.4.1 - Células do sistema imune

1.4.1.1 - Fagócitos

Células especializadas em engolfar outras células e moléculas estranhas, é uma classe composta pelos macrófagos/monócitos e neutrófilos, que fazem parte da resposta imune inata. Os macrófagos são formas derivadas dos precursores imaturos da medula óssea, os chamados monócitos, os quais são circulantes e migram para algum tecido periférico. A partir desse momento passam a ter a morfologia de um macrófago, permanecendo pouco ativos, com baixa mobilidade e produção de substâncias microbicidas (JANEWAY *et al.*, 2007).

Reconhecem antígenos quando esses ultrapassam a pele pela primeira vez. Desta forma, não é necessária a apresentação dos antígenos para que haja a ativação dos macrófagos (CURI *et al.*, 2002). Daí em diante desenvolve-se o processo inflamatório caso haja um novo contato com o antígeno, com secreção de quimiocinas e citocinas. Esses compostos serão captados por outros tipos celulares, gerando ativação de diferentes tipos celulares que levam à instalação e progresso do processo inflamatório (JANEWAY *et al.*, 2007).

1.4.1.1.1 - Fagocitose

A fagocitose é um processo de endocitose pelo qual os patógenos e células mortas necessitam ser reconhecidos através de receptores de superfície dos fagócitos (macrófago ou neutrófilo), o que os leva a serem englobados pela membrana destas células, resultando na formação de uma vesícula chamada fagossomo. Esta estrutura tende a acidificar-se, através da ativação de bombas de hidrogênio em sua membrana, processo que mata muitos dos patógenos em seu interior. Associado a isto, ocorre

fusão de outras vesículas citoplasmáticas chamadas lisossomos, os quais contêm enzimas, formando então o fagolisossoma (JANEWAY *et al.*, 2007).

Os fagócitos também são capazes de produzir substâncias tóxicas que desempenham papel na destruição dos microorganismos fagocitados. Dentre eles estão o óxido nítrico (NO), ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (JANEWAY *et al.*, 2007).

1.4.1.2 - Linfócitos

Os linfócitos, células dendríticas e as NK (*natural killer*) são tipos celulares derivados do progenitor linfóide comum. Existem dois tipos principais de linfócitos: B e T. As células B são responsáveis pela secreção de anticorpos, quando ativadas. Já as células T, quando também ativas, podem se transformar em um de dois tipos: as células T citotóxicas, cuja atividade é destruir células infectadas por vírus; ou células de memória, responsáveis pela ativação de outras células B e T (JANEWAY *et al.*, 2007).

Os linfócitos têm a capacidade de reconhecer moléculas não próprias através de dois sítios de ligação: pelas imunoglobulinas e pelos receptores das células T. A grande variedade de moléculas que podem ser reconhecidas por essas células depende do processo de rearranjo gênico, ou seja, dentre vários segmentos presentes no DNA, em cada célula ainda imatura, há ligação entre alguns trechos e outros que são deletados, dando origem a receptores de alta diversidade (JANEWAY *et al.*, 2007).

A ativação dos linfócitos ocorre principalmente nos órgãos linfóides, como baço e linfonodos. É necessário, além da ligação do antígeno, o sinal fornecido por células chamadas APCs (células apresentadoras de antígeno), ou sinal coestimulador, que consiste dos mesmos antígenos captados pelos linfócitos (JANEWAY *et al.*, 2007).

A seleção das células auto tolerantes durante os primeiros estágios da formação do sistema imune ocorre no baço e no timo, resultando na morte de grande quantidade de células necróticas que devem ser eliminadas. A falha durante a fagocitose de tais células pode tornar possível o seu acúmulo, resultando na apresentação destes antígenos às células T através das células dendríticas em locais

de ativação (baço e linfonodos), desencadeando respostas auto imunes (LAMBERT, BINGLEY, 2006; MAREÉ *et al*, 2005).

1.4.1.2.1 - Anticorpos

São as formas secretadas dos receptores de antígeno das células B, com estrutura em forma de Y e compostos de duas regiões: uma constante, chamada região efetora, responsável por determinar como se dará a eliminação do patógeno, classifica a molécula dentro de um dos cinco grupos de imunoglobulinas; e outra, variável, formada pelo rearranjo gênico de blocos de genes durante a formação do linfócito, e que contém o sítio de ligação com os antígenos. A forma mais eficiente e rápida de os anticorpos impedirem a proliferação de patógenos ou algum dano resultante da ação de suas toxinas é através da neutralização, ou seja, a ligação dos anticorpos de forma a bloquear o acesso às células que poderiam ser infectadas. Este aspecto é importante pelo fato de que células fagocíticas são capazes de reconhecer a região constante dos anticorpos, e estando a bactéria recoberta pelos anticorpos (opsonizada), facilita a fagocitose pelas células de defesa. (JANEWAY *et al*, 2007).

Anticorpos derivados das ilhotas (ICA) são proteínas produzidas em resposta a autoantígenos das ilhotas, ou seja, são imunoglobulinas secretadas por células do sistema imune, não capazes de reconhecer as células β como próprias. Por esta razão, podem ser utilizados como marcadores de risco para detectar a doença, ainda nas suas fases iniciais ou até mesmo como forma de preveni-la (LAMBERT & BINGLEY, 2006).

Outros anticorpos, como os GAD (ácido glutâmico descarboxilase), e os IA-2 e IA-2 β (anticorpos contra proteína tirosina fosfatase transmembrana de células beta) são os em maior quantidade durante a inflamação. IAA (anticorpos anti insulina) são outros autoanticorpos secretados, cuja quantidade também diminui conforme o paciente aumenta de idade, assim como os IA. Dessa forma, os marcadores mais confiáveis para diabetes tardia são os ICA (islet cell antibodies – anticorpos contra as ilhotas) e os GAD (LAMBERT & BINGLEY, 2006).

1.5 - DIABETES E ÓLEO DE PEIXE

De modo indireto, os ácidos graxos, através do estímulo da glucose, facilitam a secreção de insulina pelo pâncreas, pois a glucose inibe a utilização de um metabólito dos AG (acil CoA), de modo que seja acumulado no citoplasma. Esse acúmulo atua de dois modos na liberação do hormônio: estimulando a saída de cálcio do retículo, o que causa fusão de vesículas na membrana; e pelo fechamento dos canais de potássio, promovendo então a saída da proteína (CURI *et al.*, 2002).

Outras enzimas importantes para a regulação de canais iônicos e fusão de vesículas também são moduladas, não somente pelos metabólitos de ácidos graxos (CURI *et al.*, 2002).

Dois extremos podem ocorrer: o excesso de AG causa hiperinsulinemia, em resposta ao estímulo positivo para a liberação do hormônio. Se continuamente houver sobrecarga de AG, perde-se a capacidade de responder a este estímulo, como se as células β se acostumassem ao novo nível de ácidos graxos. Ocorre apoptose da célula após um certo período, pela produção de óxido nítrico (NO). Por outro lado, a falta de AG causa a insensibilidade das células β de responder tanto ao estímulo de carboidrato como de proteínas. Esse nível é modulado pelo PPAR α (receptor ativado pelo proliferador peroxissomo) (CURI *et al.*, 2002).

A suplementação na dieta com ácidos graxos AGPI ômega 3 inibe a quimiotaxia de neutrófilos e a aderência às células dos vasos sanguíneos, devido à redução na produção de LTB₄ via lipoxigenase-5 do metabolismo do ácido araquidônico (POCIOT *et al.*, 1991). Por meio de tal enzima, EPA dá origem a leucotrienos da série 5, como LTB₅, LTC₅, LTD₅ e LTE₅, os quais são menos proinflamatórios e vasoconstritores que os da série 4. Dessa forma, a ingestão de maiores quantidades de AGPI ômega 3 na dieta promove queda na intensidade de reações inflamatórias (ZAMPOLLI, DE CATERINA, 2004 apud DE CATERINA, 2007).

1.6 - DIABETES MELLITUS E SISTEMA IMUNOLÓGICO

O consumo de maiores quantidades de peixe por certas populações, associadas à menor ingestão de gordura saturada vêm sendo apontado como uma importante explicação para menores níveis de doenças cardiovasculares e diabetes entre essas populações (FRIEDBERG *et al.*, 1998; CONNOR, 1995; DE CATERINA, 2007). Desta forma, ao integrar maior quantidade de AGPI n3 na dieta, principalmente

EPA (ácido eicosapentaenóico) e DHA (ácido docosahexaenóico), ocorrem mudanças também na composição de membrana, a qual tem uma parte de seus fosfolípidos AGPI n6 parcialmente substituídos por AGPI n3, e isto implica em mudanças no metabolismo dos derivados destes ácidos, como a produção de leucotrienos e tromboxanos. Ácidos graxos ômega 3 também reduzem pressão sanguínea e a reatividade de plaquetas e leucócitos, diminuem níveis de triglicerídeos plasmáticos, reduzem a aterogênese e trombose em muitos estudos e possuem atividade antiarrítmica (DE CATERINA, 2007). Dietas ricas em AGPI n3 também são capazes de diminuir a quantidade de linfócitos T e B após estimulação (CURI *et al.*, 2002).

