CAMILA FERRAZ LUCENA

SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM ÓLEO DE PEIXE REDUZ A EXPRESSÃO DA NADPH OXIDASE E AUMENTA A EXPRESSÃO DA SOD1 E SOD2 EM ILHOTAS PANCREÁTICAS DE RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2012

CAMILA FERRAZ LUCENA

SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM ÓLEO DE PEIXE REDUZ A EXPRESSÃO DA NADPH OXIDASE E AUMENTA A EXPRESSÃO DA SOD1 E SOD2 EM ILHOTAS PANCREÁTICAS DE RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Lucena, Camila Ferraz.
Suplementação alimentar com óleo de peixe reduz a expressão da NADPH oxidase e aumenta a expressão da SOD1 e SOD2 em ilhotas pancreáticas de ratos / Camila Ferraz Lucena. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiologia da secreção de insulina.

Versão do título para o inglês: Fish oil dietary supplementation reduces NADPH oxidase expression and increases SOD1 and SOD2 expression in rat pancreatic islets.

1. Acidos graxos omega 3 2. Insulina 3. Ilhotas de Langerhans 4. Superóxido dismutase 5. Suplementação alimentar I. Carpinelli, Prof. Dr. Angelo Rafael II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana. III. Título.

ICB/SBIB099/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Camila Ferraz Lucena.

Título da Dissertação: Suplementação alimentar com óleo de peixe reduz a expressão da NADPH oxidase e aumenta a expressão da SOD1 e SOD2 em ilhotas pancreáticas de ratos.

Orientador(a): Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../.....,

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **71** nas fls. **88** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a Ângelo Rafael Carpinelli, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Efeito do óleo de peixe rico em ômega-3 sobre a secreção de insulina e a enzima NAD(P)H oxidase** do qual participou(aram) o(s) **Camila Ferraz Lucena, Daniel Simões de Jesus, Maira Mello Resende Valle, Fernanda Rodrigues Graciano,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **01.07.2010, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 01 de julho de 2010.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA – ICB/USP

Aos meus pais, por tudo.

Ao Maran, pelo amor, incentivo, compreensão e paciência.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao Prof. Angelo, que abriu as portas de seu laboratório, me acolhendo sem me conhecer, e me proporcionando o contato com o mundo acadêmico que eu tanto buscava. Obrigada pelos ensinamentos, incentivo, paciência e compreensão.

Aos colegas de Laboratório de Fisiologia da Secreção de Insulina, que me receberam de braços abertos, me proporcionando momentos alegres mesmo quando as coisas não davam certo. Obrigada por nossos almoços no bandejão sempre regados à muitas risadas. Obrigada pela amizade de vocês e pela troca de experiências!

Aos que sempre estiveram dispostos a ajudar e ensinar, desde os primeiros passos na minha vida dentro de um laboratório, sem ao menos saber o que era uma pipeta...rs..., e que tornaram-se verdadeiros amigos, especialmente Fernanda e Daniel.

À Marlene, pela paciência e auxílio com tudo.

Aos colegas dos outros laboratórios que auxiliaram no andamento dos experimentos.

Obrigada ao Prof. Rui, Prof. Fernando, Prof. Ubiratan, Profa. Carla e Prof. Fabio por abrirem seus laboratórios e disponibilizar o uso de equipamentos.

Obrigada à Profa. Emiko da Unifesp, pela amizade e ensinamentos.

Aos funcionários do Biotério de Criação e Biotério de Experimentação por toda ajuda com os animais.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica e do Programa de Pós-Graduação.

Aos funcionários da biblioteca do ICB, pela atenção e ótimo tratamento que dão aos alunos.

À minha família, pelo amor, incentivo e apoio, mesmo sem entender ao certo o que se passa dentro de um laboratório de pesquisa. Obrigada por tudo!

Ao Maran, que me incentivou a ingressar no mestrado, ainda como namorado e hoje divide esta conquista, já como meu marido. Obrigada pelo carinho, paciência, dedicação, incentivo e compreensão mesmo nos momentos que eu estive mais estressada...rs.

Aos amigos que me acompanharam nesta jornada, me incentivaram e muitas vezes compreenderam minha ausência. Obrigada pelo apoio!

À Herbarium que contribui com a doação de óleo de peixe.

À CAPES, CNPQ e FAPESP, pelo apoio financeiro.

RESUMO

LUCENA, C. F. **Suplementação alimentar com óleo de peixe reduz a expressão da NAD(P)H oxidase e aumenta a expressão da SOD1 e SOD2 em ilhotas pancreáticas de ratos.** 2012. 59 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A secreção de insulina é estimulada pela glicose circulante, porém os ácidos graxos (AG) podem influenciar o processo secretório induzido pela glicose (GSIS). A oxidação de AG pelas células β das ilhotas pancreáticas é importante para a estimulação da secreção de insulina por aumentar a produção de ATP, porém, alguns trabalhos mostram a existência de vias dependentes e independentes de ATP no processo secretório induzido pela glicose. Os AG polinsaturados ω-3 da dieta interferem em diversos processos fisiológicos, como regulação da concentração de lipídios plasmáticos, função imune e cardiovascular, ação periférica da insulina, desenvolvimento neuronal e função visual. Os AG ω-3 têm efeitos sobre a composição e função da membrana plasmática, sinalização e regulação da expressão gênica em diferentes tecidos, promovendo potente ação anti-inflamatória. Considerando a importante relação da NAD(P)H oxidase com a secreção de insulina, o estudo das possíveis alterações induzidas pela suplementação com AG ω-3 sobre o conteúdo de superóxido ($O_2^{\bullet}$), e a expressão das subunidades da NAD(P)H oxidase, passa a ser de grande importância para a melhor compreensão da fisiologia das células β-pancreáticas. Neste estudo, o grupo suplementado com AG ω-3 apresentou redução significativa do conteúdo de $O_2^{\bullet}$ na presença de 5.6 e 16.7mM de glicose, quando comparado ao controle. Além disso, a suplementação reduziu a expressão das subunidades da NAD(P)H oxidase e aumentou a expressão da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD1 e 2). Embora ainda desconhecido, seja qual for o mecanismo que diminuiu o conteúdo de espécies reativas de oxigênio (EROs) das ilhotas pancreáticas dos animais submetidos à ingestão diária de óleo de peixe, este dado é relevante, pois pressupõe melhor regulação do estado redox durante o processo secretório de insulina.

Palavras-chave: Ilhota Pancreática. Ácido Graxo Omega-3. Secreção de Insulina. Ânion superóxido. NADPH oxidase.

ABSTRACT

LUCENA, C. F. **Fish oil dietary supplementation reduces NAD(P)H oxidase expression and increases SOD1 and SOD2 expression in rat pancreatic islets.** 2012. 59 p. Masters thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Insulin secretion is stimulated by plasma glucose concentration, but circulating fatty acids (FA) may influence the secretory process induced by glucose (GSIS). The oxidation of FA seem to be important for the stimulation of insulin secretion by increasing the production of ATP, although some studies have shown the existence of ATP-dependent and independent pathways for GSIS. The ω-3 polyunsaturated FA affect several physiological processes, such the concentration of plasma lipids, immune and cardiovascular function, peripheral insulin action, neuronal development and visual efficiency. ω-3 FA affect the composition and function of the plasma membrane, signaling and regulation of gene expression in different tissues and promote potent anti-inflammatory action. Considering the important relationship of NAD(P)H oxidase with insulin secretion, the study of potential changes induced by the supplementation with ω-3 FA on the superoxide (O_2•) content, and expression of NAD(P)H oxidase subunits, becomes of great importance for a better understanding of the pancreatic β cells physiology. In this study, the group supplemented with ω-3 FA showed a significant reduction in the O_2• content in the presence of 5.6 and 16.7mM glucose. Moreover, ω-3 FA supplementation reduced the expression of NAD(P)H oxidase subunits, and increased the expression of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD 1 and 2). Although still unknown, the mechanism that decreased the content of reactive oxygen species (ROS) of the pancreatic islets of animals subjected to daily intake of fish oil is relevant, because it represents an improved regulation of the redox state during GSIS.

Keywords: Pancreatic islet. Fatty Acid Omega-3. Insulin secretion. Superoxide anion. NADPH oxidase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ganho de massa corporal.....39

Figura 2 - Depósitos de tecido adiposo.....40

Figura 3 - Glicemia e insulinemia basais.....41

Figura 4 - Teste de tolerância à glicose.....42

Figura 5 - Teste de tolerância à insulina.....43

Figura 6 - Secreção de insulina.....44

Figura 7 - Metabolismo da Glicose.....45

Figura 8 - Conteúdo de superóxido.....46

Figura 9 - Expressão gênica das subunidades da NAD(P)H oxidase.....47

Figura 10 - Expressão gênica das enzimas antioxidantes.....48

Figura 11 - Expressão proteica das subunidades da NAD(P)H oxidase.....49

Figura 12 - Expressão proteica das enzimas antioxidantes.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Família da ácidos graxos insaturados.....18

Tabela 2 – Gordura dietética em alimentos ingeridos por esquimós e dinamarqueses.....21

Tabela 3 - Ocorrência de doenças padrão em esquimós e dinamarqueses.....21

Tabela 4 – Conteúdo de ácidos graxos ω-3 em diferentes alimentos.....23

Tabela 5 – Composição de ácidos graxos do óleo de peixe administrado aos animais.....30

Tabela 6 – Sequências de nucleotídeos dos pares de *primers* utilizados.....36

Tabela 7 – Anticorpos utilizados para análise de expressão proteica.....38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – ácido araquidônico

AC – adenil ciclase

ADP – difosfato de adenosina

AG – ácido graxo

ALA – ácido α-linolênico

ATP – trifosfato de adenosina

CAT – catalase

CCSV – canais de cálcio sensíveis à voltagem

COX - ciclooxigenase

CPT-I – carnitina palmitoil transferase I

DAG - diacilglicerol

DHA – ácido docosaehaenóico

EPA – ácido eicosapentaenóico

EROs – expécies reativas de oxigênio

GPx – glutationa peroxidase

HPRT – hipoxantina fosforibosiltransferase

IP_3 – inositol trifosfato

LA – ácido linoleico

LOX - lipooxigenase

LT - leucotrieno

PCR – reação de polimerização em cadeia

PG - prostagladina

PKA – protein quinase A

PKC – porteína quinase C

PLC – fosfolipase C

SOD 1 – superóxido dismutase 1

SOD 2 – superóxido dismutase 2

TTG – teste de tolerância à glicose

TTI – teste de tolerância à insulina

TX - tromboxano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
1.1 Pâncreas e secreção de insulina 16
1.2 Ação dos ácidos graxos na secreção de insulina 17
1.2.1 Função dos ácidos graxos ω-3 20
1.3 Espécies reativas de oxigênio e ilhotas pancreáticas 24
1.4 Enzima NAD(P)H oxidase 25
2 JUSTIFICATIVA 27
3 OBJETIVOS 28
3.1 Objetivo geral 28
3.2 Objetivos específicos 28
4 MATERIAL E MÉTODOS 29
4.1 Animais 29
4.2 Composição corporal 30
4.3 Glicemia e insulinemia basal 31
4.4 Teste de tolerância à glicose e teste de tolerância à insulina 31
4.5 Obtenção das ilhotas pancreáticas 31
4.6 Secreção estática de insulina 32
4.7 Dosagem de insulina 32
4.8 Metabolismo da glicose 33
4.9 Conteúdo de superóxido 33
4.10 Expressão gênica por PCR em tempo real 34
4.11 Expressão proteica por *westernblotting* 36
4.12 Análise estatística 37
5 RESULTADOS 38
5.1 Composição corporal 38
5.2 Homeostase glicêmica 39
5.3 Secreção de insulina e metabolismo da glicose por ilhotas isoladas 41
5.4 Conteúdo de superóxido em ilhotas isoladas 42
5.5 Expressão gênica 43
5.6 Expressão proteica 45
6 DISCUSSÃO 47

7 CONCLUSÕES..... 51
REFERÊNCIAS 52

1 INTRODUÇÃO

1.2 Pâncreas e secreção de insulina

O pâncreas é uma glândula mista, com uma porção exócrina, formada pelos ácinos e responsável pela produção de enzimas digestivas e, uma porção endócrina, formada pelas ilhotas de Langerhans e responsável pela produção de hormônios (AIRES, 2008). As ilhotas de Langerhans são estruturas ovoides, que compõem cerca de 2% da massa pancreática. Os seres humanos têm de 1 a 2 milhões de ilhotas, formadas por quatro tipos celulares: células α, produtoras de glucagon, células β produtoras de insulina, células δ produtoras de somatostatina e células PP, responsáveis pela produção de polipeptídio pancreático (GANONG, 2006).

As células β-pancreáticas sintetizam, armazenam e liberam insulina conforme a demanda, mantendo a homeostase glicêmica (DEENEY; PRENTKI; CORKEY, 2000).

A insulina é um polipeptídio com duas cadeias de aminoácidos ligados por pontes dissulfeto, sintetizada no retículo endoplasmático rugoso e transportada até o complexo de Golgi, onde é empacotada em grânulos (GANONG, 2006). Sua secreção é, principalmente, regulada por substratos energéticos, sendo a glicose o mais importante secretagogo (BERNE; LEVY, 2009).

