**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Sandra Barbosa da Silva

# Efeitos benéficos do tratamento com óleo de peixe em camundongos c57bl/6 alimentados com dieta hiperlipídica e rica em sacarose

Rio de Janeiro

2008

Sandra Barbosa da Silva

# Efeitos benéficos do tratamento com óleo de peixe em camundongos c57bl/6 alimentados com dieta hiperlipídica e rica em sacarose

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

Orientadora: Prof.ª Dra. Márcia Barbosa Águila

Rio de Janeiro

2008

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

S586 Silva, Sandra Barbosa da.
Efeitos benéficos do tratamento com óleo de peixe em camundongos c57bl/6 alimentados com dieta hiperlipídica e rica em sacarose / Sandra Barbosa da Silva.- 2008.
49 f.

Orientador : Márcia Barbosa Águila.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Óleos de peixe - Teses. 2. Obesidade - Teses. 3. Gorduras na dieta - Teses. 4. Sacarose na dieta - Teses. 5. Camundongo como animal de laboratório - Teses. I. Águila, Márcia Barbosa. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 615.34

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

Assinatura Data

Sandra Barbosa da Silva

**Efeitos benéficos do tratamento com óleo de peixe em camundongos c57bl/6 alimentados com dieta hiperlipídica e rica em sacarose**

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

Aprovada em 31 de julho de 2008.

Banca Examinadora:

Prof.ª Dra. Márcia Barbosa Águila (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.ª Dra. Alessandra da Rocha Pinheiro
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.ª Dra. Silvia Maria Custódio das Dôres
Universidade Federal Fluminense - UFF

Rio de Janeiro

2008

# DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais Moisés e Josélia, o poder de seus sorrisos, abraços e olhares exercem milagres sobre a minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Á Deus, pelos sonhos plantados em meu coração, pelas portas abertas por Tuas mãos, por me dar a direção e pela presença constante em minha vida.

Aos meus pais amados, Moisés Marques e Josélia Santiago, meus heróis e exemplo de vida, só nós sabemos o tamanho da nossa saudade, a vocês minha fidelidade e amor eterno.

Aos meus tios, tias e primos amados, obrigada pelo incentivo, carinho e pela compreensão nos meus dias mais tensos e por garantir boas risadas.

Á minha orientadora, Profª. Drª Márcia Águila, que eu venho seguindo desde que foi minha professora durante a graduação.Obrigada por me aceitar como sua orientanda, pela dedicação, por auxiliar na construção de mais um pilar em minha vida.

Ao Profº Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, obrigada pela confiança creditada ao me aceitar no LMMC, pelo exemplo de competência, apoio e pelas reflexões críticas.

Às minhas amigas, Bárbara D'Alegria, Patrícia Lima, Izabela Rosa, obrigada pela amizade sincera e fiel, pelo ombro amigo sempre a disposição.

Ás minhas amadas amigas, desde os tempos da faculdade e que serão por toda vida, Fernanda Marques, Vanessa Aguiar, Paula Silva, Cynthia Duarte, Gisela Siqueira, Magda Flister, Thais Matsue, Raquel Magalhães, Michelle Teixeira. Obrigada pela amizade sólida, fiel e saudável, pelo carinho e preocupação, vocês tornaram minha vida longe de casa mais feliz. Amo vocês!!

Aos amigos de turma de Mestrado Júlio César e Vinícius Novaes, obrigada por dividirem momentos tensos durante as disciplinas, pelas incontáveis risadas que o Júlio consegue de todos até nos momentos mais sérios.

Aos amigos, Rodrigo Neto e Thiago Torres, pela amizade preciosa que surgiu durante este tempo, pelo incentivo, pelo exemplo profissional e não poderia esquecer pelas sessões de cinema.

Aos amigos Geraldo Jr. e Leonardo Mendonça, sempre solícitos e muito atenciosos aos meus pedidos de ajuda.

À amiga Caroline Fernandes "nossa salvadora", sempre disposta a ajudar, muitas vezes deixando de lado suas tarefas para nos ensinar como verdadeira Mestre.

À amiga Daniele Gonçalves Bezerra, saudades antecipadas!

Às amigas e colegas de profissão, Bianca Gregório e Vanessa Mello, vocês são o ápice!

Á amiga e parceira de projeto Fernanda Amorim, pela ajuda fundamental em todas as fases do projeto e elaboração do artigo, sempre com seu jeito meigo, obrigada Fê!

A todos os membros do LMMC, responsáveis por cada dia me ensinarem um pouco mais, Alessandra Pinheiro, Mariana Catta-Preta, Cláudia Mansano, Victor Motta, Rafael Evangelista, Isabelle Bringenti, Verônica Villar.

A Thatiany Marinho, nossa "General", obrigada pela amizade, pela dedicação na microtomia de mais de 2000 cortes do pâncreas, com o braço doendo e o sorriso no rosto. Você é fundamental no LMMC!

Ao Ciro Reis e Willian Lannes, obrigada pela atenção

Se enxerguei mais longe foi porque estava nos ombros de gigantes

*Isaac Newton*

# RESUMO

SILVA, Sandra Barbosa da. *Efeitos benéficos do tratamento com óleo de peixe em camundongos c57bl/6 alimentados com dieta hiperlipídica e rica em sacarose.* 2008. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Avaliar os efeitos benéficos do tratamento com óleo de peixe sobre mudanças metabólicas e morfológicas no pâncreas e tecido adiposo de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta rica em lipídeos e sacarose (HLS).Camundongos machos da linhagem C57BL/6, foram alimentados com dieta padrão (P) ou dieta HLS. Aos 3 meses de idade, os camundongos do grupo HLS foram separados em grupo não-tratado (HLS) ou grupo tratado com óleo de peixe (HLS-Px, 1,5g/kg/dia). Aos 4 meses de idade os animais foram sacrificados. O grupo HLS apresentou aumento da massa corporal (MC) e no acúmulo do tecido adiposo total, porém o grupo HLS-Px apresentou menor MC e massa de tecido adiposo comparado ao grupo HLS. As concentrações de glicose plasmática e insulina não foram afetadas entre os grupos, no entanto os grupos HLS e HLS-Px apresentaram maior HOMA-IR. Os grupos HLS e HLS-Px apresentaram maiores concentrações plasmáticas do colesterol total e LDL-C, porém o grupo HLS-Px apresentou maior concentração plasmática do HDL-C e redução da concentração de triglicerídeos. Os adipócitos do grupo HLS apresentaram maior diâmetro quando comparado aos grupos controle e HLS-Px. A massa do pâncreas foi menor no grupo HLS-Px e as ilhotas pancreáticas apresentaram maior diâmetro no grupo HLS, quando comparado ao grupo controle. A expressão de insulina, glucagon e GLUT-2 mostrou-se forte em todas as ilhotas pancreáticas do grupo controle, mas o grupo HLS apresentou fraca expressão para o GLUT-2. Entretanto, HLS-Px apresentou maior expressão do GLUT-2. O tratamento com óleo de peixe foi capaz de reduzir o ganho de massa corporal e a concentração de triglicerídeos, assim como reduzir o acúmulo de tecido adiposo,hipertrofia dos adipócitos, das ilhotas pancreáticas, assim como prevenir a redução do GLUT-2 em camundongos C57BL/6.

Palavras-chave: Óleo de peixe. Obesidade. Dieta hiperlipídica. Dieta rica em sacarose. Camundongos C57BL/6

**ABSTRACT**

To evaluate the fish oil treatment upon morphological and metabolic changes in the pancreas and adipose tissue of C57BL/6 mice fed high-fat-high-sucrose (HFHS) diet. Male C57BL/6 mice were fed HFHS chow or standard chow (SC). At 3 mo-old, HFHS mice were separated into untreated group (HFHS) or treated with fish oil (HFHS-Fo, 1.5 g/kg/day). At 4-mo-old animals were sacrificed. HFHS had increase in body mass (BM) and in total body fat, but HFHS-Fo had smaller BM and total body fat in relation to HFHS. Plasma glucose and insulin levels were not affected among the groups, but HFHS and HFHS-Fo had higher HOMA-IR ratio. HFHS and HFHS-FO had increased plasma total cholesterol and LDL-C, but HFHS-Fo increased plasma HDL-C and decreased triglycerides levels. The adipocytes size were greater in HFHS,when compared to SC and HFHS-Fo groups. HFHS-Fo had smaller pancreas mass and HFHS presented higher islet pancreatic diameter, when compared to SC group. SC group showed strong expression for insulin, glucagon and GLUT-2 in all pancreatic islets, and HFHS presented lesser expression for GLUT-2. However, HFHS-Fo presented increase of GLUT-2 expression. Fish oil treatment was able to reduce body mass gain and plasma TG, reduce fat pad adiposity as well as adipocyte and pancreatic islet hypertrophy, prevent decrease GLUT-2 in C57BL/6.

Keywords: Fish oil. Obesity. High fat diet. High sucrose diet. Mice C57BL/6

## LISTA DE FIGURAS


Figura 1 – Fracionator-físico..... 30

Figura 2 – Gráfico da massa corporal..... 33

Figura 3 – Gráfico da massa adiposa..... 34

Figura 4 – A- Gráfico diâmetro do adipócito, B fotomicrografias do tecido adiposo..... 36

Figura 5 – A - Gráfico do diâmetro das ilhotas pancreática, B fotomicrografias das ilhotas pancreáticas..... 38

Figura 6 – Fotomicrografias das ilhotas imuno-marcadas..... 39

Figura 7 – Gráfico densidade da imuno-marcação..... 40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais..... 27
Tabela 2 – Parâmetros biométricos dos camundongos..... 32
Tabela 3 – Dados bioquímicos do sangue..... 35

## SUMÁRIO


| | | |
|---|---|---|
| | **INTRODUÇÃO** | 12 |
| 1 | **REVISÃO DA LITERATURA** | 16 |
| 1.1 | **Síndrome metabólica** | 16 |
| 1.1.1 | Obesidade | 16 |
| 1.1.1.1 | Pâncreas e dieta hiperlipíca | 19 |
| 1.1.1.2 | Óleo de peixe | 21 |
| 2 | **MATERIAL E MÉTODOS** | 23 |
| 2.1 | **Animais e dieta** | 25 |
| 2.1.1 | Eutanásia | 28 |
| 2.1.1.1 | Análise bioquímica e concentração sérica de insulina | 28 |
| 2.1.1.2 | Morfometria do adipócito | 29 |
| 2.1.1.3 | Morfometria e estereologia do pâncreas | 29 |
| 2.1.1.4 | Imuno-histoquímica | 30 |
| 2.1.1.5 | Análise estatística | 31 |
| 3 | **RESULTADOS** | 32 |
| 3.1 | **Massa corporal e massa adiposa** | 32 |
| 3.1.1 | Parâmetros bioquímcos plasmáticos | 35 |
| 3.1.1.1 | Morfometria do adipócito | 36 |
| 3.1.1.2 | Pâncreas | 37 |
| 3.1.1.3 | Expressão de insulina, glucagon, GLUT-2 e PCNA | 37 |
| 4 | **DISCUSSÃO** | 41 |
| 5 | **CONCLUSÃO** | 45 |
| | **REFERÊNCIAS** | 46 |
| | **ANEXO** - Comitê de ética em pesquisa | 50 |

## INTRODUÇÃO

A obesidade pode ser considerada a origem de desordens metabólicas, sua prevalência a transforma no principal precursor de desordens como: resistência à insulina, dislipidemias (hipertrigliceridemia somada à redução dos níveis da lipoproteína de alta densidade – HDL, com aumento da lipoproteína de baixa densidade - LDL), elevação da pressão arterial e anormalidades na distribuição da massa corporal, com aumento da adiposidade. A soma desses fatores denomina-se Síndrome Metabólica (SM) [1].

