Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Marcela Anjos Martins

O papel do óleo de peixe na via L-arginina-óxido nítrico e no estresse oxidativo em eritrócitos: um estudo dose-resposta

Rio de Janeiro
2012

Marcela Anjos Martins

O papel do óleo de peixe na via L-arginina-óxido nítrico e no estresse oxidativo em eritrócitos: um estudo dose-resposta

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Cláudio Mendes Ribeiro

Coorientadora: Prof.ª Dra. Márcia Barbosa Águila

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M379 Martins, Marcela Anjos.
O papel do óleo de peixe na via L-arginina-óxido nítrico e no estresse oxidativo em eritrócitos: um estudo dose-resposta / Marcela Anjos Martins. – 2012.
74 f. : il.

Orientador: Antônio Cláudio Mendes Ribeiro
Coorientadora: Márcia Barbosa Águila
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Óleo de peixe – Teses. 2. Arginina – Teses. 3. Óxido nítrico – Teses. 4. Stress oxidativo – Teses. 5. Eritrócitos – Teses. 6. Ácidos graxos – Teses. I. Ribeiro, Antônio Cláudio Mendes. II. Águila, Márcia Barbosa. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 615.34

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

Assinatura Data

Marcela Anjos Martins

O papel do óleo de peixe na via L-arginina-óxido nítrico e no estresse oxidativo em eritrócitos: um estudo dose-resposta

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 30 de março de 2012.

Coorientadora: Prof.ª Dra. Márcia Barbosa Águila
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

_____

Prof. Dr. Antônio Cláudio Mendes Ribeiro (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Vanessa de Souza Mello
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Cristiane Matsuura
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Monique Bandeira Moss
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

_____

Prof.ª Dra. Dayane Teixeira
Universidade Estadual da Zona Oeste

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

É com grande emoção que dedico essa tese especialmente à minha querida mãe, Josefa. Foi-me concedida a graça de tê-la ao meu lado compartilhando essa conquista. Dedico também ao meu amado Marcello, por todo amor e carinho a mim dispensados.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Josefa e Joaquim, a quem devo meus valores e princípios, e ao meu irmão Marcos, por sua simples presença em minha vida.

Ao meu namorado Marcello Montillo Provenza. Em todos esses anos que estamos juntos, companheirismo, respeito, amizade e amor sempre fizeram parte da nossa união. Muito obrigada por cuidar de mim e me envolver com tanto carinho ("you treat me like I' m a princess").

Ao orientador Prof. Dr. Antônio Cláudio Mendes Ribeiro, pela oportunidade de fazer parte do grupo do Laboratório de Transporte de Membrana, pela orientação e por todas as contribuições feitas nesta tese. Agradeço também pela confiança depositada em meu trabalho durante todos os anos de laboratório.

À Prof.ª Dra Tatiana Marlowe Cunha Brunini por sempre se mostrar disposta a ajudar e por todo conhecimento transmitido brilhantemente nesses anos. Uma grande professora a qual tenho orgulho de ser aluna.

À co-orientadora Profª Dra Marcia Barbosa Águila e ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda. É um privilégio fazer parte do LMMC. Admito que nem sempre é fácil pertencer a dois grupos, mas não há dúvida que é um grande aprendizado. Agradeço pela oportunidade e por todo o conhecimento que me proporcionaram.

À amiga Monique Moss, a quem eu tanto admiro como profissional e como pessoa. Definitivamente você fez parte de todas as equipes formadas para execução da tese; juntas fizemos parte da Equipe Integral!. Teria sido muito mais difícil sem você e, por isso, sou extremamente grata a toda sua contribuição ao meu trabalho.

À amiga Mariana Siqueira, uma segunda mãe. Senti muito a sua falta quando teve que se ausentar. Saiba que sempre estarei na torcida por você, vibrando a cada conquista sua. Obrigada por toda ajuda e amizade.

À amiga Natália Pereira, que completa o quarteto e me acompanha desde o primeiro dia que entrei no laboratório, há sete anos atrás. Obrigada pela ajuda e incentivo durante todos esses anos.

Às minhas queridas IC´s Iara Karise e Carolina Chamma por toda ajuda durante o projeto e cuidado com os animais. Compartilharam comigo o "perfume" Óleo de peixe e C57BL/6 durante meses. Muito obrigada!

Aos amigos que já fizeram ou fazem parte do Laboratório de Transporte de Membrana: Wanda Mury, Monique Oliveira, Cristiane Matsuura, Vivian Liane, Carmen Leal, Paula Fontoura (Paulinha), Daniel Medeiros, Daniele Abrantes, Ive Machareth, Márcia Ferraz e Prof. Marcos Ferraz. Simplesmente amo trabalhar com essa equipe! Tornam o trabalho ainda mais prazeroso. Agradecimento especial ao turno noturno (Moss, Daniel, Jurema e Marcinha) pela ajuda e companhia até altas horas ("porque a gente é muuuito legal!!").

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Plantas Medicinais: Graziele de Bem, Cristiane da Costa, Viviane Cordeiro, Dayane Teixeira, Taline Amaral, Paola Braz, Lenize Carvalho e Prof.ª Angela. Minhas "vizinhas", todas muito prestativas. Obrigada pela paciência.

Aos meus amigos Vanessa Mello, Fernanda Ornellas, D´Angelo Magliano, Bianca Gregório e Victor Motta. Nunca vou esquecer o que fizeram por mim quando passei por momentos tão difíceis. Muito obrigada! Podem contar comigo também. Vanessa e Bianca, agora vocês também são professoras doutoras! Título merecido, fruto de dedicação e competência. Adoro!

Aos demais membros e ex-membros do Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular: Eliete Frantz, Geraldo Oliveira, Leonardo Mendonça, Jéssica Teixeira, Isabele Sarmento, Thiago Torres, Sandra Silva, Alini Schultz, Diana Moraes, Fernanda Amorim, Débora Silva, Liliane Corrêa, Thereza Bargut, Flávia Lima, André Vianna, Caroline Fernandes, Mariana Catta-Preta, Júlio Fraulob, Tatiane Faria, Milton Costa, Aline Penna, Angélica Figueiredo e Thatiany Marinho.

À equipe médica responsável pelo tratamento da minha mãe, em especial ao intensivista Dr. Luiz Rodrigo Carneiro dos Santos e ao cirurgião Dr. André da Luz Moreira. Fazem parte de um grupo distinto de médicos que batalharam pela vida da mamãe. Essa conquista não teria a mesma alegria sem ela ao meu lado.

À enfermagem do *home care* Andréia e Aline Nayade. Pessoas de confiança, que me proporcionaram noites tranquilas depois de tantos meses no hospital. Obrigada por todo carinho e preocupação dispensados à minha mãe.

Se pudermos dar a cada indivíduo a quantidade exata de nutrientes, que não seja insuficiente nem excessiva, teremos encontrado o caminho mais seguro para a saúde.

Hipócrates

RESUMO

MARTINS, Marcela Anjos. *O papel do óleo de peixe na via L-arginina-óxido nítrico e no estresse oxidativo em eritrócitos*: um estudo dose-resposta. 2012. 74f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Os ácidos graxos poli-insaturados *n*-3 derivados do óleo de peixe estão associados a benefícios cardiovasculares, que podem ser decorrentes da ativação da óxido nítrico sintase (NOS). Assim como as células endoteliais, os eritrócitos possuem NOS endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) e, portanto, são capazes de sintetizar óxido nítrico (NO). O presente estudo testou a capacidade que diferentes concentrações de óleo de peixe tem de ativar a via L-arginina-NO e, em seguida, alterar os níveis de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) em eritrócitos de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Além disso, foram analisados os marcadores de estresse oxidativo nos eritrócitos, objetivando investigar a biodisponibilidade do NO. O transporte de L-arginina, avaliado através da incubação com L-[^{3}H]-arginina, mostrou-se ativado quando da administração de dietas contendo elevadas concentrações de óleo de peixe, em comparação com as dietas contendo baixas concentrações e controle. A atividade da NOS, medida pela conversão de L-[^{3}H]-arginina em L-[^{3}H]-citrulina, e a expressão da eNOS também aumentaram nos animais que se alimentaram com dietas ricas em óleo de peixe. Apesar da ativação da via L-arginina-óxido nítrico observada em nossos experimentos, os níveis de GMPc intraeritrocitário não foram afetados. O dano oxidativo nos eritrócitos aumentou linearmente conforme o óleo de peixe era acrescido na dieta, sem afetar a atividade das enzimas antioxidantes. Além do endotélio, os eritrócitos contribuem para o metabolismo do NO. Desta forma, a ativação da via L-arginina-NO nessas células pode ser benéfica para saúde cardiovascular. Estudos futuros poderão investigar outros marcadores de estresse oxidativo durante o consumo de óleo de peixe para assegurar que o seu uso não resulta em efeitos prejudiciais secundários e para garantir a biodisponibilidade de NO.

Palavras-chave: Óleo de peixe. Ácidos graxos poli-insaturados *n*-3. Óxido nítrico. L-arginina. Estresse oxidativo. Eritrócitos.

ABSTRACT

MARTINS, Marcela Anjos. *The role of fish oil on L-arginine-nitric oxide and oxidative stress in erythrocytes*: a dose-response study. 2012. 74f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

The *n*-3 polyunsaturated fatty acids derived from fish oil are associated with cardiovascular benefits and it has been suggested that the activation of nitric oxide synthase (NOS) would be a potential mechanism responsible for its effects. Beside endothelial cells, red blood cells (RBC) possess endothelial NOS (eNOS) and inducible NOS (iNOS), and thus are capable of synthesizing their own nitric oxide (NO). The present study tested the capacity of different amounts of fish oil to activate L-arginine-NO pathway and therefore alter cyclic guanosine monophosphate (cGMP) levels in RBC from mice fed on a high fat diet. Additionally, the oxidative status in RBC was performed to investigate NO bioavailability. L-arginine transport, assessed by incubation with L-[^{3}H]-arginine, was activated by higher doses of fish oil, compared to control diet and to lowest doses of fish oil. RBC NOS activity, measured by the conversion of L-[^{3}H]-arginine into L-[^{3}H]-citrulline, and eNOS expression were also enhanced by diets rich in fish oil. Despite the L-arginine-NO activation, no effect on intra RBC cGMP basal levels was seen among the groups. Oxidative damage of RBC rises linearly with increasing amounts of fish oil in the diet without affecting the activity of antioxidant enzymes. Besides endothelium, red blood cells also contribute regulating the NO bioactivity. Therefore, the activation of L-arginine-NO pathway in RBC by fish oil would be beneficial in cardiovascular health. Future studies testing other oxidant markers during dietary fish oil supplementation will be necessary to verify that its consumption does not result in detrimental secondary effects and to ensure NO bioavailability.

Keywords: Fish oil. *n*-3 Polyunsaturated fatty acids. Nitric oxide. L-arginine. Oxidative stress. Red blood cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Possíveis efeitos fisiológicos dos AGP *n*-3 responsáveis pela redução do rico cardiovascular..... 20

Figura 2 - Metabolismo intravascular do NO..... 25

Figura 3 - A via L-arginina-óxido nítrico em eritrócitos..... 27

Figura 4 - Vias envolvidas na formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e o sistema antioxidante..... 30

Gráfico 1 - Eficiência alimentar..... 44

Gráfico 2 - Evolução da massa corporal..... 46

Gráfico 3 - Efeitos de diferentes concentrações de óleo de peixe no transporte total de L-arginina (mM/ L/ h) em eritrócitos..... 49

Gráfico 4 - Transporte de L-arginina via sistema y^+ (mM/ L/ h) em eritrócitos.. 50

Gráfico 5 - Transporte de L-arginina via sistema y^+L (mM/ L/ h) em eritrócitos 50

Gráfico 6 - Efeitos de diferentes concentrações de óleo de peixe na atividade basal total das óxido nítrico sintases em eritrócitos..... 51

Gráfico 7 - Efeitos de diferentes concentrações de óleo de peixe na expressão da óxido nítrico sintase em eritrócitos..... 53

Gráfico 8 - Efeitos de diferentes concentrações de óleo de peixe nos níveis de GMPc em eritrócitos..... 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais..... 35
Tabela 2 - Perfil lipídico e glicídico nos diferentes grupos experimentais..... 48
Tabela 3 - Parâmetros de estresse oxidativo em eritrócitos de camundongo C57BL/6 alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica..... 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGP	Ácidos graxos poli-insaturados
AGP *n*-3	Ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3
CAT	Catalase
CAT-1	Transportador de aminoácido catiônico 1
Cav-1	Caveolina-1
deoxiHb	Deoxihemoglobina
DHA	Ácido docosahexaenóico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPA	Ácido eicosapentaenóico
EPM	Erro padrão da média
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GTP	Guanosina trifosfato
Hb	Hemoglobina
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
K_m	Constante de afinidade de Michaelis-Menten
MDA	Malondialdeído
metHb	Metehemoglobina
NO	Óxido nítrico
NO_2^-	Nitrito
NO_3^-	Nitrato
NOHb	Nitrosilhemoglobina
NOS	Óxido nítrico sintase
O_2^-	Ânion superóxido
OH^-	Radical hidroxila
$ONOOH^-$	Peroxinitrito
oxiHb	Oxihemoglobina
SNOHb	S-nitrosohemoglobina
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	14
1	**REVISÃO DA LITERATURA**.....	17
1.1	**Óleo de peixe e doenças cardiovasculares**.....	17
1.2	**Óxido Nítrico**.....	21
1.2.1	A via L-arginina-óxido nítrico.....	21
1.2.2	Metabolismo do óxido nítrico em eritrócitos.....	24
1.3	**Estresse oxidativo**.....	28
1.3.1	Ácidos graxos poli-insaturados e peroxidação lipídica.....	30
2	**OBJETIVOS**.....	32
2.1	**Objetivos gerais**.....	32
2.2	**Objetivos específicos**.....	32
3	**MATERIAIS E MÉTODOS**.....	33
3.1	**Protocolo experimental**.....	33
3.2	**Massa corporal, consumo alimentar e eficiência alimentar**.....	36
3.3	**Avaliação do metabolismo de carboidratos**.....	36
3.4	**Preparo da suspensão de eritrócitos e obtenção do plasma**.....	37
3.5	**Análise bioquímica**.....	37
3.6	**Transporte de L-arginina em eritrócitos**.....	37
3.6.1	Isolamento do sistema de transporte y^+L com N-etil-maleimida.....	37
3.6.2	Transporte de L-arginina.....	38
3.7	**Análise da atividade da óxido nítrico sintase em eritrócitos**.....	38
3.8	**Análise da expressão da óxido nítrico sintase em eritrócitos**.....	39
3.9	**Mensuração intraeritócitária dos níveis de GMPc**.....	40
3.10	**Estresse oxidativo**.....	41
3.10.1	Determinação da peroxidação lipídica.....	41
3.10.2	Atividade das enzimas antioxidantes.....	41
3.10.2.1	Mensuração da atividade da enzima superóxido dismutase.....	42
3.10.2.2	Mensuração da atividade da enzima catalase.....	42
3.11	**Análise estatística**.....	43
4	**RESULTADOS**.....	44

4.1 **Ingestão alimentar e eficiência alimentar**..... 44
4.2 **Massa corporal**..... 45
4.3 **Perfil lipídico**..... 47
4.4 **Metabolismo de carboidratos**..... 47
4.5 **Transporte de L-arginina em eritrócitos**..... 49
4.6 **Atividade basal total das óxido nítrico sintases em eritrócitos**..... 51
4.7 **Expressão das isoformas endotelial e induzível da óxido nítrico sintase em eritrócitos**..... 52
4.8 **Níveis de GMPc intraeritrocitários**..... 54
4.9 **Estresse oxidativo**..... 55
4.9.1 Peroxidação lipídica..... 55
4.9.2 Atividade das enzimas antioxidantes nos eritrócitos..... 55
5 **DISCUSSÃO**..... 57
6 **CONCLUSÃO**..... 62
REFERÊNCIAS..... 63
ANEXO – Comissão de Ética para o cuidado e uso de animais experimentais..... 73

INTRODUÇÃO

O interesse científico pelo óleo de peixe teve início na década de 70, quando pesquisas revelaram baixas taxas de mortalidade por doenças cardiovasculares entre os esquimós da Groelândia, cujas dietas eram ricas em gordura animal, proveniente principalmente de peixes marinhos (1). Desde então, inúmeros estudos têm sido realizados com o objetivo de confirmar os efeitos benéficos do consumo do óleo de peixe na fisiopatologia, na progressão e no tratamento das doenças cardiovasculares (2).

O óleo de peixe é uma das principais fontes de ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3 (AGP *n*-3), entre eles destacam-se dois específicos: o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 *n*-3) e o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 *n*-3). Diversos estudos epidemiológicos e clínicos têm documentado que o consumo desses ácidos graxos está associado a uma variedade de efeitos clinicamente relevantes sobre a saúde cardiovascular, tais como: redução dos níveis de triglicerídeos, diminuição da progressão da placa aterosclerótica, ação anti-inflamatória, redução do risco de trombose e arritmias, e melhora da função endotelial (2, 3).

Baseada em tais evidências, a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC), a *American Heart Association* (AHA) e outras agências de saúde têm preconizado recomendações para o aumento da ingestão de AGP *n*-3 de origem marinha. A AHA orienta que todos os adultos comam peixes ricos em *n*-3 pelo menos duas vezes por semana e, para pacientes com doença coronariana existente, a recomendação de ambas as agências é de 1g de EPA e DHA por dia, que pode ser obtido pelo consumo de peixe ou por cápsulas de *n*-3. A suplementação de óleo de peixe em pacientes com hipertrigliceridemia também é proposta pelas duas associações, que aconselham o consumo em torno de quatro gramas de EPA e DHA por dia para uma redução de até 40% do triglicerídeo sérico (4, 5).