1.6.1 Citocinas Inflamatórias

Várias doenças chamadas autoimunes como artrite reumatóide, DM I, glomerulonefrite, são resultado do ataque de células do sistema de defesa a tecidos ou regiões específicas do corpo que não são reconhecidos. Produtos destas células, como TNF- α (fator de necrose tumoral) e IL-1 β são exemplos de substâncias chamadas citocinas, que levam ao processo inflamatório e à destruição do tecido e causando a doença ou lesão (RABINOVITCH, SUAREZ-PINZON, 1998).

Sendo a diabetes tipo 1 doença causada por morte celular, há evidências de que tal destruição seja causada pelo ataque autoimune contra antígenos específicos das células β (BACH, 1994 apud RABINOVITCH, SUAREZ-PINZON, 1998). Sabe-se que normalmente existem linfócitos T específicos para antígenos das células pancreáticas, mas que sua atividade é restringida por mecanismos que resultam na tolerância a antígenos próprios. Havendo falha em um ou mais mecanismos que levam a esta tolerância, são permitidas que células reativas entrem em contato com tais antígenos, causem insulite e desencadeiem uma resposta de destruição do tecido. Existem hipóteses de que essa resposta possa ser mediada por um conjunto de células Th1, ao passo que células Th2 possam conferir efeito protetor, ambas através das citocinas específicas a cada classe secretadas (RABINOVITCH, SUAREZ-PINZON, 1998).

Cada uma destas classes de células (Th1 e Th2) são produtoras de tipos diferentes de citocinas (MOSMANN, COFFMAN, 1989 apud RABINOVITCH, SUAREZ-PINZON, 1998). As células Th1 secretam IL-2, TNF- β e INF- γ (interferon β e γ), ao passo que as Th2 secretam IL-4 e IL-10, e essas diferenças levam a distintas funções das células T (RABINOVITCH, SUAREZ-PINZON, 1998).

2.0 - OBJETIVOS

Avaliar o efeito da suplementação com ácidos graxos ômega 3 sobre os seguintes parâmetros:

- Concentrações plasmáticas de glucose, colesterol e triacilglicerol;
- Atividade fagocitária, volume lisossomal, produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal.

3.0 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - ANIMAIS

Utilizamos ratos da linhagem Wistar com aproximadamente 70 dias de idade e aproximadamente 200 g, obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (22h/10h) e temperatura constante aproximada de 23°C em gaiolas coletivas com cinco animais por grupo. Foram formados 8 grupos, a saber: Controle alimentado somente com ração (C); suplementado com óleo de peixe (OP) ou gordura de coco (GC); diabetizado (D); diabetizado suplementado com óleo de peixe (D/OP) ou com gordura de coco (D/GC). Além destes, também foram utilizados dois grupos diabetizados e suplementados, com tratamento adicional de insulina: (D/OP/I) e (D/GC/I). Durante todo o período experimental os animais receberam água e ração à vontade. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA).

3.2 - INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL

Os animais que seriam diabetizados foram colocados em jejum 12 horas antes da administração intravenosa de estreptozotocina, na dose de 45 mg/kg peso corporal. A droga foi dissolvida em tampão citrato (ácido cítrico 18,2 mM; Na₂HPO₄. 12H₂O 29,6 mM; pH 4,8) (JUNOD *et al.*, 1969), preparado no dia da indução. Após o procedimento de indução, os animais foram mantidos por mais 1 hora em jejum, de forma que a competição da estreptozotocina com a glucose pelo receptor GLUT2 nas células beta fosse evitada (SZKUDELSKI, 2001). O diabetes experimental foi confirmado uma semana após a indução, por meio da mensuração da glucose plasmática. Coletamos o sangue periférico pela cauda dos animais e com auxílio do

glicosímetro *One Touch Ultra® Johnson & Johnson*, a glicemia foi dosada, após jejum prévio de 12 horas. Os ratos com glicemia igual ou superior a 220 mg/dL foram considerados diabéticos.

3.3 - SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE

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

3.4 - ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA

Insulina *70/30 Humulin* foi administrada aos animais pertencentes aos grupos D/OP/I e D/GC/I, via subcutânea e diariamente. A dose utilizada foi de 4U por rato, administradas sempre no mesmo horário (9 horas da manhã).

3.5 - PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

3.5.1 - Mensuração da glucose Plasmática

Foi utilizado o método enzimático colorimétrico do kit glucose-oxidase da Bioliquid, para a mensuração da glucose no plasma. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 505 nm, e os resultados expressos em mg/dl (Microplate Reader Biorad - Benchmark®)

3.5.2 - Perfil Lipídico Plasmático

Foi utilizado o método enzimático colorimétrico para determinação de TG e colesterol total, através dos kits GPO-Trinder e colesterol total, respectivamente, da Bioliquid. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro a 500 nm (Microplate Reader Biorad - Benchmark®) e os resultados expressos da mesma forma que a glucose plasmática.

3.6 - ENSAIOS COM MACRÓFAGOS

3.6.1 - Obtenção de macrófagos peritoneais

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

3.6.2 - Fagocitose de Zimosan

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

3.6.3 – Volume Lisossomal

Foi utilizado o método proposto por Pipe, Cole e Farley (1995). Assim, em placas de 96 poços foi depositado 100 µL da solução contendo 10^5 células e 20 µL da solução estoque de vermelho neutro a 2%. Após um período de 30 minutos a placa foi centrifugada por 5 minutos por 1500 rpm. O sobrenadante foi então descartado e os poços lavados com PBS para se eliminar o vermelho neutro que não foi internalizado pelas células. Posteriormente, o vermelho neutro contido nos lisossomos foi solubilizado pela adição de 100 µL de solução de extração. Este procedimento é viável, pois o vermelho neutro é corante catiônico que se difunde através da membrana celular e se mantém no lisossomo pela mudança de pH que encontra neste compartimento, o qual é ácido, e isto ocasiona alteração de cargas neste corante. A leitura foi realizada após 30 minutos em 550 nm através de leitor de microplacas

(Microplate Reader Biorad - Benchmark®). Os dados foram expressos como média \pm EPM da porcentagem de cada grupo em relação ao grupo controle (C).

3.6.4 – Produção de Ânion Superóxido

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

3.6.5 – Produção de Peróxido de Hidrogênio

Foi realizada através de método descrito por Pick e Mizel (1981). Sendo assim, a produção de peróxido de hidrogênio pôde ser mensurada através da oxidação de vermelho fenol. Alíquotas de 100 μ L da solução peritoneal contendo macrófagos foram plaqueadas em microplacas de 96 poços. Após período de incubação de 1 hora no escuro (para evitar foto-oxidação) e o sobrenadante descartado, 100 μ L de vermelho fenol contendo peroxidase (horseradish) e zimosan foram adicionados. A placa foi incubada por mais 30 minutos e a leitura feita a 620 nm em leitor de microplacas (Microplate reader Biorad - Benchmark®). Os dados foram expressos como média \pm EPM da porcentagem de cada grupo em relação ao grupo controle (C).

3.6.6 Ensaio de adesão

Foram plaqueados, em microplacas de 96 poços 100 μ L de células na concentração de 2×10^5 . Incubou-se por 1 hora em estufa a 37 °C e submeteu-se a procedimentos de lavagem. Metanol 50% foi adicionado para fixação das células e incubado por 5 minutos. Giemsa 0,2% foi adicionado e a microplaca incubada por 40

minutos. Metanol foi adicionado para solubilizar o corante. Após 30 minutos de incubação, a leitura foi realizada a 550 nm (dados não mostrados). O resultado foi expresso como absorvância de 2×10^6 células/mL.

4.0 - Análise Estatística

Os dados deste trabalho estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) dos 8 grupos experimentais e foram submetidos à análise de variância de duas vias, empregou-se pós teste de Bonferroni, tendo como fator o diabetes e a suplementação; e à análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey, para populações com distribuição normal. Para as populações que não seguiram distribuições gaussianas, foi utilizada análise de variância não-paramétrica (teste de Kruskal-Wallis), seguido de pós-teste de Dunn. Teste “t” de Student foi utilizado quando indicado. A significância estatística foi aceita quando $p < 0,05$. As análises e os gráficos foram realizados com o auxílio do software GraphPad Prism® (GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, Free Trial, GraphPad Software, San Diego California EUA).