Em 1988, Gerald Reaven, observou que alguns fatores de risco surgiam com freqüência agrupados em determinados indivíduos. A essa condição ele denominou de síndrome da resistência à insulina, pois esses indivíduos tinham pequena sensibilidade à insulina [2].

Em 1998, a Organização Mundial de Saúde (OMS) desenvolveu um critério de definição para esse quadro, chamando-o, pela primeira vez, de síndrome metabólica, nele incluindo, além da hipertensão arterial e da dislipidemia, também a obesidade e a microalbuminúria [3].

Em 2001, o *National Institute of Health*, por meio do *National Cholesterol Education Program* (NCEP), reuniu o *3rd Adult Treatment Panel* (ATP III) e sugeriu outro critério de definição para a síndrome metabólica, diferente daquele da OMS; a definição americana ficou mais simples e prática, pois não usava o peso e a microalbuminúria; entretanto, requeria para o seu diagnóstico que houvesse pelo menos três componentes anormais [4].

Em abril de 2005, foi publicada a I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica com o apoio da Sociedade Brasileira de Cardiologia [5].

Além disso, também existe uma crescente incidência do diabetes mellitus tipo II (DMII) nos países em desenvolvimento. Isto não é surpreendente, pois nesses países, a urbanização e o desenvolvimento muitas vezes são acompanhados por aumento da ingestão energética, proveniente de maior consumo de alimentos gordurosos, ricos em ácidos graxos saturados, e estilo de vida sedentário. Sabemos que o perfil dos ácidos graxos que compõe a dieta é um fator importante, uma vez que a qualidade e quantidade do lipídio dietético podem determinar a severidade da resistência à insulina. Por exemplo, o aumento da disponibilidade dos ácidos graxos livres (AGL) no músculo e no fígado está associado com resistência à insulina [6],

piora da liberação de insulina estimulada pela glicose, lipotoxicidade e disfunção nas células β pancreáticas [7].

A ingestão de óleo de peixe pode ser um tratamento alternativo eficaz para a SM. O ácido graxo eicosapentaenóico (EPA - 20:5n-3) e o ácido graxo docosahexaenóico (DHA - 22:6n-3), pertencentes à família n-3, são os principais componentes do óleo de peixe e estão relacionados com várias reações biológicas, tais como: redução da pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos [8], melhora do remodelamento cardíaco e renal de animais programados metabolicamente com restrição protéica materna na gestação [9]. Além disso, os ácidos graxos n-3 também são fatores antiinflamatórios e antitrombóticos [10, 11].

Postula-se que o óleo de peixe pode atuar na via dos receptores da ativação da proliferação peroxisomal (*peroxisome proliferator active receptors – PPARs*), controlando a expressão dos genes envolvidos no metabolismo da glicose, dos lipídios e também na adipogênese. Além disso, os efeitos positivos do óleo de peixe na regulação da lipogênese hepática e sobre as enzimas glicolíticas já estão bem documentados, assim como sua ação na prevenção da resistência à insulina e da hipertrigliceridemia, mesmo quando administrado junto com dieta rica em gordura ou rica em sacarose, por breves períodos [12, 13]. Além de exercer efeito sobre o metabolismo e sobre a morfologia do tecido adiposo, o óleo de peixe reduz a massa de gordura, diminui a hipertrofia das células adiposas, melhora a distribuição de gordura corporal e corrige os efeitos inibitórios de uma dieta rica em sacarose mediante a ação antilipolítica da insulina [14].

Considerando-se a predisposição à manifestação da SM em animais que ingeriram dieta hiperlipídica e rica em sacarose, faz-se pertinente um estudo sobre a repercussão do tratamento com óleo de peixe sobre o metabolismo de carboidratos e lipídios e sobre a morfologia pancreática e do tecido adiposo em camundongos C57BL/6.

Enfim, a prevenção e/ou tratamento uma doença que toca uma área do prazer humano que é "comer", é difícil e árduo e nós, profissionais da área da saúde, precisamos nos aprofundar em todos os aspectos que envolvem esta síndrome para que nossas intervenções possam ser mais efetivas e duradouras, atuando de forma profilática, no sentido de evitar o desenvolvimento de todos os efeitos adversos que acompanham a SM.

Diante do exposto os objetivos do presente trabalho são: Avaliar os efeitos da suplementação com óleo de peixe em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica e rica em sacarose. A análise dará ênfase ao estudo da(o):

- Massa corporal
- Metabolismo de lipídios e de carboidratos
- Morfologia do tecido adiposo
- Morfologia do pâncreas

# 1 REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 Síndrome Metabólica

Em 1988, com a constatação da freqüente associação entre resistência à insulina, intolerância à glicose, hipertensão arterial, dislipidemia e doença aterosclerótica, Gerald Reaven descreveu uma síndrome a que denominou inicialmente de *síndrome X*. Posteriormente, uma série de anormalidades metabólicas foi sendo acrescentada ao espectro da síndrome, contribuindo para a compreensão de sua etiopatogenia e de seu impacto no risco cardiovascular. Hoje, a terminologia mais empregada pelas sociedades científicas internacionais é a de síndrome metabólica (SM) [2].

A expectativa atual é de que a SM aumente sua freqüência nas populações do mundo, uma vez que muitas das anormalidades que a compõem estão relacionadas com o estilo de vida moderno. Por exemplo, a prevalência SM na população americana foi estimada em 22% a 24%, sendo variável com a etnia [15, 16].

Além do mais, a composição dos macronutrientes da dieta exerce um importante papel na modificação de alguns fatores de risco dessa síndrome. Estudos clínicos e experimentais utilizando ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) da família n-3, especialmente os ácidos graxos presentes no óleo de peixe, o ácido eicosapentaenóico (EPA-20:5) e o ácido docosahexaenóico (DHA-22:6), tem demonstrado efeitos benéficos tanto em indivíduos saudáveis, quanto em indivíduos portadores de doenças crônicos degenerativas [17].

Os efeitos dos AGPI incluem alterações na composição dos fosfolipídios da membrana plasmática que modificam processos mediados através da membrana, como a sinalização da insulina, atividade das lipases e biossíntese de eicosanóides [18], somando a essas ações, estudos demonstraram que o óleo de peixe previne não só a dislipidemia, como também a resistência à insulina, ambos componentes do conjunto de fatores que causam a SM [17, 19].

### 1.1.1 Obesidade

A obesidade, definida pelo Índice de Massa Corporal (IMC) maior ou igual a 30 kg/m$^2$, é considerado um fator de risco para doenças cardiovasculares (DCV), incluindo hipertensão arterial sistêmica (HAS), dislipidemias, diabetes mellitus e síndrome metabólica [20, 21].

A etiologia da obesidade é bastante discutida, mas sabe-se que quando a energia ingerida está em excesso, ou seja, superior ao gasto, há um balanço positivo com expansão e aumento das células adiposas. No entanto, este processo não é assim tão simples. A obesidade humana está relacionada com fatores ambientais e genéticos. O homem e a maioria dos mamíferos controlam a massa corporal regulando a ingestão de alimentos voluntariamente, sugerindo que a massa corporal é sujeita ao controle fisiológico. Entretanto, mais de 430 genes, marcadores celulares, PPARs e regiões cromossomais estão relacionadas com a obesidade [20, 22, 23]

A obesidade atualmente é considerada uma epidemia. Estima-se que na população mundial aproximadamente 22 milhões de crianças abaixo dos cinco anos de idade já apresentem sobrepeso ou obesidade [24]. A obesidade infantil representada por aumento no número de células adiposas (ou hiperplasia) pode estar ou não associada à hipertrofia dos adipócitos. Neste caso, o controle da obesidade na vida adulta é difícil, o que aumenta as chances da criança obesa se tornar um adulto obeso [25].

Em 1987, o tecido adiposo foi identificado como local de metabolismo de esteróides sexuais e em 1994, a descoberta da leptina o transformou em um órgão endócrino [26, 27]. Sabe-se que os adipócitos secretam proteínas envolvidas em diversas funções, dentre elas: homeostase da glicose, inflamação, balanço energético, metabolismo lipídico e sistema fibrinolítico/homeostase vascular e muitas dessas ações são reguladas pela insulina [28].

A função principal do tecido adiposo é o estoque de energia. Quando há necessidade de "combustível", durante períodos de fome ou longo período de trabalho muscular, os AGL são liberados dos estoques de triacilgliceróis (TG) dos adipócitos para a circulação sangüínea pelo processo de lipólise e oxidação, primeiramente pelo músculo esquelético, para prover energia [29]. Indivíduos que apresentam obesidade centrípeta (com acúmulo de gordura intra-abdominal ou visceral) têm maiores riscos de complicações metabólicas e cardiovasculares. Por exemplo, os adipócitos viscerais liberam maior quantidade de AGL quando comparados

com os adipócitos subcutâneos, onde os hormônios antilipolíticos como a insulina, exercem efeitos mais pronunciados do que as catecolaminas lipolíticas [30].