Os efeitos dos AGP *n*-3 sobre as funções de células sanguíneas e vasculares têm sido explorados por vários pesquisadores com a finalidade de entender os mecanismos de ação desses lipídeos. Entre os possíveis mecanismos envolvidos, sugere-se que o aumento do consumo do óleo de peixe ou do EPA e do DHA isoladamente modula a produção endotelial de óxido nítrico (NO), o qual

poderia atuar como denominador comum para diferentes propriedades cardioprotetoras dos AGP *n*-3 (6, 7).

O NO desempenha papel fundamental na homeostase cardiovascular, principalmente atribuído ao seu efeito sobre a parede vascular. A ação do NO é mediada pela ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), com subsequente aumento dos níveis intracelulares de guanosina monofosfato cíclica (GMPc), que, por sua vez, regula o relaxamento do músculo liso vascular e inibe a agregação e a adesão plaquetárias (8).

Além de sua ação já bem estabelecida na parede vascular, tem sido sugerido que o NO exerce efeitos cardiovasculares através da regulação do comportamento fisiológico dos eritrócitos (9). Estudos realizados em humanos e em roedores demonstraram que os eritrócitos possuem as isoformas induzível (iNOS) e endotelial (eNOS) da óxido nítrico sintase (NOS) e, portanto, são capazes de sintetizar NO (10, 11). A produção de NO pelos eritrócitos contribui para a sua própria deformabilidade, para a inibição da agregação plaquetária e para a modulação do *pool* intravascular de NO (12).

De forma similar às células endoteliais, a síntese do NO nos eritrócitos ocorre a partir do aminoácido L-arginina pela ação da família de enzima NOS, com concomitante produção equimolar de L-citrulina (9). Em eritrócitos humanos e de roedores, o transporte de L-arginina ocorre através de dois sistemas de transporte de aminoácidos catiônicos: y^+ e y^+L (13-15). O transporte de L-arginina do meio extra para o meio intracelular é um fator limitante para a produção de NO em muitos tipos celulares e, possivelmente, em eritrócitos. Em estudos prévios realizados em nosso laboratório, foram evidenciadas alterações no transporte de L-arginina nos eritrócitos em hipertensão arterial, insuficiências renal e cardíaca (16-18).

Além da sua biossíntese, a biodisponibilidade do NO é um fator que desempenha papel importante na homeostase cardiovascular. Sob condições de estresse oxidativo, ou seja, quando há desequilíbrio entre os sistemas pró- e antioxidante, a biodisponibilidade de NO pode ser significativamente reduzida, levando a uma perda de suas ações. O NO também funciona como radical livre e, em um ambiente de estresse oxidativo, pode ser inativado ao reagir, principalmente, com o ânion superóxido (O_2^-), produzindo a espécie reativa de nitrogênio peroxinitrito (19).

As espécies reativas de nitrogênio (ERNs) ou oxigênio (EROs) podem provocar dano tecidual por meio da peroxidação lipídica e da modificação de proteínas celulares e DNA. Para evitar os efeitos danosos dos agentes oxidantes, as células possuem mecanismos de defesa antioxidantes enzimáticos (glutationa peroxidase, superóxido dismutase e catalase) e não-enzimáticos (vitaminas C e E, e glutationa), que estão envolvidos na remoção dessas espécies (20). Paradoxalmente, apesar dos seus benefícios cardiovasculares, os AGP *n*-3 apresentam maior susceptibilidade à peroxidação lipídica devido a sua natureza altamente insaturada (21). Entretanto, o papel desses ácidos graxos como pró- ou antioxidantes permanece não esclarecido.

De forma contrária à dieta dos esquimós mencionada anteriormente, a dieta moderna ocidental tem levado, cada vez mais, ao aumento do consumo de alimentos com alto teor de lipídios, ricos em ácidos graxos saturados, sendo bem menos frequente a ingestão de AGP *n*-3 (22). As consequências desses hábitos alimentares são evidenciadas nas estatísticas, que continuam a indicar um número crescente de pessoas obesas e com doenças cardiovasculares (22, 23). Esses dados tornam o estudo da associação do óleo de peixe às doenças crônico-degenerativas não transmissíveis de grande relevância para que abordagens preventivas possam ser implementadas.

Desta forma, este projeto investiga se a substituição gradual de banha de porco, rica em ácidos graxos saturados, por concentrações crescentes de óleo de peixe modula a biodisponibilidade de NO em eritrócitos de camundongos e, em caso positivo, se afeta, subsequentemente, os níveis de GMPc.

Para o estudo, foi utilizado o modelo de camundongo da linhagem C57BL/6 alimentado com dieta hiperlipídica, que mimetiza a dieta das populações ocidentais. Uma vez que possui susceptibilidade à obesidade e às alterações metabólicas induzidas por dieta, essa espécie é utilizada em uma ampla variedade de áreas de pesquisas, incluindo biologia cardiovascular e metabólica (24).

1 **REVISÃO DA LITERATURA**

1.1 **Óleo de peixe e doenças cardiovasculares**

A Sociedade Brasileira de Cardiologia, a *American Heart Association*, a *European Society for Cardiology* e diversas outras agências de saúde têm emitido recomendações para o aumento da ingestão de AGP *n*-3, baseadas em fortes evidências sobre a associação da deficiência de AGP *n*-3 de origem marinha ao risco de eventos cardiovasculares (2, 4, 5).

No Brasil, as doenças cardiovasculares se destacam como a principal causa de morte em todas as regiões e estados, sendo consideradas um grave problema de saúde pública. A alimentação, sobretudo o lipídeo dietético, contribui para a determinação do risco cardiovascular, que pode ser consideravelmente reduzido com a mudança dos hábitos alimentares (23). As dietas com alto teor de lipídios, independente de sua composição, são generalizadas no termo dieta hiperlipídica, entretanto, dependendo do tipo de ácido graxo que compõe a dieta, esta pode se tornar um fator de risco ou de proteção cardiovascular. Nesse contexto, diversos estudos têm demonstrado haver uma associação positiva entre a ingestão de ácidos graxos saturados e a prevalência dessas doenças, bem como uma associação negativa com a ingestão de ácidos graxos insaturados (25, 26).

Os ácidos graxos são classificados em três famílias de acordo com a presença e com o número de ligações duplas: ácidos graxos saturados, ácidos graxos monoinsaturados e ácidos graxos poli-insaturados. Os ácidos graxos saturados não possuem dupla ligação em suas moléculas, sendo os mais frequentes em nossa alimentação: láurico, mirístico, palmítico e esteárico (variam de 12 a 18 átomos de carbono) (27). Entre os ácidos graxos monoinsaturados, ou seja, que possuem uma dupla ligação, o mais frequente é o representante da família *n*-9, o ácido oléico (contém 18 átomos de carbono). Quanto aos poli-insaturados, que se caracterizam por conter duas ou mais duplas ligações, podem ser da família ômega-3 (EPA, DHA e α-linolênico) ou ômega-6 (linoléico, araquidônico). Em particular, os AGP *n*-3 EPA e o DHA são considerados ácidos graxos de cadeia muito longa; o

EPA possui 20 átomos de carbono em sua cadeia e cinco ligações duplas (20:5 *n*-3) e o DHA 22 átomos de carbono e seis ligações duplas (22:6 *n*-3) (27).

Estudos experimentais e epidemiológicos demonstram que o excesso de gordura saturada na dieta pode levar ao surgimento de inúmeras doenças cardiovasculares e metabólicas (26). Em um estudo experimental com dieta hiperlípidica rica em ácidos graxos saturados, foi demonstrado o desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica, acompanhada por hipertrofia dos cardiomiócitos, redução da vascularização intramiocárdica, espessamento da parede da aorta e da carótida e, além disso, obesidade (28). Por outro lado, as dietas ricas em ácidos graxos insaturados – mesmo presentes em quantidades significativas na dieta – têm sido relacionadas com a capacidade de prevenir as doenças cardiovasculares (29-31).

Dentre os AGP, as pesquisas destacam o EPA e o DHA encontrados nos óleos de peixes de águas frias e profundas como salmão, arenque, atum e sardinhas. A longa cadeia de hidrocarbono, as múltiplas ligações duplas e a localização da primeira dupla ligação na posição *n*-3 resultam em uma complexa e única configuração tridimensional que contribui para as propriedades biológicas particulares desses ácidos graxos (2, 32).

Os AGP *n*-3 encontrados no óleo de peixe afetam uma variedade de funções fisiológicas em múltiplos tecidos – coração, fígado, vasculatura, e células circulantes – e resultam em benefícios para saúde vascular, reduzindo o risco de arritmia e trombose, diminuindo os níveis de triglicerídeos, promovendo ação anti-inflamatória, melhorando a função endotelial e reduzindo a pressão sanguínea (2, 3, 33).

O estudo do efeito antiarritmico do óleo de peixe constitui um desafio devido à ausência de metodologias fidedignas para mensurar este parâmetro. Apesar disso, os experimentos *in vitro* e em animais sugerem que os AGP *n*-3 podem modular diretamente a eletrofisiologia cardíaca, possivelmente, através dos efeitos sobre os canais iônicos da membrana, o que contribuiria para reduções na frequência cardíaca e no desenvolvimento de arritmias. Os AGP *n*-3 também podem reduzir as arritmias por influências indiretas, tais como a melhora da eficiência miocárdica, do enchimento diastólico ventricular esquerdo e do tônus vagal (34, 35).

Os efeitos antitrombóticos dos AGP *n*-3 são baseados no aumento do tempo de sangramento. A suplementação com AGP *n*-3 altera a função das plaquetas, mas os efeitos clínicos sobre a hemostasia são vistos somente em doses muito elevadas

(36-38). Os AGP *n*-3 também reduzem a produção de eicosanóides derivados do ácido araquidônico, como o tromboxano A_2, e aumentam a síntese de metabólitos do *n*-3, tendo como resultado efeito antitrombótico devido a menor agregação plaquetária (39).

A redução dos níveis de triglicerídeos é dependente da dose e ocorre, em parte, devido à redução da produção hepática da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). Vários mecanismos têm sido implicados, incluindo os efeitos na expressão gênica hepática relacionados com a supressão da síntese *de novo* de ácidos graxos e, possivelmente, outros efeitos como o aumento da beta-oxidação de ácido graxos (40-42).

Embora o óleo de peixe possa alterar vários mediadores inflamatórios, ainda não está esclarecido se tais efeitos são clinicamente significativos, especialmente em doses dietéticas usuais (2). Vários estudos demonstram que a suplementação com *n*-3 reduz os níveis urinários e plasmáticos de eicosanóides, como os leucotrienos E_4 (43). Os achados sobre outros marcadores inflamatórios, tais como a interleucina-1-beta e o fator de necrose tumoral alfa, são contraditórios (2). Em particular, os AGP *n*-3 EPA e DHA são precursores das moléculas lipídicas resolvinas, lipoxinas e protectinas que estão associadas a propriedades anti-inflamatória (44).

Diversos ensaios demonstraram melhora da dilatação arterial mediada por fluxo, uma medida da função endotelial, após a suplementação com *n*-3 (45, 46). O aumento na produção de NO é documentado em alguns estudos como possível mediador desse benefício (47-49). Também foi demonstrado que os AGP *n*-3 diminuem os marcadores da disfunção endotelial, tais como E-selectina, molécula-1 de adesão de célula vascular (VCAM-1) e molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1) (3, 50).

Os efeitos do óleo de peixe sobre a pressão sanguínea podem ser decorrentes de uma série de alterações na vasculatura, onde os AGP *n*-3 atuam melhorando a função endotelial, a complacência da parede arterial e a resposta vasodilatadora. Essas mudanças em conjunto contribuem para redução da resistência vascular periférica e da pressão arterial sistólica e diastólica em uma média de 2,3 mmHg e 1,5 mmHg, respectivamente (2, 7).

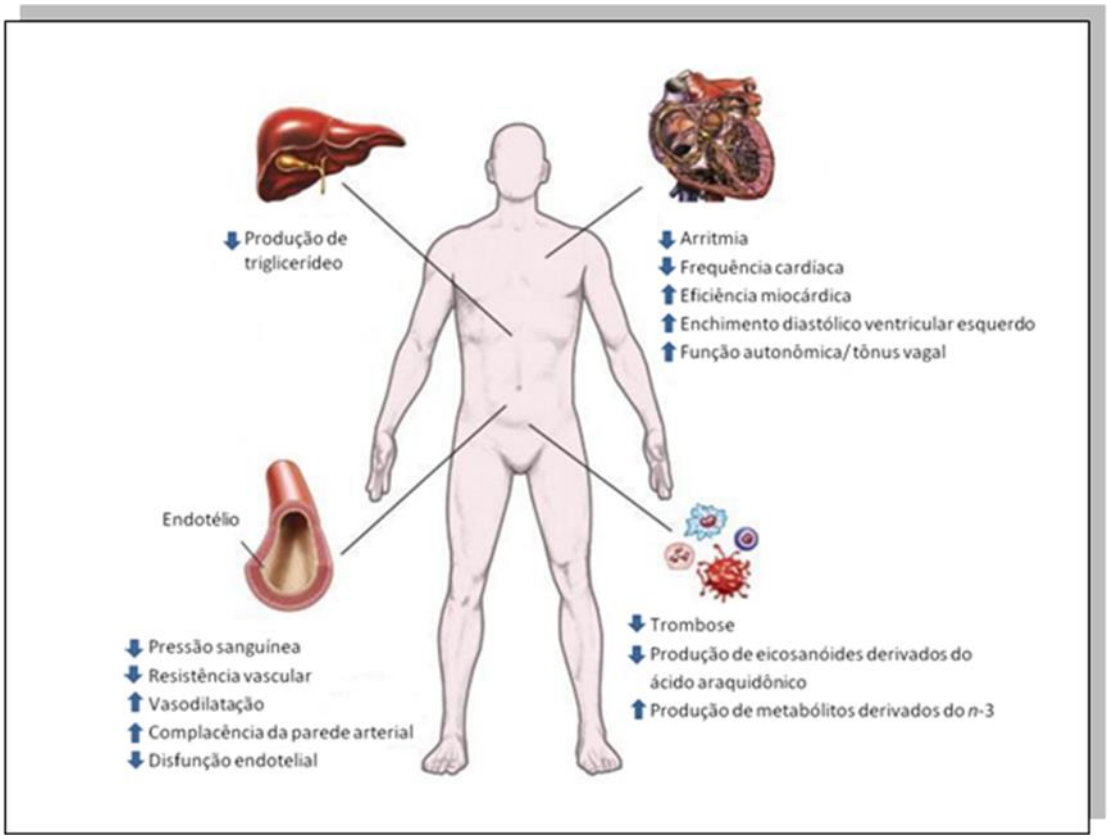

Figura 1**.** Possíveis efeitos fisiológicos dos AGP *n*-3 responsáveis pela redução do risco cardiovascular (Adaptado: Mozaffarian, D. e Wu) (2).

Os efeitos fisiológicos observados pelo consumo de óleo de peixe resultam da modulação de múltiplas vias moleculares, incluindo alterações na estrutura da membrana e nas propriedades dos canais iônicos, regulação genética e síntese de eicosanóides (6, 51).

Um dos principais mecanismos moleculares dos AGP *n*-3 é a modulação da estrutura da membrana (52). A incorporação de AGP *n*-3 nos fosfolipídios que compõem a bicamada lipídica aumenta a fluidez da membrana e pode influenciar as funções das proteínas incorporadas a ela, alterando a atividade e a afinidade dos receptores, as propriedades de transportadores, canais iônicos e eventos de sinalização. Assim, o enriquecimento das membranas celulares com AGP *n*-3 afeta os canais iônicos, tais como o de sódio (Na^{+}) e o de cálcio (Ca^{++}) (53, 54). Além dos efeitos indiretos nos canais iônicos resultantes de alterações na estrutura da membrana, alguns estudos sugerem que os AGP *n*-3 podem interagir diretamente com os canais e proteínas de membrana. Por exemplo, a modulação direta de

canais iônicos ou receptores acoplados à proteína G poderia contribuir para os efeitos anti-arrítmicos ou anti-inflamatórios, respectivamente (55, 56).

Os AGP *n*-3 também podem atuar diretamente no núcleo, onde afetam coordenadamente a transcrição de uma variedade de genes, aumentando a expressão daqueles que codificam enzimas-chave na oxidação de ácidos graxos hepáticos e do músculo esquelético, enquanto reprimem os genes que regulam enzimas envolvidas na síntese de lipídios. Entre os diversos mediadores de transcrição, os mais amplamente envolvidos em tais ações são os receptores nucleares PPARs (*peroxisome proliferator activated receptors; alpha, beta* e *gamma*) e os fatores de transcrição SREBPs (*sterol regulatory element binding proteins*, 1 e 2). Tal regulação genética contribui para os efeitos observados dos AGP *n*-3 sobre o metabolismo lipídico (41, 42, 57).

Outro mecanismo molecular através do qual os AGP *n*-3 atuam é a competição com o ácido araquidônico (*n*-6) como substrato da enzima ciclooxigenase, inibindo a formação de eicosanóides derivados do ácido araquidônico que são considerados pró-inflamatórios e pró-trombóticos. Dessa forma, ao invés da formação das prostaglandinas e tromboxanos da série dois e leucotrienos da série quatro, haverá formação de eicosanóides gerados a partir dos AGP *n*-3, que são as prostaglandinas e tromboxanos da série três e leucotrienos da série cinco. Essas alterações no perfil de eicosanóides podem influenciar positivamente a inflamação, o risco de trombose e a função vascular (2).

Diante do exposto, fica claro que os ácidos graxos desempenham outras funções além de atuar como simples fontes de energia, sendo importantes moduladores da sinalização celular e do metabolismo.