5.0 - RESULTADOS

5.1 - PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PLASMÁTICOS

5.1.1 – Glicemia

A concentração sanguínea de glucose dos animais foi verificada uma semana após a indução do diabetes experimental, em todos os animais. Constatamos, de acordo com a figura 2, que o valor obtido para o grupo controle foi de $82,33 \pm 3,48$; ($n = 15$), ao passo que os animais que sofreram a diabetização registraram valores quatro vezes maiores $379,30 \pm 9,11$ ($n = 68$), diferença esta significativa ($p < 0,0001$).

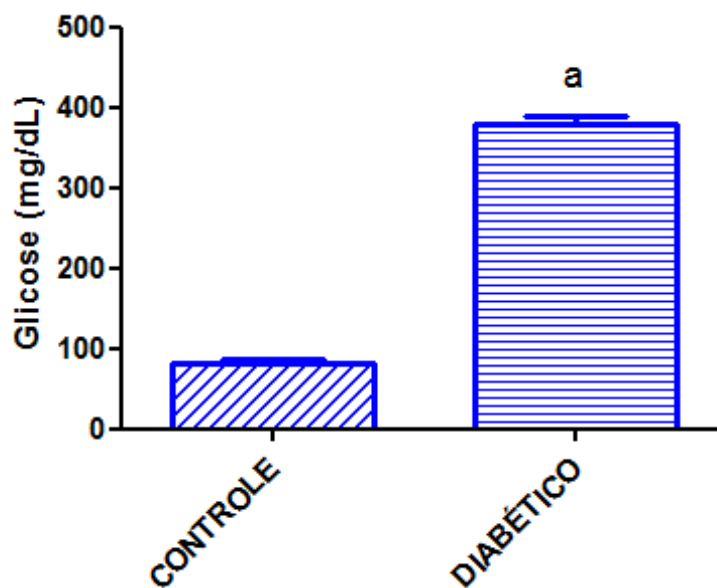


Fig. 2: Glicemia obtida dos animais em jejum, em mg/dL, sete dias após a indução.
^a $p < 0,0001$ ao ser comparado ao controle.

As glicemias estão demonstradas na figura 3, separadas por grupo. Os valores para os animais controle e controles suplementados ficaram dentro da mesma faixa, apresentando normoglicemia (glicemia do grupo controle: $74,33 \pm 3,77$). Quando são comparados os grupos controle e diabético, observa-se que o quadro diabético aumentou em mais de 400% o valor sérico de glucose (glicemia do grupo diabético: $379,10 \pm 28,58$). Os valores para o grupo diabético e os grupos diabéticos com suplementação foram semelhantes entre si (grupo diabético: D, grupo diabético suplementado com óleo de peixe: D/OP, grupo diabético suplementado com gordura de côco: D/GC), porém verificamos que a glicemia dos animais com o quadro diabético suplementados difere significativamente dos dados dos seus respectivos controles (C/OP e C/GC): $328 \pm 26,90$ e $358,10 \pm 19,32$, respectivamente, ou seja, 382% e 395,8% de aumento.

O tratamento com insulina fez com que os níveis plasmáticos de glucose fossem reduzidos nos grupos em que foi utilizada ($84,81 \pm 21,38$ para D/OP/I e $81,77 \pm 17,88$ para D/CG/I) assemelhando-se com seus respectivos controles ($p < 0,05$).

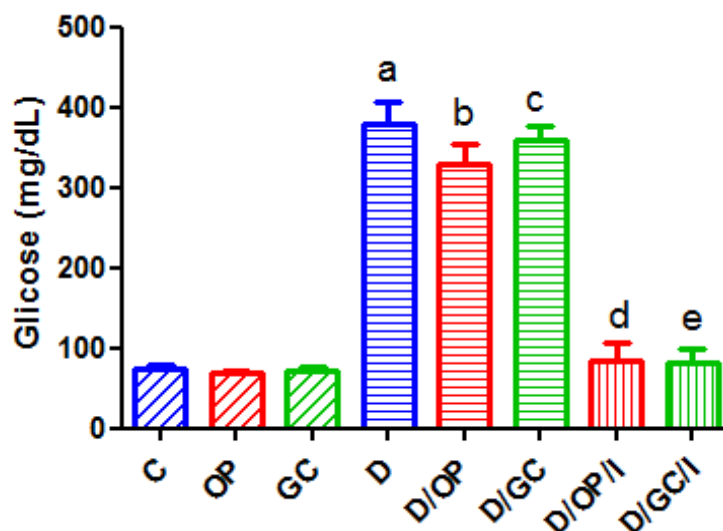


Fig. 3: Valores de glicose plasmática (mg/dL) para cada grupo. ^a $p < 0,05$ quando comparado ao grupo C. ^b $p < 0,05$ quando comparado ao grupo C/OP. ^c $p < 0,05$ quando comparado ao grupo C/GC. ^d $p < 0,05$ quando comparado ao grupo D/OP. ^e $p < 0,05$ quando comparado ao grupo D/GC.

5.1.2 Lipídeos Plasmáticos

5.1.2.1 Triacilgliceróis

Os dados dos triacilgliceróis plasmáticos estão representados na figura 4. De acordo com ela, os grupos não diabetizados apresentaram concentrações semelhantes (para o grupo C: $63,04 \pm 5,48$; OP: $51,04 \pm 4,37$; GC: $61,22 \pm 6,00$), de forma que a suplementação não alterou de forma significativa esse parâmetro ($p > 0,05$). Entretanto, o grupo diabético (D) mostrou valores expressivos ao ser comparado ao grupo não doente (C): $108,8 \pm 7,80$ ($p < 0,01$). Os grupos com o quadro diabético e suplementados apresentaram alterações entre si, de modo que o grupo D/OP evidenciou queda na concentração de triglicerídeos plasmáticos ao ser comparado ao grupo D: $71,05 \pm 7,99$ ($p < 0,05$). O grupo suplementado com gordura de côco (D/GC) apresentou aumento: $118,53 \pm 17,41$, quando comparado ao grupo com a mesma suplementação, mas sem o quadro doentio (C/GC) ($p < 0,001$). Os grupos tratados com insulina mostraram valores próximos: $64,46 \pm 5,05$ para o grupo D/OP/I e $63,53 \pm 5,58$ para D/GC/I.

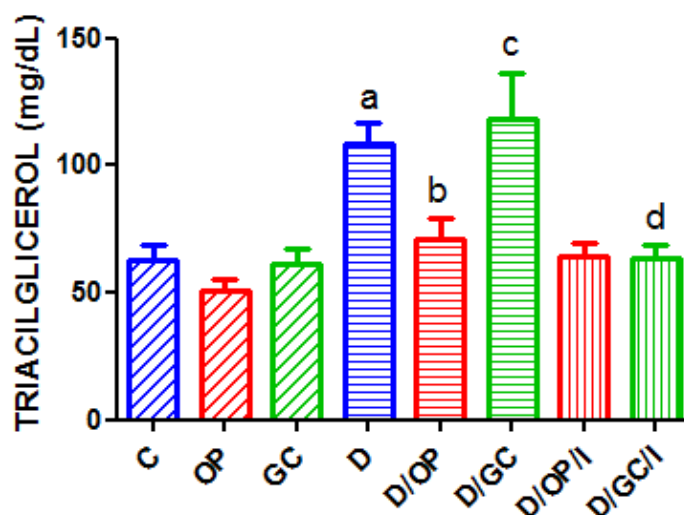


Fig. 4: Valores de triacilgliceróis plasmáticos. ^a $p < 0,01$ quando comparados os grupos D e C; ^b $p < 0,05$ quando comparados os grupos D/OP e D; ^c $p < 0,001$ quando comparados os grupos D/GC e GC; ^d $p < 0,05$ quando comparados os grupos D/GC/I e D/GC.

5.1.2.3 Colesterol

Os resultados obtidos quanto à concentração plasmática de colesterol estão evidenciados na figura 5. Em relação ao grupo controle, que alcançou valor de $42,78 \pm 2,45$, os animais suplementados com óleo de peixe obtiveram valores próximos, chegando a $39,65 \pm 3,56$, portanto sem diferença estatística ($p > 0,05$). Diferentemente, aqueles suplementados com gordura de côco mostraram colesterolemia de $66,24 \pm 6,42$, resultado significativamente maior que o obtido pelo grupo controle ($p < 0,05$). Os animais diabéticos apresentaram produção de colesterol de $55,36 \pm 7,08$ mg/dL, ao passo que aqueles que receberam óleo de peixe produziram $29,90 \pm 4,50$ mg/dL, valor significativamente menor que os anteriormente citados ($p < 0,01$). Os ratos diabéticos que foram suplementados com gordura de côco apresentaram valores de $60,56 \pm 6,37$ mg/dL de colesterolemia. Os animais do grupo D/GC/I obtiveram valores potencialmente menores comparados aos grupos D/GC ($p < 0,05$), enquanto o grupo D/OP/I não foi diferente do grupo D/OP ($p > 0,05$).