A insulina exerce regulação crucial na função do adipócito, tais como diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos e estes em adipócitos maduros, aumentando o transporte de glicose e a síntese de TG, além de inibir a lipólise. A ligação da insulina com o seu receptor gera uma cascata de sinalizações moleculares. Na resistência à insulina, a sinalização normal da insulina no adipócito é prejudicada, o que provoca um decréscimo na captação da glicose mediada por insulina. Diversos fatores secretados pelo tecido adiposo tais como fator de necrose tumoral-α (TNF-α) e AGL, influenciam a sinalização da insulina nos indivíduos com aumento de gordura visceral [29].

O TNF-α é o maior contribuinte no desenvolvimento da resistência à insulina. Indivíduos obesos e/ou diabéticos do tipo II apresentam níveis elevados de TNF-α correlacionados com elevação dos níveis de insulina e diminuição de sua sensibilidade. O tecido adiposo apresenta correlação negativa entre secreção de TNF-α e metabolismo de glicose [31]. Somando-se a isso, a secreção de TNF-α pelo tecido adiposo pode ser a chave para o desenvolvimento da resistência à insulina no músculo e no fígado, embora tais efeitos não estejam tão bem estabelecidos em humanos quanto em modelos experimentais. Outro fator preponderante do TNF-α é a habilidade de estimular a secreção de AGL, mais uma vez mediado pela resistência à insulina [32].

Recentemente, outros fatores como a resistina e adiponectina têm sido atribuídos ao adipócito e ao seu papel na obesidade. A resistina não tem sua função tão explorada, mas sabe-se que está envolvido com a diferenciação dos adipócitos e também como indicador de resistência à insulina. A adiponectina, que é produzida pelos adipócitos e possui propriedades antiinflamatórias e anti-aterogênicas, está diminuída nas pessoas obesas e diabéticas e elevada nas pessoas que perdem peso. Todavia, a adiponectina é capaz de favorecer a oxidação de ácidos graxos e diminuir as concentrações de AGL, TG, glicose e molécula de adesão endotelial, em modelos experimentais e humanos. Esses efeitos sugerem que a adiponectina exerce um potente papel na prevenção da aterosclerose e nas DCV. Esta adipocina circula em alta concentração no plasma sangüíneo, cerca de três vezes mais do que os demais hormônios sintetizados pelos adipócitos e sua expressão é maior no tecido adiposo subcutâneo em comparação com o tecido adiposo visceral, diferentemente do que ocorre com a leptina [33].

A leptina é um hormônio produzido, mas não exclusivamente, pelo tecido adiposo, que age sobre o hipotálamo e regula a ingestão de alimentos, a massa corporal e o balanço energético, diminuindo o apetite, aumentando a saciedade e o gasto energético através da estimulação do sistema nervoso central (SNC) [34]. Entretanto, nos indivíduos obesos ocorre resistência à leptina e essa situação ainda não está totalmente elucidada, no entanto, postula-se que possa ser resultado de defeitos na sinalização ou no transporte através da barreira hemato-encefálica do SNC [35].

#### 1.1.1.1 Pâncreas e dieta hiperlipídica

O pâncreas exerce papel chave no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. A função endócrina do pâncreas reside dentro pequenos aglomerados celulares microscópicos, denominada ilhota pancreática ou de Langerhans. As ilhotas pancreáticas são compreendidas de quatro tipos principais celulares: As células β, produtoras de insulina, células α, produtoras de glucagon, células δ, produtoras de somatostatina e células PP, produtoras de polipeptídeo pancreático. A célula β pancreática é a maior fonte de insulina do corpo, produção e secreção são reguladas através da glicose, hormônios peptídeos, neurotransmissores e drogas anti-diabéticas [36]. As células β pancreáticas respondem a glicose circulante com aumento concomitante da liberação de insulina. A característica da hiperglicemia no diabetes é resultado de deficiência ou ausência de secreção de insulina e/ou ação prejudicada deste hormônio sobre tecidos alvos, criando um ciclo vicioso, gerando aumento na concentração de glicose circulante e conseqüente progressão do diabetes [36].

Em pessoas normais, as células β pancreáticas possuem mecanismos inerentes e se adaptam ao excesso de nutrientes para manter a homeostase da glicose e dos ácidos graxos. Ambos, glicose e ácidos graxos exercem efeitos positivos ou negativos sobre as células β pancreáticas, de acordo com suas concentrações e duração da exposição (aguda ou crônica). A exposição crônica de elevadas concentrações de glicose nas ilhotas pancreáticas pode exercer mudanças no metabolismo das células β. Por exemplo, tanto a hiperglicemia, quanto a hiperlipidemia presentes no DM II, pode alterar a função das células β pancreáticas e esses efeitos são chamados de glicose-toxicidade, lipotoxicidade ou glico-lipo-toxicidade [7, 36].

Embora, os AGLs sejam os combustíveis fisiológicos para as células β pancreáticas, a exposição crônica a elevadas concentrações de AGLs, resulta no decréscimo da liberação de

insulina estimulada pela glicose, prejudicando a expressão gênica da insulina com aumento nas taxas de morte celular. Os mecanismos exatos subjacentes a esses efeitos ainda estão sob investigação. Embora tenha sido inicialmente acreditado que a oxidação elevada dos AGLs poderia reduzir a oxidação da glicose, verifica-se agora que o mecanismo mais provável seja o aumento na esterificação dos AGLs, levando ao acúmulo progressivo de lipídios o que pode ser a maior causa de falência das células β. Isso pode ser acrescentado com o estresse oxidativo e geração de espécies reativas de oxigênio, relatadas em condições onde há glicose-toxicidade ou lipotoxicidade. Os mecanismos pelos quais concentrações elevadas de glicose e/ou lipídios prejudicam as células β pancreáticas, ainda não estão bem esclarecidos, contudo esse assunto é alvo de intensa investigação clínica e experimental [36]. Na tentativa de elucidar e até mesmo encontrar novos mecanismos de ação e tratamento para os males da obesidade e/ou da síndrome metabólica, utiliza-se animais de experimentação alimentados com dietas hiperlipídicas [37, 38].

Já é bem conhecido que o consumo da dieta hiperlipídica induz a obesidade e a resistência à insulina; ambos os fatores considerados como risco para o desenvolvimento do DM II. Na sobrecarga energética ocorre uma compensação fisiológica nas ilhotas pancreáticas com aumento da secreção de insulina para manutenção do metabolismo normal da glicose, porém se esta compensação for prejudicada, ocorre a instalação do DM II [39, 40].

O tecido adiposo possui papel central no desenvolvimento do DM II, devido à liberação de várias adipocinas biologicamente ativas. [29, 41]. Essas adipocinas podem ser sinais tanto para estimular o mecanismo compensatório, quanto para a deterioração da ilhota pancreática na presença da resistência à insulina. Um ponto importante nesse contexto é a adiponectina, que tem papel na regulação do equilíbrio energético, principalmente no aumento da sensibilidade à insulina [42, 43]. No entanto, a adiponectina mostra-se reduzida em humanos e em modelos experimentais de obesidade e DMII [44, 45].

A adiponectina melhora a sensibilidade à insulina através do aumento da oxidação dos AGL no músculo esquelético e diminuição do acúmulo de triglicerídeos [46, 47]. Além disso, a adiponectina suprime a produção hepática de glicose [48] o que favorece a homeostase da glicose através desse mecanismo [49].

Estudos demonstraram claramente o papel da adiponectina na redução da resistência à insulina no tecido periférico. Entretanto, se a adiponectina atua sobre as células β

pancreáticas, ainda não está elucidado [50], mas os receptores desse hormônio foram identificados em células β pancreáticas em humanos e em ratos [51]. Esse fato sugere que a adiponectina pode também atuar sobre as células β pancreáticas e, dessa forma, possuir ação contra citocinas e ácidos graxos que induzem apoptose das células β pancreáticas [52].

#### 1.1.1.2 Óleo de peixe

Como percebemos, a etiologia e os fatores metabólicos relacionados com a obesidade são complexos, inclusive, na busca da sua prevenção, tratamento ou controle. Muito se discute e existem hoje no mercado diversas opções para tratamento, como drogas inibidoras de apetite, nutro-fármacos e manipulação cirúrgica, além da já conhecida alteração dietética associada à atividade física.

Os efeitos dos AGPI da família n-3 contidos no óleo de peixe tem mobilizado uma série de pesquisadores nas últimas três décadas por todo mundo. O estudo de prevenção GISSI (*Gruppo Italiano per lo studio della sopravvivenza nell'Infarto miocardico)* – com 11.324 pacientes mostrou uma diminuição de 45% no risco de morte súbita no grupo que ingeriu no mínimo 850mg/dia de AG n-3 [53]. Em altas doses, também são eficazes no tratamento da hipertrigliceridemia (3 a 5g/dia), podem reduzir de 30% a 50% os níveis de TG séricos, minimizando o risco tanto de doença coronariana quanto de pancreatite aguda [54].

Os ácidos eicosapentaenóico (EPA-20:5n-3) e docosahexaenóico (DHA-22:6n-3) são os principais componentes do óleo de peixe e estão relacionados com várias reações biológicas, tais como: redução da pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos [8], melhora o remodelamento cardíaco e renal de animais programados metabolicamente com restrição protéica materna na gestação [9]. Além do mais, os AG n-3 também são fatores antiinflamatórios e antitrombóticos [10, 11].

Já está bem descrito na literatura ações vasodilatadoras e antitrombóticas dos AG n-3, sabe-se que o EPA (ácido eicosapentaenóico, com 20 carbonos) compete com o ácido araquidônico (AA, com 20 carbonos), como substrato para as enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase. Com isso, a síntese de tromboxano $A_2$ é inibida e a de tromboxano $A_3$ é estimulada, gerando um desvio benéfico, com instalação de uma condição mais vasodilatadora e antitrombótica [55]. Somando-se a este fato, o EPA também inibe a síntese de mais dois potentes eicosanóides inflamatórios, a prostaglandina E2 e o leucotrieno B4,

além de estimular a produção de óxido nítrico e de prostaciclinas $I_2$ nas células endoteliais, contribuindo assim para o aumento da capacidade vasodilatadora [56, 57].