1.2 **Óxido Nítrico**

1.2.1 A via L-arginina-óxido nítrico

O NO é um gás inorgânico lipofílico com uma meia-vida curta (2 a 30 segundos em sistemas biológicos) que atua como uma molécula sinalizadora em diferentes tipos de células (macrófagos, linfócitos, eritrócitos, plaquetas,

fibroblastos), controlando ou influenciando importantes processos fisiológicos, como neurotransmissão e a atividade citotóxica do sistema imune. Além desses mecanismos, o NO desempenha papel fundamental na homeostase vascular por seus efeitos na inibição da adesão e agregação plaquetárias, na vasodilatação e na redução da proliferação de células musculares lisas (8, 58).

As ações do NO são mediadas essencialmente via ativação da enzima guanilato ciclase (GCs). Uma vez liberado, o NO rapidamente se difunde através da membrana celular e interage com o ferro do grupo heme da GCs, acarretando alteração da conformação desta enzima, tornando-a ativa. Uma vez ativa, a GCs catalisa a formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) por meio da saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP) (8). Os efeitos celulares do GMPc são mediados por proteínas quinases dependentes de GMPc e canais iônicos regulados por GMPc, participando das vias finais de sinalização específicas para cada tipo celular (59, 60). A elevação da concentração de GMPc induzida pelo NO é contrabalançada pela ativação das fosfodiesterases, que são responsáveis pela degradação do GMPc (60).

A produção do NO ocorre durante a conversão de L-arginina a L-citrulina, catalisada pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS) na presença de oxigênio (O_2) e nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzida (NADPH). Inicialmente, ocorre a hidroxilação do nitrogênio guanidino terminal da L-arginina que leva à formação do intermediário N^{ω}-hidroxi-L-arginina (NOHA) e, subsequentemente, uma reação de oxidação cujos produtos são NO e L-citrulina. Outros cofatores necessários para a síntese de NO são o dinucleotídeo adenina-flavina (FAD), o mononucleotídeo flavina (FMN) e a tetrahidrobiopterina (BH_4)(8, 61, 62).

A família NOS consiste de três isoformas: neuronal (nNOs ou NOS I; 155 Kd), induzível (iNOS ou NOS II; 130 Kd) e endotelial (eNOS ou NOS III; 140 Kd). Estas enzimas, embora sejam produtos de genes distintos, apresentam estrutura dimérica em comum, composta por um domínio redutase e outro oxigenase. O domínio redutase está ligado aos cofatores NADPH, FAD e FMN, enquanto o domínio oxigenase contém um centro heme e sítios de ligação para L-arginina e BH_4. Esses dois domínios são unidos por uma pequena sequência na qual está localizado o sítio de ligação da calmodulina (CaM), uma proteína associada ao Ca^{++} (63). A principal diferença entre as três isoformas está relacionada à dependência de

Ca^{++} e CaM. As isoformas nNOS e eNOS são constitutivas e reguladas pelo Ca^{++} intracelular e pela CaM. Em contraste, a isoforma iNOS é Ca^{++} e CaM-independentes, podendo ser induzida por citocinas e endotoxina, com produção de grande quantidade de NO por períodos longos de tempo (64).

Embora os níveis intracelulares normais de L-arginina sejam bem acima do K_m e, portanto, suficientes para sua síntese, a produção de NO é dependente da ocorrência do transporte da L-arginina extracelular em diferentes tipos de células e condições patológicas, o que é denominado “paradoxo da arginina”(65-67).

Apesar de não existir um consenso sobre o exato mecanismo envolvido no paradoxo da L-arginina, ele corrobora a importância dos carreadores de aminoácidos catiônicos na produção de NO. Em mamíferos, quatro sistemas de transporte foram descritos como responsáveis pelo transporte de aminoácidos catiônicos (L-arginina, L-lisina e L-ornitina): y^+, y^+L, $b^{0,+}$ e $B^{0,+}$ (65). O sistema de transporte y^+ é seletivo para aminoácidos catiônicos e é Na^+-independente (65, 66). Os sistemas de transporte y^+L, $B^{0,+}$ e $b^{0,+}$ transportam aminoácidos catiônicos e neutros, mas diferem em suas interações com íons monovalentes inorgânicos. O sistema $b^{0,+}$ é Na^+-independente, enquanto o sistema $B^{0,+}$ é Na^+-dependente. Finalmente, o sistema y^+L transporta aminoácidos catiônicos sem a dependência de Na^+ e aminoácidos neutros somente na presença deste íon (66, 68).

O aminoácido precursor do NO, a L-arginina, é considerado condicionalmente essencial (61, 69, 70). Em situações patológicas em que a sua demanda é elevada e durante a fase de crescimento, a L-arginina se torna um aminoácido essencial (71, 72). Embora macrófagos e células endoteliais produzam L-arginina, a maior parte da sua síntese ocorre no fígado e nos rins. Como o fígado utiliza a maior parte da L-arginina que produz no ciclo de uréia, a manutenção dos níveis plasmáticos normais de L-arginina (80-120 μmol/L) será dependente da sua síntese nos rins e ingestão alimentar (1-3g/dia) (62). As principais fontes dietéticas de L-arginina são: soja, amêndoa, noz brasileira, castanha, carne e linguado (73).

Além de participar da produção de NO, a L-arginina é substrato para outras importantes vias metabólicas, como síntese da agmatina, creatinina, ornitina e ureia (61, 69, 70, 74). As enzimas que participam do metabolismo da arginina são as arginases, a arginina decarboxilase, a arginina:glicina amidinotransferase e a família de enzimas NOS. Como a expressão dessas enzimas varia amplamente, existe uma

complexa interação entre elas de modo que o produto de uma pode inibir a atividade da outra (74).

1.2.2 Metabolismo do óxido nítrico em eritrócitos

Os eritrócitos, também conhecidos como células vermelhas ou hemácias, são células bicôncavas anucleadas produzidas na medula óssea e são responsáveis pelo transporte de oxigênio e dióxido de carbono entre os tecidos corporais e os pulmões. Originalmente, acreditava-se que, nessas células, o NO reagisse rapidamente com a hemoglobina, sendo retirado da circulação (75). Entretanto, este paradigma tem sido rejeitado nos últimos anos. Existem evidências de que os eritrócitos são indispensáveis para o transporte de NO na circulação, liberando-o principalmente em situações de hipóxia (76).

O NO produzido pelas células endoteliais pode difundir para o músculo liso subjacente, bem como para o lúmen vascular. Na circulação, o NO reage com constituintes do plasma para formar espécies nitrosiladas (RXNO), incluindo S-nitrosotióis (RSNO) e nitrito (NO_2^-). Cada uma destas espécies é capaz de transportar a bioatividade do NO para longe do seu local de formação (77).

Uma outra parte do NO entra no eritrócito e reage com a deoxihemoglobina (deoxiHb) para formar a nitrosilhemoglobina (NOHb) ou com a oxihemoglobina (OxiHb) para formar nitrato (NO_3^-) e metehemoglobina (metHb). Acredita-se que o NO também reaja com o grupo sulfidrila da cisteína 93 na hemoglobina formando S-nitrosohemoglobina (SNOHb)(75).

O NO_2^- também pode difundir-se nos eritrócitos, onde aparece em uma concentração mais elevada do que no plasma. Nos eritrócitos, o NO_2^- reage com a deoxiHb para formar MetHb e NO, que pode difundir para fora do eritrócito de forma direta ou por intermédio de um metabólito (77, 78). Apesar de intenso debate sobre a real forma de transporte intra-eritrocitário de NO, acredita-se que o NO_2^- e a formação do SNOHb sejam os principais mecanismos para o armazenamento e o transporte do NO pelos eritrócitos, preservando a bioatividade do mesmo e fazendo-o agir como um “hormônio”(77).

Portanto, os eritrócitos podem carrear (e não destruir) o NO, sendo indispensáveis para as formas oxidativa (nitrito/ nitrato) e nitrosilada (SNOHb/ NOHb) de armazenamento e transporte de NO na circulação. Dessa forma, o NO é transportado dos pulmões e outros tecidos oxigenados para as regiões de baixa concentração de oxigênio, onde o NO pode se dissociar do SNOHb e do NO_2^- e levar à vasodilatação hipóxica, garantindo oxigênio e suprimento metabólico aos tecidos (75, 77, 78).

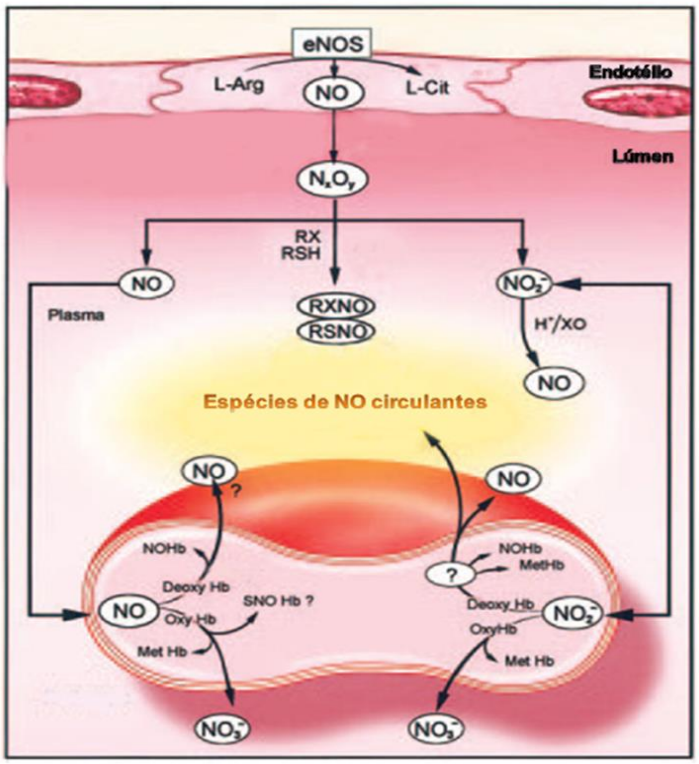

Figura 2. Metabolismo intravascular do NO (L-arg, L-arginina; NOS, óxido nítrico sintase; L-cit, L-citrulina; NO, óxido nítrico; NO_3^-, nitrato; NO_2^-, nitrito; SNOHb, S-nitrosohemoglobina; NOHb, nitrosilhemoglobina; Hb, hemoglobina, RXNO, espécies nitrosiladas; RSNO, S-nitrosotióis; metHb, metehemoglobina) (Adaptado: Kim shapiro, D.B. e Schechter, A.N.) (77).

Além da produção não-enzimática de NO, foi relatado que os eritrócitos possuem a eNOs e a iNOS, bem como a CaM, sugerindo que essas células são capazes de sintetizar NO (79). Essa idéia foi discutida em estudos subsequentes que apresentaram resultados contraditórios quanto a funcionalidade da NOS (80-82). Mais recentemente, Kleinbongard et al. (10) demonstraram, por microscopia confocal de imunofluorescência, que os eritrócitos humanos expressam a eNOS e que essa enzima é funcionalmente ativa, estando localizada no citoplasma e na face interna da membrana de acordo com sua atividade. A NOS intraeritrocitária parece

ser uma fonte importante de NO na circulação e esse NO pode estar envolvido na regulação da função plaquetária e do fluxo sanguíneo (12, 81).

Além disso, o NO produzido pelos eritrócitos funciona de maneira autócrina via alteração das características funcionais da sua membrana plasmática, bem como da sua deformabilidade, permitindo a passagem dos eritrócitos através dos capilares. Foi previamente demonstrado que doadores de NO são capazes de alterar a fluidez da membrana e a deformabilidade dos eritrócitos (83, 84), e que a incubação de eritrócitos com inibidores da NOS também diminui a deformabilidade dessas células, mostrando que o NO produzido pelos eritrócitos tem um papel importante na função dos mesmos (10, 12, 73).

A regulação da NOS em eritrócitos possui alguns mecanismos distintos, comparada a outros tipos celulares devido à ausência de determinadas organelas envolvidas na regulação da enzima. Os primeiros experimentos demonstraram que um dos fatores mais importantes na regulação das propriedades da NOS nos eritrócitos é a disponibilidade de L-arginina, já que a atividade dessa enzima foi aumentada pela suplementação desse aminoácido (12).

Outros fatores parecem estar envolvidos na modulação da NOS no eritrócito, sendo provável a participação de um processo circular comparável ao da NOS no endotélio, mas os exatos mecanismos permanecem teóricos até o momento. De acordo com o mecanismo circular, a NOS se liga à caveolina-1 (Cav-1) e é transportada do citoplasma para a membrana, localizando-se nos microdomínios da membrana, os chamados *lipid rafts.* Após estímulo, ocorre a fosforilação da serina e o influxo de Ca^{++} para o citoplasma. O Ca^{++} se liga à CaM e esta, por sua vez, se liga à NOS, enfraquecendo a ligação Cav-1-NOS. A NOS se torna enzimaticamente ativa e é translocada para o citoplasma. A diminuição na concentração de Ca^{++} facilita a ligação da NOS eritrocitária à Cav-1 novamente e, consequentemente, a inativação da enzima. Assim, da mesma forma que no endotélio, a NOS do eritrócito seria inativada pela Cav-1 (12, 85, 86).

Em eritrócitos, o transporte de L-arginina é mediado por dois sistemas de transporte: o sistema y^+ e o sistema y^+L. O sistema y^+ foi descoberto a partir de um estudo pioneiro realizado por Halvor Christensen e caracterizado como Na^+-independente e seletivo para aminoácidos catiônicos (87). Características adicionais desse sistema de transporte são a insensibilidade ao pH e a potente ativação pela hiperpolarização e *trans*-estimulação. O sistema y^+L, evidenciado inicialmente por

Deves em eritrócitos, transporta aminoácidos catiônicos na ausência de Na^+ e aminoácidos neutros na dependência de Na^+. Este sistema de transporte foi identificado como de alta afinidade e baixa capacidade de transporte [K_m=10 µM] para aminoácidos catiônicos, e também transporta aminoácidos neutros com elevada afinidade na presença de Na^+ [K_m= 10 µM] (88).

Uma vez que apresentam morfologia e metabolismo simples, são de fácil obtenção e podem refletir alterações de outras células (89-91), os eritrócitos são usados como modelo de transporte de aminoácidos (92). Crescentes evidências mostram alteração da atividade desses transportadores nos eritrócitos em diversas doenças, como insuficiência renal crônica, hipertensão arterial sistêmica, pré-eclâmpsia e insuficiência cardíaca (16, 18, 93).

Cada vez mais, o NO gerado pelo eritrócito tem sido considerado importante; a existência da via L-arginina-NO em eritrócitos e as evidências de que o NO produzido por essas células participa da modulação da sua própria fisiologia e das plaquetas corroboram a importância da avaliação dessa via em diversas condições (10).

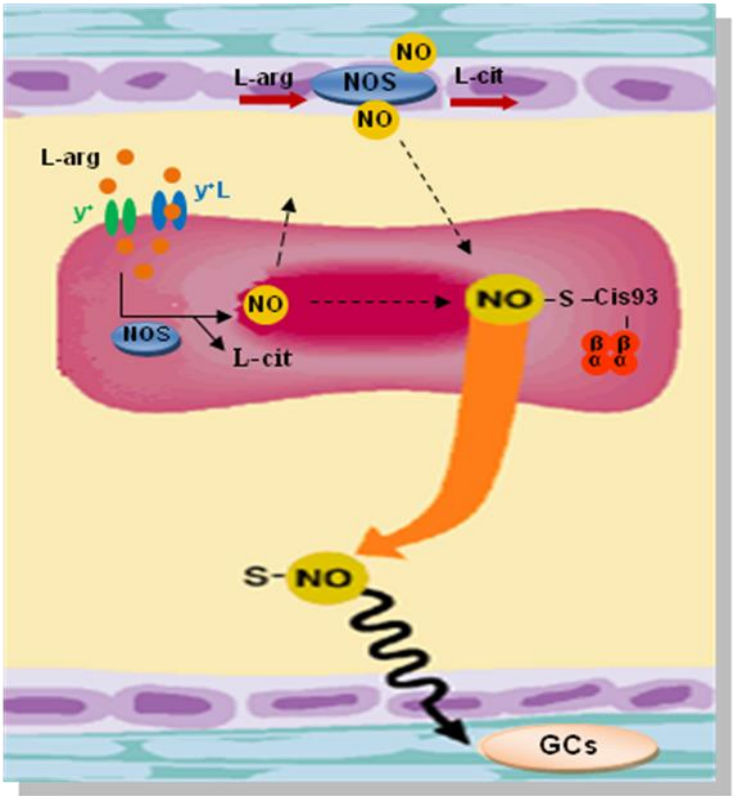

Figura 3**.** A via L-arginina-óxido nítrico em eritrócitos (L-arg, L-arginina; NOS, óxido nítrico sintase; L-cit, L-citrulina; NO, óxido nítrico; S-NOHb, S-nitrosohemoglobina; GCs, guanilato ciclase solúvel). (Adaptado: Gladwin MT et al) (75)**.**

1.3 **Estresse oxidativo**

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) são produzidas de forma contínua pelas células como parte de seus processos metabólicos. A produção desses agentes oxidantes é equilibrada pela remoção dos mesmos através de mecanismos de defesa antioxidantes presentes nas células. Entretanto, um desequilíbrio entre a formação e a remoção destas espécies – decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou ainda do aumento da geração de espécies oxidantes – ocasiona o processo conhecido como estresse oxidativo (19).

As EROs e as ERNs podem ser altamente tóxicas ao provocar dano tecidual por meio da peroxidação lipídica e da modificação de proteínas celulares e DNA, estando envolvidas, dessa forma, em processos fisiopatológicos como envelhecimento, câncer, aterosclerose e inflamação (21, 94). Contudo, esses agentes podem participar também de processos fisiológicos como a geração de eicosanóides, fagocitose e diversas vias de transdução de sinais (94-97)

As EROs são derivadas, em sua maioria, do metabolismo do oxigênio e são encontradas em todos os sistemas biológicos (95). Durante o processo de redução do oxigênio molecular na mitocôndria até a formação de água, várias EROs são formadas, dentre as quais destacam-se: o ânion superóxido ($^{\cdot}O_2^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($^{\cdot}OH^-$) (94).