O transporte da glicose plasmática através da membrana das células β é feito pelo transportador GLUT 2, que permite o rápido influxo de glicose para o meio intracelular (MUECKLER, 1994). No interior da célula, a glicose é fosforilada a glicose-6-fosfato pela hexoquinase IV (glicoquinase) e pela hexoquinase I. A glicoquinase, além de regular outras funções da célula β, tem papel preponderante na fosforilação da glicose, atuando como enzima limitante no fluxo de substratos através desta via (BERNE; LEVY, 2009; HABER et al., 2002).

A metabolização da glicose-6-fosfato aumenta a produção de ATP e o aumento da relação ATP/ADP leva ao fechamento de canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), aumentando a concentração intracelular de K^+. O acúmulo de K^+ promove a despolarização da membrana, com abertura dos canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem (CCSV), aumentando o fluxo deste íon para o meio intracelular. O aumento do Ca^{2+} é um dos principais responsáveis pela ativação da exocitose dos grânulos de insulina (ASHCROFT; RORSMAN,

1990; ISHIHARA; WOLLHEIM, 2000; PRENTKI; CORKEY, 1996). A metabolização da glicose e o aumento do Ca^{2+} intracelular ativam diferentes isoformas da fosfolipase C (PLC), promovendo a hidrólise de fosfolípides de membrana, gerando 1,4,5 inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 estimula o efluxo de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, aumentando sua concentração no citosol. O DAG age como um potente ativador da proteína quinase C (PKC), responsável pela fosforilação de proteínas envolvidas no processo de exocitose, além de promover a liberação do Ca^{2+} do retículo endoplasmático, aumentando a responsividade dos CCSV e, consequentemente, a concentração de cálcio intracelular, importante para o processo secretório. A adenilciclase (AC) leva à ativação de proteína quinase A (PKA) através da formação de AMPc, que participa do mecanismo de exocitose (BERNE; LEVY, 2009; PINTON et al., 2004).

Segundo Wan et al. (2004) as proteínas quinases controlam a secreção de insulina, modulam a excitabilidade da célula, influxo de Ca2+ e expressão gênica, além de agir diretamente na maquinaria secretória, aumentando o número de vesículas disponíveis para liberação. A PKA e PKC potencializam as vias de sinalização geradas pelo metabolismo dos secretagogos, induzindo uma resposta insulínica bifásica completa (NESHER et al., 2002).

Os efeitos dos nutrientes sobre as células β podem ser diferentes, de acordo com a exposição aguda ou crônica. Concentrações elevadas de glicose e ácidos graxos estimulam a secreção de insulina agudamente, enquanto que a exposição crônica, como ocorre em certas patologias, pode levar a efeitos deletérios como glicotoxicidade e lipotoxicidade (DEENEY; PRENTKI; CORKEY, 2000).

1.2 Ação dos ácidos graxos na secreção de insulina

Os ácidos graxos (AG) constituem-se de elementos como carbono, hidrogênio e oxigênio, que são arranjados como um esqueleto carbônico linear de variável comprimento, com um grupo carboxil e um grupo metil terminal (CALDER; YAGOOB, 2009; CHOW, 2007). Podem ser classificados pelo número de carbonos na cadeia, pela ausência de duplas ligações (saturados) ou pela presença de duplas ligações (insaturados). As principais fontes de AG saturados são as carnes e os produtos lácteos, mas também são abundantes em óleos de côco e palma. Os AG insaturados podem ser divididos ainda, segundo a configuração da dupla ligação, onde os átomos de hidrogênio ligados aos carbonos que compartilham a dupla ligação podem estar no mesmo lado da cadeia hidrocarbônica (ligação *CIS*) ou em lados opostos

(ligação *TRANS*). Os AG insaturados, incluem os monoinsaturados e polinsaturados, conforme demonstrado na **tabela 1**. O AG monoinsaturado mais comum é o ácido oléico, com insaturação no carbono 9 a partir do grupo metil terminal (ômega-9), encontrado nos óleos de oliva, canola e girassol. Dos AG polinsaturados, o linoléico, com a primeira insaturação no carbono 6 (ômega-6) é o mais conhecido, sendo encontrado principalmente em plantas e sementes, como a semente de girassol. O ácido araquidônico, derivado do ácido linoléico, está presente em carnes e alguns peixes. O terceiro grupo de AG insaturados, com a primeira insaturação no carbono 3 (ômega-3), é representado pelo α-linolênico (ALA), eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) (CHOW, 2007; NETTLETON, 1995).

Tabela 1 – Família de Ácidos Graxos Insaturados. Ácidos Graxos Insaturados, estrutura química e fonte alimentar.

Família	Ácido Graxo	Estrutura	Fonte
ω-3	Linolênico	(18:3ω3)	Óleos vegetais, nozes
	Eicosapentaenóico	(20:5ω3)	Peixe
	Docosahexaenóico	(22:6ω3)	Peixe
ω-6	Linoleico	(18:2ω6)	Óleos vegetais
	Araquidônico	(20:4ω6)	Tecido animal
ω-9	Oleico	(18:1ω9)	Óleos vegetais

Fonte: Adaptado de Nettleton (1995).

A secreção de insulina é estimulada pela glicose circulante, porém os AG podem influenciar o processo secretório induzido pela glicose, modulando a atividade de diversas enzimas que participam do processo. A oxidação de AG parece ser importante para a estimulação da secreção de insulina por aumentar a produção de ATP, porém existem hipóteses para existência de vias dependentes e independentes de ATP no processo secretório induzido pela glicose (MALAISSE et al., 1985).

A função dos AG na célula β é demonstrada pela concentração elevada dos mesmos, em ratos em jejum. Em animais alimentados e com glicemia elevada, o metabolismo da glicose nas células β resulta em aumento na produção de citrato, que age como precursor de

malonil CoA. O aumento do malonil CoA inibe a carnitina palmitoil transferase I (CPT-I), reduzindo assim a beta-oxidação e aumentando a concentração de acil CoA, que participa da modulação da secreção de insulina. Com a inibição da beta-oxidação, bem como a esterificação dos AG e síntese de lipídios complexos pela célula β, aumenta-se a concentração de diacilgliceróis (DAG). Sabe-se que o aumento do DAG está envolvido na extrusão dos grânulos de insulina (KRONENBERG et al., 2010; STEIN et.al., 1997). É interessante notar que, em células β expostas à baixa concentração de glicose, a oxidação de AG está aumentada, reduzindo desta forma o conteúdo intracelular de AG (HABER et al., 2002; STEIN et al., 1997).

Os AG saturados aparentemente reduzem a resposta secretória das ilhotas à glicose, enquanto que os monoinsaturados e polinsaturados aumentam esta resposta (STEIN et al., 1997). É importante ressaltar que o potencial insulinossecretório dos AG varia com o comprimento da cadeia, com o grau de insaturação e o tempo de exposição das ilhotas aos mesmos. (MARTINS et al., 2004).

As interferências no processo de secreção de insulina acima descritas, provavelmente estão relacionadas ao fato de o tipo de gordura da dieta afetar principalmente a composição de AG da membrana plasmática, e consequentemente sua função, alterando a translocação de transportadores de glicose, a fluidez da membrana, a permeabilidade a íons, a afinidade do receptor de insulina, a expressão gênica e a atividade enzimática (RISÉRUS, 2008). Além disso, os AG poliinsaturados ω-3 interferem em diversos processos fisiológicos, como regulação da concentração de lipídios plasmáticos, função imune e cardiovascular, ação periférica da insulina, desenvolvimento neuronal e função visual. A ingestão de ω-3 tem efeitos sobre a composição e função da membrana plasmática, sinalização e expressão gênica em diferentes tecidos (JUMP, 2002).

Lipídios funcionam como importantes reservas energéticas, mas também como moduladores da sinalização intracelular e metabolismo. Especialmente AG polinsaturados ω-3 e ω-6 têm sido implicados na modulação de várias vias bioquímicas, envolvendo resposta imune, inflamação e câncer (CHOW, 2007).

1.2.1 Funções dos ácidos graxos ω-3

Aos AG ω-3 têm sido atribuídos benefícios em vários processos patológicos, como melhora do perfil lipídico (HARRIS et al., 1997), prevenção de doença coronariana e infarto (SKERRETT; HENNEKENS, 2003), melhora da resposta imune (HWANG, 2000), prevenção de câncer de mama e próstata (ROSE, 1997) e câncer de cólon (DECKERE, 1999).

O termo ω-3 é uma descrição estrutural para uma família de AG polinsaturados, onde a primeira dupla ligação está no carbono 3 mais próxima do grupo metil terminal da cadeia. Eles também são descritos de acordo com o número de carbonos na cadeia e o número de duplas ligações. O ω-3 mais simples é o α-linolênico (ALA). O ALA pode ser sintetizado a partir do α-linoleico (LA) por desaturação. Porém, animais, incluindo humanos, não possuem a enzima necessária para síntese de ALA a partir de LA, desta forma o ALA torna-se um AG essencial na alimentação humana, sendo o ω-3 mais presente na dieta ocidental, encontrado principalmente em sementes e seus óleos (CALDER, 2012; CALDER; YAGOOB, 2009).

Os outros AG ω-3 são eicosapentaenóico (EPA) e o docosahexaenóico (DHA), de origem marinha e que são sintetizados no fitoplâncton e consumidos por peixes, moluscos e crustáceos, sendo estes animais fontes de ω-3 (NETTLETON, 1995).

Embora o ALA tenha estrutura ω-3, sua função metabólica difere substancialmente do EPA e DHA. Em humanos, o ALA pode ser convertido em EPA e DHA, porém a eficiência desta conversão é baixa, cerca de 7% do ALA consumido é incorporado e convertido em EPA e DHA no fígado. O passo limitante desta conversão seria a pequena incorporação do ALA aos fosfolípides de membrana (CALDER, 2012; GOYENS et al., 2005).

A biodisponibilidade de ALA para conversão em EPA e DHA é determinada também pela eficiência da absorção no trato digestório, captação para β-oxidação, incorporação e armazenamento (BURGDE; CALDER, 2005).

A menor presença de doença cardíaca ou infarto do miocárdio entre esquimós na Groenlândia, voltou a atenção aos AG ω-3 (HOLUB, 1988; KROMANN; GREEN, 1980), mostrando que, quando comparado à população dinamarquesa, embora a ingestão de gordura seja ligeiramente maior pelos esquimós, a composição de AG é significantemente diferente, com pequena quantidade de gordura saturada e predomínio de monoinsaturada e polinsaturada.

Bang, Dyeberg e Sinclair (1980) analisaram o consumo alimentar de esquimós e verificaram esta diferença, conforme demonstrado na **tabela 2**.

Tabela 2 – Gordura dietética em alimentos ingeridos por esquimós e dinamarqueses.

Tipo	Esquimós	Dinamarqueses
Saturada (%)	22,8	52,7
Monoinsaturada(%)	57,3	34,6
Polinsaturada(%)	19,2	12,7
Razão P/S	0,84	0,24
ω-6 (g/dia)	5,4	10,0
ω-3 (g/dia)	13,7	2,8

Fonte: Adaptado de Bang, Dyeberg e Sinclair (1980).

Além disso foi observada também a menor ocorrência de outras doenças, conforme **tabela 3**.

Tabela 3 – Ocorrência de Doenças Padrão em Esquimós e Dinamarqueses.

Doença	Esquimós	Dinamarqueses
Infarto agudo do miocárdio	3	40
Psoríase	2	40
Asma	1	25
Diabetes	1	9
Tireotoxicose	0	7
Esclerose Múltipla	0	2
Câncer	46	53
Ùlcera Peptica	19	29

Fonte: Adaptado de Kromann e Green (1980).

O aumento na ingestão de peixes ou suplementos com óleo de peixe, resultam em maiores concentrações de EPA e DHA no plasma, células e tecidos, os quais estão associados à benefícios à saúde, como menor risco para doenças cardiovasculares e inflamatórias (BURDGE; CALDER, 2005).

O consumo de AG ω-3 altera os lipídios plasmáticos, fatores de coagulação sanguínea, além da composição e função da membrana plasmática. A presença destes AG nas membranas celulares influencia o metabolismo de eicosanoides com resultados em diversos sistemas (CALDER, 2003; NETTLETON, 1995).

Os eicosanoides estão implicados no controle de muitos processos fisiológicos, incluindo-se modulação da reação inflamatória. São compostos derivados da oxigenação do ácido araquidônico (AA) e surgem da atividade de duas enzimas: ciclooxigenase (COX), responsável pela produção de prostanóides, como prostaglandinas (PG) e tromboxanos (TX) e lipooxigenase (LOX), responsável pela produção de leucotrienos (LT) (RANG et al., 2004).

Os tecidos podem conter uma ou as duas enzimas e a disponibilidade de AG afeta a produção dos eicosanoides, sendo que o principal estímulo é a disponibilidade de AA e a atividade a fosfolipase A_2 (PLA_2), que libera o AA da membrana plasmática (JUMP, 2002).

O ALA é menos efetivo que o óleo de peixe para alterar lipídios plasmáticos e de membrana, e também na redução da síntese de prostaglandina E (PGE). O ω-3 tem sido mostrado como potente inibidor da COX, mediando o metabolismo do AA. Nas dietas ricas em ω-3, parece haver uma redução da COX_2 , devido à função inibitória do ω-3 sobre a síntese de PGE_2 a partir de AA (DOMMELS et al., 2003).

Dietas ricas em LA aumentam a disponibilidade de AA e consequentemente alteram o metabolismo de eicosanoides (NETTLETON, 1995).