Os AG n-3, assim como os AG n-6, são considerados essenciais porque não são sintetizados no organismo humano e devem ser obtidos através da dieta. Através de um processo de dessaturação enzimática, o AG α-linoléico (ALA) produz o EPA e DHA (ácido docosahexaenóico, com 22 carbonos). Esses dois tipos de AG são precursores de um grupo de eicosanóides: prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos que exercem ação vasodilatadora e antiinflamatória [58].

O DHA possui algumas características anti-hipertensivas. Os prováveis mecanismos propostos para esse efeito são: abrandamento do sistema renina-angiotensina-aldosterona por meio da diminuição da síntese adrenal de aldosterona, alterações no metabolismo do AA renal e ativação dos canais de potássio sensíveis ao ATP. Dados demonstram que a suplementação com DHA pode resultar em incorporação de AG n-3, em substituição aos da família n-6, na membrana celular e essa característica pode também interferir na estrutura vascular, na contratilidade e na regulação da pressão arterial [59].

Todavia, o DHA é um composto vital na membrana fosfolipídica das células, especialmente no cérebro e retina, sendo extremamente necessário para a realização de sua função [17]. Quando adicionados à dieta, o EPA e o DHA podem não só ativar fatores antiinflamatórios como também diminuir as concentrações séricas de TG, inibindo a síntese de VLDL e TG no fígado [60, 61]. Além disso, estudos com humanos e animais mostram que a suplementação com óleo de peixe reduz a resistência periférica à insulina, mesmo administrados concomitantemente a dietas de alta concentração de gordura e sacarose. O possível mecanismo atribuído aos AG n-3, e que provavelmente é responsável pela diminuição da hipertrigliceridemia, é a diminuição da atividade de algumas enzimas presentes no metabolismo da glicose, como a glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-P-DH) [14]. Outro fator preponderante dos AG n-3 é a regulação da supressão da síntese lipídica no fígado e do aumento da oxidação, em músculo e fígado [62]. Uma das vias atuantes nesse processo é a redução da malonil-CoA hepática, permitindo que os AG possam entrar na mitocôndria para sofrer o processo da β-oxidação [63]. Além disso, eles participam de eventos independentes que governam a expressão gênica, via PPARs.

O PPAR-α e o PPAR-γ parecem ter um efeito protetor sobre a atividade vascular das células musculares lisas, além de serem capazes de responder a um vasto número de ligantes, provenientes de AG eicosanóides e metabólitos do ácido linoléico [64]. Outros AG e seus metabólitos, como EPA e DHA, α-linolênico, AG monoinsaturados e AG saturados também podem afetar o PPAR. O leucotrieno B4 (LTB4), um eicosanóide pró-inflamatório, se liga ao PPAR-α e induz a transcrição genética envolvida na ω - e β-oxidação que leva à indução de seu próprio catabolismo [65].

O PPAR-γ regula a expressão de proteínas adipócito-secretadoras, adipocitocinas, que incluem a leptina, TNF-α, e adiponectina. Em relação à adiponectina, tem-se postulado a ela ação antiinflamatória, especialmente nas células endoteliais e nos macrófagos. Tais efeitos confirmam ação benéfica dos AG n-3, principalmente do EPA e DHA presentes no óleo de peixe.

# 2 MATERIAL E MÉTODOS

## 2.1 Animais e dieta

Camundongos machos da linhagem C57BL/6J (total de 15 animais, n=5 por grupo) foram estudados dos dois aos quatro meses de idade, todos obtidos de colônias mantidas na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Os animais foram acondicionados em caixas de polietileno em temperatura (21±1°C) e umidade (60±10%) controladas, e com um ciclo de luz invertido (12h no escuro/12h no claro) e exaustão de ar (15 min./h). Todos os procedimentos conduzidos estavam de acordo com normas convencionais para experimentação com animais (NIH *publication* nº 85-23, revisado em 1996, http://grants.nih.gov/grants/olaw.htm) e protocolo experimental aprovado pelo comitê de ética local (Anexo 1).

Aos dois meses de idade, os animais foram, aleatoriamente, separados pelo tipo de dieta a ser administrada: **dieta hiperlipídica rica em sacarose** (**Grupo HLS**) e **dieta padrão** para roedores de laboratório (**Grupo P**). Com base na energia, a dieta HLS consistiu de 14% de proteína, 44% de carboidratos (dos quais 16% foram de sacarose) e 42% de lipídio (total de ≈20 kJ/g), enquanto a dieta padrão P apresentava 14% de proteína, 76% de carboidratos (dos quais 8% eram de sacarose) e 10% de lipídio (total de ≈16 kJ/g). Os compostos de vitaminas e minerais em ambas as dietas foram idênticos e respeitaram as normas do *American Institute of Nutrition* (AIN 93M) [66]. As dietas experimentais HLS e P foram preparadas pela Rhoster (Rhoster, SP, Brasil, www.rhoster.com.br) e as composições estão mostradas na Tabela 1. Durante todo o experimento os animais tiveram acesso livre à ração e à água.

Aos três meses de idade, os animais com ração padrão continuaram com a mesma ração (grupo **P**). Os animais com ração **HLS** foram divididos aleatoriamente em dois grupos, um grupo sem tratamento e um grupo tratado com óleo de peixe (fonte de ácidos graxos n-3, EPA e DHA; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA, Batch # 035K0184), na dose de 1,5 g/kg de massa corporal por dia. O grupo tratado recebeu diariamente suplementação de óleo de peixe (grupo **HLS-Px**) e o grupo não-tratado recebeu água no mesmo volume do óleo (grupo **HLS**). O óleo de peixe ou placebo (água) foi administrado via tubo orogástrico (gavagem), diariamente, durante um mês, entre 07h e 08h da manhã.

Os grupos ficaram, então, dispostos da seguinte forma:

**Grupo - P** (grupo com ração padrão para roedores);

**Grupo - HLS** (grupo com ração hiperlipídica e rica em sacarose);

**Grupo- HLS- Px** (grupo com ração hiperlipídica e rica em sacarose e tratado com óleo de peixe).

A massa corporal (MC) e o comprimento naso-anal (CNA) foram aferidos semanalmente (as sextas, 8h da manhã) e a ingestão da ração dos animais foi contabilizada diariamente (às 8h da manhã).

**Tabela 1.** Composição das dietas experimentais. Abreviação: **P** = dieta padrão; **HLS** = dieta hiperlipídica e rica em sacarose.

| **Ingredientes (g/kg)** | Dietas experimentais | |
|---|---|---|
| | **P** | **HLS** |
| Caseína | 140,0 | 160,0 |
| Amido de Milho | 620,69 | 320,69 |
| Sacarose | 100,0 | 200,0 |
| Óleo de soja | 40,0 | 40,0 |
| Banha de porco | - | 180,0 |
| Colesterol | - | 0,437 |
| Fibra | 50,0 | 50,0 |
| Mix de vitaminas (AIN 93M) | 10,0 | 10,0 |
| Mix de minerais (AIN 93M) | 35,0 | 35,0 |
| Cistina | 1,8 | 1,8 |
| Colina | 2,5 | 2,5 |
| Antioxidante | 0,008 | 0,008 |
| Total (g) | 1000 | 1000 |
| kJ/g | 16 | 20 |

### 2.1.1 Eutanásia

No dia que antecedeu a eutanásia, os animais foram desprovidos de alimento por seis horas e depois foram anestesiados (solução de pentobarbital sódico intraperitoneal, 15mg/kg) e amostras de sangue foram rapidamente obtidas por punção cardíaca. Os depósitos de gordura (retroperitoneal e genital) foram completamente removidos de ambos os lados do animal e pesados em balança de precisão. A massa de gordura retroperitoneal foi dissecada no depósito distinto em torno de cada rim ao longo dos músculos lombares. A gordura genital incluiu o tecido adiposo ao redor dos ureteres, bexiga e epidídimo. O pâncreas foi removido, pesado em balança de precisão e imerso em solução fixadora, assim como fragmentos do tecido adiposo (1,27mol/l de formaldeído em 0,1M de tampão fosfato, pH 7,2) durante 48h em temperatura ambiente.

#### 2.1.1.1 Análise bioquímica e concentração sérica de insulina

Após a coleta de sangue, o plasma foi obtido por centrifugação (120g por 15 minutos) em temperatura ambiente e estocado individualmente a -20°C até a realização das análises bioquímicas. Todos os lipídios sanguíneos [colesterol total (CT), triacilgliceróis (TG), lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL)] foram aferidos utilizando o método enzimático colorimétrico, com o analisador semi-automático de Bioquímica (Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil).

As concentrações da glicemia de jejum foram determinadas no momento da eutanásia e para isso, usou-se o método da glicose-oxidase, utilizando o glicosímetro (Accu-chek, Roche Diagnostic, Germany). A concentração da insulina de jejum foi mensurada por radioimunoensaio, Cat. RI-13K para insulina (coeficiente de variação intra-ensaio foi de 1,4%).

O modelo homeostático para avaliação da resistência à insulina (HOMA, *Homeostasis Model Assessment*) foi calculado, utilizando a insulina e a glicose de jejum através da seguinte fórmula:

HOMA-IR = Insulina de jejum (μU/ml) **X** Glicose de jejum (mmol/l)/22,5.

2.1.1.2 Morfometria do adipócito

Fragmentos do tecido adiposo genital foram incluídos em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, EUA). Os blocos foram seccionados em 5 μm de espessura e os cortes foram corados com a coloração Hematoxilina e Eosina. O diâmetro dos adipócitos foi determinado através da utilização de imagens digitais adquiridas aleatoriamente (mínimo de 10 adipócitos/animal, formato TIFF, 36-bit color, 1280x1024 pixels) com câmera LC Evolution e microscópio Olympus BX51, e analisados com software Image-Pro Plus, versão 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

2.1.1.3 Morfometria e estereologia do pâncreas

Os pâncreas foram incluídos por inteiro em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, EUA), exaustivamente seccionados em 5 μm de espessura e depois os cortes foram corados com a coloração de Hematoxilina e Eosina.

Resumidamente, um número entre 1 e 50 foi sorteado de uma tabela de números aleatórios como, por exemplo, 10. Neste caso, os cortes 10, 60, 110, 160, etc., foram utilizados como plano de referência primário (*look up*), e os cortes 18, 68, 118, etc., foram utilizados como plano de referência secundário (*look down*) (Figura 1). Esses cortes foram utilizados para quantificar o número total de ilhotas através do método do fracionator-físico [67, 68]. O restante dos cortes foi utilizado para determinação do diâmetro das ilhotas e para a análise através da imuno-histoquímica.

