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

Orientador: Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli

Versão original

São Paulo

2012

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. 61f. 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. 61p. Master 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.

1 INTRODUÇÃO

1.1 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 (de 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 ; YAGOOB, 2009; CALDER, 2012).

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/100g.

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.

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.