Os produtos da COX e LOX saem da célula e agem localmente em concentrações nanomolares através de processos autócrinos e parácrinos em receptores associados à proteína G nas células. A ativação destes receptores altera os níveis intracelulares de AMPc e cálcio, servindo como segundos mensageiros que ativam mecanismos com efeitos em vários funções celulares. Os produtos da COX são moduladores tromboregulatórios, inflamatórios e de resposta quimiotática, enquanto os produtos da LOX estão envolvidos em permeabilidade vascular, vasoconstrição e broncoconstrição (JUMP, 2002).

A suplementação com óleo de peixe resulta em substituição de AA por EPA nos fosfolípides de membrana, levando à diminuição da produção de mediadores derivados de AA, exercendo desta forma um efeito anti-inflamatório potente (CALDER, 2003). O ω-3 desloca o AA do pool de AG dos tecidos, reduzindo sua disponibilidade, afetando desta forma a

produção de PG, TX e LT. O EPA e o DHA competem com o AA pela COX, ocupando os sítios disponíveis, além disso sua incorporação à membrana pode alterar propriedades físico-químicas, atividade de receptores e sinalização celular (NETTLETON, 1995).

O EPA E O DHA agem diretamente, substituindo o AA como substrato para síntese de eicosanoides e reduzindo o metabolismo do AA, e indiretamente, alterando a expressão gênica (CALDER, 2003).

O EPA e DHA são predominantemente encontrados em alimentos de origem marinha, sendo que a quantidade dos mesmos nas diferentes espécies varia de acordo com a alimentação do animal, tamanho, idade, localização geográfica e estação do ano (NETTLETON, 1995), conforme demonstrado na **tabela 4**.

Tabela 4 – Conteúdo de Ácidos Graxos ω-3 em diferentes alimentos. Valores expressos em g /100 g.

Alimento	**ALA (18:3)**	**EPA (20:5)**	**DHA (22:6)**	**EPA+ DHA**
Linhaça	53,3	0	0	0
Canola	11,1	0	0	0
Noz	10,4	0	0	0
Germen de Trigo	6,9	0	0	0
Soja	6,8	0	0	0
Manteiga	1,2	0	0	0
Banha de Porco	1,0	0	0	0
Salmão	0,1	0,6	1,2	1,8
Anchova	0	0,5	0,9	1,4
Sardinha	0,5	0,4	0,6	1,1

Fonte: Adaptado de Nettleton (1995).

1.3 Espécies reativas de oxigênio e ilhotas pancreáticas

Toda molécula que tem um elétron desemparelhado em sua órbita externa, é caracterizado como radical livre. Cerca de 2-5% do oxigênio que consumimos, transformam-se em radicais livres, ou espécies reativas de oxigênio (EROs), tornando-se uma molécula instável, como o superóxido ($O_2^{\bullet}$). Na necessidade de parear-se, esta molécula, pode interagir com outra igual, tornando-se neutra, ou ainda interagir com lipídios da membrana plasmática, alterando suas propriedades (GEHRMANN; ELSNER; LENZEN, 2010; OLSZEWER, 1995).

A produção excessiva ou continuada de EROs pode alterar a integridade e função fisiológica de macromoléculas como DNA, proteínas e lipídios, contribuindo para a patogênese de doenças neurodegenerativas, envelhecimento, processos inflamatórios, reações imunológicas, câncer e diabetes. O dano provocado por EROs é determinado pela geração das mesmas, mas também pelo status antioxidante da célula, sendo que os tecidos apresentam diferenças na suscetibilidade aos danos citotóxicos. As ilhotas pancreáticas, apresentam expressão gênica e atividade reduzida de algumas enzimas antioxidantes, comparadas à outros tecidos, o que torna-as mais sensíveis à lesão por EROs (ACHARYA; GHASKABDI, 2010; BINDOKAS et al., 2003; BRAND et al., 2004; KANETO et al., 1999; LENZEN; DRINKGERN; TRIEDGE, 1996; PI et al., 2007; SCHONFELD; WOJTCZACK, 2008).

A exposição da célula β à grandes quantidades de EROs, está associada à disfunção da mesma e apoptose, como encontrado no diabetes tipo I e diabetes tipo II. Porém em pequenas quantidades, as EROs agem como mensageiros intracelulares em diversos tecidos, inclusive na célula β, atuando como sinalizadores da secreção de insulina (ACHARYA; GHASKABDI, 2010; BINDOKAS et al., 2003; PI et al., 2007).

A mitocôndria é a maior fonte de EROs, a partir do metabolismo dos nutrientes e geração de ATP, sendo que a disfunção mitocondrial é a principal responsável pelo aumento na geração de EROs associado ao diabetes (BRAND et al., 2004; GEHRMANN; ELSNER; LENZEN, 2010). Porém, outras fontes celulares produzem EROS, dentre elas o sistema NAD(P)H oxidase (SCHONFELD; WOJTCZACK, 2008; SYED et al., 2011).

1.4 Enzima NAD(P)H oxidase

A NAD(P)H oxidase é um complexo enzimático envolvido na ação anti-patogênica de neutrófilos e outros fagócitos. Esta ação é mediada pela produção de EROs. A habilidade em produzir EROs é vital para defesa contra infecções (JONES; HANCOCK; MORICE, 2000). Este complexo é encontrado em diversas células e possui como substrato as coenzimas NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida) ou NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) (BABIOR, 1999).

A enzima é formada por duas subunidades presentes na membrana plasmática: gp91^{phox} e p22 ^{phox}, que formam o citocromo b558 e contituem o centro redox da enzima. Além delas, existem subunidades presentes no citosol: p67^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox} e Rac. A ativação do complexo inicia-se com a fosforilação da subunidade citosólica p47^{phox} , desta forma, as subunidades citosólicas translocam-se para a membrana, gerando grandes quantidades de $O_2^{\bullet}$. As subunidades da NAD(P)H oxidase atuam como cadeias de transporte de elétrons, tendo o oxigênio molecular (O_2) como aceptor final de elétrons. Através da redução da molécula de oxigênio, a enzima catalisa a produção de $O_2^{\bullet}$ e utiliza como doador de elétrons a molécula de NADPH. O $O_2^{\bullet}$ é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela superóxido dismutase (SOD) (BABIOR, 1999; JONES; HANCOCK; MORICE, 2000).

O complexo NAD(P)H oxidase é reconhecido como importante fonte de $O_2^{\bullet}$ em fagócitos. Outros tecidos e células também apresentam o complexo enzimático ativo, como células endoteliais, células vasculares musculares lisas, células da tireóide, fibroblastos, linfócitos e osteoclastos (BABIOR, 1999). Oliveira et al. (2003), observaram que ilhotas pancreáticas expressam os componentes da NAD(P)H oxidase.

A atividade e expressão da NAD(P)H oxidase em ilhotas é modulada pela glicose e por alguns AG, sendo que a produção de H_2O_2 é um importante sinalizador da secreção de insulina (MORGAN et al., 2009, SANTOS et al., 2011). A glicose estimula a produção de EROs em ilhotas através da ativação do complexo enzimático, mediada pela PKC (OLIVEIRA et al., 2003). Os AG aumentam a expressão das subunidades da NAD(P)H oxidase, aumentando a produção de $O_2^{\bullet}$, em neutrófilos, fibroblastos e linfócitos (SCHONFELD; WOJTCZACK, 2008).

Morgan et al. (2009) observaram que o palmitato ativa a NAD(P)H oxidase, aumentando a produção de $O_2^{\bullet}$ e, consequentemente de H_2O_2. Em baixas concentrações o H_2O_2 funciona como sinalizador intracelular. Da mesma forma, o oleato aumentou a

expressão de $p47^{phox}$, $gp91^{phox}$ e PKC, com aumento no conteúdo de $O_2^{\bullet}$, sugerindo também, uma possível ação regulatória sobre a NAD(P)H oxidase (SANTOS et al., 2011).

Miyasaka et al. (2001), observaram aumento na produção de H_20_2 por macrófagos de ratos suplementados com óleo de peixe. O mesmo foi visto por Folador et al. (2006), indicando um possível efeito modulador do ácido graxo sobre a atividade da NAD(P)H oxidase.

2 JUSTIFICATIVA

O impacto de alguns AG sobre a secreção de insulina e a atividade da NAD(P)H oxidase em ilhotas pancreáticas tem sido estudado e já é, pelo menos em parte, conhecido. Porém, os efeitos da suplementação com óleo de peixe, em animais normais, são ainda desconhecidos.

A NAD(P)H oxidase tem papel importante no processo secretório de insulina e sua atividade está relacionada à produção de $O_2^{\bullet}$ e consequentemente de H_2O_2. A suplementação de óleo de peixe já mostrou aumentar a produção de H_2O_2 em macrófagos, possivelmente via NAD(P)H oxidase, mas em ilhotas pancreáticas de animais normais, este efeito ainda não é conhecido.

Considerando a importante relação da NAD(P)H oxidase com a secreção de insulina, o estudo das possíveis alterações induzidas pela suplementação com AG ω-3 sobre a produção de $O_2^{\bullet}$ e sobre a expressão da NAD(P)H oxidase, passa a ser de grande importância para a melhor compreensão da fisiopatologia das células β-pancreáticas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar possíveis alterações da secreção de insulina e da expressão da enzima NAD(P)H oxidase em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos normais submetidos à suplementação alimentar com óleo de peixe.

3.2 Objetivos Específicos:

* Acompanhar ganho de peso e distribuição de depósitos de tecido adiposo;
* dosar glicemia basal e insulinemia basal;
* aplicar teste de tolerância à glicose (TTG) e teste de tolerância à insulina (TTI);
* verificar a secreção de insulina por ilhotas isoladas na presença de concentrações crescentes de glicose (2,8, 5,6, 8,3, 11,1 e 16,7mM);
* verificar a produção de $^{14}CO_2$ a partir da glicose [U-^{14}C] para avaliar o metabolismo da glicose;
* verificar o conteúdo de $O_2^{\bullet}$ na presença de 5,6 e 16,7 mM de glicose;
* avaliar a expressão gênica e expressão proteica das subunidades $gp91^{phox}$, $p22^{phox}$ e $p47^{phox}$ da NAD(P)H oxidase, bem como das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), superóxido dismutase 1 e 2 (SOD 1 e SOD 2).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com 21 dias de vida. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura constante em torno de 23 ± 2 ºC e sob ciclo de iluminação (claro/escuro) de 12/12 horas. Foram divididos em grupo controle e grupo suplementado.

O grupo suplementado recebeu óleo de peixe comercial da marca Herbarium, cuja composição encontra-se na **tabela 5**. A suplementação (1 g/kg de peso corpóreo) foi iniciada partir de 21 dias de vida após o desmame e seguiu durante 60 dias. Os animais foram pesados a cada dois dias, para correção da dose a ser administrada. A administração foi via oral, através de pipeta microvolumétrica. Passado o período de suplementação, os animais foram eutanasiados para a obtenção das ilhotas e realização dos experimentos.

Tabela 5 – Composição de ácidos graxos do óleo de peixe administrado aos animais. Dados expressos como porcentagem do total de ácidos graxos.

Ácido Graxo	**Óleo de Peixe**
Laurico (12:0)	0,5
Mirístico (14:0)	11,66
Palmítico (16:0)	14,44
Esteárico (18:0)	3,23
Oléico (18:1)	8,85
Linoléico (18:2)	0,20
γ-linolênico (18:3)	1,76
Araquidonico (20:4)	12,33
Eicosapentaenóico (20:5)	26,48
Docosahexaenóico (20:6)	20,55

Fonte: Adaptado de Folador et al. (2009).

4.2 Composição corporal

Foi analisado o ganho de peso dos animais durante o tratamento. Para isso os mesmos foram pesados semanalmente, em balança digital.

A distribuição do tecido adiposo foi avaliada. Após eutanásia, foram retirados os depósitos de tecido adiposo peri-epididimal e retroperitoneal, pesados e normalizados para cada 100g de peso corporal.

4.3 Glicemia e insulinemia basal

A glicemia basal foi obtida após restrição alimentar de 4 horas. Os animais foram anestesiados com solução anestésica de zoletil® (Virbac, São Paulo, Brasil), que cuja composição é tiletamina e zolazepam, na dose de 0,2 ml/300 g peso e fentanest® (Cristália, São Paulo, Brasil), cuja composição é citrato de fentanila, na dose de 0,1 ml/300 g peso administrado por via intramuscular. A amostra de sangue foi coletada da cauda do animal, e a glicemia determinada por fita teste e glicosímetro Accu Chek Active.

Para a insulinemia basal, foram mantidas as mesmas condições de restrição alimentar e anestesia. Foram coletados cerca de 600 μl de sangue da cauda do animal em tubos previamente heparinizados. Após centrifugação, obteve-se o plasma, onde foi dosada a insulina. A dosagem da insulina foi determinada por radioimunoensaio, conforme descrito na seção 4.7.

4.4 Teste de tolerância à glicose (TTG) e teste de tolerância à insulina (TTI)

Os animais foram submetidos ao teste de tolerância à glicose após restrição alimentar de 4 horas. Os animais foram anestesiados com solução anestésica conforme descrito na seção 4.3. Foi administrado 1 g de glicose 100% a cada quilo de peso corpóreo por via endovenosa através da veia peniana. Amostras de sangue foram coletadas da cauda do animal, nos tempos: 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 e 32 minutos e a glicemia determinada por fita teste e glicosímetro Accu Chek Active. Os dados foram analisados através do cálculo da área sob a curva.