O Método do fracionator-físico nos permitiu estabelecer a distância de 40 μm entre o corte primário e o corte de referência, representando aproximadamente ¼ do diâmetro da ilhota. Dessa maneira, as ilhotas que apareciam nos cortes primários (exemplo, no corte 10) e não apareciam nos cortes de referência (exemplo, no corte 18) foram contadas.

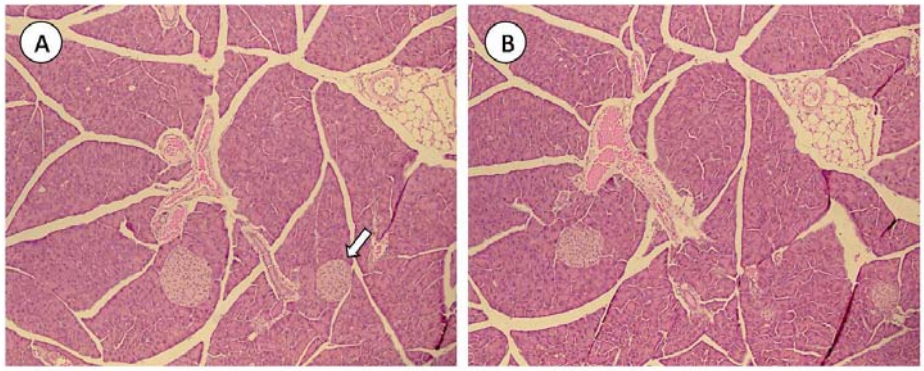


**Figura 1.** Fracionator-físico – As ilhotas vistas em A e que não apareceram em B, foram contadas (seta branca) Para maiores detalhes ver na seção de material e métodos.

O diâmetro da ilhota pancreática foi determinado através da medida do maior e do menor diâmetro nas imagens digitais adquiridas aleatoriamente (formato TIFF, 36-bit color, 1280x1024 pixels) com câmera LC Evolution e microscópio Olympus BX51, e analisados com software Image-Pro Plus, versão 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Foram analisadas 40 ilhotas pancreáticas por animal, totalizando 200 ilhotas por grupo.

2.1.1.4 Imuno-histoquímica

Foram utilizados cortes do pâncreas com 5 μm de espessura, fixados em formalina e incluídos em paraplast plus. A recuperação antigênica foi feita com tampão citrato pH 6,0 a 60ºC e a peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio a 3%. Os cortes foram incubados com os seguintes anticorpos: anti-glucagon (A0565, Dako), anti-insulina (A0564, Dako) e anti-GLUT-2 (AB1342, Chemicon) durante 2 horas. Um anticorpo biotinilado foi utilizado como anticorpo secundário e sua detecção foi feita através da formação do complexo peroxidase-estreptavidina-biotina (K0679, Universal DakoCytomation LSAB + Kit, Peroxidase, Glostrup, Denmark). A reação imunohistoquímica foi identificada através da incubação com 3,3' diaminobenzidina (K3466, DAB, DakoCytomation) e os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Mayer.

Imagens digitais dos cortes corados foram obtidas (câmera LC Evolution e microscópio Olympus BX51, formato TIFF, 36-bit color, 1280x1024 pixels) e analisadas com software Image-Pro Plus, versão 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA). Uma ferramenta de seleção de pixels foi utilizada para selecionar as áreas da ilhota pancreática que apresentaram imunoreatividade ao GLUT-2, insulina ou glucagon. A área imuno-marcada foi expressa

como percentual da média da área-seccional da ilhota (densidade da imuno-marcação em %, calculado automaticamente através do software). Essas medidas foram obtidas em 10 ilhotas pancreáticas por animal.

2.1.1.5 Análise Estatística

Os dados foram expressos em média e erro padrão da média. Diferenças entre os grupos foram testadas pela análise de variância "one-way" (ANOVA) e pós-teste de Tukey (Versão Statistica 7.0, Statsoft, Tulsa, OK, EUA). O valor de $P \leq 0{,}05$ foi considerado estatisticamente significativo.

# 3 **RESULTADOS**

## 3.1 **Massa corporal e massa adiposa**

A administração da dieta HLS resultou em aumento significativo da massa corporal comparada com a dieta P (*P*<0,01). A suplementação com óleo de peixe no grupo HLS-Px resultou em menor ganho de massa corporal comparado com ambos os grupos P e HLS (*P* <0,01), sendo assim, após a ingestão do óleo de peixe, a massa corporal do grupo HLS-Px foi similar a massa corporal do grupo P, como demonstrada na Figura 2. O comprimento naso-anal dos animais não foi diferente entre os grupos estudados (Tabela 2).

A dieta HLS provocou significativo aumento da massa de gordura em ambas as gorduras retroperitoneal e epididimal (genital) (*P*<0,003) e, conseqüentemente, aumento no percentual de gordura total dos animais HLS comparados com os animais dos demais grupos (*P*<0,0002). Além disso, o tratamento com óleo de peixe no grupo HLS-Px, reduziu significativamente o percentual da gordura epididimal e a massa total de gordura em relação ao grupo HLS (*P*<0,03) (Tabela 2 e Figura 3).

**Tabela 2.** Parâmetros biométricos dos camundongos estudados (média ± EPM). As diferenças foram testadas com o teste one-way ANOVA e pós-teste de Tukey (*P*<0,05). Abreviações: CNA = comprimento naso-anal, GRP = gordura retroperitoneal, GEp = gordura epididimal, MP = massa do pâncreas. Grupos: P = grupo padrão, HLS = grupo dieta hiperlipídica e rica em sacarose, HLS-Px = grupo dieta hiperlipídica e rica em sacarose e tratamento com óleo de peixe. Os símbolos significam diferença estatística, quando [a]≠P e [b]≠HLS (*P*<0,05).

| **Parâmetros** | **Grupos** | | |
|---|---|---|---|
| | **P** | **HLS** | **HLS-Px** |
| CNA (cm) | 9,7±0,1 | 9,7±0,1 | 9,7±0,1 |
| GRP (g) | 0,16±0,02 | 0,38±0,04[a] | 0,29±0,02[b] |
| GEp (g) | 0,40±0,03 | 0,63±0,06[a] | 0,47±0,02[b] |
| MP (g) | 0,23±0,01 | 0,23±0,01 | 0,17±0,003[a][b] |

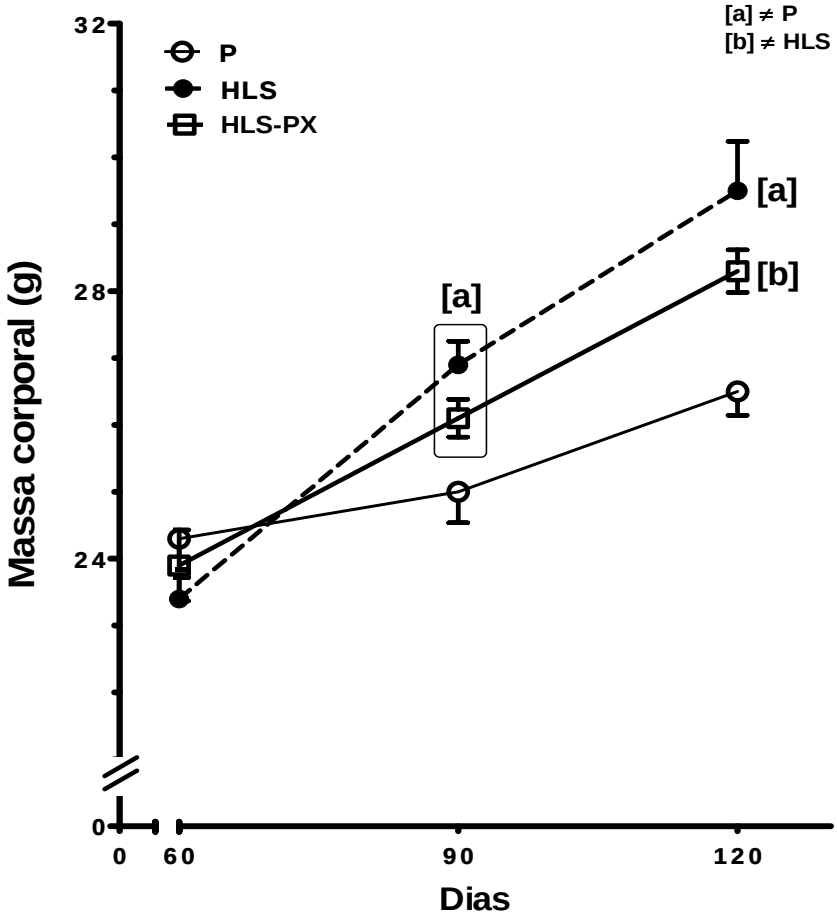


**Figura 2.** Massa corporal dos animais estudados aos 60, 90 e 120 dias (média ± EPM). Diferenças foram testadas com teste one-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Os símbolos acima significam diferença estatística ($P$<0,05). Grupos: P = dieta controle; HLS = dieta hiperlipídica e rica em sacarose; HLS-Px = dieta hiperlipídica e rica em sacarose com tratamento com óleo de peixe.