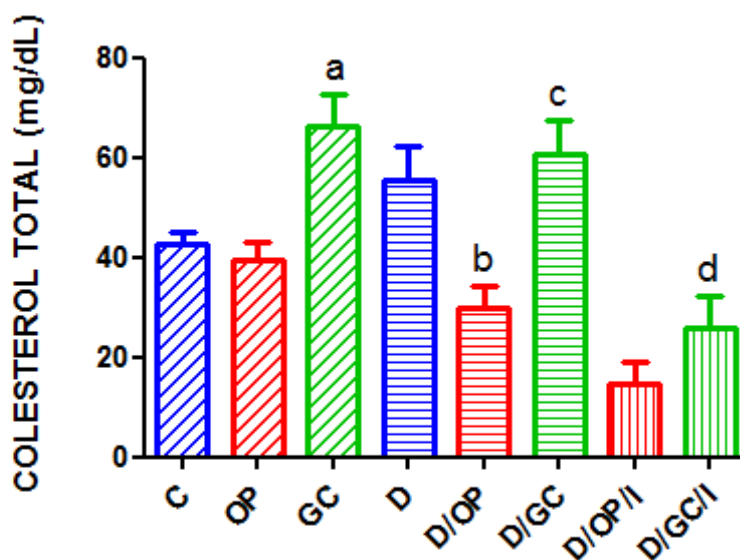


Fig.5: Concentrações plasmáticas de colesterol total nos diversos grupos, expressas em mg/dL. ^ap<0,05 quando comparados os grupos GC e C; ^bp<0,01 quando comparados os grupos D/OP e D; ^cp<0,05 quando comparados os grupos D/GC e D/OP; ^dp<0,05 quando comparados os grupos D/GC/I e D/CG.

5.2 - ENSAIOS COM MACRÓFAGOS

5.2.1 - Fagocitose

Os dados obtidos para a fagocitose são apresentados na figura 6, e expressos em porcentagem em relação ao controle. Foi notada certa homogeneidade entre os valores obtidos para os animais dos grupos controle suplementados, de forma que aqueles que receberam óleo de peixe apresentaram $109,23 \pm 7,67$, ao passo que os que foram suplementados com gordura de côco obtiveram valores de $88,51 \pm 11,69$ ($p>0,05$). O grupo com o quadro diabético apresentou fagocitose de $131,4 \pm 10,42$, sendo significativamente maior que o valor do grupo controle ($p<0,05$). Já os grupos diabéticos suplementados apresentaram valores semelhantes, de $133,15 \pm 9,82$ para o grupo D/OP e $135,65 \pm 5,96$ para o grupo D/GC. A terapia com insulina permitiu que os valores diminuíssem de forma significativa ($p<0,05$ para ambos os grupos D/OP/I e D/GC/I), se comparados aos respectivos grupos com o quadro diabético, mas sem o tratamento, de tal modo que para D/OP/I $107,8 \pm 6,72$ e para D/GC/I $87,90 \pm 11,74$.

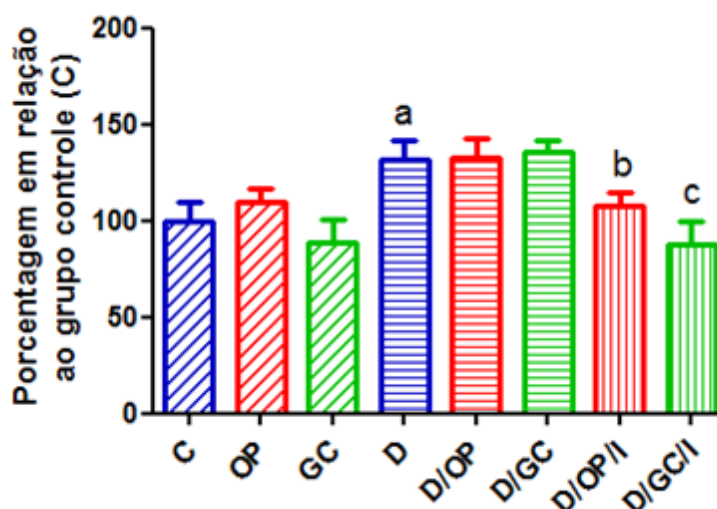


Fig. 6: Porcentagem de fagocitose expressa em relação ao grupo controle. ^a $p < 0,05$ quando comparados os grupos D e C; ^b $p < 0,05$ quando comparados os grupos D/OP/I e D/OP; ^c $p < 0,05$ quando comparados os grupos D/GC/I e D/GC.

5.2.2 - RETENÇÃO LISOSSOMAL

A retenção de lisossomos no citoplasma dos macrófagos foi uniforme entre os animais dos grupos controle e controle com suplementação, de acordo com a figura 7: o grupo controle apresentou o valor referência ($100,00 \pm 7,25$), ao passo que o suplementado com óleo de peixe apresentou $107,4 \pm 11,88$; já o grupo que recebeu gordura saturada $86,59 \pm 11,79$. Desta forma, podemos dizer que tais valores são homogêneos ($p > 0,05$).

Novamente tomando o grupo controle como referência, podemos afirmar que o quadro diabético isolado foi capaz de gerar menor retenção de lisossomos, uma vez que o valor obtido foi de $66,30 \pm 2,75$, valor significativamente menor que o do grupo controle ($p < 0,01$).

O quadro diabético associado à suplementação promoveu aumento na retenção dos lisossomos, mas somente com o óleo de peixe possuindo valores significativos ($134,36 \pm 7,25$) ao ser comparado com os animais do grupo diabético (D) ($p < 0,001$). A suplementação com gordura saturada obteve valores de $82,50 \pm 5,47$,

não sendo significativamente maior que o do grupo D ($p > 0,05$). Observando os grupos tratados com insulina, percebemos que houve uma queda na retenção de tais vesículas, de forma que o grupo D/OP/I gerou o valor de $57,94 \pm 3,16$, enquanto que o grupo D/GC/I: $40,40 \pm 1,62$, quando confrontados respectivamente com os grupos D/OP e D/GC ($p < 0,0001$).

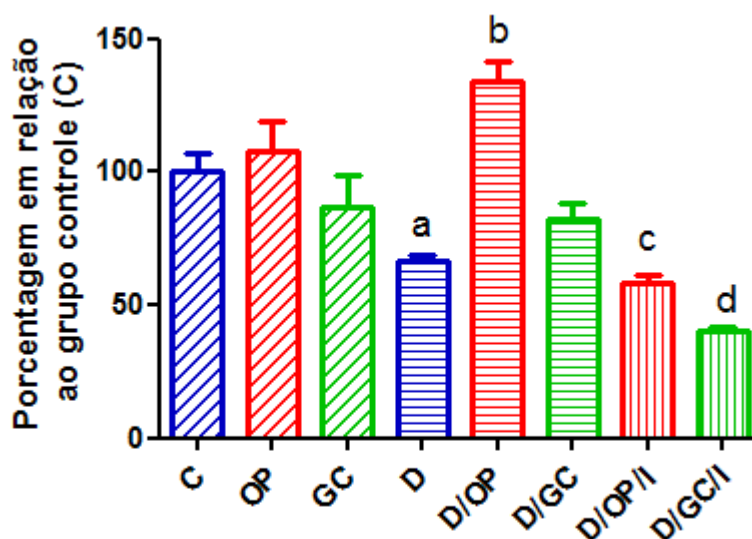


Fig. 7: Retenção de lisossomos no citoplasma das células, valores expressos em porcentagem em relação ao grupo controle. ^a $p < 0,01$ quando comparados os grupos D e C; ^b $p < 0,001$ quando comparados os grupos D/OP e D; ^c $p < 0,0001$ quando comparados os grupos D/OP/I e D/OP; ^d $p < 0,0001$ quando comparados os grupos D/GC/I e D/GC.

5.2.3 – Produção de Ânion Superóxido

O gráfico abaixo demonstra os resultados obtidos com relação à produção do composto (O_2^-) (FIGURA 8). Tendo como referência o grupo controle (C), é possível observar que a suplementação com óleo de peixe e gordura de côco gerou valores distintos: a suplementação com óleo de peixe aumentou os valores obtidos ($126,12 \pm 11,12$), ao passo que a suplementação com gordura de côco os fez diminuir ($66,33 \pm 8,42$) ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle (C). Ao fazer a mesma comparação do grupo controle com o grupo diabético, percebemos que o quadro diabético resultou em redução na produção do composto ($50,20 \pm 3,02$) comparado ao grupo C ($p < 0,001$). Entre os grupos diabetizados e sem insulina, percebemos aumento nos valores dos grupos suplementados, sendo significativo somente para o grupo

D/OP ($71,53 \pm 2,42$), com $p < 0,05$ ao ser comparado com o grupo D, ao passo que o grupo D/GC obteve $58,88 \pm 3,65$, que não é estatisticamente relevante ($p > 0,05$).