O $^{\cdot}O_2^-$ é o primeiro intermediário da redução monovalente do oxigênio até água, sendo formadas a partir dele as demais EROs. Em condições fisiológicas, a reação favorecida é a dismutação, com a formação do H_2O_2. Entretanto, quando produzido em excesso, uma quantidade significativa de $^{\cdot}O_2^-$ reage com o NO, produzindo assim o peroxinitrito (95).

O H_2O_2 é produzido principalmente pela dismutação do $^{\cdot}O_2^-$. Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados, o H_2O_2 é extremamente deletério porque, na presença de ferro, participa da reação que produz $^{\cdot}OH^-$. Essa espécie reativa é capaz de atravessar camadas lipídicas, podendo reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe^{++} (95, 98).

O $^{\cdot}OH^{-}$ é considerado o radical mais reativo em sistemas biológicos, produzindo dano no local onde é formado. A combinação extremamente rápida do $OH^{\cdot}$ com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Além disso, o $OH^{\cdot}$ pode iniciar a oxidação dos AGP das membranas celulares (lipoperoxidação) (94).

As ERNs compreendem o NO e o peroxinitrito ($ONOO^{-}$). O NO contém um elétron desemparelhado em seu orbital e é, portanto, um radical livre. O NO é gerado em tecidos biológicos e age como uma importante molécula de sinalização biológica em uma grande variedade de processos fisiológicos. Entretanto, quando em excesso, pode levar a reações de nitrosilação, o que provoca alterações na estrutura de proteínas e, consequentemente, perda de função (99). Já o $ONOO^{-}$ é um potente agente oxidante que pode causar fragmentação do DNA e oxidação lipídica e protéica (100), que é formado quando o $^{\cdot}O_2^{-}$, em excesso, doa um elétron para o NO (95).

Para evitar a ação prejudicial das EROs e das ERNs, as células possuem mecanismos de defesa antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos contra a elevada reatividade dessas espécies (101). A primeira linha de defesa compreende os mecanismos intracelulares enzimáticos, incluindo a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GSH-Px) (102, 103). A SOD é a primeira linha de defesa que catalisa a dismutação do $^{\cdot}O_2^{-}$ em H_2O_2, que posteriormente, é convertido em água e oxigênio pela ação da enzima CAT ou pela enzima GSH-Px (94, 104, 105). Outras substâncias antioxidantes, porém não-enzimáticas, são as vitaminas C (ácido ascórbico) e E (tocoferol). Com exceção da Vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (94).

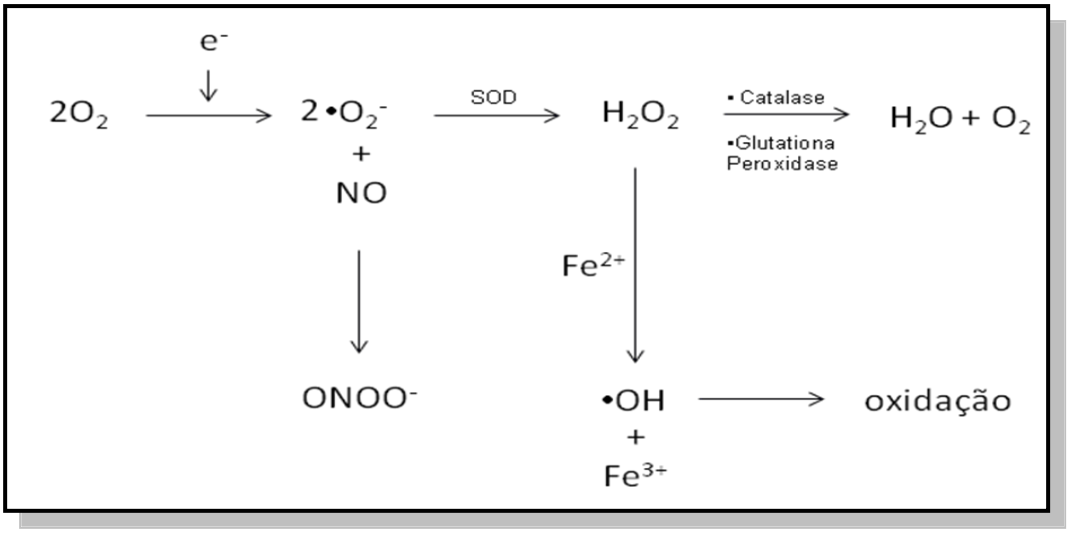

Figura 4. Vias envolvidas na formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e o sistema antioxidante. (Adaptado: Toyuz, R.M. et al) (95).

1.3.1 Ácidos graxos poli-insaturados e peroxidação lipídica

Os fosfolipidos contendo AGP encontrados nas membranas celulares têm recebido grande destaque nos últimos anos, visto que eles desempenham papel tanto estrutural como funcional na membrana. A natureza flexível desses ácidos graxos resulta em um aumento na fluidez da bicamada lipídica, o que é essencial para um grande número de funções celulares. Por outro lado, quando comparados aos ácidos graxos saturados e aos monoinsaturados, os AGP são particularmente mais suscetíveis à peroxidação lipídica, o que torna a membrana mais vulnerável ao dano em sua estrutura.

A peroxidação lipídica consiste em uma reação em cadeia representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação, resultantes da ação das EROs, predominantemente, sobre os lipídeos insaturados das membranas. Esse processo é iniciado quando o AGP sofre ataque de uma espécie que é suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio a partir do grupo metileno ($-CH_2-$), formando um radical de carbono. Os radicais produzidos na reação propagam a cadeia de peroxidação lipídica, retirando cada vez mais átomos de hidrogênio do AGP para formar hidroperóxidos e novos radicais de carbono, levando à oxidação de muitas

moléculas e ácidos graxos (106). A fase de terminação compreende a combinação de dois radicais para formar um produto que não seja um radical.

A terminação também pode resultar da ação antioxidante da vitamina E (α-tocoferol), que é denominada de “antioxidante de interrupção de cadeia”, devido ao fato de doar um átomo de hidrogênio para os radicais lipídicos pondo, dessa forma, um fim no processo de propagação e de peroxidação lipídica. Uma razão relativamente estável entre o ácido linoleico e a vitamina E, em óleos vegetais, oferece proteção contra o risco de dano oxidativo. Já os AGP *n*-3 altamente insaturados EPA e DHA e a quantidade relativamente baixa de vitamina E no óleo de peixe elevam de forma marcante a suscetibilidade *in vivo* deste óleo à peroxidação lipídica (27).

A função antioxidante da vitamina E é fundamental para a prevenção da oxidação dos AGP presentes nos tecidos. Recentemente, um estudo apresentou a hipótese de que o α-tocoferol está situado nos domínios da membrana nos quais se encontra a maior parte dos AGP, aumentando a concentração da vitamina no local onde há maior demanda (21).

A peroxidação lipídica resulta em perda de AGP, com consequente diminuição da fluidez da membrana. As alterações nas membranas celulares levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico, perda da seletividade para entrada e saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, modificações no DNA, perda da atividade enzimática e de receptores. Numa condição extrema, a peroxidação lipídica pode levar à perda completa da integridade da membrana, como pode ser observado a partir da hemólise associada à peroxidação lipídica das membranas dos eritrócitos (27).

Os produtos da peroxidação lipídica incluem, entre outros, os aldeídos 4-hidroxi-2-nonenal, 4-hidroxi-2-hexenal e o malondialdeído (MDA), sendo o último o mais frequentemente mensurado. O MDA é um aldeído de cadeia curta, medido através da reação com o ácido tiobarbitúrico.

2 **OBJETIVOS**

2.1 **Objetivos gerais:**

Investigar a capacidade de diferentes concentrações de óleo de peixe, rico em ácidos graxos poli-insaturados *n*-3, de ativar a via L-arginina-NO e, em seguida, alterar os níveis de GMPc em eritrócitos de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica. Além disso, avaliar a biodisponibilidade do óxido nítrico através da análise de parâmetros de estresse oxidativo.

2.2 **Objetivos Específicos:**

Avaliar o efeito de diferentes porcentagens de óleo de peixe e de uma dieta padrão sobre:

- O consumo e a eficiência alimentar, bem como sobre a massa corporal dos animais;
- O metabolismo lipídico e glicídico;
- O transporte de L-arginina total e via sistemas y^+ e y^+L em eritrócitos;
- A atividade total das enzimas óxido nítrico sintases em eritrócitos;
- A expressão das isoformas endotelial e induzível da enzima óxido nítrico sintase em eritrócitos;
- Os níveis intraeritrocitários de GMPc;
- A peroxidação lipídica dos eritrócitos;
- A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase em eritrócitos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Protocolo experimental

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 de três meses de idade, obtidos no biotério da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (Campinas, SP, Brasil). Os animais foram alocados em caixas de polipropileno, com temperatura (21 ± 1ºC) e umidade (60 ± 10 %) controladas. O ambiente foi submetido a ciclos de 12 horas de claro e escuro (claro de 01:00 h às 13:00 h) e ciclo de exaustão de ar (15 min/hora).

Os camundongos foram divididos em seis grupos de acordo com o tipo de dieta oferecida durante o período experimental de 12 semanas. O grupo controle recebeu dieta normolipídica (10% de lipídeos na dieta, sendo a densidade energética de 3,8 Kcal/g) e os outros cinco grupos foram alimentados com dieta hiperlipídica com a mesma densidade energética (50% de lipídeos na dieta, sendo a densidade energética de 5,0 Kcal/g), porém com diferentes porcentagens de óleo de peixe (fonte de AGP *n*-3 EPA e DHA; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, USA).

As dietas hiperlipídicas foram compostas de 10% de óleo de soja e 40% de uma mistura de banha de porco e óleo de peixe; nessa mistura, a banha de porco foi gradualmente substituída pelo óleo de peixe que aumentou em concentrações de 0 a 40%, mantendo a quantidade total de lipídeo constante. Dessa forma, os seguintes grupos foram formados: **grupo C** (dieta padrão para roedores), **grupo P0** (0% de óleo de peixe; 40% de banha de porco), **grupo P10** (10% de óleo de peixe; 30% de banha de porco), **grupo P20** (20% de óleo de peixe; 20% de banha de porco), **grupo P30** (30% de óleo de peixe; 10% de banha de porco) e **grupo P40** (40% de óleo de peixe; 0% de banha de porco).

As dietas experimentais foram elaboradas pela Prag soluções® (PragSolucoes, Jau, SP, Brasil, www.pragsolucoes.com.br) de acordo com as recomendações-padrão para roedores no estado de manutenção da *American Institute of Nutrition* (AIN-93M) (107). A composição das dietas padrão e hiperlipídicas se encontra descrita na tabela 1.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro para o cuidado e uso de animais experimentais (CEUA/033/2011). O estudo foi realizado de acordo com a diretriz de “Cuidado e uso de animais de laboratório” (*National Institute of Health* 85-23, revisado 1996, EUA).

Tabela 1. Composição das dietas experimentais**.** *As misturas de vitaminas e de minerais seguiram as recomendações para roedores da AIN 93M (107) **Antioxidante Butilhidroxitolueno. C, dieta controle; grupo P0, dieta hiperlipídica contendo 0% de óleo de peixe; grupo P10, dieta hiperlipídica contendo 10% de óleo de peixe; grupo P20, dieta hiperlipídica contendo 20% de óleo de peixe; grupo P30, dieta hiperlipídica contendo 30% de óleo de peixe; grupo P40, dieta hiperlipídica contendo 40% de óleo de peixe.

Nutrientes (U/Kg dieta)	**Dieta Padrão**	**Dietas hiperlipídicas**				
	C	**P0**	**P10**	**P20**	**P30**	**P40**
Caseína (g)	140	175	175	175	175	175
Amido de milho (g)	465,7	192,6	192,6	192,6	192,6	192,6
Amido dextrinizado (g)	155	155	155	155	155	155
Sacarose (g)	100	100	100	100	100	100
Óleo de soja (g)	40	40	40	40	40	40
Óleo de peixe (g)	0	0	56	111	166	238
Banha de porco (g)	0	238	182	127	72	0
Celulose (g)	50	50	50	50	50	50
Mistura de minerais* (g)	35	35	35	35	35	35
Mistura de vitaminas* (g)	10	10	10	10	10	10
L-cistina (g)	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Cloreto de Colina (g)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
BHT** (g)	0,008	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Energia (kcal)	3800	5000	5000	5000	5000	5000
Carboidrato (%)	76	36	36	36	36	36
Proteína (%)	14	14	14	14	14	14
Lipideo (%)	**10**	**50**	**50**	**50**	**50**	**50**
Óleo de soja (%)	10	7	7	7	7	7
Banha de porco (%)	**0**	**43**	**33**	**23**	**13**	**0**
Óleo de peixe (%)	**0**	**0**	**10**	**20**	**30**	**43**

3.2 **Massa corporal, ingestão alimentar e eficiência alimentar**

Os animais tiveram livre acesso à ração e à água durante todo o experimento. A ingestão alimentar era controlada diariamente através da verificação do resto-ingestão, que consiste em mensurar a ração restante na gaiola e subtrair esse valor pela quantidade de ração oferecida. Assim, a ingestão energética dos animais foi calculada através da multiplicação da quantidade de ração consumida em gramas pela densidade energética da dieta. Além disso, a massa corporal dos animais era aferida semanalmente em balança digital (precisão 0,01 g).

Em posse desses dados, pôde-se determinar a eficiência alimentar dos animais. Esse parâmetro foi calculado pela razão entre o ganho de massa corporal por semana e a ingestão energética semanal em quilocalorias (kcal) multiplicado por 100; o resultado é fornecido em percentual (%).

3.3 **Avaliação do metabolismo de carboidratos**

A análise da glicemia de jejum e o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) foram realizados para avaliar o metabolismo de carboidratos dos animais. A glicemia de jejum foi avaliada antes do início do fornecimento das dietas experimentais e o TOTG 11 semanas após o início da dieta.

Para o TOTG, foi feita a glicemia de jejum e, após a administração por gavagem de solução de glicose 25% (1,0g/ Kg), nos tempos de 15, 30, 60 e 120 minutos. As concentrações dos níveis de glicose no sangue foram determinadas pelo método da glicose-oxidase, utilizando o glicosímetro (Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brasil). Os resultados geraram curvas glicêmicas, que foram avaliadas posteriormente através de um gráfico com medição da área sob a curva (a.c.). Para realização dos testes, os animais foram mantidos em jejum por seis horas e o sangue foi coletado por uma pequena incisão na cauda do animal.

3.4 **Preparo da suspensão de eritrócitos e obtenção do plasma**

Ao final do período experimental e após seis horas de jejum, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódio intraperitoneal (0,42 mg/g) e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca, em tubos contendo heparina (10 UI/ml).

Os eritrócitos foram isolados do plasma por centrifugação (Centrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) a 2400 rpm por 20 minutos e em seguida foram suspendidos em solução salina (mM: 145 NaCl, 1 CaCl, 5 glicose e 10 MOPS; pH 7,4) para atingir valores de hematócrito entre 5 a 10%. O hematócrito e a hemoglobina foram determinados por um contador de células (Sysmex XT-2000i, Sysmex Corporation, Hyogo, Japão). O plasma foi armazenado a -80ºC para análise bioquímica.

3.5 **Análise bioquímica**

O colesterol total e os triglicerídeos foram avaliados no plasma através de teste enzimático colorimétrico (Kit Bioclin, Minas Gerais, Brasil).

Para a determinação da insulina foi utilizado o kit MADPK-71K (Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA).

3.6 **Transporte de L-arginina em eritrócitos**

3.6.1 <u>Isolamento do sistema de transporte y^+L com N-etil-maleimida</u>

O N-etil-maleimida (NEM) é um inibidor seletivo do sistema y^+ em eritrócitos, que permite a determinação do transporte de aminoácidos catiônicos via sistemas y^+L e y^+. Para isolar os sistemas y^+ e y^+L, a suspensão de eritrócitos foi dividida em

duas partes, adicionando-se em uma delas 1 mM de NEM. Em seguida, ambas as suspensões foram incubadas 20 minutos a 37°C, seguidas de lavagem com solução salina.

3.6.2 Transporte de L-arginina

Para medir o transporte, a L-[^{3}H]-arginina (100 µM) foi adicionada às alíquotas de suspensão e as células foram incubadas por 5 minutos a 37°C. O transporte de L-arginina foi interrompido através do resfriamento rápido, seguido da lavagem das células com solução de $MgCl_2$ (mM: 107 $MgCl_2$ e 10 MOPS; pH 7,4) e posterior centrifugação (Centrifugue 5417C, Eppendorf AG, Alemanha) a 14.000 rpm por 20 segundos, para remoção da radioatividade extracelular. Finalmente, os eritrócitos foram lisados com Triton X-100 0,1% e a hemoglobina precipitada com ácido tricloroacético 5%. Após nova centrifugação (Centrifugue 5417 C, Eppendorf AG, Alemanha) a 14.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para tubos de cintilação e a radioatividade β mensurada em um aparelho de contagem de cintilação (LS 6500 Liquid Scintillation Counter, Beckman Counter Inc., California, EUA).

3.7 **Análise da atividade da óxido nítrico sintase em eritrócitos**

A atividade basal da NOS foi avaliada pela conversão de L-[^{3}H]-arginina em L-[^{3}H]-citrulina. A suspensão de eritrócitos foi incubada na presença de L-[^{3}H]-arginina (500 µM) por 120 minutos a 37°C. A reação foi interrompida por rápida centrifugação (Centrifugue 5417 C, Eppendorf AG, Alemanha), seguida por lavagem com solução de $MgCl_2$. Os eritrócitos foram lisados com Triton X-100 0,1% e a hemoglobina precipitada com ácido tricloroacético 5%. Após nova centrifugação (Centrifuge 5417 C, Eppendorf AG, Alemanha), o sobrenadante foi transferido para uma coluna contendo a resina catiônica Dowex. A L-[^{3}H]-citrulina foi removida para tubos de cintilação, o líquido cintilante adicionado e a radioatividade β medida em

um contador de cintilação (LS 6500 Liquid Scintillation Counter, Beckman Counter Inc., EUA).