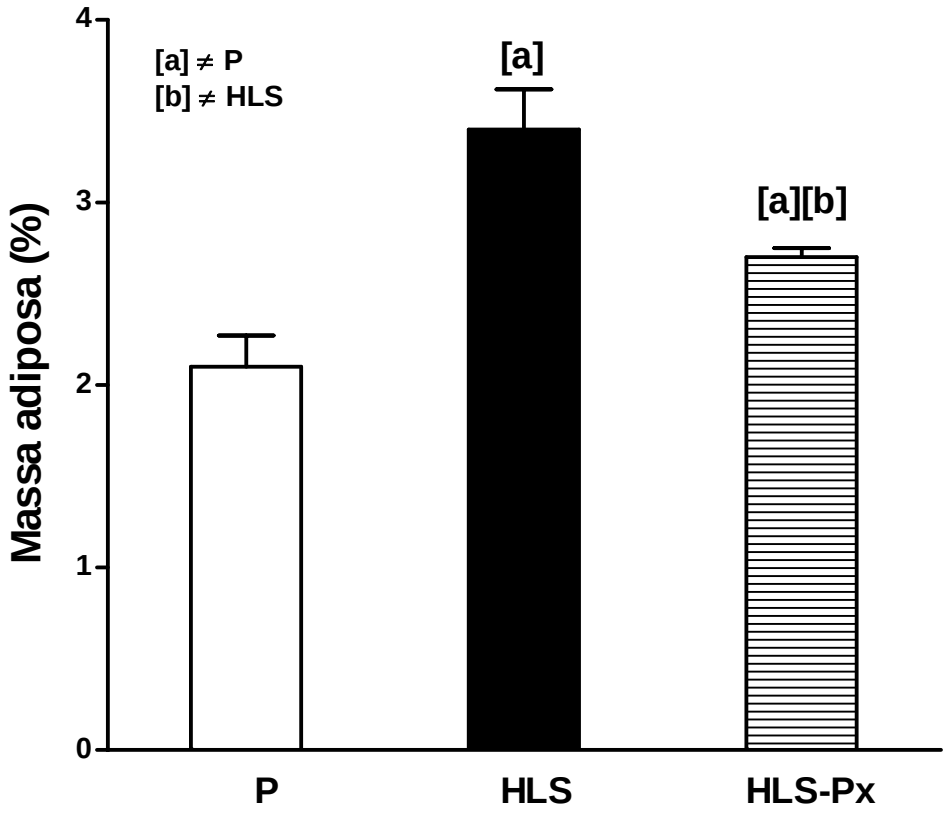


**Figura 3.** Massa Adiposa (média ± EPM). Diferenças foram testadas com teste one-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Os símbolos acima das barras significam diferença estatística ($P$<0,05). Grupos: P = dieta controle; HLS = dieta hiperlipídica e rica em sacarose; HLS-Px = dieta hiperlipídica e rica em sacarose com tratamento com óleo de peixe.

3.1.1 Parâmetros bioquímicos plasmáticos

A análise bioquímica do plasma está demonstrada na Tabela 3. Os níveis da glicemia de jejum e insulina não se mostraram diferentes entre os grupos experimentais, embora os animais que receberam dieta HLS, com ou sem tratamento, apresentassem uma tendência à elevação desses níveis. Entretanto, através da análise do HOMA, os animais HLS e HLS-Px apresentaram maiores valores em comparação com os animais do grupo P ($P<0,01$).

A dieta HLS resultou em aumento significativo nas concentrações de CT ($P<0,002$) e LDL ($P<0,005$) em ambos os grupos HLS e HLS-Px. Por outro lado, o tratamento com óleo de peixe aumentou significativamente as concentrações de HDL no grupo HLS-Px comparado com o grupo HLS ($P<0,05$). Além disso, o tratamento com óleo de peixe reduziu em cerca de 50% os níveis plasmáticos de TG no grupo HLS-Px em comparação com os grupos P e HLS ($P<0,01$).

**Tabela 3.** Dados bioquímicos do sangue (média ± EPM). Diferenças foram testadas com teste one-way ANOVA e pós-teste de Tukey ($P<0,05$). Abreviações: HDL = lipoproteína de alta densidade, HOMA-IR, LDL = lipoproteína de baixa densidade, CT = Colesterol total, TG = Triacilgliceróis. Os símbolos significam diferença estatística, quando [a]≠P e [b]≠HLS ($P<0,05$). Grupos: P = dieta controle; HLS = dieta hiperlipídica e rica em sacarose; HLS-Px = dieta hiperlipídica e rica em sacarose com tratamento com óleo de peixe.

| **Parâmetros** | **Grupos** | | |
|---|---|---|---|
| | **P** | **HLS** | **HLS-Px** |
| Glicose (mmol/L) | 6,2 ± 0,2 | 6,5 ± 0,2 | 6,8 ± 0,1 |
| Insulina (pmol/L) | 144,4 ± 14,1 | 164,5 ± 15,6 | 151,1 ±10,1 |
| HOMA-IR | 40,0 ± 1,5 | 47,7 ± 2,0[a] | 46,5 ± 1,4[a] |
| CT (mmol/L) | 2,7 ± 0,2 | 6,1 ± 1,0[a] | 7,0 ± 0,4[a] |
| HDL (mmol/L) | 1,91 ± 0,1 | 1,36 ± 0,14[a] | 1,78 ± 0,02[b] |
| LDL (mmol/L) | 0,42 ± 0,1 | 4,3 ± 1,0[a] | 5,0 ± 0,5[a] |
| TG (mmol/L) | 1,65 ± 0,08 | 1,80 ± 0,3 | 0,91 ± 0,1[a][b] |

3.1.1.1 Morfometria do adipócito

O grupo que recebeu dieta HLS apresentou maior diâmetro dos adipócitos comparado ao grupo que recebeu dieta padrão (+75%, *P*<0,0001). O diâmetro dos adipócitos diminuiu significativamente com o tratamento com óleo de peixe no grupo HLS-Px comparado com o grupo HLS (*P*<0,0001). Figura 4(a).

Fotomicrografias do tecido adiposo dos animais dos três grupos estudados. Figura 4(b) – Grupo P, demonstrando aparência normal dos adipócitos. Figura 4(c) – Grupo HLS, apresentando adipócitos hipertrofiados. Figura 4(d) – Grupo HLS-Px, demonstrando adipócitos de tamanho intermediário.

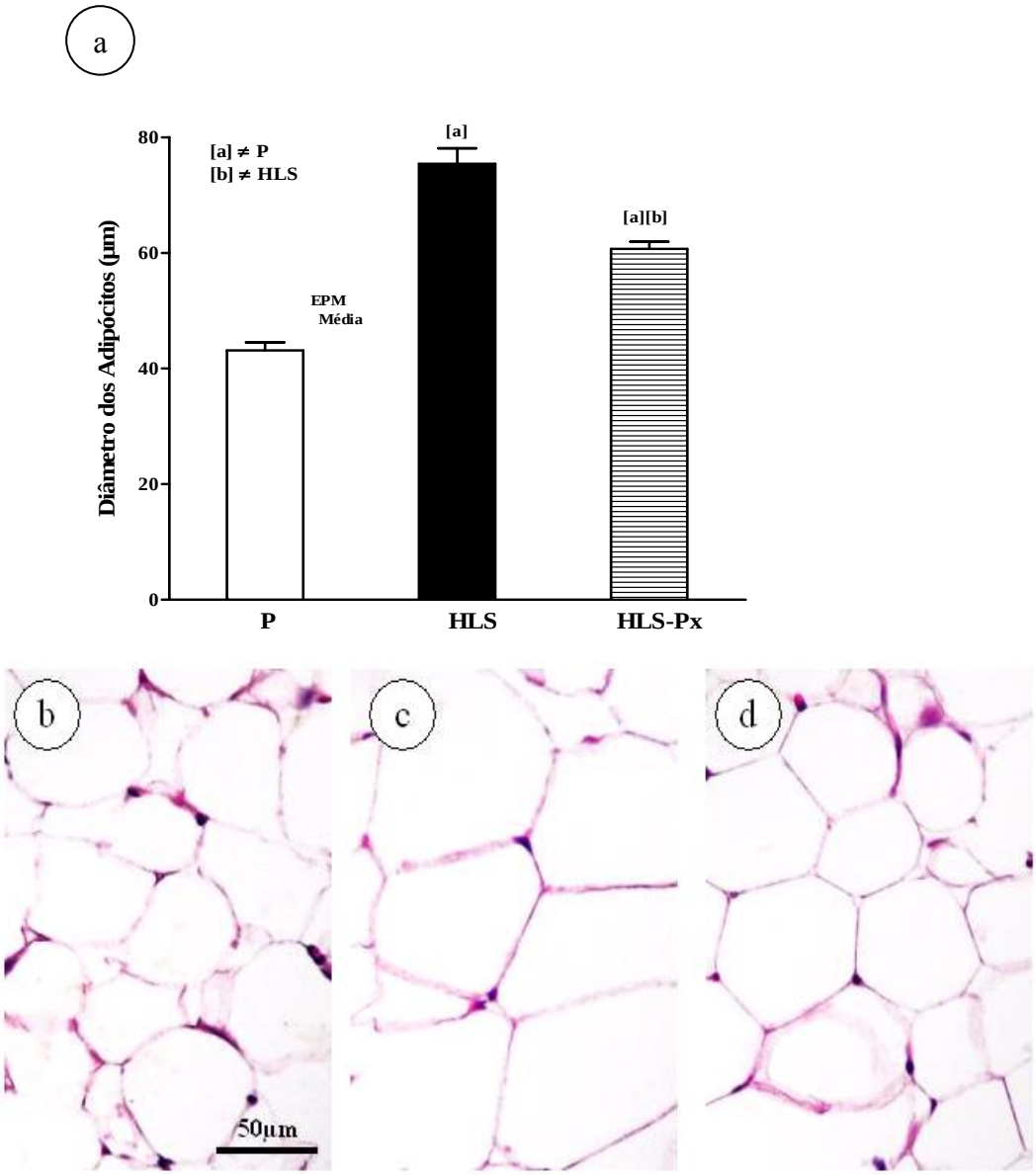

**Figura 4 (a).** Diâmetro dos adipócitos. Diferenças foram testadas com teste one-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Os símbolos acima das barras significam diferença estatística (*P*<0,05). Grupos: P = dieta controle; HLS = dieta hiperlipídica e rica em sacarose; HLS-Px = dieta hiperlipídica e rica em sacarose com tratamento com óleo de peixe.
Em b, c, d, fotomicrografias do tecido adiposo dos camundongos C57BL/6J coradas com Hematoxilina e Eosina (todas no mesmo aumento), (**b**) grupo C, aspecto normal dos adipócitos, (**c**) grupo HLS, adipócitos hipertrofiados, (**d**) grupo HLS-Px, tamanho intermediário dos adipócito.

3.1.1.2 Pâncreas

O grupo HLS-Px apresentou menor massa pancreática, quando comparado aos grupos HLS e P (P<0,05, Tabela 2). O número de ilhotas pancreáticas não diferiu entre os grupos (2131,0 ± 258,9 no grupo P; 2447,6 ±203,6 no grupo HLS e 2344,2 ±186,2 no grupo HLS-Px). Em contraste, as ilhotas pancreáticas do grupo HLS apresentaram maior diâmetro (170,3±12,3 µm) em comparação com o grupo P (121,6±2,7 µm) (*P*<0,001) e com o grupo HLS-Px (134,4±5,9 µm) (*P*<0,05). Além disso, o diâmetro das ilhotas pancreáticas dos grupos P e HLS-Px não apresentaram diferença estatística entre os dois grupos (Figura 5).