Para o teste de tolerância à insulina, foram mantidas as mesmas condições de restrição alimentar e anestesia. A dose de insulina administrada foi 0,75 U/kg peso corpóreo por via endovenosa através da veia peniana. Amostras de sangue foram coletadas da cauda do animal, nos tempos: 0, 4, 8, 12, 16 e 20 minutos e a glicemia determinada por fita teste e glicosímetro Accu Chek Active. Os dados foram analisados através do cálculo da constante de decaimento da glicose do teste de tolerância à insulina (K_{TTI}).

4.5 Obtenção de ilhotas pancreáticas

O isolamento das ilhotas foi feito pelo método da colagenase (0,7 mg/ml - Collagenase Type V – Sigma Chemical Co.) proposto por Lacy e Kostianovsky (1967). Os animais foram decapitados e submetidos à antissepsia da região abdominal com álcool 70%. Foi realizada a laparotomia mediana e a exposição do ducto biliar que foi clampeado na sua extremidade distal e dissecado próximo ao pedículo hepático, por onde foi introduzida uma cânula de polietileno e injetados, por via retrógada, cerca de 20 ml de solução de colagenase em Hanks. A solução de Hanks contém NaCl 8.00 g/l, KCl 0,40 g/l, $CaCl_2$ 0,14 g/l, $MgSO_4.7H_2O$ 0,20 g/l, NaH_2PO_4 0,48 g/l, KH_2PO_4 0,06 g/l, $NaHCO_3$ 0,35 g/l, H_2O (qsp): 1,00 L.

Após inflar o pâncreas, o mesmo foi retirado e colocado em placa de Petri para dissecção de gânglios linfáticos, tecido adiposo e vasos sanguíneos, sendo fragmentado em pedaços e depositado em tubo falcon. A preparação foi colocada em banho-maria a 37 °C durante 25 minutos. A seguir, foi agitado manualmente para separação da porção exócrina e endócrina. Após a lavagem com Hanks (0,1% de albumina) foi realizada a coleta das ilhotas pancreáticas com micropipeta e lupa.

4.6 Secreção estática de insulina

Para a verificação da secreção de insulina, grupos de 5 ilhotas foram coletados em tubos contendo 500 µl de Krebs-Henseleit, suplementado com albumina bovina (0,1%) e pré-incubados por 30 minutos à 37 ^oC na presença de 5,6 mM de glicose. Após a retirada do meio de pré incubação, as mesmas foram incubadas em diferentes concentrações de glicose (2,8, 5,6, 8,3, 11,1 e 16,7 mM) por 60 minutos a 37 ^oC. O sobrenadante foi removido e estocado a -20 ^oC para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio. As ilhotas foram ressuspendidas em 350 µL de uma solução de álcool ácido (52 ml etanol, 17 ml água, 1 ml ácido clorídrico) e rapidamente sonicadas, provocando o rompimento das células para dosagem do conteúdo intracelular de insulina. Os dados foram expressos através da normalização da secreção pelo conteúdo de insulina e foram abordados como percentagem em relação ao controle.

4.7 Dosagem de insulina

A dosagem da quantidade de insulina secretada foi determinada por radioimunoensaio. Para tanto, a solução reagente inclui uma quantidade conhecida de anticorpo, uma quantidade conhecida do hormônio marcado radioativamente (insulina marcada com iodo – ^{125}I, Amershan Biosciences, Inglaterra) e uma quantidade desconhecida de hormônio não – radioativo (amostra). Como as duas formas de hormônio, competem pelo sítio de ligação ao anticorpo, quanto mais hormônio não – radioativo estiver presente, menos o hormônio radioativo irá se ligar. O complexo insulina – anticorpo marcado formado foi precipitado em polietilenoglicol (PM 6000) e dosado em contador tipo gama (PerkinElmer, Turku, Finlândia). Uma curva padrão foi preparada, na qual a relação ligado/livre para o hormônio radioativo foi plotada em função da concentração do hormônio não-radioativo. A relação ligado/livre do hormônio radioativo é maior quanto menos hormônio não-radioativo estiver presente. A curva padrão foi utilizada para determinar a concentração do hormônio em cada amostra.

4.8 Metabolismo da glicose

Grupos de 80 ilhotas pancreáticas foram incubadas em 1,2 ml de Krebs-Henseleit contendo 0,1% de albumina em 5,6 mM ou 16,7 mM glicose. Os tubos de incubação continham, em compartimento separado, papel de filtro embebido em 400 μl de feniletilamina, diluída 1:1 v/v em metanol. A solução de incubação continha glicose marcada com carbono 14 ([U-^{14}C]), na atividade de 0,2 μCi/ml para a solução de 5,6 mM e 0,6 μCi/ml para a solução 16,7 mM glicose. As amostras devidamente vedadas, foram incubadas em banho-maria a 37 °C sob agitação. Após 60 minutos, foram adicionados 400 μl de ácido clorídrico (HCl) e os tubos foram incubados por mais 90 minutos a 37 °C, sob agitação. O papel de filtro foi então transferido para tubo específico com adição de 1,8 ml de líquido de cintilação biodegradável (Amershan Pharmacia, Upsala Sweden). A contagem da radioatividade do $^{14}CO_2$ produzido foi realizada em Cintilador Beckman-LS 5000TD (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA).

4.9 Conteúdo de superóxido

O conteúdo de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) foi determinado utilizando o método de fluorescência com dihidroetídeo (BINDOKAS et al., 2003). A Hidroetidina (EH) ou Diidroetídeo (DHE) é uma sonda redox-sensível, extensamente usada para detectar a produção intracelular de ânion superóxido. A reação entre o superóxido e o DHE resulta na formação de um produto oxidado, o etídeo, este se intercala às bases de DNA, corando o núcleo com uma fluorescência vermelha (ZHAO et al., 2003).

Grupos de 20 ilhotas foram pré-incubadas durante 30 minutos em uma solução de Krebs Henseleit na presença de 0,1% de albumina e 5,6 mM de glicose. Após a retirada da solução de pré-incubação, as ilhotas foram incubadas novamente na presença de 5,6 mM ou 16,7 mM glicose por 30 minutos, em banho-maria sob agitação, à 37 ºC. Em seguida, adicionou-se a hidroetidina em concentração final de 50 μM e incubou-se por 20 minutos em temperatura ambiente. Passado este período, a solução de incubação foi retirada, as ilhotas foram lavadas em Krebs–Henseleit e transferidas para lâminas de cultura (chamber slide system).

A produção da fluorescência foi analisada em microscópio confocal (LSM 510 – Aaxiovert 100M – Carl Zeiss; Jena – Germany). Para tanto, as ilhotas foram submetidas à excitação com laser de hélio-neônio no comprimento de onda 488 nm, sendo a emissão capturada no comprimento de 566 nm. A obtenção das imagens foi realizada com uma objetiva de 40x, sendo utilizados parâmetros idênticos entres as amostras de uma mesma seqüência experimental. Para a quantificação da fluorescência foi feita a projeção das secções e utilizado o programa Image J. (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Os dados foram expressos pela área da ilhota pancreática analisada.

4.10 Expressão gênica por PCR em tempo real

Para a extração dos RNAs totais das ilhotas, as mesmas foram homogeneizadas com o reagente Trizol até a completa solubilização. Em seguida, incubadas durante 5 min a temperatura ambiente, foi acrescido de 0,2 ml de clorofórmio a cada 1 ml de Trizol. O sobrenadante foi separado por centrifugação (12.000 rpm, 15 min, 4 ºC), e o RNA precipitado com isopropanol, lavado com etanol 75% e dissolvido em água deionizada previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). Os RNAs obtidos foram quantificados por

espectrofotometria e submetidos à eletroforese em gel de agarose, para análise da integridade do RNA.

Após a extração do RNA, cada amostra de 3 μg de RNA foi submetida à reação de transcrição reversa com *primers* randômicos e adição de tampão DNAse 10X e DNAse (1U/μL). Após incubação de 25 minutos a 25 °C, a DNAse foi inibida com EDTA (25 mM), em seguida foram adicionados *primers* randômicos (146 ng/ μL) e os reagentes tampão RT 5X, DTT (100 mM) e dNTP mix (10 mM). A transcriptase reversa SuperScript III foi adicionada e as amostras foram incubadas. A reação foi realizada utilizando termociclador *Multicycler PTC-0200* (Mj Researc. Inc, Walhan, MA, USA).

A expressão gênica foi avaliada utilizando o equipamento *ROTOR GENE 6000* (Corbett Research, Mortlake, Austrália) e o *SYBR GREEN* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para quantificação fluorométrica. A quantificação relativa do valor de cada gene alvo foi analisada utilizando o método do Ct (*cycle threshold*) comparativo proposto por Livak e Schmittgen (2001). O valor do Ct é o número de ciclos calculado onde o sinal de fluorescência emitido está significativamente acima dos níveis basais. A expressão do RNA para cada gene foi normalizada pela expressão do gene constitutivo HPRT (hipoxantina fosforibosiltransferase). As sequências dos pares de *primers* para cada gene analisado encontra-se na **tabela 6**.

Tabela 6 – Sequências de nucleotídeos dos pares de *primers* utilizados.

Primer	Sequência
gp91^{PHOX}	sense: 5'-TGC CCA GTA CCA AAG TTTGCC-3´
	antisense: 5'-GAC CCA CGA TCC ATT TCC AAG-3´
p22^{PHOX}	sense: 5'-GAG GTC CGC AAG AAG CCA AG-3'
	antisense: 5'-GAA ACT CAA GCA GGA GCC ACT G-3'
p47^{PHOX}	sense: 5'-CTT CAT TCG CCA CAT CGC -3´
	antisense: 5'-TTT CTG TAG ACC ACC TTC TCC G - 3'
CAT	sense: 5'-CAT TGA GCC CAG CCC G-3'
	antisense: 5'-GGC GGT GAG TGT CTG GGT AA-3'
GPx	sense: 5'-CCT GGT GGT GCT CGG TTT-3'
	antisense: 5'-TCG GAC ATA CTT GAG GGA ATT CA-3'
SOD 1	sense: 5'-CCG GTG CAG GGC GTC-3'
	antisense: 5'-TCC TGT AAT CTG TCC TGA CAC CA-3'
SOD 2	sense: 5'-TAC CAG CAT TTT CTG GCA AAA CC-3'
	antisense: 5'-AGT CAC GCT TGA TAG CCT CCA-3'
HPRT	sense: 5'-GCT GAA GAT TTG GAA AAG GTG T-3´
	antisense: 5'-ACA GAG GGC CAC AAT GTG AT-3´

Sequências para análise da expressão gênica de gp91^{phox}, p22^{phox} e p47^{phox}, catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), superóxido dismutase 1 (SOD1) e superóxido dismutase 2 (SOD2). Para controle interno foi utilizado HPRT.
Fonte: Lucena (2012).

4.11 Expressão protéica por *Westernblotting*

Em grupos de 300 ilhotas foram adicionados 80 µl de tampão de extração previamente fervido (Tris-Base 100 mM, pH 7,5; EDTA 10 Mm; SDS 10%; fluoreto de sódio 100 mM; ortovanadato de sódio 10 mM e água destilada). Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 minutos e centrifugadas por 20 minutos à 4 ºC (12000 rpm). Foi determinado o conteúdo protéico do sobrenadante pelo método de Bradford (1976). Após corrida em gel de eletroforese (gel de 10% e de 15%) e transferência para membrana de nitrocelulose, a expressão das subunidades da NAD(P)H oxidase, bem como das enzimas antioxidantes foram avaliadas através de anticorpos específicos (ver tabela 6). Para a revelação, foram utilizados os reagentes de quimioluminescência ECL da Millipore, onde as soluções 1 e 2 foram adicionadas na mesma proporção e a membrana foi analisada no aparelho Image Quant, GE Healthcare (GE Healthcare AS, Oslo, Noruega). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica pelo software Image J. A quantificação da expressão proteica foi normalizada pela proteína tubulina.

A **tabela 7**, apresenta as proteínas analisadas, bem como os respectivos anticorpos utilizados.

Tabela 7 – Anticorpos utilizados para análise da expressão proteica.

Anticorpo Primário	**Anticorpo Secundário**	**Fabricante**	**Concentração**
$gp91^{PHOX}$	rabbit	Millipore	1:1000
$p22^{PHOX}$	rabbit	Abicans	1:500
$p47^{PHOX}$	rabbit	Millipore	1:1000
CAT	rabbit	Santa Cruz	1:500
GPx	goat	Sigma	1:1000
SOD 1	rabbit	Santa Cruz	1:1000
SOD 2	rabbit	Millipore	1:1000
Tubulina	mouse	Invitrogen	

Anticorpos para análise de $gp91^{phox}$, $p22^{phox}$ e $p47^{phox}$, CAT, GPx, SOD1 e SOD2. Para controle interno foi utilizada Tubulina.
Fonte: Lucena (2012).

4.12 Análise estatística

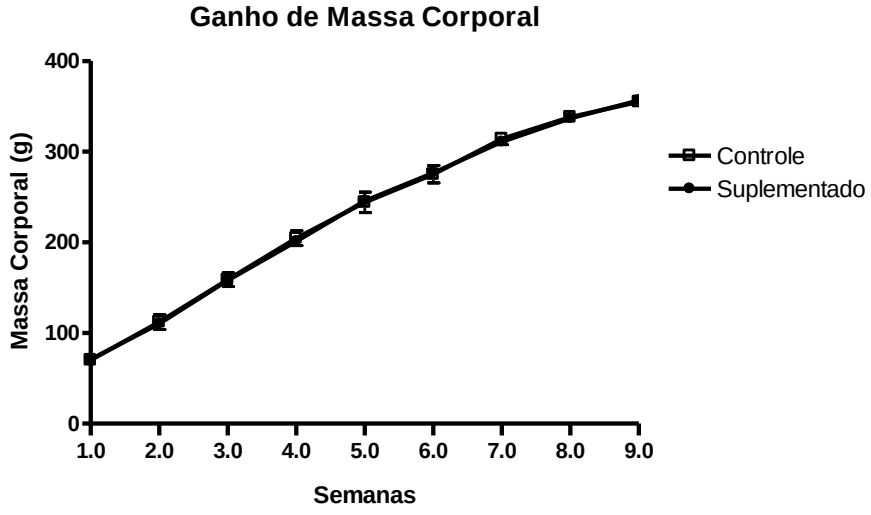
Para a análise estatística, os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). O intervalo mínimo de significância considerado foi de 95% ($p<0,05$). Foi feita a análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni, ou análise por Teste *t*.