3.8 **Análise da expressão da óxido nítrico sintase em eritrócitos**

A expressão das isoformas da NOS endotelial e induzível em eritrócitos foi avaliada através de Western Blotting.

Para extração de proteínas da amostra, a suspensão de eritrócitos foi homogeneizada com tampão de lise e inibidores de protease, seguido por rápido congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, e banho de ultrassom (MaxiClean 1400, Unique, São Paulo, Brasil) por 15 minutos. Os homogeneizados resultantes foram centrifugados (Centrifuge 5417 C, Eppendorf AG, Alemanha) a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C para a remoção de debris celulares e o sobrenadante foi armazenado a -80°C até a sua utilização.

Os ensaios de Western Blotting foram realizados com 30 µg de proteína dos lisados de eritrócitos suspensos em tampão NuPAGE LDS, após desnaturação das proteínas por incubação a 70°C por 10 minutos. A mensuração das proteínas foi feita através de ensaio colorimétrico, utilizando-se o kit BCA^{TM} Protein Assay (Thermo Fisher Scientific Pierce Protein Research, Illinois, EUA).

As proteínas foram fracionadas por eletroforese (200 V, 200 mA, 60 min) em gel de poliacrilamida NuPAGE® Novex Bis-Tris 10% (Invitrogen, Califórnia, EUA), utilizando-se tampão de corrida (250 mM MOPS, 250 mM Tris; 5 mM EDTA, 17,3 SDS; concentrado 5 x), e transferidas (15 V, 300 mA, 45 min) para membranas de PVDF (Invitrogen, Califórnia, EUA) em tampão de transferência (48 mM Tris, 39 mM Glicina, 1,3 mM SDS).

Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpos primários monoclonais anti-mouse eNOS ou iNOS (1:1000, BD Biosciences, Califórnia, EUA), seguido de nova incubação com anticorpo secundário anti-mouse conjugado à peroxidase (1:10000, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA). A proteína β-tubulina anti-rabbit (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA) foi usada como controle de quantidade de proteína nas amostras. Foi utilizado como padrão

de peso molecular o Full-Range Rainbow™ Molecular Weight Marker (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

O procedimento empregado para detecção da expressão das proteínas foi o sistema de quimioluminescência aumentada (ECL-Amersham-Biosciences, Buckinghamshire, UK). Os sinais foram visualizados por autoradiografia, que foi digitalizada para posterior análise quantitativa das imagens através do programa ImageJ (ImageJ1.43µ, National Institutes of Health, EUA), o qual permite mensurar a densidade integral ótica (IOD) das proteínas expressas. A densidade da proteína NOS foi corrigida pela densidade da proteína β-tubulina correspondente (NOS/ β-tubulina) e os resultados foram expressos como % do grupo controle.

3.9 **Mensuração intraeritócitária dos níveis de GMPc**

A suspensão de eritrócitos (hematócrito 80%) foi incubada com 500 µM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) por 30 minutos para prevenir a degradação dos nucleotídeos ciclícos pelas fosfodiesterases. Em seguida, foi adicionado ácido perclórico à suspensão de eritrócitos, as células foram lisadas em ultrassom (MaxiClean 1400, Unique, São Paulo, Brasil) por 15 minutos e congeladas rapidamente em nitrogênio. Posteriormente, as células fragmentadas foram centrifugadas (Centrifuge 5417 C, Eppendorf AG, Alemanha) a 6000g por 20 minutos e o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C. Os níveis de GMPc foram detectados utilizando o método de ensaio imunoenzimático (ELISA -Cyclic GMP EIA kit, Cayman Chemical Company, MI, EUA)

3.10 **Estresse oxidativo**

3.10.1 Determinação da peroxidação lipídica

O dano em lipídios de membrana foi determinado pela formação de subprodutos da lipoperoxidação (malondialdeído – MDA), que são substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico, gerando um produto colorido róseo lido em espectrofotômetro. Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Draper et al. (108) e adaptada para eritrócitos.

Foram adicionados 50 µl da suspensão de eritrócitos em 1000 µl de ácido tricloroacético 10%. As amostras foram sonicadas (MaxiClean 1400, Unique, Brasil) durante 15 minutos e centrifugadas (Centrifuge 5417 C, Eppendorf AG, Alemanha) a 7000 rpm, 4ºC, por 10 segundos. O sobrenadante foi misturado com ácido tiobarbitúrico a 0,67% e aquecido durante 30 minutos em banho seco a 100ºC. Os níveis de TBARS foram determinados através da absorbância a 532 nm (Amersham Biotrak II Visible Plate Reader, GE Healthcare,Uppsala, Suécia), utilizando 1,1,3,3-tetrametoxi propano como padrão. A concentração de TBARS foi expressa como nM/ g de hemoglobina.

3.10.2 Atividade das enzimas antioxidantes

A análise da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase foi realizada em lisado de eritrócitos. Para isso, a suspensão de eritrócitos obtida foi diluída em água destilada gelada (1:1). Os resultados foram expressos por U/ g de hemoglobina.

3.10.2.1 Mensuração da atividade da enzima superóxido dismutase

A atividade enzimática foi estimada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente. A adrenalina é oxidada pelo $^{\cdot}O_2$- para formar um produto róseo, adenocromo. Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Bannister et al. (109) e adaptada para eritrócitos.

Foram utilizados 20, 40 e 60 µL de lisado de eritrócitos em cubetas separadas. Em cada cubeta, foram adicionados 20 µl de catalase (2,4 mg/mL de água destilada) + 1940 µL de tampão glicina (0,75g/ 200 mL de água destilada; pH 10,2) + 34 µl de norepinefrina (19 mg/ mL de água destilada + 15 µL de HCl concentrado). A atividade da enzima foi medida por análise cinética com duração de 180 segundos e leitura em intervalos de 10 segundos, em uma absorbância de 480 nm (Ultrospec™ 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer, GE Healthcare,Uppsala, Suécia).

3.10.2.2 Mensuração da atividade da enzima catalase

A catalase é uma hemeproteína que catalisa a degradação do H_2O_2. Na reação, uma das moléculas do H_2O_2 é oxidada a oxigênio molecular e a outra é reduzida à água (110).

Foram utilizados 50 µL do lisado em cubetas de quartzo. Em cada cubeta, foi adicionado 1 mL de tampão fosfato (PBS) com peróxido de hidrogênio (25 mL de tampão para 40 µL de H_2O_2). O comprimento de onda utilizado foi de 240 nm (Ultrospec™ 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer, GE Healthcare,Uppsala, Suécia) e a leitura foi feita nos tempos 0, 30 e 60 segundos.

3.11 **Análise estatística**

Os dados obtidos foram apresentados em forma de média ± erro padrão da média (EPM). Nos casos em que foi confirmada a homocedasticidade das variâncias, a diferença estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de uma entrada (*one way* ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni (para amostras de tamanho diferente) ou de Tukey (para amostras de mesmo tamanho). Para todas as outras análises, a diferença estatística foi analisada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Em todos os casos, o valor de *P* menor ou igual a 0,05 foi aceito como estatisticamente significante. As análises e o preparo dos gráficos foram realizados no programa de análise estatística *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, Califórnia, EUA, www.graphpad.com).

4 **RESULTADOS**

4.1 **Ingestão alimentar e eficiência alimentar**

A ingestão alimentar (g) do grupo P40 foi maior em relação ao grupo P20. Entre os demais grupos não houve diferença estatística (C: 3,9 ± 0,06; P0: 3,9 ± 0,13; P10: 4,0 ± 0,15; P20: 3,6 ± 0,07; P30:4,0 ± 0,15; P40: 4,4 ± 0,18; $p \leq 0,05$).

Na avaliação da eficiência alimentar, os resultados mostraram que os animais que receberam dieta hiperlipídica isenta de óleo de peixe (0%) apresentaram maior eficiência em comparação aos animais que receberam dieta hiperlipídica contendo de 20% a 40% de óleo de peixe e ao grupo controle. Os animais alimentados com dieta contendo 10% de óleo de peixe também apresentaram maior eficiência alimentar comparados aos animais do grupo controle e P40 (Gráfico 1).

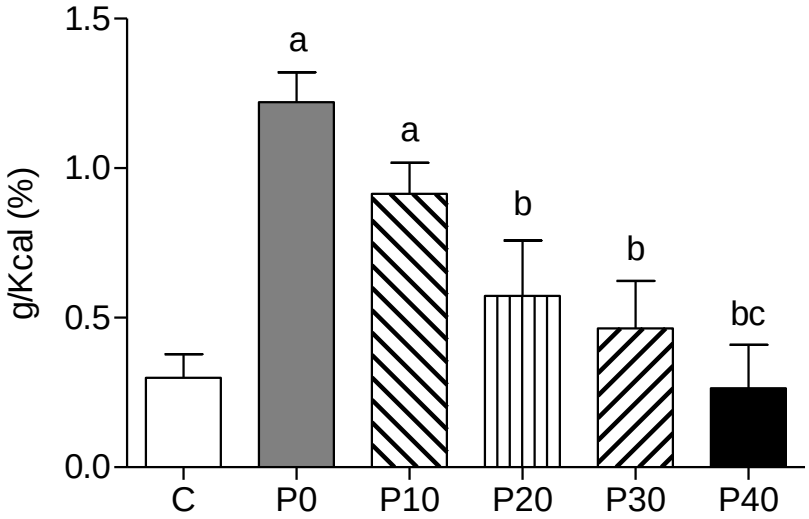

Gráfico 1. Eficiência alimentar (n=8-10). Os animais foram alimentados com dieta controle (Grupo C) ou com dieta hiperlipídica contendo 0%, 10%, 20%, 30% ou 40% de óleo de peixe (Grupos P0-P40). Os dados são apresentados em média ± EPM. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [a] vs grupo C, [b] vs grupo P0, [c] vs grupo P10.

4.2 **Massa corporal**

Todos os animais iniciaram o experimento com a massa corporal similar. Durante o fornecimento das dietas experimentais, o ganho de massa corporal entre os grupos que receberam dieta hiperlipídica foi diferenciado, apesar de as dietas possuírem a mesma densidade energética. Desta maneira, após o período de 12 semanas, os animais que receberam dieta hiperlipídica contendo menores porcentagens ou isenta de óleo de peixe (0-20%) apresentaram maior ganho de massa corporal em comparação aos animais que receberam dieta hiperlipídica com alto teor de óleo de peixe (30% e 40%), os quais mantiveram massa corporal similar à do grupo controle durante todo o período experimental. Conforme ilustrado no gráfico 2, na segunda semana a massa corporal do grupo P0 já era maior em relação aos grupos P30 e P40. As outras diferenças encontradas ao final do período experimental foram estabelecidas a partir da quarta semana. Ao observar o gráfico também é possível perceber que o ganho de massa corporal possui uma relação dose-dependente com a quantidade de óleo de peixe na dieta, visto que, quanto maior a sua concentração, menor o ganho de peso.

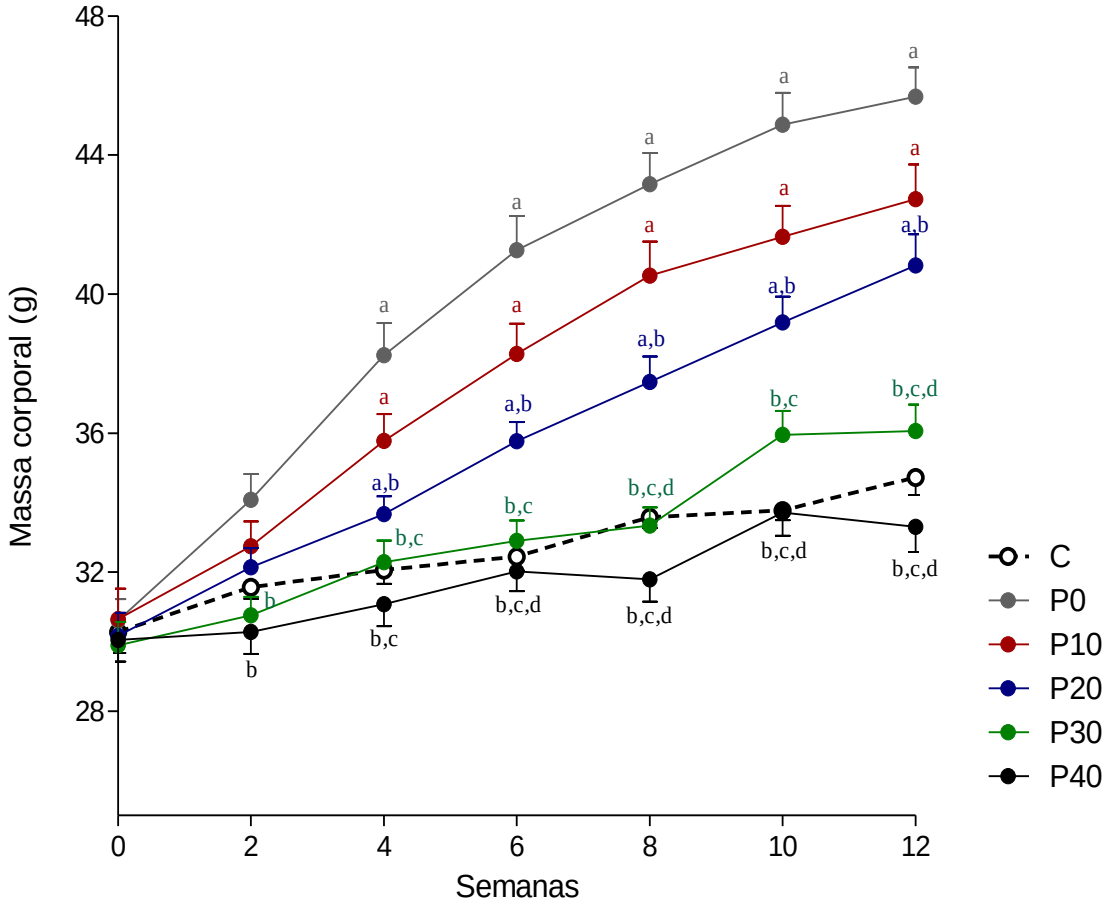

Gráfico 2. Evolução da massa corporal (n=11-13). Os animais foram alimentados com dieta controle (Grupo C) ou com dieta hiperlipídica contendo 0%, 10%, 20%, 30% ou 40% de óleo de peixe (Grupos P0-P40). Os dados são apresentados em média ± EPM. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [a] vs grupo C, [b] vs grupo P0, [c] vs grupo P10, [d] vs grupo P20.

4.3 **Perfil lipídico**

A análise do colesterol total plasmático demonstrou que o grupo P0 apresentou valores mais elevados quando comparado aos grupos controle e aos grupos que receberam óleo de peixe em qualquer concentração. Além disso, as dietas com alto teor de óleo de peixe (30 e 40%) foram capazes de reduzir o colesterol total comparado aos grupos controle e P10 (Tabela 2).

No que se refere à análise dos triglicerídeos plasmáticos, constatou-se que o grupo P0 apresentou valores mais elevados, em relação aos grupos controle, P20, P30 e P40 (Tabela 2).

4.4 **Metabolismo de carboidratos**

Os valores de glicemia (mg/dl) entre os grupos estudados antes do fornecimento das dietas experimentais eram similares (C: 113,6 ± 5,5; P0: 108,2 ± 5,0; P10: 115,6 ± 10,2; P20: 126,0 ± 6,5; P30: 116 ± 3,1; P40: 123,2 ± 6,3).

Ao final do experimento, foi observado que a glicose basal dos grupos P0 e P10 foi maior em comparação aos grupos que receberam dieta hiperlipídica contendo de 20% a 40% de óleo de peixe e ao controle. Além disso, os grupos P30 e P40 tiveram uma redução da glicemia em relação ao grupo P20.

Em relação ao TOTG, os grupos P0 e P10 apresentaram intolerância oral à glicose, comparados aos controles e aos grupos que receberam dietas com maiores concentrações de óleo de peixe (P20-P40).

Quando avaliado a insulina, foi observado que o grupo alimentado com dieta hiperlipídica isenta de óleo de peixe apresentou hiperinsulinemia em relação aos grupos em que foram administradas dietas com maiores concentrações de óleo de peixe (20-40%) e ao grupo controle. O grupo P10 apresentou aumento de 67% no valor de insulina comparado ao grupo controle, porém sem diferença estatística.

Esses dados podem ser visualizados na tabela 2.

Tabela 2. Perfil lipídico e glicídico nos diferentes grupos experimentais**.** Valores apresentados em média ± EPM. TOTG, teste oral de tolerância à glicose; a.c., área sob a curva. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): **[a]** vs grupo C, **[b]** vs grupo P0, **[c]** vs grupo P10, **[d]** vs grupo P20.