Os grupos que receberam doses diárias de insulina apresentaram queda na produção do ânion, as quais são significativamente distintas de seus respectivos grupos controle (D/OP e D/GC). Os valores obtidos foram de $37,09 \pm 2,01$ para D/OP/I e $32,48 \pm 1,30$ para D/GC/I, ambos com $p < 0,0001$ em relação aos grupos D/OP e D/GC, respectivamente.

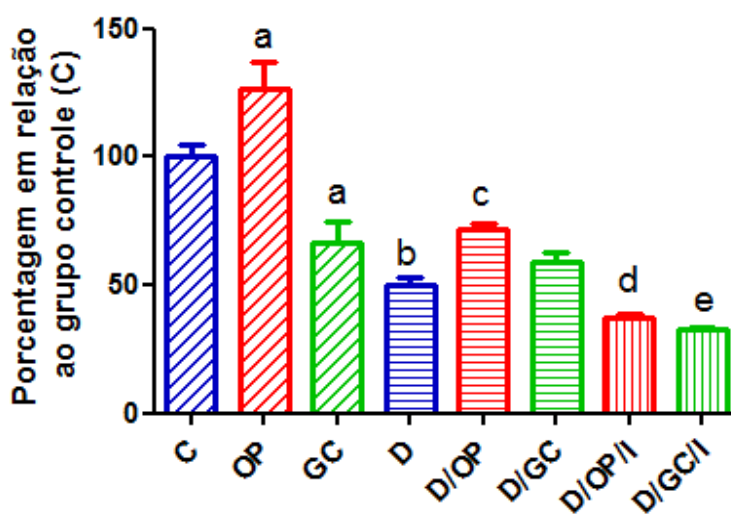


Fig. 8: Produção de ânion superóxido pelos macrófagos, valores expressos em porcentagem em relação ao grupo controle. ^a $p < 0,05$ quando comparados os grupos C/OP e C/GC com o grupo controle; ^b $p < 0,001$ quando comparados os grupos D e C; ^c $p < 0,05$ quando comparados os grupos D/OP e D; ^d $p < 0,0001$ quando comparados os grupos D/OP/I e D/OP; ^e $p < 0,0001$ quando comparados os grupos D/GC/I e D/GC.

5.2.4 – Produção de Peróxido de Hidrogênio

A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), conforme a figura 9, demonstra que a suplementação nos grupos controle e o quadro diabético isolado foram capazes de diminuir a produção do composto, de forma significativa: $70,31 \pm 4,58$ para o grupo OP; $44,71 \pm 5,10$ para o grupo GC; $57,49 \pm 4,58$ para o grupo D, todos comparados com o grupo C, com $p < 0,001$. Entretanto, a suplementação com óleo de peixe foi capaz de reverter o quadro gerado pelo diabetes, promovendo o aumento da substância ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo diabético (D), o que não foi observado com o uso da gordura de côco: $82,31 \pm 5,24$ para o grupo D/OP e $53,55 \pm$

3,70 para o grupo D/GC. Os grupos com tratamento à base de insulina mostraram uma redução na produção de peróxido em relação aos seus respectivos grupos sem terapia insulínica: para o grupo D/OP/I $46,45 \pm 4,27$ e $38,81 \pm 4,50$ para o grupo D/GC/I, com $p < 0,05$.

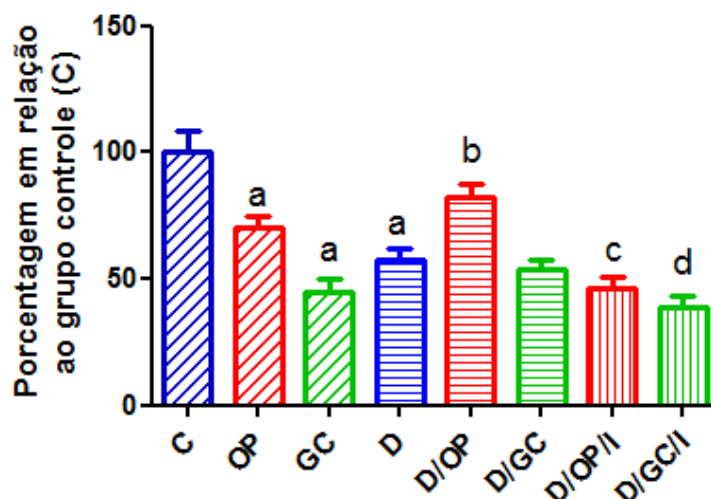


Fig. 9: Produção de peróxido de hidrogênio, expressa em porcentagem em relação ao valor obtido no grupo C. ^a $p < 0,001$ quando comparados os grupos C/OP, C/GC e D com o grupo C; ^b $p < 0,01$ quando comparados os grupos D/OP e D; ^c $p < 0,0001$ quando comparados os grupos D/OP/I e D/OP; ^d $p < 0,05$ quando comparados os grupos D/GC/I e D/GC.

6.0 - DISCUSSÃO

6.1 -ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS NO DIABETES E EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO

O principal indício do estabelecimento do quadro diabético é a constatação de hiperglicemia, causada pela deficiência de insulina. Havendo dois tipos principais de diabetes *mellitus* reconhecidos pela American Diabetes Association, o diagnóstico é feito principalmente por exclusão. Somente o tipo I é consequência da destruição das células pancreáticas, que pode levar à cetoacidose e hiperglicemia, e o tratamento inclui injeções diárias para repor a insulina que não é naturalmente produzida, ao passo que o segundo tipo da doença é caracterizado não pela falta do hormônio, mas

pela sua ineficiência em sensibilizar seus tecidos alvo (LAMBERT, BINGLEY, 2006; HEBERT, NAIR, 2009).

Na ausência da reposição de insulina em pacientes diabéticos é promovido um quadro catabólico, no qual há depleção das reservas energéticas e consumo de massa protéica. Além da glicose elevada outras modificações metabólicas ocorrem, entre elas perda de glicose através da urina, eliminada juntamente com água, e tal perda culmina no desequilíbrio no balanço energético (HEBERT, NAIR, 2009). Os ácidos graxos (AG) são importantes reguladores da secreção de insulina, de modo que baixos níveis plasmáticos de AG diminuem a taxa basal de secreção do hormônio, e altas concentrações sinalizam para saída do cálcio dentro das células, culminando na secreção hormonal (MARTINS, *et al.* 2004).

A pesquisa sobre o tipo I de diabetes comumente faz uso de murinos como animais experimentais, e para provocar a destruição das células β pancreáticas, são usadas drogas como aloxana e estreptozotocina (WRIGHT, *et al.* 1988; SZKUDELSKI, 2001). A ação citotóxica destas drogas difere, de modo que a aloxana, após ser rapidamente absorvida, age através da produção de espécies reativas de oxigênio (no caso, de ânion superóxido). Já a estreptozotocina, sintetizada pelo fungo *Streptomyces achromogenes*, que pode ser administrada tanto em dose única como por várias doses em quantidades menores, é captada pelos receptores GLUT2 das células beta, promovendo destruição no material genético de tais células através da inserção de radicais acila neste. Além disso, a droga é fonte de óxido nítrico, também participando na destruição das células secretoras do hormônio (SZKUDELSKI, 2001).

Antes da indução, os animais foram deixados 12 horas em jejum, para evitar ao máximo a competição das moléculas de glicose e da droga pelo receptor GLUT2 no pâncreas. A dose usada foi de 45 mg/kg de peso corpóreo, por via endovenosa, seguindo-se a isso mais 1 hora em jejum.

O quadro diabético foi evidenciado uma semana após a indução experimental através de teste com sangue periférico, conforme figura 2. Os valores obtidos após tal constatação estão na figura 3, na qual a glicemia é exposta de forma individual para cada grupo após o período experimental.

Os animais que não sofreram diabetização e que receberam suplementação mantiveram a mesma taxa glicêmica, portanto, é possível afirmar que a quantia extra de lipídeos não influenciou este parâmetro nos animais dos grupos C/OP e C/GC em relação ao grupo C. Tanto o grupo diabético quanto os grupos diabetizados e que receberam suplementação (grupos D, D/OP e D/GC) apresentaram valores próximos entre si e significativamente distintos do grupo controle ($p < 0,05$). Segundo Friedberg *et al.*, (1998), a ingestão de óleo de peixe tende a aumentar os valores da glicemia em pacientes insulino dependentes, o que foi atribuído ao aumento da ingestão calórica ocorrida quando há suplementação com lipídeos. Analisando o efeito da insulina no tratamento, utilizou-se como referência os grupos com o quadro diabético e suplementados, e a partir deles pôde-se perceber que em ambos, D/OP/I e D/GC/I, a administração do hormônio foi capaz de reverter a hiperglicemia a níveis normais, e assim concluímos que tal efeito foi gerado somente pela administração do hormônio.