3.1.1.3 Expressão de insulina, glucagon, GLUT-2 e PCNA

Observamos imuno-marcação positiva para insulina, glucagon e GLUT-2 nas ilhotas pancreáticas de todos os grupos experimentais (Figura 6). No grupo P, a expressão de insulina representou 24% da área da ilhota pancreática, 14% para a expressão de glucagon e 19% para a expressão de GLUT-2 (Figura 7). Comparado ao grupo P, houve um aumento significativo na expressão de insulina no grupo HLS (+97%, *P*<0,0001) e no grupo HLS-Px (+42%, *P*<0,0001). Por outro lado, no grupo HLS, houve uma redução significativa na expressão do glucagon (-57%; *P*<0,0001) e na expressão do GLUT-2 (-70%; *P*<0,0001) em comparação com o grupo P. Não foram observadas diferenças na expressão do PCNA entre os grupos.

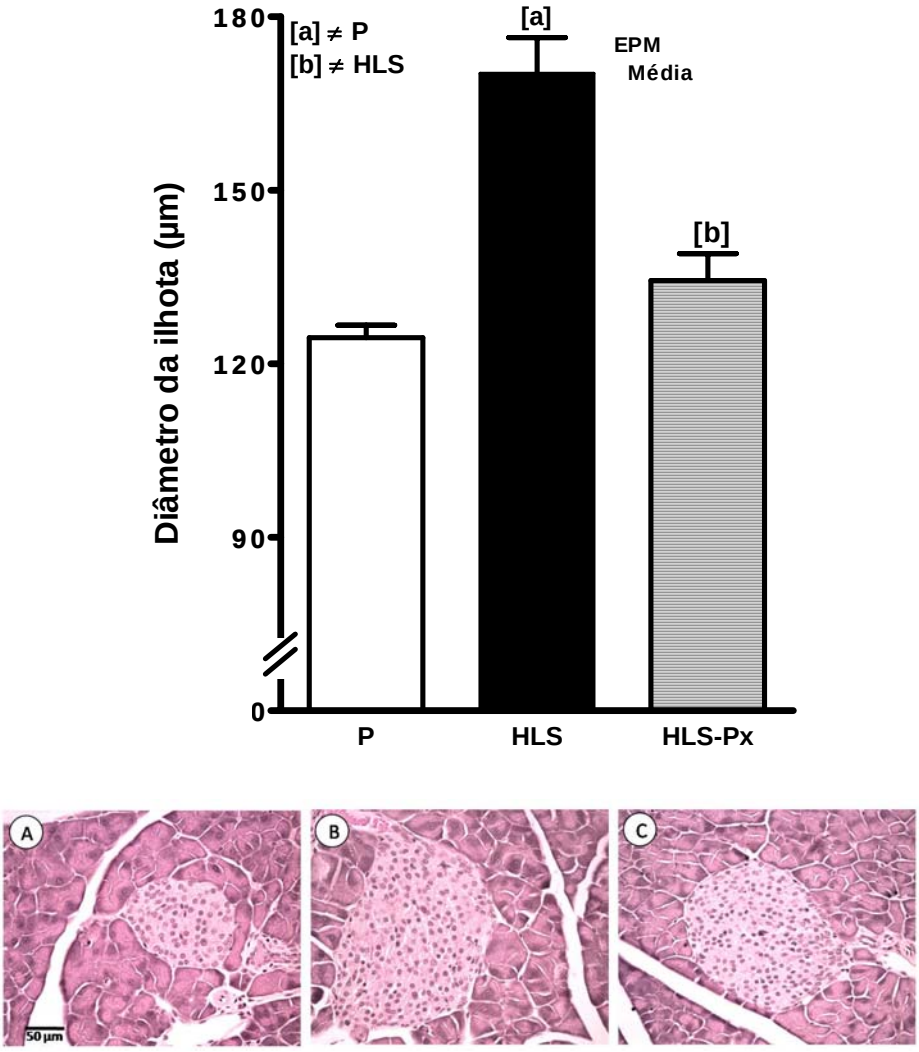


**Figura 5**. Diâmetro da ilhota pancreática. Diferenças foram testadas com teste one-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Os símbolos acima das barras significam diferença estatística ($P$<0,05). Grupos: P = dieta controle; HLS = dieta hiperlipídica e rica em sacarose; HLS-Px = dieta hiperlipídica e rica em sacarose com tratamento com óleo de peixe. Em A, B e C, fotomicrografias das ilhotas pancreáticas dos camundongos C57BL/6J coradas com Hematoxilina e Eosina (todas no mesmo aumento). 5-A - grupo P, ilhotas pancreáticas com diâmetro menor; 5-B - grupo HLS, ilhotas pancreáticas hipertrofiadas e 5-C - grupo HLS-Px, ilhotas pancreáticas com diâmetro intermediário.

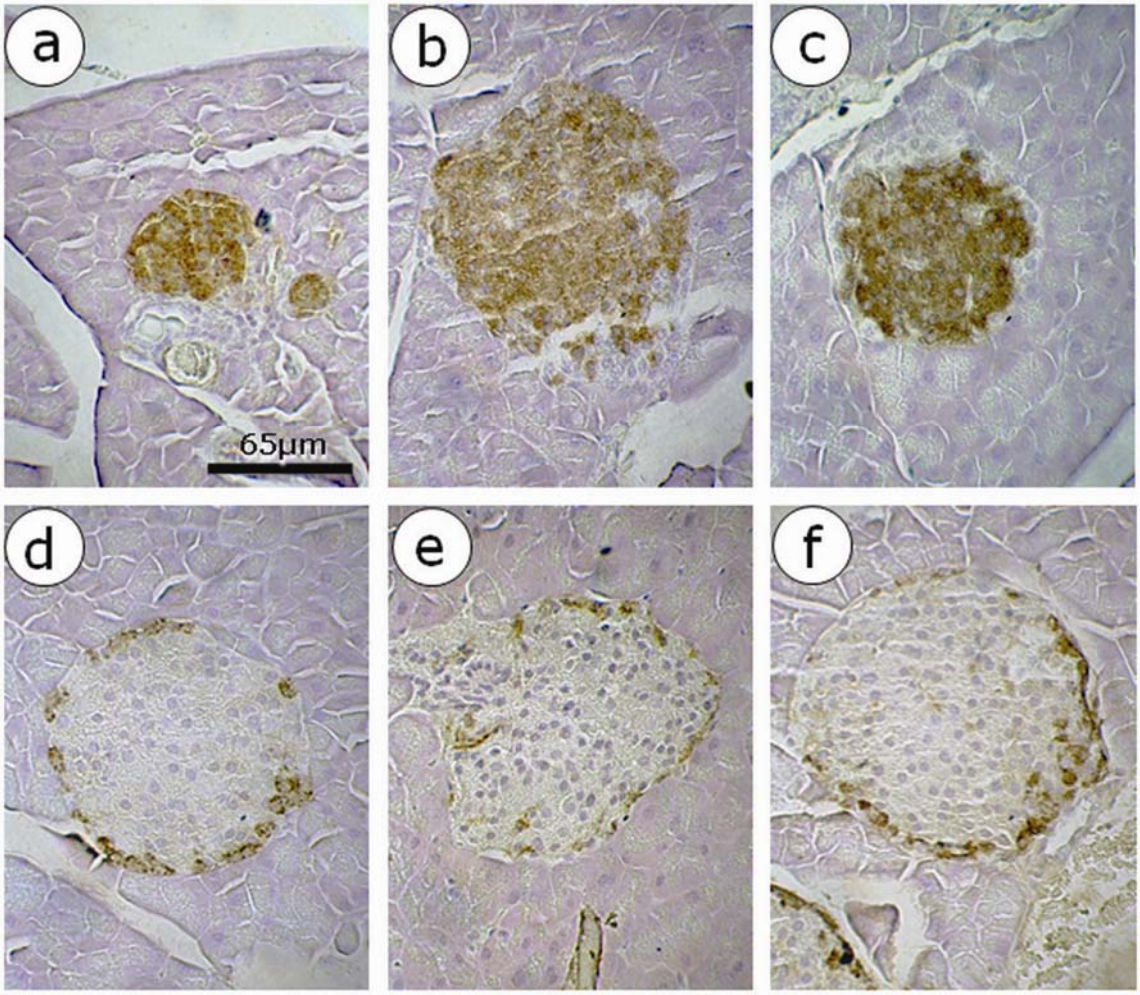


**Figura 6**. Fotomicrografias das ilhotas pancreáticas marcadas com diferentes anticorpos para mostrar a expressão de insulina e glucagon. Presença de células positivas para insulina na região central da ilhota pancreática (**a** - grupo P; **b** - grupo HLS, **c** - grupo HLS-Px; aumento X40); e células positivas para glucagon encontram-se na periferia da ilhota (**d** - grupo P; **e** - grupo HLS; **f** - grupo HLS-Px; aumento X40).

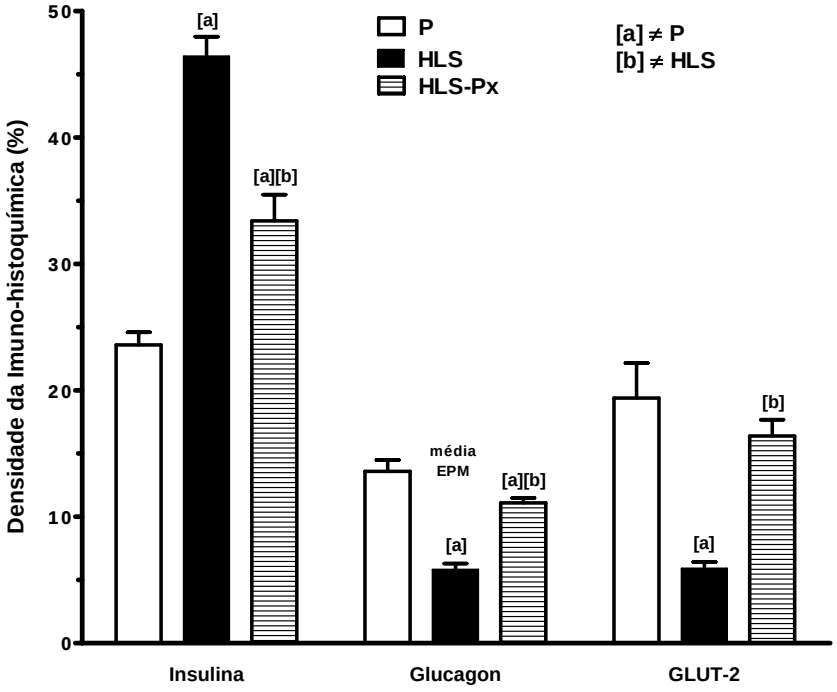


**Figura 7.** Densidade da marcação com imuno-histoquímica (%) para: Insulina, Glucagon e GLUT-2 (média ± EPM). Diferenças foram testadas com teste one-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Os símbolos acima das barras significam diferença estatística ($P<0,05$). Grupos: P = dieta controle; HLS = dieta hiperlipídica e rica em sacarose; HLS-Px = dieta hiperlipídica e rica em sacarose com tratamento com óleo de peixe.