Parâmetros	**Grupos**					
	C	**P0**	**P10**	**P20**	**P30**	**P40**
PERFIL LIPÍDICO						
Colesterol Total, mg/dl	113,5 ± 1,4	153,2 ± 10,3[a]	110,1 ± 13,1[b]	84,8 ± 6,9[b]	71,5 ±8,2[abc]	66,5 ± 1,6[abc]
Triglicerídeos, mg/dl	39,0 ± 2,1	55,0 ± 4,1[a]	46,0 ± 5,1	39,5 ± 3,1[b]	39,0 ± 2,8[b]	35,0 ± 1,4[b]
PERFIL GLICÍDICO						
Glicose basal, mg/dl	153,6 ± 3,3	211,4 ± 8,9[a]	213,4 ± 12,4[a]	170,6 ± 4,5[bc]	129,8 ± 8,3[bcd]	126,0 ± 6,3[bcd]
TOTG, a.c.	21990 ± 727	36150 ± 3396[a]	32280 ± 1195[a]	23750 ± 520,7[bc]	23320 ± 1696[bc]	19950 ± 1133[bc]
Insulina, pg/ml	1347 ± 289,6	3402 ± 359,3[a]	2248 ± 318,7	1904 ± 388,1[b]	1868 ± 274,6[b]	1342 ± 316,4[b]

4.5 **Transporte de L-arginina em eritrócitos**

Como mostrado no gráfico 3, a dieta contendo maior concentração de óleo de peixe (40%) levou a um aumento do transporte total de L-arginina nos eritrócitos em relação à dieta controle e às dietas contendo de 0% a 20% de óleo de peixe. Embora nenhuma diferença tenha sido observada entre as dietas com alto teor de óleo de peixe P30 e P40, a dieta com 30% de óleo de peixe foi capaz de induzir a ativação do transporte total de L-arginina somente quando comparada à dieta contendo 10% de óleo de peixe.

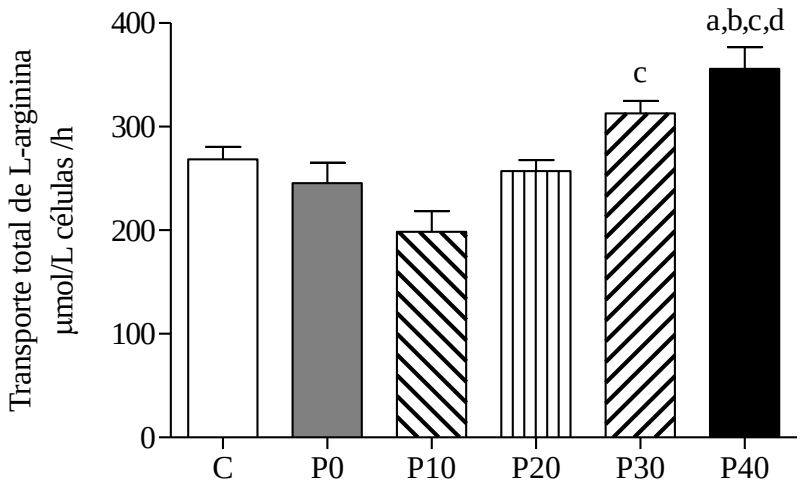

Gráfico 3. Efeitos de diferentes concentrações de óleo de peixe no transporte total de L-arginina (mM/ L/ h) em eritrócitos (n=6). Os animais foram alimentados com dieta controle (Grupo C) ou com dieta hiperlipídica contendo 0%, 10%, 20%, 30% ou 40% de óleo de peixe (Grupos P0-P40). Os dados são apresentados em média ± EPM. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [a] vs grupo C, [b] vs grupo P0, [c] vs grupo P10, [d] vs grupo P20.

Nesses experimentos, o transporte total de L-arginina foi fracionado nos componentes de transporte saturáveis y^+ e y^+L, através da inibição seletiva do y^+. O transporte de L-arginina via sistema y^+ no grupo P40 foi maior que nos grupos controle, P0 e P10 (gráfico 4).

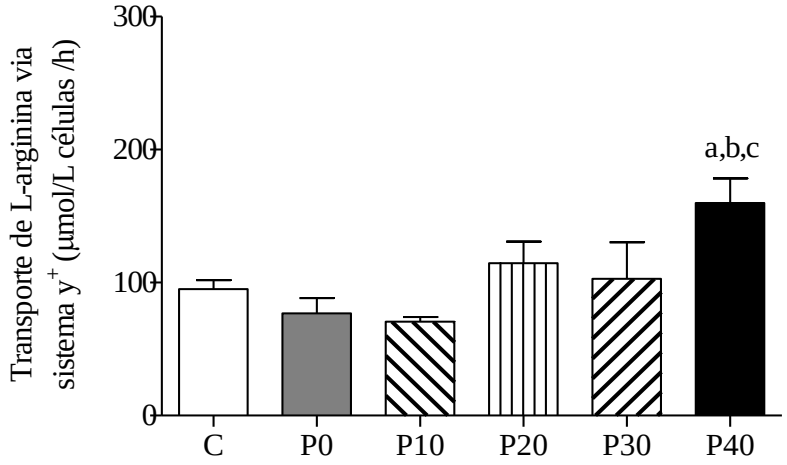

Gráfico 4. Transporte de L-arginina via sistema y^+ (mM/ L/ h) em eritrócitos (n=6). Os dados são apresentados em média ± EPM. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [a] vs grupo C, [b] vs grupo P0, [c] vs grupo P10.

Quando avaliado o transporte de L-arginina via sistema y^+L, observou-se que a dieta contendo 30% de óleo de peixe induziu uma ativação, em relação aos grupos P10 e P20 (gráfico 5).

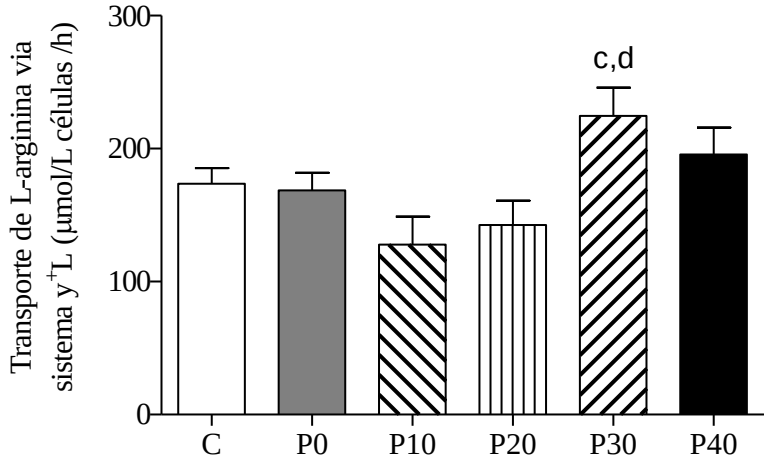

Gráfico 5. Transporte de L-arginina via sistema y^+L (mM/ L/ h) em eritrócitos (n=6). Os dados são apresentados em média ± EPM. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [c] vs grupo P10, [d] vs grupo P20.

4.6 **Atividade basal total das óxido nítrico sintases em eritrócitos**

A dieta contendo a maior dose de óleo de peixe (40%) foi capaz de aumentar a atividade total das NOS nos eritrócitos, comparada à dieta controle e às dietas contendo 0 a 20% de óleo de peixe. Além disso, também foi observado um aumento na atividade da NOS no grupo P30 comparado ao grupo P0 (Gráfico 6).

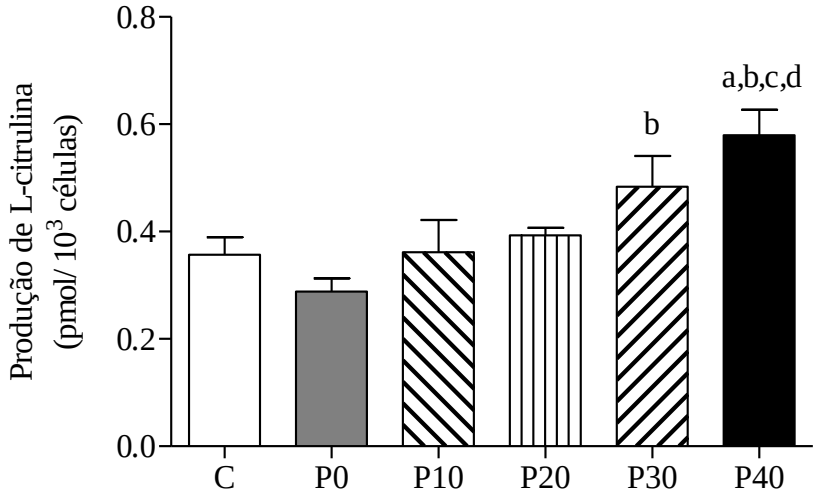

Gráfico 6. Efeitos de diferentes concentrações de óleo de peixe na atividade basal total das óxido nítrico sintases em eritrócitos (n=6). Os animais foram alimentados com dieta controle (Grupo C) ou com dieta hiperlipídica contendo 0%, 10%, 20%, 30% ou 40% de óleo de peixe (Grupos P0-P40). Os dados são apresentados em média ± EPM. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [a] vs grupo C, [b] vs grupo P0, [c] vs grupo P10, [d] vs grupo P20.

4.7 **Expressão das isoformas endotelial e induzível da óxido nítrico sintase em eritrócitos**

Como ilustrado no gráfico 7-A, as dietas contendo 30% e 40% de óleo de peixe aumentaram a expressão da eNOS, comparadas às dietas com baixo teor do óleo (0-20%). Além disso, os grupos P10 e P20 apresentaram uma menor expressão da enzima, em relação ao grupo C.

Quando avaliada a expressão eritrocitária da iNOS, foi observado que o grupo P20 apresentou menor expressão, comparado aos grupos C e P40 (Gráfico 7-B).

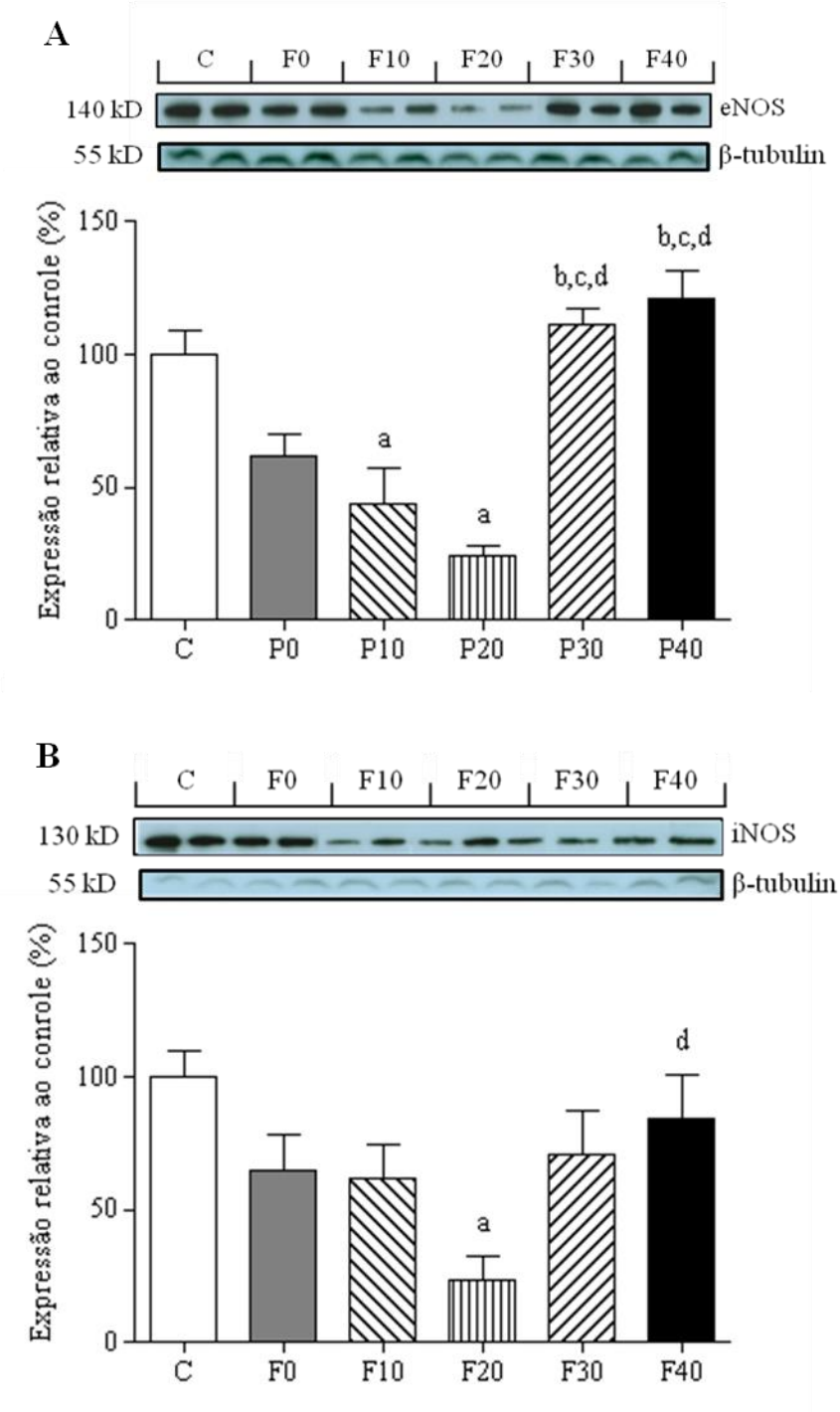

Gráfico 7. Efeitos de diferentes concentrações de óleo de peixe na expressão da óxido nítrico sintase em eritrócitos (n=5-6). (A) Expressão da NOS endotelial (eNOS), (B) Expressão da NOS induzível (iNOS). Imagens representativas das expressões da eNOS, iNOS e β-tubulina por western blotting são apresentadas acima do gráfico. Os animais foram alimentados com dieta controle (Grupo C) ou com dieta hiperlipídica contendo 0%, 10%, 20%, 30% ou 40% de óleo de peixe (Grupos P0-P40). Os dados são apresentados em média ± EPM da razão NOS/ β-tubulina. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [a] vs grupo C, [b] vs grupo P0, [c] vs grupo P10, [d] vs grupo P20.

4.8 **Níveis de GMPc intraeritrocitários**

As diferenças nos níveis de GMPc intraeritrocitários entre os grupos não foram estatisticamente significativas (Gráfico 8).

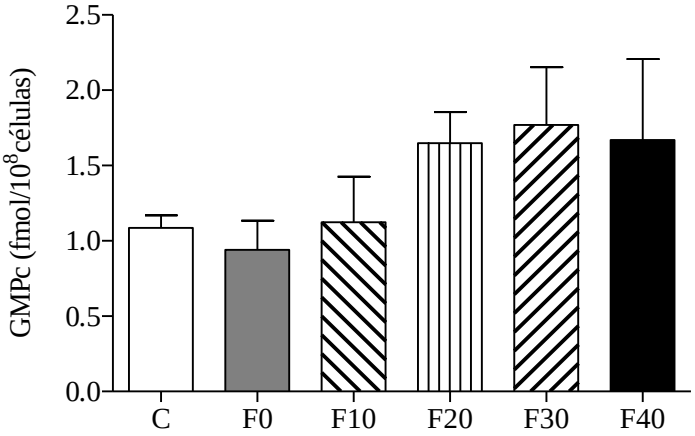

Gráfico 8. Efeitos de diferentes concentrações de óleo de peixe nos níveis de GMPc em eritrócitos (n=6). Os animais foram alimentados com dieta controle (Grupo C) ou com dieta hiperlipídica contendo 0%, 10%, 20%, 30% ou 40% de óleo de peixe (Grupos P0-P40). Os dados são apresentados em média ± EPM.

4.9 **Estresse oxidativo**

A Tabela 3 apresenta os resultados das variáveis de estresse oxidativo em eritrócitos dos camundongos alimentados com dieta padrão ou com dieta hiperlipídica contendo diferentes porcentagens de óleo de peixe.

4.9.1 Peroxidação lipídica

Na análise da peroxidação lipídica, as concentrações de 0%, 20%, 30% e 40% de óleo de peixe apresentaram efeitos similares; quando comparados ao controle, esses grupos tiveram maior dano oxidativo, em termos de MDA. Além disso, os eritrócitos do grupo P40 sofreram maior peroxidação lipídica, comparados ao grupo P10.

4.9.2 Atividade das enzimas antioxidantes nos eritrócitos

Os resultados da análise das enzimas antioxidantes mostraram que a atividade da SOD nos eritrócitos dos grupos P0 e P10 estava reduzida comparada à do grupo controle. Maiores porcentagens de óleo de peixe não foram capazes de alterar este parâmetro. Quando a atividade da catalase foi avaliada, não se observou modificação pelas diferentes dietas.

Tabela 3. Parâmetros de estresse oxidativo em eritrócitos de camundongo C57BL/6 alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica. Valores apresentados em média ± EPM. TBARS, substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; Hb, hemoglobina. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [a] vs grupo C, [c] vs grupo P10

Dietas experimentais	**TBARS (nM/g Hb)**	**SOD (U/g Hb)**	**CAT (U/g Hb)**
C	0,023 ± 0,003	731 ± 80	0,058 ± 0,009
P0	0,040 ± 0,004[a]	174 ± 110[a]	0,060 ± 0,007
P10	0,030 ± 0,002	112 ± 73[a]	0,050 ± 0,006
P20	0,040 ± 0,002[a]	567 ± 56	0,075 ± 0,007
P30	0,044 ± 0,005[a]	548 ± 42	0,069 ± 0,009
P40	0,049 ± 0,005[a,c]	577 ± 61	0,097 ± 0,017

5 DISCUSSÃO

O avanço na abordagem nutricional em relação à quantidade e às fontes de lípideos dietéticos tem sido considerado uma estratégia fundamental para a redução do risco cardiovascular. Ao contrário dos já estabelecidos efeitos adversos cardiovasculares decorrentes do consumo elevado de ácidos graxos saturados, as dietas ricas em AGP *n*-3 derivados do óleo de peixe estão associadas à melhora no metabolismo de lipídeos, na pressão arterial e na redução do risco de trombose e arritmias (2). Dessa forma, a pesquisa sobre o óleo de peixe é de grande importância para que se possa fundamentar o seu uso como nova ferramenta terapêutica e medida preventiva para saúde cardiovascular.