Os lipídeos encontrados no sangue são divididos em três grupos: fosfolipídeos, colesterol (ésteres de colesterol e colesterol livre) e triacilglicerol (TG). O consumo diário, secreção intestinal e produção hepática fornecem triacilglicerol, que são moléculas de glicerol esterificadas com 3 ácidos graxos, para as lipoproteínas, servindo de estoque energético para as células. Após toda demanda energética ter sido suprida, o excesso de triacilglicerol é armazenado no fígado e no tecido adiposo, e um pouco fica circulante no sangue (PARKS, 2001). A taxa de HDL sanguíneo é inversamente relacionada à probabilidade de aterosclerose, complicação não rara de ser observada em quadros diabéticos sem acompanhamento. As transferências de lipídeos entre as classes de lipoproteínas são bidirecionais, mas dependem da concentração e da estrutura da lipoproteína doadora e receptora e também da ação de proteínas de transferência. Deste modo, a insulina exerce papel importante na regulação do HDL, por regular sua produção e atuar nas proteínas de transferência (FEITOSA *et al.* 2009; KRIS-ETHERTON, HARRIS, APPEL, 2009). A lipoproteína lipase hidrolisa os triacilgliceróis dos quilomicrons e dos VLDL (very low density lipoprotein), resultando na liberação de ácidos graxos livres, que devem ser oxidados ou reesterificados, ou se ligar à albumina. Colesterol e fosfolipídeos são transferidos para proteínas de alta densidade (HDL) e o fígado metaboliza os quilomicrons restantes. As moléculas de VLDL e LDL são responsáveis pelo transporte de lipídeos do fígado para os tecidos periféricos. Em pacientes sem hipertriacilglicerolemia, as partículas de VLDL são convertidas em partículas de lipoproteína de densidade intermediária e finalmente em LDL. Na ausência de insulina em pacientes diabéticos, a

quebra dos lipídeos de dieta está aumentada, o que fornece AG para o fígado, para a formação de VLDL. Com o acúmulo do VLDL causado pela menor atividade da lipase lipoprotéica, o quadro com hipertiracilglicerolemia e queda do HDL se instala. Naqueles em que há excesso de triglicerídeos, a conversão do VLDL em LDL é inibida e pode resultar em baixos níveis de LDL e altos de VLDL. Assim que os triacilgliceróis são normalizados, as partículas de VLDL diminuem de tamanho e número, o que pode aumentar a concentração de LDL (SADOVSKY, KRIS-ETHERTON, 2009).

No perfil típico de um paciente diabético tipo I, encontramos normalmente alterações nas lipoproteínas plasmáticas, as quais são responsáveis pelo transporte de lipídeos como colesterol e triacilglicerol na corrente sanguínea. Não é raro ocorrer hipertriacilglicerolemia, altos valores para LDL e baixos para HDL, ao passo que o tratamento com insulina retorna tais parâmetros bioquímicos a valores normais (FEITOSA *et al.* 2008).

Segundo Berry (1997); De Caternina *et al* (2007); Friedberg *et al* (1998); Kris-Etherton, Harris, Appel (2009) e Sirtori, Galli (2002), o consumo de óleo de peixe é responsável pela diminuição dos triacilgliceróis séricos, contribuindo para uma menor taxa de problemas cardiovasculares associados a perfis lipídicos desfavoráveis, com altos níveis de VLDL e baixos de HDL, por meio da diminuição da produção hepática de VLDL (FRIEDBERG *et al.* 1998). A ausência da insulina no diabetes tipo I e a sua relativa ineficiência no diabetes tipo II permitem que haja aumento no fluxo de lipídeos dos adipócitos, interferindo na utilização da glucose. AGPI n3 podem inibir a lipólise, e portanto, prevenir a produção de triacilgliceróis (BERRY, 1997), sendo assim atuantes na proteção do sistema vascular.

Observamos isto de forma isolada no grupo controle suplementado com óleo de peixe em relação ao grupo sem suplementação (FIGURA 4). Como já era esperado, o grupo diabético obteve altos níveis de triglicerídeos, e o uso do óleo de peixe o fez diminuir visivelmente (FIGURA 4). Avaliando o efeito da gordura de côco entre o grupo diabetizado (D/GC) e o não diabetizado (GC), percebemos que a administração desta gordura resultou no aumento da concentração plasmática de triacilgliceróis, sendo possível dizer que a gordura saturada piorou o quadro lipídico. Ambos os grupos que receberam insulina apresentaram queda nos valores obtidos, estabilizando na mesma faixa que o grupo C. Comparando-se os grupos D/GC e D/GC/I foi observada grande diferença, a qual está associada à ação da insulina.

Quanto ao colesterol total plasmático, houve aumento com a suplementação com a gordura saturada (de côco) nos animais controle (FIGURA 5). Já os animais diabéticos que receberam AGPI n3 apresentaram queda em sua colesterolemia, quando comparados aos animais diabetizados e sem suplementação (grupo D). Comparando o efeito dos dois tipos de suplementação nos animais diabéticos, é possível afirmar que a ingesta de óleo de peixe foi muito mais eficiente em manter baixos os níveis de colesterol plasmático. Já os grupos que receberam insulina subcutânea demonstraram os menores valores dentre todos os grupos analisados, de modo que o efeito isolado da insulina pôde ser percebido ao confrontarmos o grupo D/GC com o grupo D/GC/I, portanto, podemos afirmar que a presença de insulina foi capaz de reverter o quadro de hipercolesterolemia.

6.2 EFEITOS DO QUADRO DIABÉTICO E DA SUPLEMENTAÇÃO NO SISTEMA IMUNOLÓGICO

A destruição de patógenos por meio de células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos e monócitos) pode ocorrer tanto pela fagocitose, como pela produção de ânion superóxido e outras espécies reativas de oxigênio (REES *et al.* 2006). A fagocitose é uma função essencial do sistema imune, uma vez que está relacionada à retirada de patógenos e células necróticas do organismo do hospedeiro. Os fagócitos fazem parte do sistema imune inato, sendo responsáveis também pela modulação do sistema de defesa por meio da apresentação de antígenos (GORDON apud MAREÉ *et al.* 2005). Para que o processo ocorra, o material deve ser internalizado e destruído logo em seguida, sendo necessário antes ser reconhecido por receptores específicos de tais células (MAREÉ *et al.* 2005). Componentes da parede celular dos patógenos, como por exemplo o LPS (lipopolissacarídeo), podem desencadear tal ligação, promovendo secreção de eicosanóides e citocinas por monócitos e macrófagos. A partir de então, ocorre ativação de outros tipos celulares, como linfócitos B, produtores de anticorpos (REES *et al.* 2006).

O óleo de peixe, por ser rico em DHA e EPA (ácido docosahexaenóico e eicosapentaenóico, respectivamente), é dito como tendo propriedades imunossupressoras uma vez que é capaz de diminuir a expressão de moléculas de adesão em monócitos (importantes para que ocorra diapedese de tais células), produção de superóxido por neutrófilos e de citocinas e quimiocinas estimulatórias do

processo inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6). Entretanto, não se sabe se tal ação é devido à presença de DHA ou do EPA (KEW *et al.* 2004). Apesar de possuírem atividade supressora do sistema imune, não há problemas em consumir AGPI, uma vez que os estudos em que são relatados tais efeitos supressores fizeram uso de altas quantidades de AGPI n3, entre 8.6 g/dia (REES *et al.* 2006).

A composição de fosfolipídeos de membrana em células do sistema imune é modificada não somente pela ingestão de AGPI, como também pela duração com que tal ingestão é mantida, já que altas doses de DHA e EPA consumidas por longos períodos (6 meses) promovem grande aumento destes lipídeos nos fosfolipídeos de membrana de tais células, e substituição de certos tipos de moléculas, como o AA na membrana. Tais alterações influenciam não somente a fluidez da membrana como também a produção de eicosanóides (DE CATERINA *et al.* 2007; KEW *et al.* 2004), uma vez que a estrutura da membrana está alterada, processos como fagocitose, a qual é dependente do reconhecimento de antígenos do patógeno e da formação de pseudópodes, é afetada.

Quanto à capacidade fagocítica, avaliada através da fagocitose de zimozan, em relação ao grupo controle, a suplementação foi um fator que não promoveu mudanças no parâmetro analisado, provavelmente devido à dose utilizada. Diferentemente, o quadro diabético (grupo D) evidenciou aumento da capacidade fagocítica, em relação ao grupo sadio (grupo C), como observado na figura 6. A associação entre o quadro diabético e a suplementação não evidenciou qualquer mudança em tal atividade, ficando no mesmo nível do grupo diabetizado sem suplementação com lipídeos (FIGURA 6). É possível afirmar então, que a ingestão de AGPI n3 nas concentrações utilizadas neste estudo, não promoveu alterações na atividade fagocitária nos animais.