5 RESULTADOS

5.1 Composição corporal

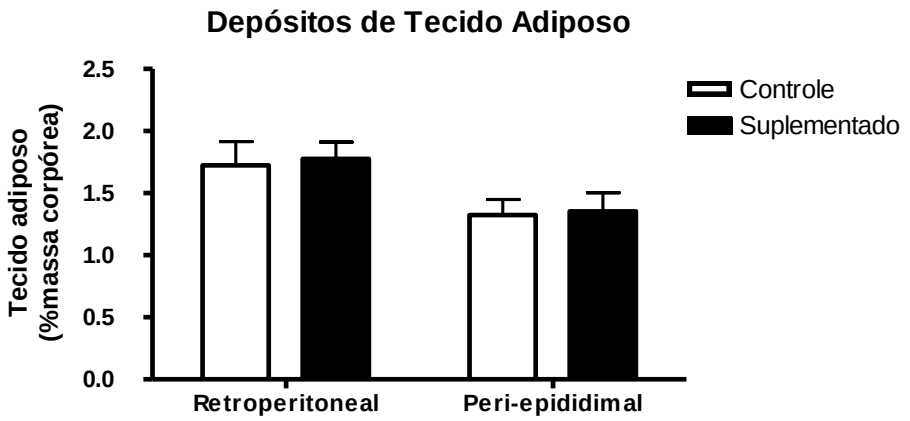
O ganho de peso dos animais foi avaliado semanalmente (figura 1). Foi avaliada a distribuição do tecido adiposo (figura 2). Os grupos suplementado e controle apresentaram mesmo padrão de ganho de peso e distribuição de tecido adiposo após 60 dias de tratamento.

Figura 1 – Ganho de massa corporal.



Evolução da massa corporal dos animais ao longo do tratamento (Teste t não pareado. n=22).
Fonte: Lucena (2012).

Figura 2 - Depósitos de Tecido Adiposo.



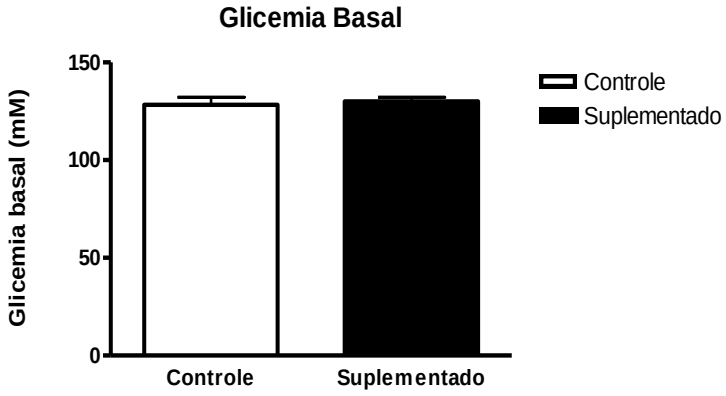
Peso do tecido adiposo retroperitoneal e do peri-epididimal em comparação percentual à massa corpórea (Teste t não pareado. n=6).
Fonte: Lucena (2012)

5.2 Homeostase Glicêmica

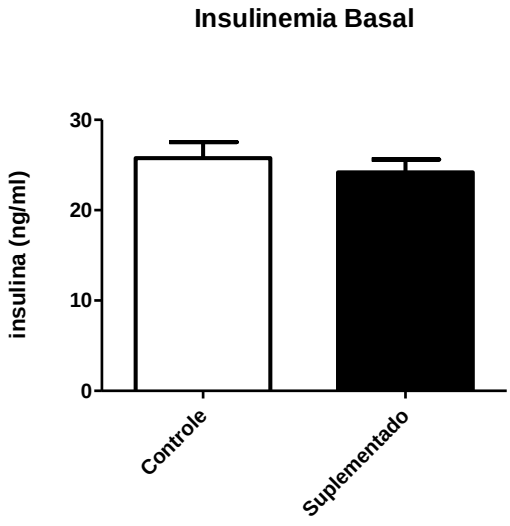
A glicemia basal e a insulinemia basal (figura 3) foram avaliadas após 4hs de restrição alimentar. Não houve diferenças entre os grupos controle e suplementado.

Figura 3 - Glicemia e insulinemia basais.

A



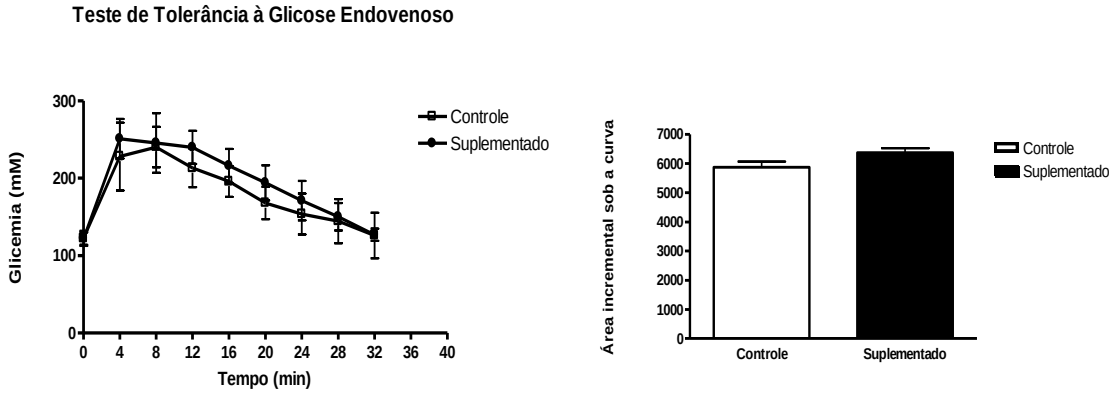
B



A - Glicemia basal avaliada após 4hs de restrição alimentar (Teste t não pareado. n=10). B – Insulinemia basal avaliada após 4hs de restrição alimentar (Teste t não pareado. n=9).
Fonte: Lucena (2012).

O teste de tolerância à glicose (TTG) foi realizado quatro dias antes do sacrifício dos animais. Os grupos controle e suplementado apresentaram respostas similares, não havendo diferença significativa entre os mesmos (figura 4).

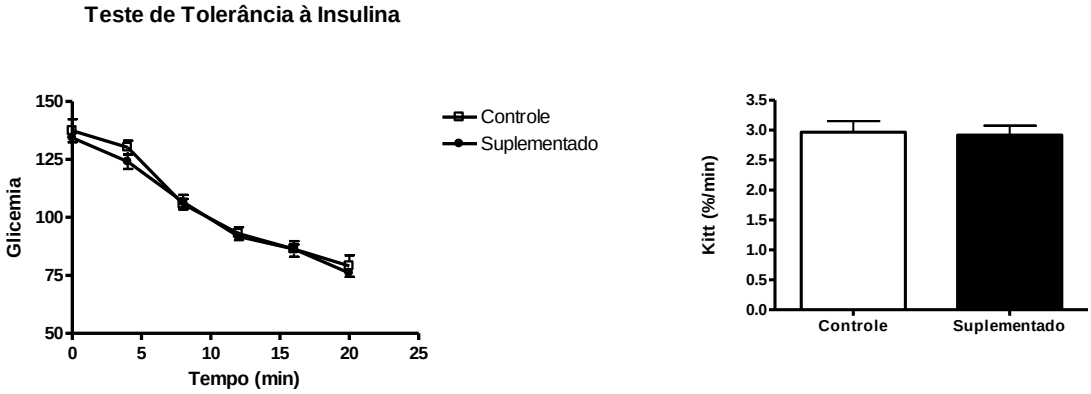
Figura 4 - Teste de tolerância à glicose



.
Curva glicêmica durante o TTG e área incremental sob a curva (ANOVA com duas variáveis seguida de Teste de Bonferroni. n=10).
Fonte: Lucena (2012).

O teste de tolerância á insulina (TTI) foi realizado quatro dias antes do sacrifício dos animais. Os grupos controle e suplementado não apresentaram diferença significativa no teste (figura 5).

Figura 5 - Teste de tolerância à insulina.

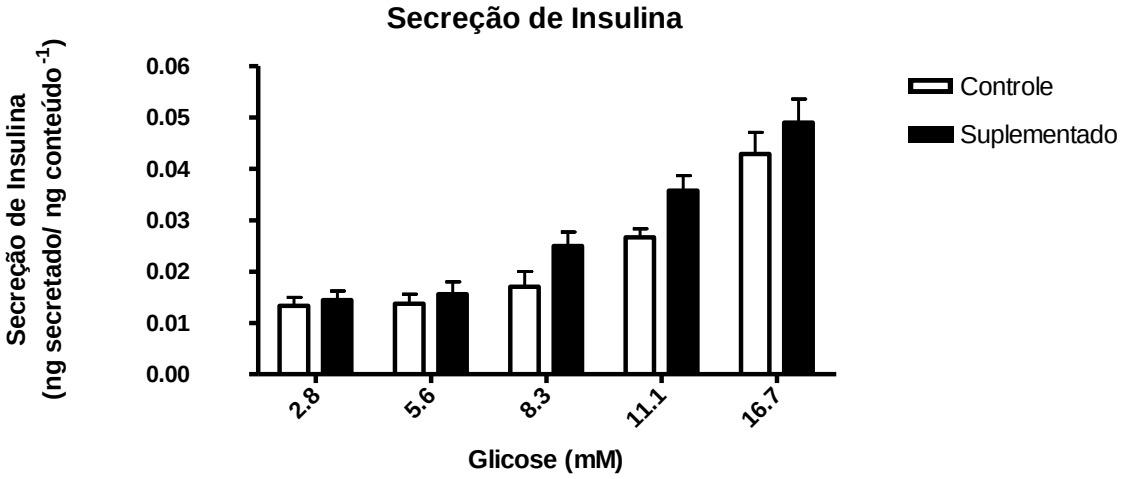


Curva glicêmica durante o TTI e constante de decaimento – Ktti - (ANOVA com duas variáveis seguida de Teste de Bonferroni. n=5).
Fonte: Lucena (2012).

5.3 Secreção de insulina e metabolismo de glicose por ilhotas isoladas

Foi analisada a secreção estática de insulina por ilhotas isoladas. Em concentrações crescentes de glicose não houve diferença na secreção de insulina pelos diferentes grupos experimentais (figura 6).

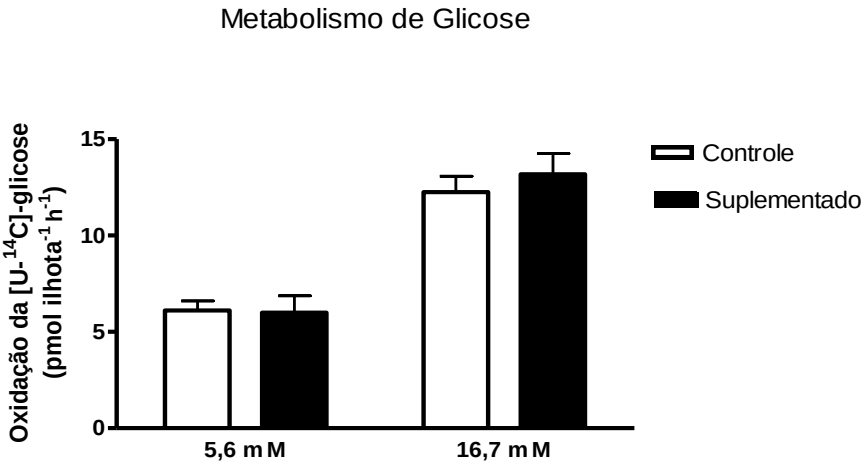
Figura 6 - Secreção de Insulina.



Resposta da secreção de insulina em concentrações crescentes de glicose (ANOVA com duas variáveis seguido de Teste de Bonferroni. n=8).
Fonte: Lucena (2012).

Foram realizados ensaios para analisar o metabolismo de glicose em ilhotas pancreáticas isoladas através da produção de $^{14}CO_{2.}$ Não foram detectadas respostas diferentes entre os grupos (figura 7).

Figura 7 - Metabolismo de glicose.