Uma vez que a síntese de NO endotelial e em células sanguíneas está fortemente associada à homeostase vascular, as análises acerca dos efeitos dos AGP *n*-3 sobre biomarcadores relacionados podem elucidar os possíveis mecanismos envolvidos nos benefícios cardiovasculares resultantes do consumo de óleo de peixe. Por conseguinte, o presente estudo investigou o efeito de diferentes concentrações de óleo de peixe sobre a via L-arginina-NO-GMPc em eritrócitos de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Os resultados principais desse estudo demonstram que as dietas contendo altas concentrações de óleo de peixe induziram ativação do transporte de L-arginina associada ao aumento da atividade basal e da expressão da enzima NOS em eritrócitos. Esses resultados considerados em conjunto indicam um aumento da produção de NO nos eritrócitos dos animais que receberam dieta rica em óleo de peixe, contudo, os níveis de GMPc nessas células não foram alterados.

O transporte de L-arginina do meio extra para o meio intracelular é primordial para a produção de NO em muitos tipos celulares e, possivelmente, em eritrócitos. Corroborando essa hipótese, Kleinbongard et al (9) mostraram que a administração de L-arginina exógena aumentou a síntese de NO em eritrócitos, bem como alterou sua capacidade de deformação. O presente estudo mostrou uma ativação do transporte total de L-arginina nos grupos que receberam dietas ricas em óleo de peixe em comparação com as dietas contendo baixas concentrações ou isentas do óleo. O aumento do influxo de L-arginina observado foi resultante, principalmente, da ativação do sistema de transporte y^+. Cada carreador possui suas próprias

características quanto ao requerimento de íons, à especificidade por substratos, bem como há variações entre as espécies. Apesar da identificação dos sistemas y^+L e y^+ em diferentes tipos de células, os mecanismos responsáveis pela modulação da captação de L-arginina via Transportador de aminoácido catiônico 1 (CAT-1) em eritrócitos permanecem pouco estudados (111). Sabe-se que a fluidez da membrana celular interfere no funcionamento de transportadores, como os sistemas de transporte y^+L e y^+, devido ao fato de serem proteínas imersas na bicamada lipídica. Portanto, os resultados encontrados no transporte de L-arginina podem ser consequência de alterações na composição de ácidos graxos dos fosfolipídeos da membrana dos eritrócitos.

A incorporação de EPA e DHA em membranas de eritrócitos como consequência da suplementação com AGP *n*-3 foi documentada em diversos estudos, que também indicam que o conteúdo de AGP *n*-3 nos eritrócitos possui uma boa correlação com o conteúdo desses ácidos graxos em outros tipos celulares (91, 112). Com base nas evidências de que as concentrações de AGP *n*-3 nos eritrócitos refletem fortemente a sua ingestão dietética e que o efeito protetor desses lipídeos é resultante da incorporação de EPA e DHA nos fosfolipídeos da bicamada lipídica das células, Clemens Von Scharcky e William S. Harris (52) propuseram recentemente que o “índice *n*-3” (% de EPA + DHA nos eritrócitos) poderia ser considerado, pelo menos, como um marcador, senão como um novo fator de risco para doença coronariana.

A incorporação de AGP *n*-3 nas membranas celulares altera a fluidez da mesma, influenciando o ambiente das proteínas transmembranas, modificando a atividade e a afinidade dos receptores e as propriedades dos transportadores, como os carreadores y^+ e y^+L, o que pode interferir na maneira pela qual eles interagem com seus substratos (53). Portanto, como os AGP da dieta podem modular acentuadamente a composição dos lipídeos da membrana, a função celular pode ser amplamente afetada pelos lipídeos consumidos.

Além da ativação do transporte de L-arginina, foi observado nesse estudo o aumento da atividade da NOS total em eritrócitos dos grupos que receberam dietas ricas em óleo de peixe. Como a L-arginina é o substrato para a NOS, a ativação do seu transporte nos eritrócitos poderia fornecer o substrato necessário para sustentar a atividade da enzima elevada. O aumento da atividade da enzima NOS foi acompanhado pelo aumento da expressão da eNOS nos eritrócitos dos animais que

receberam dieta rica em óleo de peixe. Tem sido dado grande destaque para a presença da enzima NOS e a capacidade da geração de NO por eritrócitos, bem como para seus efeitos sobre as próprias hemácias. Em estudo prévio realizado pelo nosso grupo, as análises de Western Blotting usando controle positivo (lisado de células endoteliais e lisado de macrófagos para eNOS e iNOS, respectivamente) demonstraram a presença de ambas as isoformas endotelial e induzível das enzimas NOS em eritrócitos de camundongo C57BL/6. As análises por western blotting deste estudo confirmam a expressão da NOS em eritrócitos evidenciada em estudos anteriores (10, 11). Os fatores que modulam a expressão da NOS nas células precursoras dos glóbulos vermelhos em camundongos precisa ser mais investigada.

Além da ativação do transporte de L-arginina e do aumento da expressão da eNOS, outros mecanismos podem contribuir para a alta atividade da NOS nos eritrócitos. Nas células endoteliais (85) e, possivelmente, em eritrócitos (12), a eNOS está localizada nos microdomínios de membrana denominados *lipid rafts*, associada à Cav-1, a qual regula a atividade da eNOS ao mantê-la no estado inativo. Dessa forma, é possível que esses ácidos graxos levem a alterações na composição de lipídeos dos *lipid rafts*, causando o deslocamento da eNOS para o citoplasma, o que é determinante para a ativação da enzima.

Estudos recentes realizados em células endoteliais demonstraram que o AGP *n*-3 modificou a composição lipídica do cavéolo e reduziu a interação da eNOS com a Cav-1. Em paralelo, esses estudos encontraram elevada atividade da NOS (48, 113, 114). De forma similar, outro estudo demonstrou aumento da expressão da Cav-1 acompanhado por diminuição da atividade da eNOS na aorta de ratos com obesidade induzida por dieta (115). Em estudo prévio realizado pelo nosso grupo (11), também foi demonstrada diminuição da atividade NOS nos eritrócitos de camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados (60% de lipídeos). No presente estudo, a quantidade de lipídeo nas dietas hiperlipídicas foi reduzida em 10% e, apesar dessa redução, a dieta rica em ácidos graxos saturados também induziu a obesidade, entretanto, a atividade da NOS nos eritrócitos desses animais não foi afetada, o que demonstra que a quantidade de lipídeos na dieta também pode influenciar a atividade da enzima.

Em geral, a formação do NO irá ativar a GCs para produzir o segundo mensageiro GMPc (116), no entanto, apesar da ativação da via L-arginina-NO

observada em nossos experimentos, os níveis de GMPc intraeritrocitário não foram afetados. Tal achado poderia ser justificado pela reação do NO derivado dos eritrócitos com a hemoglobina formando SNOHb em condições de normóxia (77, 117). Esse mecanismo poderia explicar a ativação da NOS nos eritrócitos por *shear stress* apenas em hipóxia e não em normóxia (118). Portanto, o efeito da produção de NO sobre os níveis de GMPc em eritrócitos pode ser limitada a determinadas condições, tais como o *shear stress* e em hipóxia.

Outra possibilidade para os níveis de GMPc estarem inalterados sob essas condições é o comprometimento da biodisponibilidade de NO, devido ao estresse oxidativo. Paradoxalmente, apesar dos benefícios cardiovasculares fornecidos pelo AGP *n*-3, esse tipo de lipídeo apresenta maior sensibilidade à peroxidação (21), que, por sua vez, pode aumentar a formação de EROs, reduzindo a biodisponibilidade de NO. Estudos anteriores realizados em eritrócitos de animais e de humanos demonstraram que a suplementação com esses ácidos graxos podem afetar a estabilidade oxidativa dependendo da dose (119-123). Assim, o dano oxidativo ocorre à medida que a quantidade de óleo de peixe é aumentada, já quando o óleo de peixe é administrado em doses mais baixas, a susceptibilidade dos eritrócitos à peroxidação lipídica não é afetada. Esses estudos são consistentes com os nossos dados, que evidenciam a presença do dano oxidativo em eritrócitos de uma maneira dose-resposta, ou seja, os níveis de MDA aumentaram linearmente conforme o óleo de peixe era acrescido na dieta, sem afetar a atividade das enzimas antioxidantes. Alterações na enzima superóxido dismutase só foram observadas nas dieta ricas em banha de porco que, além de reduzirem a atividade antioxidante, também ocasionaram peroxidação lipídica nos eritrócitos.

A peroxidação dos lipídeos pode induzir modificações nocivas na estrutura da membrana, causando alterações nos transportadores e inativação enzimática (21). Um estudo realizado em 2009, demonstrou que o peroxinitrito reduziu o transporte de L-[^{3}H]-arginina endotelial e a concentração intracelular de L-arginina e L-citrulina (124). Em contraste, os nossos dados evidenciaram uma melhora na captação de L-arginina e na produção de L-citrulina em eritrócitos promovidas pelo óleo de peixe, mesmo com o aumento da peroxidação lipídica. Em consonância com os nossos achados, outros estudos mostraram que o aumento da susceptibilidade à peroxidação lipídica em eritrócitos de animais alimentados com óleo de peixe não se refletiu no aumento da fragilidade osmótica dessas células, teste pelo qual a

resistência da membrana celular é avaliada (121, 123). Para explicar essas observações, os autores sugerem que a oxidação de ácidos graxos pode ocorrer até que um nível crítico na redução de fosfolipídeos intactos na membrana dos eritrócitos seja alcançado, após o qual a membrana se desestabilizaria.

Estudos futuros poderão investigar outros marcadores de estresse oxidativo durante o consumo prolongado de óleo de peixe e, se confirmado o dano oxidativo, o uso de produtos antioxidantes em conjunto com o óleo de peixe poderia ser uma alternativa para evitar o dano oxidativo e para garantir a biodisponibilidade de NO.

Além dos efeitos benéficos dos AGP *n*-3 no aumento da produção de NO, os resultados desse estudo relacionados à massa corporal e ao metabolismo de lipídios e carboidratos podem contribuir para melhor compreensão do efeito cardioprotetor do óleo de peixe descrito na literatura. A análise da massa corporal evidenciou que as dietas contendo óleo de peixe apresentaram menor eficiência alimentar e foram capazes de prevenir a obesidade. Além disso, como já esperado, os grupos que receberam dietas contendo óleo de peixe, até mesmo em menores concentrações, apresentaram um melhor perfil lipídico e glicídico. Nossos achados corroboram os resultados de estudos prévios quanto a esses parâmetros, que indicam que os AGP *n-3* exercem efeitos benéficos na massa corporal, no metabolismo de carboidratos e estão associados à diminuição na síntese de lipídeos, bem como ao aumento na oxidação dos mesmos (41, 42, 125).

Embora não conste nos objetivos desse trabalho, a análise dos mediadores de transcrição, como os PPARs e SREBPs, e das proteínas UCPs (*uncoupling proteins*) no fígado e no tecido adiposo poderia ajudar a explicar as alterações metabólicas evidenciadas no estudo. Uma série de pesquisas científicas tem indicado que os AGP *n*-3 modulam esses parâmetros, afetando a termogênese e a síntese e oxidação de lipídeos (41, 42, 126).

6 **CONCLUSÃO**

Os resultados apresentados nessa tese demonstram que o óleo de peixe foi capaz de ativar o transporte de L-arginina, bem como aumentar a atividade e a expressão da NOS. Se a ativação da via L-arginina-óxido nítrico encontrada nesse estudo for um fenômeno universal, outras células, tais como as endoteliais, os leucócitos e as plaquetas, podem apresentar uma produção aumentada de NO induzida pelos ácidos graxos *n*-3 e esse efeito explicaria, pelo menos em parte, seus benefícios cardiovasculares.

Existem poucas estratégias terapêuticas desenvolvidas para aumentar a atividade da NOS em eritrócitos. Estudos recentes, mostraram que a rosuvastatina (127), o óleo de oliva (11) e o WS® 1442 (128) também melhoram a atividade dessa enzima nos eritrócitos. Além do endotélio, os eritrócitos contribuem para a regulação da bioatividade do NO e o aumento da atividade da NOS nessas células poderia preparar o ambiente circulatório para determinadas situações como a hipóxia e o *shear stress* intravascular.

Futuros estudos utilizando outros marcadores de dano oxidativo durante a suplementação com óleo de peixe serão necessários para assegurar que o seu consumo não resulta em efeitos prejudiciais secundários e garantir o uso do óleo de peixe como ferramenta não-farmacológica na prevenção da doença cardiovascular.

REFERÊNCIAS

1. Bang HO, Dyerberg J, Hjoorne N. The composition of food consumed by Greenland Eskimos. Acta Med Scand. 1976;200(1-2):69-73.

2. Mozaffarian D, Wu JH. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. J Am Coll Cardiol. 2011 Nov 8;58(20):2047-67.

3. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003 Feb 1;23(2):e20-30.

4. Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, et al. Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. Circulation. 2006 Jul 4;114(1):82-96.

5. Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FA, Bertolami MC, Afiune Neto A, Souza AD, et al. [IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology]. Arq Bras Cardiol. 2007 Apr;88 (1):2-19.

6. Calder PC. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. Clin Sci (Lond). 2004 Jul;107(1):1-11.

7. Calnek DS, Hart CM. Regulation of vascular endothelial nitric oxide production by fatty acids. Curr Organic Chem. 2000;4:1111-23.

8. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. Br J Pharmacol. 2006 Jan;147 (1):S193-201.

9. Kleinbongard P, Keymel S, Kelm M. New functional aspects of the L-arginine-nitric oxide metabolism within the circulating blood. Thromb Haemost. 2007 Nov;98(5):970-4.

10. Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, et al. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. Blood. 2006 Apr 1;107(7):2943-51.

11. Martins MA, Catta-Preta M, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB, Brunini TC, Mendes-Ribeiro AC. High fat diets modulate nitric oxide biosynthesis and antioxidant defence in red blood cells from C57BL/6 mice. Arch Biochem Biophys. 2010 Jul;499(1-2):56-61.

12. Ozuyaman B, Grau M, Kelm M, Merx MW, Kleinbongard P. RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects. Trends Mol Med. 2008 Jul;14(7):314-22.

13. Rojas AM, Deves R. Mammalian amino acid transport system y^+ revisited: specificity and cation dependence of the interaction with neutral amino acids. J Membr Biol. 1999 Mar 15;168(2):199-208.

14. Deves R, Angelo S, Rojas AM. System y^+L: the broad scope and cation modulated amino acid transporter. Exp Physiol. 1998 Mar;83(2):211-20.

15. Brunini TM, Yaqoob MM, Roberts NB, Ellory JC, Moss MB, Siqueira MA, et al. Characterization of cationic amino acid transport systems in rat erythrocytes: lack of effect of uraemia on L-arginine influx. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2006 Aug;33(8):702-7.

16. Moss MB, Brunini TM, Soares De Moura R, Novaes Malagris LE, Roberts NB, Ellory JC, et al. Diminished L-arginine bioavailability in hypertension. Clin Sci (Lond). 2004 Oct;107(4):391-7.

17. Hanssen H, Brunini TM, Conway M, Banning AP, Roberts NB, Mann GE, et al. Increased L-arginine transport in human erythrocytes in chronic heart failure. Clin Sci (Lond). 1998 Jan;94(1):43-8.

18. Mendes Ribeiro AC, Hanssen H, Kiessling K, Roberts NB, Mann GE, Ellory JC. Transport of L-arginine and the nitric oxide inhibitor NG-monomethyl-L-arginine in human erythrocytes in chronic renal failure. Clin Sci (Lond). 1997 Jul;93(1):57-64.

19. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? Hypertension. 2004 Sep;44(3):248-52.

20. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol. 2001 Mar;54(3):176-86.

21. Catala A. Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the "Fluid Mosaic Model" to the "Lipid Whisker Model". Biochimie. 2012 Jan;94(1):101-9.

22. Dixon JB. The effect of obesity on health outcomes. Mol Cell Endocrinol. 2010 Mar 25;316(2):104-8.

23. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. Circulation. 2006 Feb 14;113(6):898-918.

24. Gallou-Kabani C, Vige A, Gross MS, Rabes JP, Boileau C, Larue-Achagiotis C, et al. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. Obesity (Silver Spring). 2007 Aug;15(8):1996-2005.

25. Damjanovic M, Barton M. Fat intake and cardiovascular response. Curr Hypertens Rep. 2008 Feb;10(1):25-31.

26. Hall WL. Dietary saturated and unsaturated fats as determinants of blood pressure and vascular function. Nutr Res Rev. 2009 Jun;22(1):18-38.

27. Jones PJH, Kubow S. Lipídios, esteróis e seus metabólitos. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editors. Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença. 9 ed. São Paulo: Manole; 2003. p. 71-101.

28. Pinheiro AR, Cunha AR, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effects of physical exercise on hypertension and cardiovascular adverse remodeling of diet-induced obese rats. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2007 Jun;17(5):365-75.

29. Aguila MB, Sa Silva SP, Pinheiro AR, Mandarim-de-Lacerda CA. Effects of long-term intake of edible oils on hypertension and myocardial and aortic remodelling in spontaneously hypertensive rats. J Hypertens. 2004 May;22(5):921-9.

30. Aguila MB, Pinheiro AR, Mandarim-de-Lacerda CA. Spontaneously hypertensive rats left ventricular cardiomyocyte loss attenuation through different edible oils long-term intake. Int J Cardiol. 2005 Apr 28;100(3):461-6.

31. Aguila MB, Pinheiro AR, Aquino JC, Gomes AP, Mandarim-de-Lacerda CA. Different edible oil beneficial effects (canola oil, fish oil, palm oil, olive oil, and soybean oil) on spontaneously hypertensive rat glomerular enlargement and glomeruli number. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2005 May;76(1-4):74-85.

32. Lee JH, O'Keefe JH, Lavie CJ, Marchioli R, Harris WS. Omega-3 fatty acids for cardioprotection. Mayo Clin Proc. 2008 Mar;83(3):324-32.

33. von Schacky C, Harris WS. Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids. Cardiovasc Res. 2007 Jan 15;73(2):310-5.

34. Leaf A, Kang JX, Xiao YF, Billman GE. Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils. Circulation. 2003 Jun 3;107(21):2646-52.