6.2.2 – Produção de Espécies Reativas de Oxigênio e Retenção Lisossomal

No tocante à retenção de lisossomos no citosol de macrófagos, como é possível verificar na figura 7, pôde-se notar que a suplementação não modificou tal capacidade, independente do tipo de gordura associada à dieta. Diferentemente, a diabetização promoveu queda, se relacionada ao grupo C. De forma surpreendente, o uso de óleo de peixe em animais diabéticos foi capaz de não somente reverter a baixa promovida pelo quadro diabético, mas sim até aumentá-lo, obtendo o maior valor

encontrado entre os grupos para este parâmetro. A gordura de côco adicionada à suplementação não promoveu alterações significantes, de modo que o valor obtido se assemelhou ao do grupo GC.

O uso da insulina demonstrou queda na retenção de vesículas preenchidas por enzimas nas células investigadas, em ambos os grupos em que foi utilizada, servindo como referência para tal, os grupos D/OP e D/GC (FIGURA 7).

As também chamadas espécies reativas de oxigênio (EROS), como o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH^-), são produtos do metabolismo do oxigênio em células fagocíticas, gerados através do complexo enzimático NADPH oxidase, principalmente. A partir do momento em que há ativação, monócitos produzem uma grande quantidade de ânion superóxido, devido à ativação do complexo NADPH oxidase. Tal ânion, quando em excesso, pode contribuir para estresse oxidativo em locais durante o processo inflamatório, tanto os dependentes como os independentes de insulina (CATHCART, 2004).

Em monócitos não ativados, os componentes do complexo enzimático responsável pela produção do ânion estão desmontados e localizados na membrana e no citosol das células. Assim que ocorre ativação, os componentes que estão no citosol dirigem-se para a membrana e lá se associam com outros componentes, catalisando a produção de ânion superóxido. A estrutura de tal complexo é similar em macrófagos, monócitos e neutrófilos, exceto pela proteína Rac1, que em neutrófilos está substituída por outra proteína da mesma família, Rac2 (CATHCART, 2004), (FIGURA 10).

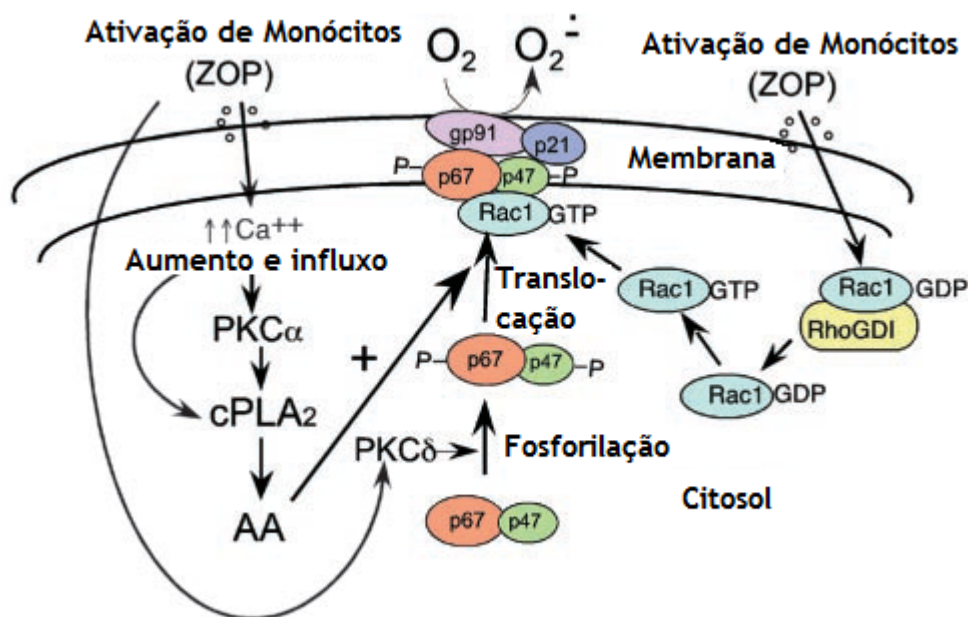


FIG. 10 – Estrutura do complexo NADPH oxidase em monócitos. ZOP: partículas de zimosan opsonizado (adaptado de CATHCART, 2004).

A ativação celular promove a montagem do complexo protéico na membrana, regulado pelo influxo de cálcio intracelular, fosforilação de proteínas citosólicas e produção de ácido araquidônico, o qual é responsável pela translocação das proteínas p47phox e p65phox à membrana, não sendo acoplados sem terem sido fosforilados antes. De outra forma, a ativação do monócito promove desacoplamento do complexo Rac1- RhoGDI, liberando a proteína Rac1, de seu inibidor, carregando consigo uma molécula de GTP (CATHCART, 2004), e culminando na redução do oxigênio. As vesículas contendo o complexo NADPH oxidase podem também ficar retidas no citoplasma das células fagocíticas e fusionarem-se com fagossomos contendo patógenos (LIMA, *et al.*, 2007).

Encontramos o óleo de peixe influenciando a produção de superóxido, aumentando sua produção em macrófagos. EROs (espécies reativas de oxigênio) apresentam produção estimulada pelos AG, aumentando o stress oxidativo de modo a ser detectado no plasma e urina, embora seu mecanismo não seja totalmente conhecido (LIMA *et al.*, 2007). Essa informação é contraditória ao já conhecido fato de que tal óleo seja supressor das atividades imunológicas. Entretanto, tal função imunossupressora normalmente é verificada quando há ingestão de grandes quantias de AGPI n3 (REES *et al.*, 2006; KEW *et al.*, 2003). Já a gordura saturada de côco foi capaz de diminuir tal produto. O quadro diabético (grupo D), por si só, apresentou

queda marcante em relação ao grupo sadio (C). A presença da suplementação com óleo de peixe, da mesma forma que em animais saudáveis, promoveu aumento da produção de ânion superóxido em animais diabéticos, em relação aos animais que com o quadro diabético sem suplementação (grupo D) (FIGURA 8).

Alguns estudos mostram que a insulina é capaz de ativar o conjunto de enzimas responsáveis pela formação do complexo NADPH oxidase (ALBA-LOUREIRO *et al.* 2006), mas em nosso estudo, não verificamos aumento e sim queda na produção desta espécie reativa nos animais dos grupos D/OP/I e D/GC/I, em comparação aos grupos D/OP e D/GC (FIGURA 8).

O peróxido de hidrogênio, outra espécie reativa de oxigênio, pode ser formado pela dismutação espontânea do ânion superóxido ou pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD) (ALBA-LOUREIRO *et al.* 2006). Sabe-se que o peróxido de hidrogênio pode ser diminuído por meio da ingestão de AGPI n3 (DE CATERINA *et al.* 2007), o que realmente foi verificado no presente estudo, da mesma forma que a suplementação com gordura de côco e o quadro diabético (FIGURA 9).

A suplementação com AGPI n3 promoveu aumento do peróxido de hidrogênio nos animais do grupo D/OP em relação ao grupo D. Já a insulina fez cair os valores em ambos os grupos em que foi utilizada, em relação aos grupos diabéticos também suplementados (D/OP e D/GC) (FIGURA 9).

7.0 - CONCLUSÃO

A ingestão de ácidos graxos ômega 3, os quais vêm se tornando cada vez mais discutidos através de estudos e cada vez mais populares devido ao incentivo da mídia, foi objeto de estudo neste trabalho. Seus efeitos foram verificados não somente em indivíduos saudáveis, como também naqueles portadores do quadro diabético tipo I.

Dentre os pontos analisados, objetivou-se analisar de que forma tais lipídeos eram capazes de afetar parâmetros bioquímicos estreitamente ligados à doença – hiperglicemia, hipercolesterolemia e hipertriacilglicerolemia – e também parâmetros imunitários, de forma que se observou que em animais sem tratamento, não há ação hipoglicemiante do AGPI n3. A hipertriacilglicerolemia, importante fator relacionado à doenças vasculares, foi afetada de modo positivo pela suplementação com óleo de peixe, de modo que a presença da insulina nos grupos tratados alterou os valores obtidos somente para o grupo suplementado com gordura de côco (D/GC/I), quando comparado sem o tratamento (D/GC), cujos valores foram os mais elevados dentre os grupos experimentais.

O colesterol total foi amplamente alterado com a suplementação com gordura de côco no grupo controle, demonstrando que tal ingestão, muito comum hoje em dia principalmente nos países ocidentais, pode levar facilmente a complicações vasculares. O consumo de óleo de peixe pelos animais diabetizados reduziu amplamente o colesterol do grupo, havendo, então, efeitos benéficos também neste parâmetro.