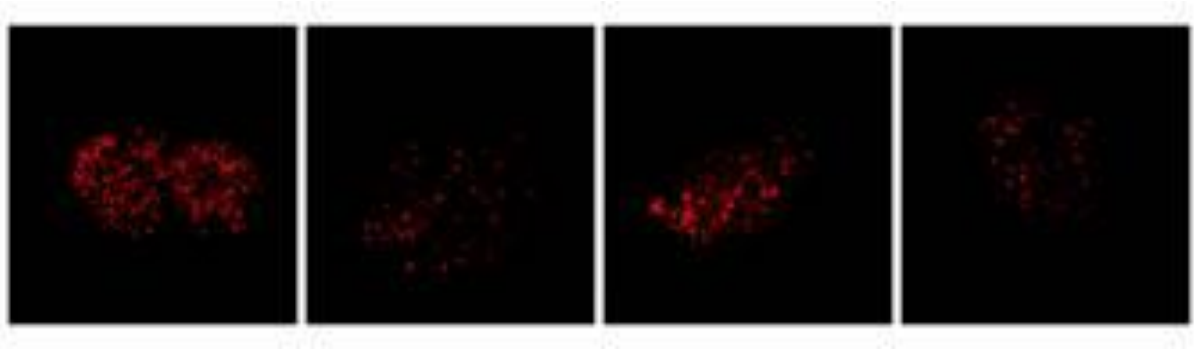


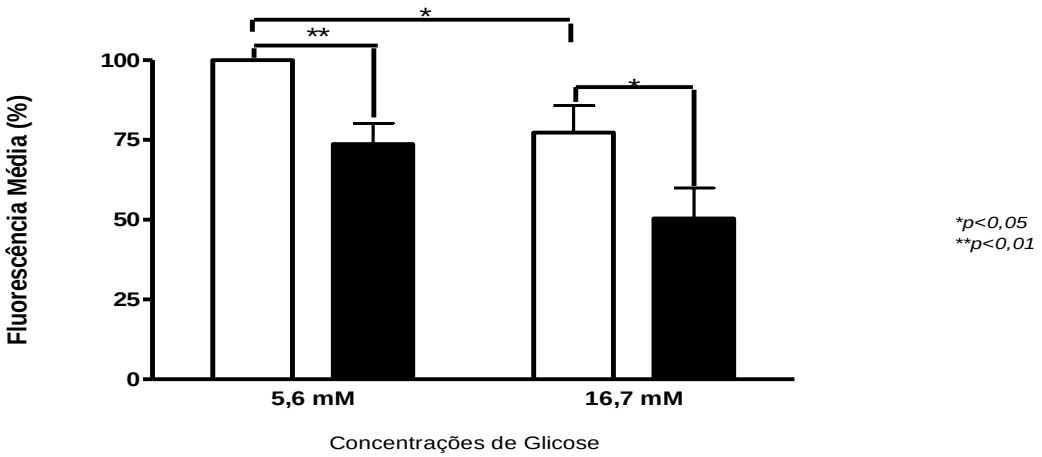
Produção de CO_2 a partir do metabolismo de glicose em ilhotas pancreáticas isoladas (ANOVA com duas variáveis seguido de Teste de Bonferroni. n=6).
Fonte: Lucena (2012).

5.4 Conteúdo de Superóxido em Ilhotas Isoladas

Foram realizados ensaios para analisar o conteúdo de superóxido em ilhotas pancreáticas sob diferentes estímulos de glicose. Houve redução no conteúdo de superóxido em ambas concentrações de glicose, no grupo suplementado com óleo de peixe (figura 8).

Figura 8 - Conteúdo de Superóxido.





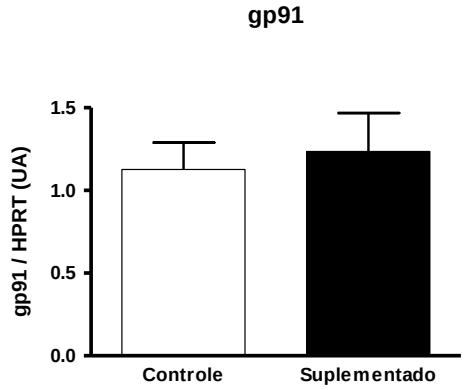
Conteúdo de ânion superóxido em ilhotas pancreáticas isoladas (ANOVA com duas variáveis seguido de Teste de Bonferroni. Teste t não pareado. n=7-10). *p<0,05, **p<0,01.
Fonte: Lucena (2012).

5.5 Expressão gênica

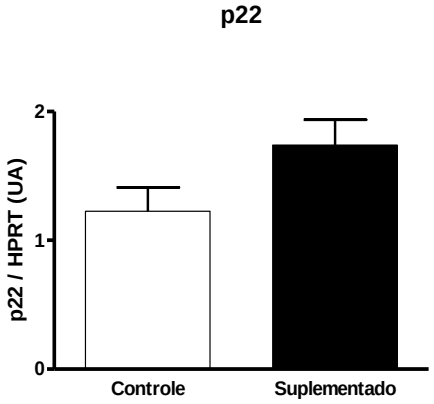
Foi analisada a expressão gênica das subunidades da NAD(P)H oxidase, conforme demonstrado na figura 9.

Figura 9 - Expressão gênica das subunidades da NAD(P)H oxidase.

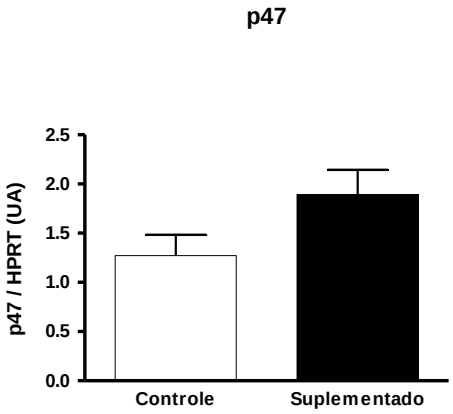
A



B



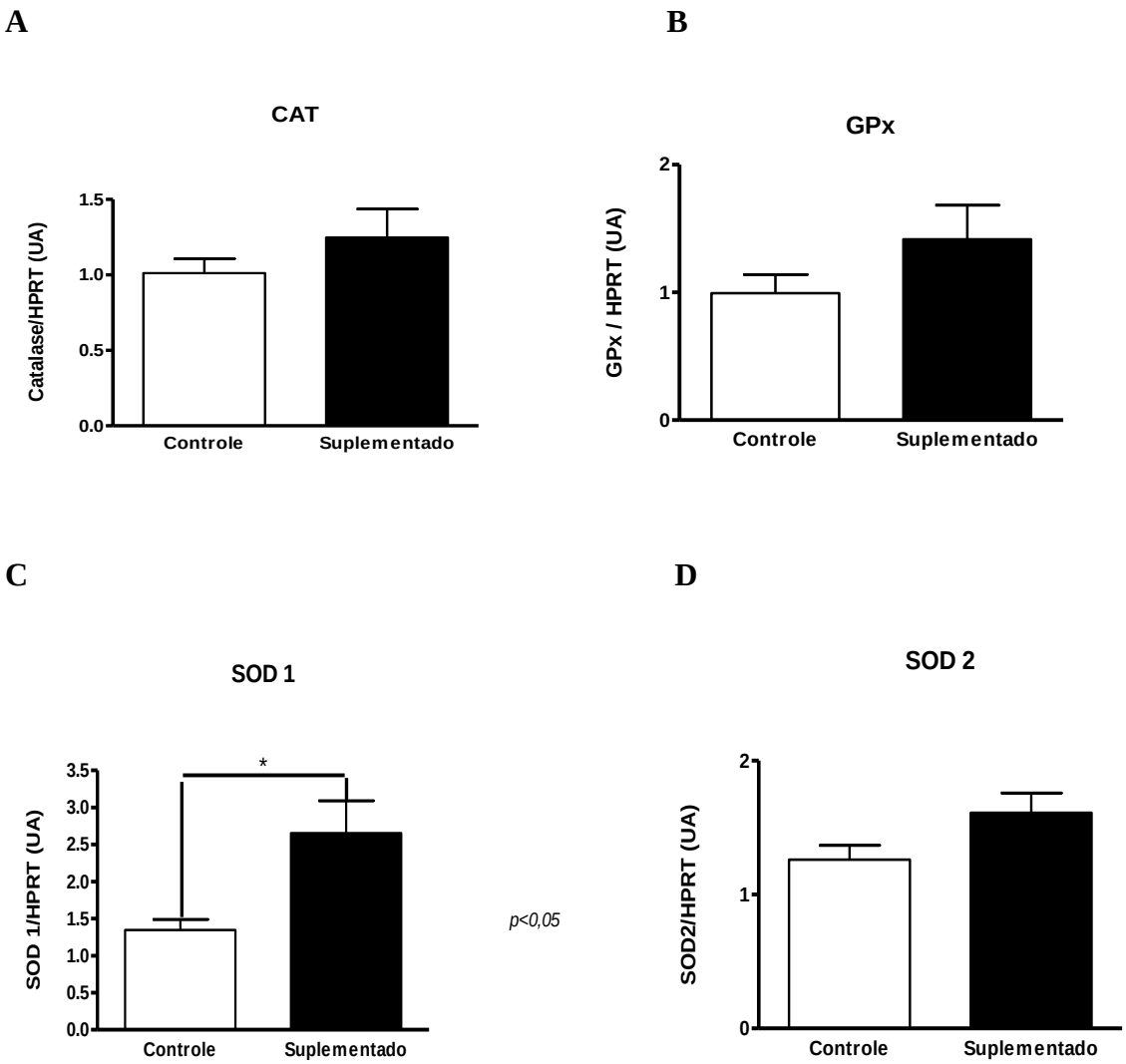
C



A - Expressão gênica de $gp91^{phox}$ em ilhotas pancreáticas isoladas (Teste t não pareado.n=6). B - Expressão gênica de $p22^{phox}$ em ilhotas pancreáticas isoladas (Teste t não pareado. n=6). C – Expressão gênica de $p47^{phox}$ em ilhotas pancreáticas isoladas (Teste t não pareado. n=6).
Fonte: Lucena (2012).

Foi analisada também a expressão gênica das enzimas antioxidantes, conforme demonstrado na figura 10.

Figura 10 - Expressão gênica das enzimas antioxidantes.

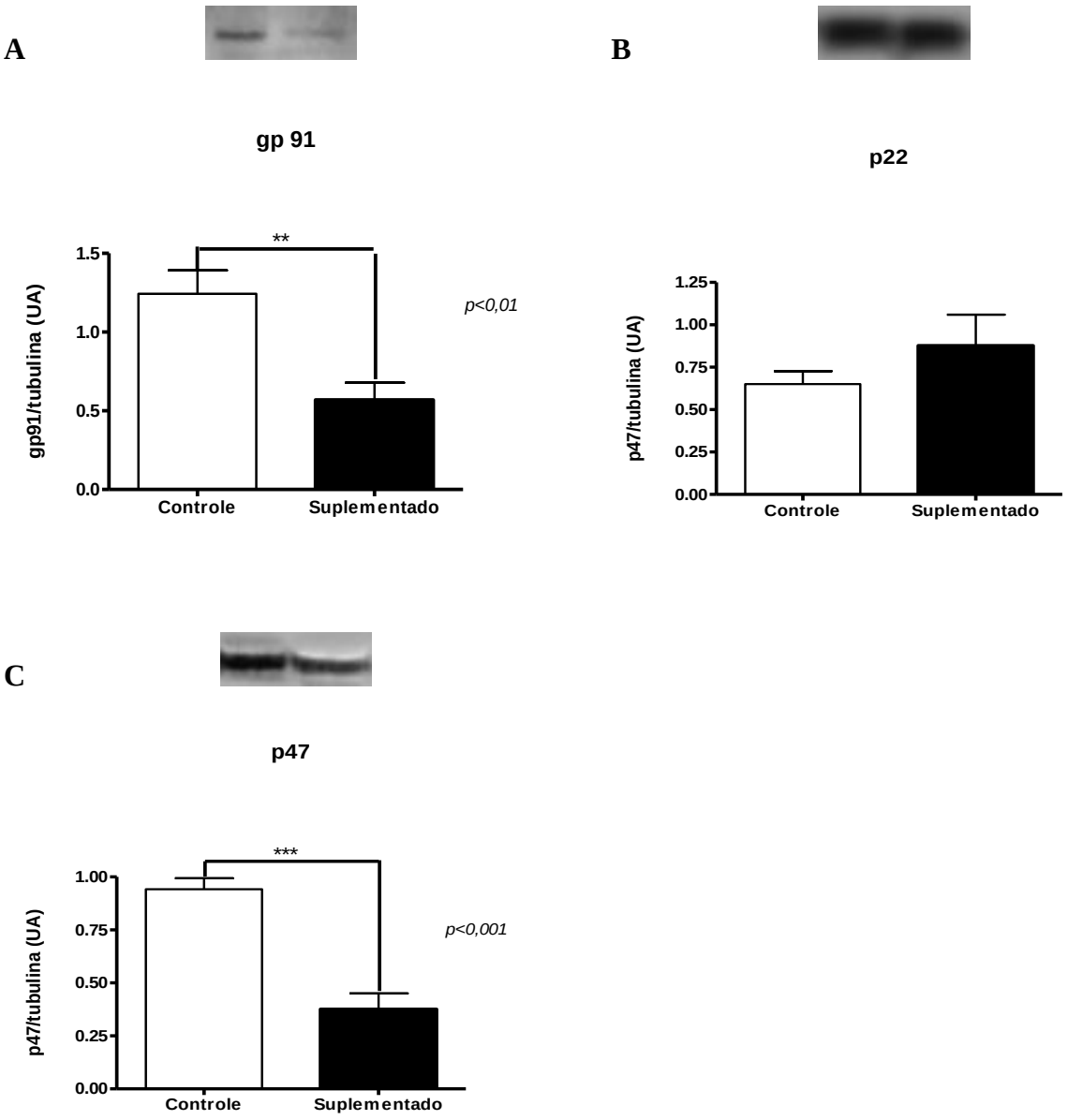


A – Expressão gênica da catalase (CAT) em ilhotas pancreáticas isoladas (Teste t não pareado. n=5). B – Expressão gênica da glutationa peroxidase (GPx) em ilhotas pancreáticas isoladas (Teste t não pareado. n=5). C - Expressão gênica de superóxido dismutase 1 (SOD1) em ilhotas pancreáticas isoladas (Teste t não pareado. n=4). *p<0,05. D - Expressão gênica de superóxido dismutase 2 (SOD2) em ilhotas pancreáticas isoladas (Teste t não pareado. n=3).
Fonte: Lucena (2012).