35. McLennan PL. Myocardial membrane fatty acids and the antiarrhythmic actions of dietary fish oil in animal models. Lipids. 2001;36 Suppl:S111-4.

36. Balk E, Chung M, Lichtenstein A, Chew P, Kupelnick B, Lawrence A, et al. Effects of omega-3 fatty acids on cardiovascular risk factors and intermediate markers of cardiovascular disease. Evid Rep Technol Assess (Summ). 2004 Mar(93):1-6.

37. Wang C, Chung M, Lichtenstein A, Balk E, Kupelnick B, DeVine D, et al. Effects of omega-3 fatty acids on cardiovascular disease. Evid Rep Technol Assess (Summm). 2004 Mar(94):1-8.

38. Kristensen SD, Iversen AM, Schmidt EB. n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary thrombosis. Lipids. 2001;36 Suppl:S79-82.

39. Batlouni M. Antiplaquetários. In: Batlouni M, Ramires JAF, editors. Farmacologia e Terapêutica Cardiovascular. 1 ed. São Paulo: Atheneu; 1999. p. 327-54.

40. Shearer GC, Savinova OV, Harris WS. Fish oil - How does it reduce plasma triglycerides? Biochim Biophys Acta. 2011 Oct 25.

41. Clarke SD. The multi-dimensional regulation of gene expression by fatty acids: polyunsaturated fats as nutrient sensors. Curr Opin Lipidol. 2004 Feb;15(1):13-8.

42. Jump DB. Fatty acid regulation of hepatic lipid metabolism. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. Mar;14(2):115-20.

43. von Schacky C, Kiefl R, Jendraschak E, Kaminski WE. n-3 fatty acids and cysteinyl-leukotriene formation in humans in vitro, ex vivo, and in vivo. J Lab Clin Med. 1993 Feb;121(2):302-9.

44. Serhan CN. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? Am J Pathol. 2010 Oct;177(4):1576-91.

45. Dangardt F, Osika W, Chen Y, Nilsson U, Gan LM, Gronowitz E, et al. Omega-3 fatty acid supplementation improves vascular function and reduces inflammation in obese adolescents. Atherosclerosis. 2010Oct; 212(2):580-5.

46. Brown AA, Hu FB. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. Am J Clin Nutr. 2001 Apr;73(4):673-86.

47. Okuda Y, Kawashima K, Sawada T, Tsurumaru K, Asano M, Suzuki S, et al. Eicosapentaenoic acid enhances nitric oxide production by cultured human endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 1997 Mar 17;232(2):487-91.

48. Omura M, Kobayashi S, Mizukami Y, Mogami K, Todoroki-Ikeda N, Miyake T, et al. Eicosapentaenoic acid (EPA) induces $Ca(2^{+})$-independent activation and translocation of endothelial nitric oxide synthase and endothelium-dependent vasorelaxation. FEBS Lett. 2001 Jan 5;487(3):361-6.

49. Harris WS, Rambjor GS, Windsor SL, Diederich D. n-3 fatty acids and urinary excretion of nitric oxide metabolites in humans. Am J Clin Nutr. 1997 Feb;65(2):459-64.

50. de Roos B, Mavrommatis Y, Brouwer IA. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids: new insights into mechanisms relating to inflammation and coronary heart disease. Br J Pharmacol. 2009 Sep;158(2):413-28.

51. Harris WS, Park Y, Isley WL. Cardiovascular disease and long-chain omega-3 fatty acids. Curr Opin Lipidol. 2003 Feb;14(1):9-14.

52. Harris WS. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: a case for omega-3 index as a new risk factor. Pharmacol Res. 2007 Mar;55(3):217-23.

53. Murphy MG. Dietary fatty acids and membrane protein function. J Nutr Biochem. 1990 Feb;1(2):68-79.

54. Cao J, Schwichtenberg KA, Hanson NQ, Tsai MY. Incorporation and clearance of omega-3 fatty acids in erythrocyte membranes and plasma phospholipids. Clin Chem. 2006 Dec;52(12):2265-72.

55. Xiao YF, Ke Q, Wang SY, Auktor K, Yang Y, Wang GK, et al. Single point mutations affect fatty acid block of human myocardial sodium channel alpha subunit Na^+ channels. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Mar 13;98(6):3606-11.

56. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. Cell. 2010 Sep 3;142(5):687-98.

57. Clarke SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. J Nutr. 2001 Apr;131(4):1129-32.

58. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev. 1991 Jun;43(2):109-42.

59. Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. J Cell Sci. 2000 May;113 (10):1671-6.

60. Francis SH, Turko IV, Corbin JD. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 2001;65:1-52.

61. Closs EI, Simon A, Vekony N, Rotmann A. Plasma membrane transporters for arginine. J Nutr. 2004 Oct;134(10):2752S-9S; discussion 65S-67S.

62. Mendes Ribeiro AC, Brunini TM. L-Arginine transport in disease. Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents. 2004 Apr;2(2):123-31.

63. Stuehr DJ, Santolini J, Wang ZQ, Wei CC, Adak S. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. J Biol Chem. 2004 Aug 27;279(35):36167-70.

64. Gross R, Roye M, Manteghetti M, Broca C, Hillaire-Buys D, Masiello P, et al. Mechanisms involved in the effect of nitric oxide synthase inhibition on L-arginine-induced insulin secretion. Br J Pharmacol. 1997 Feb;120(3):495-501.

65. Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. Physiol Rev. 2003 Jan;83(1):183-252.

66. Deves R, Boyd CA. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. Physiol Rev. 1998 Apr;78(2):487-545.

67. Brunini TM, Yaqoob MM, Novaes Malagris LE, Ellory JC, Mann GE, Mendes Ribeiro AC. Increased nitric oxide synthesis in uraemic platelets is dependent on L-arginine transport via system $y(^{+})L$. Pflugers Arch. 2003 Feb;445(5):547-50.

68. Mendes Ribeiro AC, Brunini TM, Ellory JC, Mann GE. Abnormalities in L-arginine transport and nitric oxide biosynthesis in chronic renal and heart failure. Cardiovasc Res. 2001 Mar;49(4):697-712.

69. Tong BC, Barbul A. Cellular and physiological effects of arginine. Mini Rev Med Chem. 2004 Oct;4(8):823-32.

70. Huynh NN, Chin-Dusting J. Amino acids, arginase and nitric oxide in vascular health. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2006 Jan-Feb;33(1-2):1-8.

71. Beaumier L, Castillo L, Yu YM, Ajami AM, Young VR. Arginine: new and exciting developments for an "old" amino acid. Biomed Environ Sci. 1996 Sep;9(2-3):296-315.

72. Coman D, Yaplito-Lee J, Boneh A. New indications and controversies in arginine therapy. Clin Nutr. 2008 Aug;27(4):489-96.

73. de Lorgeril M, Salen P, Monjaud I, Delaye J. The 'diet heart' hypothesis in secondary prevention of coronary heart disease. Eur Heart J. 1997 Jan;18(1):13-8.

74. Wu G, Morris SM, Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. Biochem J. 1998 Nov 15;336 (1):1-17.

75. Gladwin MT, Lancaster JR, Jr., Freeman BA, Schechter AN. Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm. Nat Med. 2003 May;9(5):496-500.

76. Pawloski JR, Swaminathan RV, Stamler JS. Cell-free and erythrocytic S-nitrosohemoglobin inhibits human platelet aggregation. Circulation. 1998 Jan 27;97(3):263-7.

77. Kim-Shapiro DB, Gladwin MT, Patel RP, Hogg N. The reaction between nitrite and hemoglobin: the role of nitrite in hemoglobin-mediated hypoxic vasodilation. J Inorg Biochem. 2005 Jan;99(1):237-46.

78. Dejam A, Hunter CJ, Pelletier MM, Hsu LL, Machado RF, Shiva S, et al. Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. Blood. 2005 Jul 15;106(2):734-9.

79. Jubelin BC, Gierman JL. Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide. Am J Hypertens. 1996 Dec;9(12):1214-9.

80. Chen LY, Mehta JL. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. J Cardiovasc Pharmacol. 1996 Jan;27(1):154-8.

81. Chen LY, Mehta JL. Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function. J Cardiovasc Pharmacol. 1998 Jul;32(1):57-61.

82. Kang ES, Ford K, Grokulsky G, Wang YB, Chiang TM, Acchiardo SR. Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins. J Lab Clin Med. 2000 Jun;135(6):444-51.

83. Bor-Kucukatay M, Wenby RB, Meiselman HJ, Baskurt OK. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003 May;284(5):H1577-84.

84. Tsuda K, Kimura K, Nishio I, Masuyama Y. Nitric oxide improves membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension: An electron paramagnetic resonance investigation. Biochem Biophys Res Commun. 2000 Sep 7;275(3):946-54.

85. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. Am J Physiol Renal Physiol. 2001 Feb;280(2):F193-206.

86. Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, et al. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the NOS caveolin binding domain in vivo. J Biol Chem. 1997 Oct 10;272(41):25437-40.

87. Christensen HN, Cullen AM. Synthesis of metabolism-resistant substrates for the transport system for cationic amino acids; their stimulation of the release of insulin and glucagon, and of the urinary loss of amino acids related to cystinuria. Biochim Biophys Acta. 1973 Apr 16;298(4):932-50.

88. Mendes Ribeiro AC, Brunini TM, Yaqoob M, Aronson JK, Mann GE, Ellory JC. Identification of system y^+L as the high-affinity transporter for L-arginine in human platelets: up-regulation of L-arginine influx in uraemia. Pflugers Arch. 1999 Sep;438(4):573-5.

89. Connor WE, Neuringer M, Lin DS. Dietary effects on brain fatty acid composition: the reversibility of n-3 fatty acid deficiency and turnover of docosahexaenoic acid in the brain, erythrocytes, and plasma of rhesus monkeys. J Lipid Res. 1990 Feb;31(2):237-47.

90. Makrides M, Neumann MA, Byard RW, Simmer K, Gibson RA. Fatty acid composition of brain, retina, and erythrocytes in breast- and formula-fed infants. Am J Clin Nutr. 1994 Aug;60(2):189-94.

91. Elizondo A, Araya J, Rodrigo R, Poniachik J, Csendes A, Maluenda F, et al. Polyunsaturated fatty acid pattern in liver and erythrocyte phospholipids from obese patients. Obesity (Silver Spring). 2007 Jan;15(1):24-31.

92. Mendes Ribeiro AC, Brunini TMC. Amino acid transport in disease. In: Ellory JC, Bernhardt I, editors. Red cell membrane transport in health and disease. Berlin: Springer-Verlag; 2003. p. 621-42.

93. da Costa BP, Steibel JP, Antonello IC, Guimaraes JA, Poli de Figueiredo CE. L-Arginine erythrocyte transport in normal pregnant and preeclamptic women. Am J Obstet Gynecol. 2004 Feb;190(2):468-71.

94. Ferreira AL, Matsubara LS. [Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress]. Rev Assoc Med Bras. 1997 Jan-Mar;43(1):61-8.

95. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. Histochem Cell Biol. 2004 Oct;122(4):339-52.

96. Zafari AM, Wenger NK. Secondary prevention of coronary heart disease. Arch Phys Med Rehabil. 1998 Aug;79(8):1006-17.

97. Barber DA, Harris SR. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. Am Pharm. 1994 Sep;NS34(9):26-35.

98. Fridovich I. Superoxide anion radical ($^{\cdot}O2^{-}$), superoxide dismutases, and related matters. J Biol Chem. 1997 Jul 25;272(30):18515-7.

99. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(1):44-84.

100. Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000 Jul;20(7):1716-23.

101. Seddon M, Looi YH, Shah AM. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. Heart. 2007 Aug;93(8):903-7.

102. Nakamura YK, Omaye ST. Alpha-tocopherol modulates human umbilical vein endothelial cell expression of Cu/Zn superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation. Nutr Res. 2008 Oct;28(10):671-80.

103. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. Biol Chem. 2009 Mar;390(3):191-214.

104. Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. Mol Aspects Med. 2005 Feb-Apr;26(1-2):3-31.

105. Wei D, Zhang XL, Wang YZ, Yang CX, Chen G. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. Aust Dent J. 2010 Mar;55(1):70-8.

106. Jialal I, Grundy SM. Influence of antioxidant vitamins on LDL oxidation. Ann N Y Acad Sci. 1992 Sep 30;669:237-47; discussion 47-8.

107. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr. 1993 Nov;123(11):1939-51.

108. Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. Free Radic Biol Med. 1993 Oct;15(4):353-63.

109. Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. Methods Biochem Anal. 1987;32:279-312.

110. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984;105:121-6.

111. Alves de Sa Siqueira M, Martins MA, Rodrigues Pereira N, Bandeira Moss M, Santos SF, Mann GE, et al. Modulation of the cationic amino acid transport system y^+L by surface potential, ouabain and thrombin in human platelets: effects of uremia. Nephron Exp Nephrol. 2007;107(4):e132-8.

112. Harris WS, Sands SA, Windsor SL, Ali HA, Stevens TL, Magalski A, et al. Omega-3 fatty acids in cardiac biopsies from heart transplantation patients: correlation with erythrocytes and response to supplementation. Circulation. 2004 Sep 21;110(12):1645-9.

113. Li Q, Zhang Q, Wang M, Zhao S, Ma J, Luo N, et al. Eicosapentaenoic acid modifies lipid composition in caveolae and induces translocation of endothelial nitric oxide synthase. Biochimie. 2007 Jan;89(1):169-77.

114. Li Q, Zhang Q, Wang M, Liu F, Zhao S, Ma J, et al. Docosahexaenoic acid affects endothelial nitric oxide synthase in caveolae. Arch Biochem Biophys. 2007 Oct 15;466(2):250-9.

115. Yang N, Ying C, Xu M, Zuo X, Ye X, Liu L, et al. High-fat diet up-regulates caveolin-1 expression in aorta of diet-induced obese but not in diet-resistant rats. Cardiovasc Res. 2007 Oct 1;76(1):167-74.

116. Wu CP, Woodcock H, Hladky SB, Barrand MA. cGMP (guanosine 3',5'-cyclic monophosphate) transport across human erythrocyte membranes. Biochem Pharmacol. 2005 Apr 15;69(8):1257-62.

117. Huang KT, Han TH, Hyduke DR, Vaughn MW, Van Herle H, Hein TW, et al. Modulation of nitric oxide bioavailability by erythrocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Sep 25;98(20):11771-6.

118. Ulker P, Meiselman HJ, Baskurt OK. Nitric oxide generation in red blood cells induced by mechanical stress. Clin Hemorheol Microcirc. 2010;45(2-4):169-75.

119. Iraz M, Erdogan H, Ozyurt B, Ozugurlu F, Ozgocmen S, Fadillioglu E. Brief communication: omega-3 essential fatty acid supplementation and erythrocyte oxidant/antioxidant status in rats. Ann Clin Lab Sci. 2005;35(2):169-73.

120. Calviello G, Palozza P, Franceschelli P, Bartoli GM. Low-dose eicosapentaenoic or docosahexaenoic acid administration modifies fatty acid composition and does not affect susceptibility to oxidative stress in rat erythrocytes and tissues. Lipids. 1997 Oct;32(10):1075-83.

121. van den Berg JJ, de Fouw NJ, Kuypers FA, Roelofsen B, Houtsmuller UM, Op den Kamp JA. Increased n-3 polyunsaturated fatty acid content of red blood cells from fish oil-fed rabbits increases in vitro lipid peroxidation, but decreases hemolysis. Free Radic Biol Med. 1991;11(4):393-9.

122. Palozza P, Sgarlata E, Luberto C, Piccioni E, Anti M, Marra G, et al. n-3 fatty acids induce oxidative modifications in human erythrocytes depending on dose and duration of dietary supplementation. Am J Clin Nutr. 1996 Sep;64(3):297-304.

123. Cools A, Maes D, Papadopoulos G, Vandermeiren JA, Meyer E, Demeyere K, et al. Dose-response effect of fish oil substitution in parturition feed on erythrocyte membrane characteristics and sow performance. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 2011 Feb;95(1):125-36.

124. Venardos K, Zhang WZ, Lang C, Kaye DM. Effect of peroxynitrite on endothelial L-arginine transport and metabolism. Int J Biochem Cell Biol. 2009 Dec;41(12):2522-7.

125. Catta-Preta M, Martins MA, Cunha Brunini TM, Mendes-Ribeiro AC, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Modulation of cytokines, resistin, and

distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by different high-fat diets. Nutrition. 2012 Feb;28(2):212-9.

126. Mookerjee SA, Divakaruni AS, Jastroch M, Brand MD. Mitochondrial uncoupling and lifespan. Mech Ageing Dev. 2010 Jul-Aug;131(7-8):463-72.

127. Ludolph B, Bloch W, Kelm M, Schulz R, Kleinbongard P. Short-term effect of the HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin on erythrocyte nitric oxide synthase activity. Vasc Health Risk Manag. 2007;3(6):1069-73.

128. Rieckeheer E, Schwinger RH, Bloch W, Brixius K. Hawthorn special extract WS(R) 1442 increases red blood cell NO-formation without altering red blood cell deformability. Phytomedicine. 2011 Dec 15;19(1):20-4.

ANEXO - Comissão de Ética para o cuidado e uso de animais experimentais

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES

COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº **CEUA/033/2011** sobre **"Efeitos de diferentes concentrações de óleo de peixe sobre parâmetros cardiovasculares e metabólicos"**, sob a responsabilidade de **Antônio Claudio Mendes Ribeiro,** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **14/07/2011.** Este certificado expira em **14/07/2015.**

Rio de Janeiro, 14 de Julho de 2011.

Profa. Patricia Cristina Lisboa
CEA/IBRAG/UERJ

Prof. Israel Felzenszwalb
CEA/IBRAG/UERJ

Profª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Profª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matricula 34765-8

Israel Felzenszwalb
Diretor
IBRAG - UERJ
Mat. 2895

/.ass

☎ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br