Em relação aos parâmetros imunológicos investigados, a fagocitose não foi afetada de nenhuma forma pelas suplementações utilizadas. Ao passo que a retenção de lisossomos em macrófagos apresentou aumento substancial em relação ao grupo diabético, a presença de insulina os fez diminuir.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio) foram afetadas de forma diferente pela suplementação com óleo de peixe nos indivíduos saudáveis: a produção de ânion superóxido sofreu aumento, ao passo que o peróxido foi menos produzido em relação ao grupo controle. Já nos animais com o quadro diabético, ambos apresentaram aumento da produção de tais moléculas. Na

presença de insulina, as EROS foram menos produzidas, comparando-se com os grupos doentes e sem hormônio.

De forma geral, podemos afirmar que a ingesta diária com fonte de ácidos graxos ômega 3 não promove alteração na glicemia em diabéticos sem tratamento, entretanto é eficaz em diminuir os valores séricos de triacilgliceróis e de colesterolemia nestes pacientes (FRIEDBERG *et al*, 1998). A melhora nos quadros de hipertriacilglicerolemia e hipercolesterolemia reduz as chances de problemas vasculares graves, como aterosclerose, doença coronariana e infarto, doenças que matam milhares de pessoas anualmente. Já os ratos diabéticos que receberam gordura saturada apresentaram aumento considerável destes parâmetros, reforçando a idéia de que dietas ricas em gordura deste tipo não são benéficas ao sistema vascular.

Quanto aos parâmetros imunológicos, o óleo de peixe não influenciou a capacidade fagocítica dos macrófagos dos animais diabetizados, entretanto foi eficiente em aumentar a retenção de lisossomos no citoplasma das células, revertendo o quadro instalado pela doença, que é o de queda na retenção de tais vesículas. As espécies reativas de oxigênio, cuja importância reside em serem substâncias microbicidas, mas em desequilíbrio podem causar estresse oxidativo com lesão celular, foram afetadas diferentemente pelo consumo de n3: o ânion superóxido sofreu aumento em sua produção, acima dos níveis do grupo controle, o que pode levar à lesão tecidual. Nos animais diabetizados, o consumo do ômega 3 reverteu a expressiva queda causada pelo diabetes. A produção de peróxido de hidrogênio, ao contrário da síntese de superóxido, sofreu decréscimo nos animais controle suplementados, e aumento nas cobaias diabetizadas que recebiam suplementação. Desta forma, pode-se dizer que a suplementação foi benéfica no sentido de reverter, nos ratos diabetizados, o impacto causado pelo quadro doentio.

8.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBA-LOUREIRO, T. C.; HIRABARA, S. M.; MENDONÇA, J. R.; CURI, R.; PITHON-CURI, T. C. Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils. **Journal of Endocrinology**. v. 188, p. 295 – 303, 2006.

BACH, J. F. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. **Endocr Rev**. v. 15, p. 516 – 542, 1994.

BERRY, E. M. Dietary fatty acids in the management of diabetes mellitus. **The American Journal of Clinical Nutrition**. suppl. 66, p. 991-997, 1997.

CATHCART, M. K. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/ macrophages. **Journal of the American Heart Association**. v. 24, p. 23 – 28, 2004.

CONNOR, W. E. Diabetes, Fish Oil, and Vascular Disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 123, p. 950-952, 1995.

CONSTANZO, L. - **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 3ª ed, p. 422 – 429, 2007.

CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYAKASA, C. K.; PROCOPIO, J. Entendendo a gordura – Os ácidos graxos. **Manole**, 2002, 6ª ed. p. 2 – 7 ; 2007.

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

DREVON, C. A.; BAKASAAS, I.; KROKAN H. E.; Omega-3 fatty acids : Metabolism and Biological Effects. **Birkhäuser**, p. 1-11, 1993.

FEITOSA, A. C. R.; MARANHÃO, R. C.; FEITOSA FILHO, G. S.; WAJCHENBERG, B. L. Transferência de lípidos para a lipoproteína de alta densidade (HDL) em mulheres com diabetes melito tipo 1. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**. v. 53, p. 95 – 101, 2009.

FRIEDBERG, C. E.; JANSSEN, M. J. F. M.; HEINE, R. J.; GROBBEE, D. E. Fish oil and glycemic control in diabetes. **Diabetes Care**, v. 21, n. 4, p. 494-500, 1998.

GORDON, S. The role of the macrophage in immune regulation.

Res. Immunol. v. 149, p.685–688, 1998.

GUYTON, A. C. & HALL, J. E. – **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 11ª ed, p. 961 – 976, 2006.

GUYTON, A. C. & HALL, J. E. – **Fisiologia e os Mecanismos das Doenças**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6ª ed, p. 883 – 889, 2003.

HEBERT, S. L.; NAIR, K. S. Protein and energy metabolism in type I diabetes. **Clinical Nutrition**, p. 1- 5, 2009.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION . Disponível em :
http://www.eatlas.idf.org/About_e_Atlas/. Acesso em 03 Fev 2008.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHOLMCHIK, M. J. **Imunologia – O sistema imune na saúde e na doença**. Porto Alegre: Artmed, 6ª ed. 2007. P. 25 – 57.

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

KELLEY, D. S. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. **Nutrition**, v. 17, n. 7/8, p. 669 – 673, 2001.

KEW, S.; BANERJEE, T.; MINIHANE, A. M.; FINNEGAN, Y. E.; MUGGLI, R.; ALBERS, R.; WILLIAMS, C. M.; CALDER, P. C. Lack of effect of foods enriched with plant- or marine-derived n-3 fatty acids on human immune function. **The American Journal of Clinical Nutritional**. v. 77, p. 1287 – 1295, 2005.

KEW, S.; MESA, M. D.; TRICON, S.; BUCKLEY, R.; MINIHANE, A.; YAQOUB, P. Effects of oils rich in eicosapentanoic and docosahexanoic acids on immune cell

composition and function in healthy humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 79, p. 674 – 681, 2004.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. **Circulation**, v.106, p. 2747 – 2757, 2002.

LAMBERT P.; BINGLEY P. What is type 1 diabetes? **Diabetes: Basic Facts**, p. 47-51, 2006.

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

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

MARÉÉ, A. F. M.; KOMBA, M.; DYCK, C.; LABECKI, M.; FINEGOOD, D.; ELDESTSTEIN-KESHET, L. Quantifying macrophage defects in type 1 diabetes. **Journal of Theoretical Biology**. v. 233, p. 533-551, 2005.

MARTINS, E. F.; MIYASAKA, C. K.; NEWSHOLME, P.; CURI, R.; CARPINELLI A. R. Changes in fatty acids composition in incubated rat pancreatic islets. **Diabetes metab**. V. 30, p. 21 – 27, 2004.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol**. v. 7, p. 145 – 173, 1989.

PARKS, E. Effect of dietary carbohydrate on triglyceride metabolism in human. **The Journal of Nutrition**. V. 131, p. 2772 – 2774, 2001.

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

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

POCIOT, F.; WORSAAE, H.; DYERBERG, J.; MOLVIG, J.; NERUP, J.; ANDERSEN, K.; BAEK, L.; WOGENSEN, L. D.; CHRISTENSEN, P.; MADSEN, P.; MANDRUP-POULSEN, T. Dietary supplementation with ω -3-polysaturated fatty acids decreases mononuclear cells proliferation and interleukin-1 β content but not monokine secretion in healthy and insulin-dependent diabetic individuals. *Scand. J. Immunol.* v. 34, p. 399-410, 1991.

RABINOVITCH, A.; SUAREZ-PINZON, W. L. Cytokines and their roles in pancreatic islet β cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochemical Pharmacology*.

REES, D.; MILES, E. A.; BANERJEE, T.; WELLS, S. J.; ROYNETTE, C. E.; WAHLE, K. W. J.; CALDER, P. C. Dose-related effects of eicosapentanoic acid on innate immune function in healthy humans: a comparison of young and older men. *The American Journal of Clinical Nutrition*. v. 83, p. 331 – 342., 2006.

ROGLIC G. Diabetes in women: The global perspective. *Journal of Gynecology and Obstetrics*. v. 104, p. 11 – 13, 2009.

SADOVSKY, R.; KRIS-ETHERTON, P. Prescription omega-3-acid ethyl esters for the treatment of very high triglycerides. *Postgraduate Medicine*. v. 121, p. 145 – 153, 2009.

SIRTORI, C. R.; GALLI, C. N-3 fatty acids and diabetes. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. v. 56, p. 397 – 406, 2002.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research*. v.50, p. 537 – 546, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em :

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>. Acesso em 03 Fev 2008.

WRIGHT JR, J. R.; LEFKOWITH, J. B.; SCHREINER, G.; LACY, P. E. Essential fatty acid deficiency prevents multiple low-dose streptozotocin-dose induced diabetes in CD-1 mice. **Medical Sciences**, v.85, p. 6137 – 6141, 1988.