5.6 Expressão proteica

Foi analisada a expressão gênica das subunidades da NAD(P)H oxidase, conforme demonstrado na figura 11.

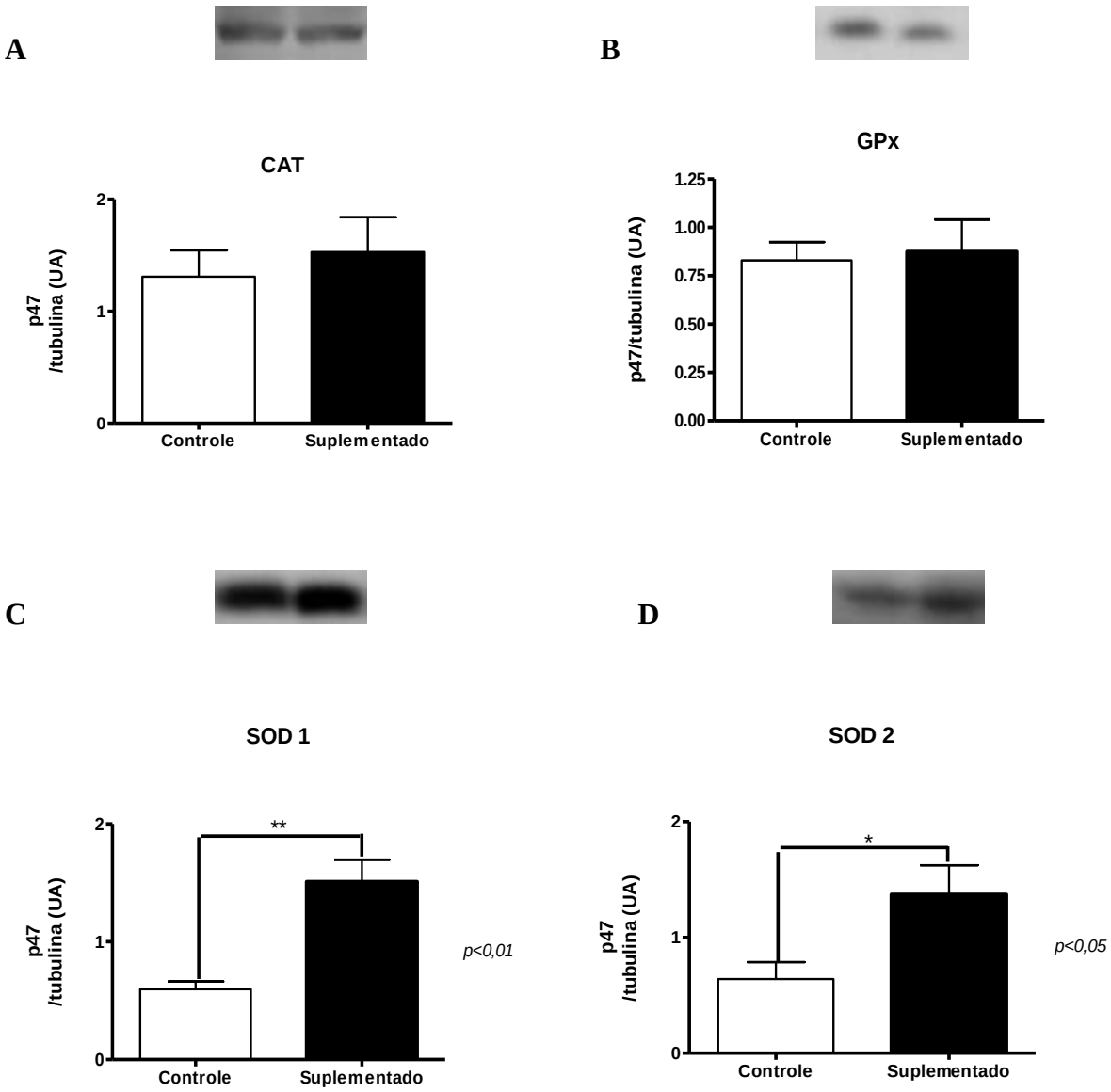
Figura 11 - Expressão proteica das subunidades da NAD(P)H oxidase.



A - Expressão proteica de gp91^{phox} em ilhotas pancreáticas isoladas (Teste t não pareado. n=5). **p<0,01. B - Expressão proteica de p22^{phox} em ilhotas pancreáticas isoladas (Teste t não pareado. n=6). C - Expressão proteica de p47^{phox} em ilhotas pancreáticas isoladas (Teste t não pareado. n=5). ***p<0,001.
Fonte: Lucena (2012).

Foi analisada também a expressão proteica das enzimas antioxidantes, conforme demonstrado na figura 12.

Figura 12 - Expressão proteica das enzimas antioxidantes.



A - Expressão proteica de catalase (CAT) em ilhotas pancreáticas isoladas (Teste t não pareado. n=3). B - Expressão proteica de glutationa peroxidase (GPx) em ilhotas pancreáticas isoladas (Teste t não pareado. n=6). C - Expressão proteica de superóxido dismutase 1 (SOD1) em ilhotas pancreáticas isoladas (Teste t não pareado. n=5). **p<0,01. D - Expressão proteica de superóxido dismutase 2 (SOD2) em ilhotas pancreáticas isoladas . (Teste t não pareado. n=5). *p<0,05.
Fonte: Lucena (2012).

6 DISCUSSÃO

A prevalência da obesidade, resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2 vem aumentando rapidamente em todo mundo, com conseqüências para a saúde da comunidade e demanda por cuidados médicos (VESSBY, 2000). A composição da dieta pode ter um papel significante também para a sensibilidade periférica à insulina. Os AG oléico, linoléico, palmitato e esteárico são os mais abundantes em nossa alimentação e refletem a composição de lipídios plasmáticos e nos tecidos. O aumento da resistência à insulina está freqüentemente associada à alta ingestão de gordura saturada e baixa ingestão de gordura poliinsaturada como o óleo de peixe (STORLIEN et al., 1991).

Assim, considerando a possível importância do aumento da ingestão de óleo de peixe como preventivo ao desenvolvimento de doenças relacionadas a alterações metabólicas propusemo-nos a estudar em ratos os possíveis benefícios da suplementação alimentar baseada nesse composto. Ambos os grupos (controle e suplementado) receberam dieta padrão para roedores sendo que ao grupo suplementado foi adicionado óleo de peixe (1 g/kg peso/dia). A dose correspondeu à 0,1% do peso corpóreo do animal, contribuindo com valor energético irrelevante (cerca de 1,8 kcal para um animal de 200 g/peso corpóreo).

O ganho de peso dos animais foi avaliado semanalmente e os depósitos de gordura foram determinados após o tratamento, para verificar as possíveis alterações promovidas pelo óleo de peixe. Os grupos controle e suplementado não apresentaram diferenças no ganho de peso (figura1) bem como na distribuição do tecido adiposo (figura 2). Resultados semelhantes foram observados por Castellano et al. (2010), onde porcos saudáveis alimentados com dietas isocalóricas e suplementados com gordura animal e diferentes óleos de peixes, não apresentaram diferenças nos ganhos de peso e depósito de tecido adiposo. Em nosso modelo e no modelo de Castellano et al. (2010), a dieta habitual parece ser o fator determinante do ganho de peso e da distribuição de tecido adiposo nos animais.

Foram avaliadas a glicemia basal, insulinemia basal, tolerância à glicose (TTG) e tolerância à insulina (TTI) nos grupos controle e suplementado, a fim de investigar possíveis alterações moduladas pelo óleo de peixe. Ambos os grupos apresentaram glicemia e insulinemia basal (figura 3), TTG (figura 4) e TTI (figura 5) semelhantes.

Castellano et.al. (2010) em trabalho realizado com porcos saudáveis suplementados com gordura animal e diferentes óleos de peixes, obtiveram resultados semelhantes. O mesmo foi observado em estudo com cães normais (IRVINE et al., 2002).

Em animais com resistência à insulina induzida por dieta rica em gordura saturada, a suplementação aguda (24hs) com óleo de peixe não melhorou a sensibilidade ao hormônio além de aumentar a glicose plasmática (HOLNESS et al., 2004). Resultados semelhantes foram observados por Borkman et al. (1989) ao suplementar indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 2 com óleo de peixe. Já Storlien et al. (1991), conseguiram reverter a resistência à insulina induzida pela dieta com alto teor de gordura saturada, com a suplementação de ω-3 por 30 dias. Esses dados indicam que em animais resistentes, apenas o tratamento à longo prazo seja eficiente para melhora da sensibilidade à insulina e intolerância à glicose, através, provavelmente, da alteração da composição de AG da membrana plasmática e perfil plasmático de lipídios. Por outro lado, animais com deficiência de ω-3, apresentam resistência à insulina e intolerância à glicose (OGUZHAN et al., 2006).

Têm-se avaliado o impacto dos diferentes ácidos graxos e da obesidade sobre o processo secretório de insulina. Animais alimentados com dietas ricas em gordura saturada, constantemente, desenvolvem resistência à insulina, acompanhada de intolerância à glicose, hiperglicemia e hiperinsulinemia (DUARTE et al., 2006).

Neste estudo realizamos experimentos de secreção estática de insulina com ilhotas pancreáticas dos grupos controle e suplementado em concentrações crescentes de glicose (figura 6). Nossos resultados não mostraram diferença estatisticamente significante entre os grupos. Da mesma forma, Castellano et al. (2010) não encontraram diferenças significativas na resposta insulínica em porcos normais suplementados com óleo de peixe.

Em animais alimentados com dieta rica em gordura saturada, a substituição de uma pequena porcentagem do total de ácidos graxos por óleo de peixe reverteu a hipersecreção de insulina (HOLLNESS et al., 2004). Na realidade, o óleo de peixe parece ser mais eficiente na reversão da hiperinsulinemia presente em animais obesos ou expostos à dietas ricas em gordura animal. Em nosso modelo com animais normais, esta diferença não foi encontrada.

Avaliamos a oxidação da glicose entre os grupos (figura 7) através da produção de $^{14}CO_2$. Ambos apresentaram acréscimo da oxidação de glicose, frente às concentrações maiores da mesma no meio, porém a resposta não foi diferente entre grupo controle e grupo suplementado.

A suplementação em animais normais parece não afetar a oxidação de glicose na ilhota. Porém, ilhotas de animais com deficiência de ω-3 (OGUZHAN et al., 2006), apresentam menor taxa de oxidação em diferentes concentrações de glicose.

Os estudos com humanos ainda são controversos, porém Giacco et al. (2007) mostraram que a suplementação com óleo de peixe não foi capaz de modular a sensibilidade

e secreção de insulina em indivíduos normais. Assim, maiores estudos são necessários para confirmar os efeitos agudos e crônicos do óleo de peixe sobre a homeostase da glicose em animais normais e com patologias como obesidade e diabetes.

Com relação à produção de EROs, como descrito anteriormente, a atividade e NAD(P)H oxidase em ilhotas pancreáticas é modulada pela glicose e por alguns AG . A presença do palmitato aumenta a produção de $O_2^{\bullet}$ em 5,6mM de glicose (MORGAN et al., 2009). O oleato aumenta a expressão da $p47^{phox}$, $gp91^{phox}$ e o conteúdo de $O_2^{\bullet}$ em ilhotas expostas em 16,7mM de glicose (SANTOS et al., 2011).

Em macrófagos, Miyasaka et al. (2001), observaram aumento na produção de H_2O_2 em ratos suplementados com óleo de peixe. O mesmo foi visto por Folador et al. (2006), indicando um possível efeito modulador do AG sobre a atividade da NAD(P)H oxidase.

Porém, nosso estudo obteve efeito inverso, ao suplementar ratos com óleo de peixe e analisar o conteúdo de $O_2^{\bullet}$ de ilhotas pancreáticas destes animais (figura 8). Em altas concentrações de glicose, o grupo controle apresentou redução do conteúdo de $O_2^{\bullet}$ nas ilhotas, o mesmo foi observado por Rebelato et al. (2011), sugerindo que a glicose por si só possa estar interferindo na produção de EROs pela ilhota. O grupo suplementado apresentou redução significativa do conteúdo de EROs na presença de 5.6 e 16.7mM de glicose quando comparado ao controle. Resultados semelhantes foram obtidos por Richard et al. (2008) onde células endoteliais de aorta foram incubadas com 10μM de EPA ou DHA por 48 horas, e apresentaram conteúdo reduzido de EROs. O mecanismo envolvido nesta redução está por ser esclarecido.

A suplementação com óleo de peixe foi capaz de reduzir a expressão proteica das subunidades $gp91^{phox}$ e $p47^{phox}$ (figura 11) nas ilhotas pancreáticas, sugerindo uma possível participação da NAD(P)H oxidase, já que Santos et al. (2011), ao fazer o *knockdown* da $p47^{phox}$ promoveu uma redução no conteúdo de $O_2^{\bullet}$ nas ilhotas, relacionando a geração de EROs e a expressão da enzima.

A redução do conteúdo de $O_2^{\bullet}$ até certo ponto parece ser benéfico para as ilhotas, pois ratos diabéticos apresentam maior conteúdo de EROs quando comparados à animais normais, e isso pode estar associado à maior ativação da NAD(P)H oxidase, já que os mesmos apresentam maior expressão das subunidades $gp91^{phox}$ e $p47^{phox}$ (SYED et al., 2011).

Por outro lado, o tratamento também aumentou a expressão proteica da enzima SOD1 e SOD2 (figura 12), indicando um possível aumento na defesa antioxidante das ilhotas, promovida pelo óleo de peixe.

Wang et al. (2004) analisaram a atividade da SOD em macrófagos incubados com óleo de milho e óleo de peixe, por 1, 3 ou 24 horas. Observaram que a partir de 1 hora de incubação o óleo de peixe já foi capaz de aumentar atividade desta enzima. Erdogan et al. (2004) observou aumento na atividade da SOD plasmática em animais tratados com 0,4g/kg de óleo de peixe, durante 30 dias. Da mesma forma, células de hepatoma humano, tratadas por 21 horas com DHA, tiveram a atividade da SOD aumentada (DI NUNZIO; VALLI; BORDONI, 2011).

Seja qual for o mecanismo que diminui o conteúdo de EROs das ilhotas pancreáticas dos animais submetidos à ingestão diária de óleo de peixe, este dado é relevante, pois pressupõe melhor regulação do estado redox durante o processo secretório de insulina.

7 CONCLUSÕES

Estudos têm mostrado que a suplementação com óleo de peixe melhora a resistência periférica e secreção de insulina, associados à obesidade/diabetes. Em nosso modelo com animais normais, a suplementação não alterou estes parâmetros quando comparados ao grupo controle.

Por outro lado, foram observadas reduções no conteúdo de $O_2^{\bullet}$ das ilhotas dos animais tratados, bem como redução da expressão de $gp91^{phox}$ e $p47^{phox}$ e aumento da expressão da SOD1 e SOD2, porém o exato mecanismo responsável não está claro, sugerindo, no entanto, que tanto a NADPH oxidase como a SOD 1 e SOD 2 participam desse processo. Os dados indicam modulação do estado redox da célula induzida pelo óleo de peixe.

REFERÊNCIAS[1]

ACHARYA, J. D.; GHASKABDI, S. S. Islets and their antioxidant defense. **Islets**, v. 2, n. 4, p. 225-235, 2010.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ASHCROFT, F. M.; RORSMAN, P. ATP-sensitive K+ channels: a link between β-cell metabolism and insulin secretion. **Biochem. Soc. Trans**., v. 18, p. 109-111, 1990.

BABIOR, B. M. NAD(P)H oxidase: an update. **Blood**, v. 93, n. 5, p. 1464-1476, 1999.

BANG, H. O., DYERBERG, J.; SINCLAIR, H. M. The composition of the Eskimo food in north western Greenland. **Am. J. Clin. Nutr**., v. 33, p. 2657-2661, 1980.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Fisiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

BINDOKAS, V. P. et al. Visualising superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. **J. Biol. Chem**., v. 278, n. 11, p. 9796-9801, 2003.

BURDGE, G. C.; CALDER, P. C. Conversion of α-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. **Reprod. Nutr. Dev**., v. 45, n. 1, p. 581-597, 2005

BORKMAN, M. et al. Effects of fish oil supplementation on glucose and lipid metabolism in NIDDM. **Diabetes**, v. 38, n. 10, p. 1314-1319, 1989.

BRAND, M. D. et al. Serial review: the powerhouse takes control of the cell: the role of mitochondria in signal transduction. **Free Radic. Biol. Med**., v. 37, n. 6, p.755-767, 2004.

CALDER, P. C. ω-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. **Lipids**, v. 38, n. 4, p. 343-352, 2003.

CALDER, P. C. Mechanisms of action of ω-3 fatty acids. **J. Nutr**., v. 142, n. 3, p. 592S-599S, 2012.

CALDER, P. C.; YAGOOB, P. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. **Biofactors**, v. 35, n. 3, p. 266-272, 2009.

CASTELLANO, C. A. et al. Fish oil do not improve insulin sensitivity and secretion in healthy adult male pigs. **Br. J. Nutr**., v. 10, n. 1, p. 189-196, 2010.

CHOW, C. K. **Fatty acids in foods and their health implications**. 3rd ed. New York: CRC Press, 2007.

[1] De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DECKERE, E. A. Possible beneficial effect of fish and fish ω-3 polyunsaturated fatty acids in breast and colorectal cancer. **Eur. J. Cancer Prev**., v. 8, p. 213-221, 1999.

DEENEY, J. T.; PRENTKI, M.; CORKEY, B. E. Metabolic control of β-cell function. **Cell & Develop. Biol**., v. 11, n. 1, p. 267-275, 2000.

DI NUNZIO, M.; VALLI, V.; BORDONI, A. Pro- and anti-oxidant effects of polyunsaturated fatty acid supplementation in HepG2 cells. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 85, p. 121–127, 2011

DOMMELS, Y. E. M. et al. The role of cyclooxygenase in ω-6 and ω-3 polyunsaturated fatty acid mediated effects on cell proliferation, PGE_2 synthesis and cytotocity in human colorectal carcinoma cell lines. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 3, p. 385-392, 2003.

DUARTE, A. C. G. O. et al. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. **Rev. Nutr. Campinas**, v. 19, n. 3, p. 341-348, 2006.

ERDOGAN, H. et al. Effect of fish oil supplementation on plasma oxidant/antioxidant status in rats. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 71, p. 149–152, 2004.

FOLADOR, A. et al. Effect of fish oil supplementation for 2 generations on changes in macrophage function induced by Walker 256 cancer cachexia in rats. **Int. J. Cancer**, v. 120, n. 1, p. 44-50, 2006.

GANONG, W. F. **Fisiologia médica**. 22. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

GEHRMANN, W.; ELSNER, M.; LENZEN, S. Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic β-cells. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 12, p. 149-158, 2010. Suppl. 2.

GIACCO, R. et al. Fish oil, insulin sensitivity, insulin secretion and glucose tolerance in healthy people: Is there any effect of fish oil supplementation in relation to the type of background diet and habitual dietary intake of ω-6 and ω-3 fatty acids?. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis**., v. 7, n. 1, p. 572-580, 2007.

GOYENS, P. L. L. et al. Compartmental modeling to quantify α-linolenic acid conversion after long term intake of multiple tracer boluses. **J. Lip. Res**. v. 46, n. 1, p. 1474-1483, 2005.

HABER, E. P. et al. Secreção de Insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**., v. 45, n. 3, p. 219-227, 2001.

HABER, E. P. et al.. Pleiotropic effects of fatty acids on pancreatic beta-cells. **J. Cell. Physiol**., v. 194, p. 1-12, 2002.

HARRIS, W. S. et al. Influence of ω3 fatty acid supplementation on the endogenous activities plasma lipases. **Am. J. Clin. Nutr**., v. 66, p. 254-260, 1997.

HOLLNESS, M. J. et al. Acute ω-3 fatty acid enrichment selectively reverses high-saturated fat feeding-induced insulin hypersecretion but does not improve peripheral insulin resistance. **Diabetes**, v. 53, n. 1, p. S166-S171, 2004. Suppl. 1.

HOLUB, B. J. Dietary fish oils containing eicosapentaenoic acid and the prevention of atherosclerosis and thrombosis. **CMAJ**, v. 139, p. 377-381, 1988.

HWANG, D. Fatty acids and immune responses – a new perspective in searching clues to mechanism. **Annu. Rev. Nutr**., v. 20, p. 431-456, 2000.

IRVINE, A. J. et al. Dietary supplementation with ω-3 polyunsaturated fatty acids does not affect insulin sensitivity in healthy Labrador retriever dogs. **J. Nutr**., v. 132, p. S1709-S1710, 2002.

ISHIHARA, H.; WOLLHEIM, C. B. What couples glycolysis to mitochondrial signal generation in glucose-stimulated insulin secretion? **IUBMB Life,** v. 49, p. 391-395, 2000.

JONES, R. D.; HANCOCK, J. T.; MORICE, A. H. NAD(P)H oxidase: a universal oxygen sensor? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, n. 5, p. 416-424, 2000.

JUMP, D. B. The biochemistry of ω-3 polyunsaturated fatty acids**. J. Biol. Chem**., v. 277, n. 11, p. 8755-8758, 2002.

KANETO, H. et al. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic βcells against glucose toxicity. **Diabetes**, v. 48, p. 2398-2406, 1999.

KROMANN, N.; GREEN, A. epidemiological studies in the Upernavik District, Greenland. **Acta Med. Scand**., v. 208, p. 401-406, 1980.

KRONENBERG, H. M. et al. **Williams:** tratado de endocrinologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

LACY, P. E.; KOSTIANOVSKY, M.. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, v. 16, p. 35-39, 1967.

LENZEN, S.; DRINKGERN, J.; TRIEDGE, M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 3, p. 463-466, 1996.

MALAISSE, W. J. et al. Participation of endogenous fatty acids in the secretory activity of the pancreatic β-cell. **Biochem. J**., v. 227, p. 995-1002, 1985.

MARTINS, E. F. et al. Changes of fatty acid composition in incubated rat pancreatic islets. **Diabetes Metab**., v. 1, n. 1, p. 21-27, 2004.

MIYASAKA, C. K. et al. Comparative effects of fish oil by gavage and fish oil enriched diet on leukocites. **Life Sci**., v. 69, n. 15, p. 1739-1751, 2001.

MORGAN, D. et al. Association of NAD(P)H oxidase with glucose-induced insulin secretion by pancreatic β-cells. **Endocrinology**, v. 150, n. 5, p. 2197-2201, 2009.

MUECKLER, M. Facilitative glucose transporters. **Eur J Biochem**, v. 219, p. 713-725, 1994.

NETTLETON, J. A. **Omega-3 Fatty Acids and Health**. New York: Champman & Hall, 1995.

NESHER, R. et al. β-cell protein kinases and the dynamics of the insulin response to glucose. **Diabetes**, v. 51, p. S68-S73, 2002. Suppl. 1.

OGUZHAN, B. et al. Pancreatic islet function in ω-3 fatty acid-depleted rats: glucose metabolism and nutrient-stimulated insulin release. **Endocrine**, v. 29, n. 3, p. 457-466, 2006.

OLIVEIRA, H. R. et al. Pancreatic β-cells Express phagocyte-like NADPH oxidase. **Diabetes**, v. 52, p. 1457-1463, 2003.

OLSZEWER, E. **Radicais livres em medicina**. 2. ed. São Paulo: Fundo Editorial, 1995.

PI, J. et al. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. **Diabetes**, v. 56, p. 1783-1791, 2007.

PINTON, P. et al. Long-term modulation of mitochondrial Ca^{2+} signals by protein kinase C isozymes. **J. Cell. Biol**., v. 165, n. 2, p. 223–232, 2004

PRENTKI, M.; CORKEY, B. E.. Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? **Diabetes**, v. 45, p. 273-283, 1996.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

REBELATO, E. et al. Control of the intracellular redox state by glucose participates in the insulin secretion mechanism. **PLOS ONE**, v. 6, n. 8, p. e24507, 2011.

RICHARD, D. et al. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. **Pharmac. Res**., v. 57, p. 451–455, 2008.

RISÉRUS, U. Fatty acids and insulin sensitivity. **Curr. Opinion Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 11, n. 1, p. 100-105, 2008.

ROSE, D. P. Effects of dietary fatty acids on breast and prostate cancers: evidence from *in vitro* experiments and animal studies. **Am. J. Clin. Nutr**., v. 66, p. 1513S- 1522S, 1997.

SANTOS, L. R. B. et al. Oleic acid modulates metabolic substrate channeling during glucose-stimulated insulin secretion via NAD(P)H oxidase. **Endocrinology**, v. 152, n. 10, p. 3614-3621, 2011.

SCHONFELD, P.; WOJTCZAK, L. Fatty acids as modulators of cellular production of reactive oxygen species. **Free Rad. Biol. Med**., v. 45, p. 231-241, 2008.

SKERRETT, P. J.; HENNEKENS, C. H. Consumption of fish and fish oils and decreased risk of stroke. **Prev. Cardiol**., v. 6, p. 38-41, 2003.

STEIN, D. T. et al. The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. **J. Clin. Invest**., v. 10, n. 2, p. 398-403, 1997.

STORLIEN, L. H. et al. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and ômega-3 fatty acids in muscle. **Diabetes**, v. 40, n. 2, p. 280-289, 1991.

SYED, I. et al. Increased phagocyte- like NADPH oxidase and ROS generaton in type 2 diabetic ZDF rat and human islets: Role of Rac1–JNK1/2 signaling pathway in mitochondrial dysregulation in the diabetic islet. **Diabetes**, v. 60, p. 2843-2852, 2011.

VESSBY, B.. Dietary fat and insulin action in humans. **Br. J. Nutr**. v. 83, n. 1, p. S91-S96, 2000. Suppl. 1.

WAN, Q. F. et al. Protein kinase activation increases insulin secretion by sensitizing the secretory machinery to Ca^{2+}. **J. Gen. Physiol**., v. 126, p. 653-662, 2004.

WANG, H. H. et al. Fish oil increases antioxidant enzyme activities in macrophages and reduces atherosclerotic lesions in apoE-knockout mice. **Cardiov. Res**., v. 61, p. 169–176, 2004.

ZHAO, H. et al. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. **Free Rad. Biol. Med**., v. 34, n. 1, p. 1359-1368, 2003.