# 4 **DISCUSSÃO**

O presente trabalho observou que o tratamento com óleo de peixe foi eficaz em atenuar mudanças metabólicas nos lipídios plasmáticos e morfológicas no tecido adiposo e estrutura pancreática de camundongos C57BL/6J alimentados com dieta hiperlipídica e rica em sacarose. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com óleo de peixe foi capaz de: i) reduzir do ganho da massa corporal; ii) melhorar o metabolismo lipídico com aumento dos níveis de HDL e decréscimo dos níveis de TG; iii) reduzir a massa total de gordura e o diâmetro dos adipócitos; iv) amenizar o dano à estrutura pancreática, reduzindo a hipertrofia das ilhotas pancreáticas e aumentando a expressão de GLUT-2 e a expressão de glucagon no grupo tratado.

Os resultados mostraram que a dieta HLS pode provocar ganho de massa corporal e favorecer o desenvolvimento de fatores de risco associados à síndrome metabólica. É importante ressaltar que a dieta HLS não apresentava deficiência de proteína ou de qualquer outro nutriente (vitaminas, minerais ou fibras), pois seguimos as recomendações da AIN-M 93 na confecção das dietas experimentais.

Observamos que o tratamento com óleo de peixe, rico em AG da família n-3, especialmente o EPA e DHA, nos animais alimentados com dieta HLS foi eficaz na redução do ganho de massa corporal e, conseqüentemente, menor estoque de gordura no tecido adiposo. Em relação aos efeitos do óleo de peixe sobre o metabolismo de lipídios, nossos resultados estão de acordo com trabalhos anteriores. Nós também observamos que os camundongos C57BL/6 alimentados com dieta HLS e tratados com óleo de peixe apresentaram menores valores de TG plasmático, porém, sem detectar mudanças nos níveis séricos de glicose e insulina. O óleo de peixe é reconhecido como um potente estimulador da β-oxidação dos AG. A ação aumentada da β-oxidação pode ter afetado diretamente a síntese de TG com concomitante diminuição da secreção de TG, ambos os fatores que contribuem para os efeitos hipolipêmicos do óleo de peixe [17].

Os AG da família n-3, principalmente o DHA, diminuem os níveis de RNAm de diversas enzimas, incluindo a enzima AG sintase e a lipoproteína lipase (LPL) , no tecido adiposo retroperitoneal de ratos . Além do mais, há uma preferência pelos AG n-3 para a β-oxidação e mobilização no tecido adiposo. O DHA também é reconhecido como um ativador do PPAR-α, que pertence à superfamília dos receptores nucleares e desenvolve um importante papel no

metabolismo lipídico. A ativação do PPAR-α induz diversos genes responsáveis pela codificação de proteínas e que agem no transporte lipídico, na β-oxidação e na termogênese. Essas ações poderiam explicar a diminuição do percentual de massa adiposa, do tecido adiposo genital e da área seccional do adipócito nos camundongos tratados com óleo de peixe em nosso estudo.

Baseado no método do fracionator-físico, nossos resultados demonstraram que o número de ilhotas pancreáticas não foi afetado nos grupos estudados. Entretanto, nós encontramos um aumento acentuado no diâmetro das ilhotas do grupo HLS comparado com os grupos P e HLS-Px, sugerindo hipertrofia das ilhotas pancreáticas.

Sabemos que uma dieta hiperlipídica causa resistência à insulina, resultando no desenvolvimento e/ou exacerbação do DMII [69, 70]. Dieta hiperlipídica contendo mais de 40% da energia proveniente do lipídio, aumenta a massa das células β através da hipertrofia e neogênese como um mecanismo compensatório contra a resistência à insulina e tentativa de criar uma glicemia normal [71, 72].

No presente estudo, não foi encontrada marcação positiva para o PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen),* marcador de proliferação celular, nas ilhotas pancreáticas dos grupos estudados, logo o aumento no diâmetro das ilhotas pancreáticas encontrado no presente estudo, provavelmente deve-se a hipertrofia ao invés de hiperplasia das células pancreáticas. Alguns autores demonstraram que a expansão das ilhotas pancreáticas após consumo de dieta hiperlipídica ocorre devido à hiperinsulinemia para compensar a resistência à insulina, mantendo a glicemia normal [71, 72]. Contudo, o consumo de dieta hiperlipídica durante longo período pode causar liberação insuficiente de insulina proveniente da senescência das células β, indução do DMII, redução da expressão da glicoquinase e da GLUT-2 [73].

A literatura enfatiza que não é apenas a quantidade, mas também o tipo de AG que induz o desenvolvimento do DMII. Por exemplo, dietas isoenergéticas que diferem apenas do tipo de lipídio (e, conseqüentemente, o tipo de AG) causam diferentes efeitos sobre a sensibilidade à insulina [74], como os AGPI, EPA e DHA, que são capazes de prevenir não só a dislipidemia, como também a resistência à insulina em ratos alimentados com dieta hiperlipídica [12] ou com dieta rica em sacarose [75].

Ademais, nossos resultados mostraram que administração de óleo de peixe aumentou a expressão do GLUT-2, mesmo nos camundongos que receberam dieta hiperlipídica e rica em

sacarose, mostrando o efeito protetor do óleo de peixe. Esse resultado é bastante promissor, uma vez que sabemos que a dieta hiperlipídica diminui tanto a expressão de RNAm para GLUT-2 como a sua translocação do plasma para a membrana [73]. Uma alteração na expressão do GLUT-2 é uma indicação precoce do metabolismo de carboidratos, já que a expressão do GLUT-2 reduzida pode prejudicar a sensibilidade à glicose e resultar em hiperglicemia. Nos nossos resultados, encontramos alterações na expressão do GLUT-2 nos animais do grupo HLS, antes mesmo de serem detectadas elevações plasmáticas na concentração de glicose e /ou insulina.

O fator de transcrição, Pdx-1, é requerido em células β para a manutenção da produção da insulina e para a homeostasia da glicose [76], e também regula a expressão dos genes sensibilizadores de glicose e de GLUT-2 [77]. Por exemplo, a translocação nuclear do Pdx-1 em ilhotas pancreáticas de camundongos diminuiu após consumo de dieta hiperlipídica [78]. O tratamento de ilhotas pancreáticas isoladas com ácido pamítico (um dos AG saturados mais comuns encontrados em plantas e em gorduras de fonte de animais), também resultou em redução no RNAm de algumas proteínas e do Pdx-1. Além disso, a exposição dessas ilhotas ao ácido palmítico prejudicou a atividade de ligação do Pdx-1 a elementos reguladores da insulina e GLUT-2. Em contraste, a expressão de RNAm da pré-pró-insulina, Pdx-1 e GLUT-2 foi super-regulada, através do consumo do ácido oléico, e observou-se elevação da secreção basal de insulina pelas células β pancreáticas.

Quanto à expressão da insulina, o óleo de peixe demonstrou efeitos benéficos sobre as células β, mantendo a expressão de insulina próxima aos dos valores do grupo controle, mesmo com os animais recebendo concomitantemente a dieta HLS. Este resultado sugere que as células β pancreáticas do grupo tratado com óleo de peixe foram mais sensíveis à ação da insulina do que os animais do grupo HLS sem tratamento. Esse parâmetro corrobora com nossos resultados do GLUT-2, onde o grupo HLS-Px, apresentou a expressão desse transportador preservada, quando comparada com o grupo HLS que teve a expressão de GLUT-2 reduzida.

# 5 **CONCLUSÃO**

O presente estudo demonstrou que, em modelo animal de síndrome metabólica utilizando camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica e rica em sacarose, o tratamento com óleo de peixe foi capaz de:

• Reduzir o ganho de massa corporal;

• Diminuir os níveis plasmáticos de TG, sem alterar a glicose plasmática;

• Prevenir o ganho de massa de gordura corporal, assim como a hipertrofia dos adipócitos e das ilhotas pancreáticas.

• Prevenir a redução na expressão de glucagon e GLUT-2 e prevenir o aumento da expressão da insulina.

## REFERÊNCIAS


1. Eckel, R., S. Grundy, and P. Zimmnet, *The metabolic syndrome.* Lancet, 2005. **365**: p. 1415-28.

2. Reaven, G.M., *Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease.* Diabetes, 1988. **37**(12): p. 1595-607.

3. Alberti KGMM, Z.P., *For the WHO Consultation: definition, diagnosis and classification of the diabetes mellitus. Part 1.* Diabet Med. , 1998. **15**: p. 539-53.

4. American Heart Association, A., *Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults: executive summary of the 3rd report of the adult treatment panel.* JAMA, 2001. **285**: p. 2486-97.

5. Sociedade Brasileira de Hipertensão, S., *I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica.*Arq Bras Cardiol. , 2005. **84** (supl I): p.1-28.

6. Boden, G., *Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM.* Diabetes, 1997. **46**(1): p. 3-10.

7. McGarry, J.D. and R.L. Dobbins, *Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion.* Diabetologia, 1999. **42**(2): p. 128-38.

8. Aguila, M.B., et al., *Effects of long-term intake of edible oils on hypertension and myocardial and aortic remodelling in spontaneously hypertensive rats.*J Hypertension, 2004. **22**(5): p. 921-9.

9. Catta-Preta, M., et al., *Adult cardiorenal benefits from postnatal fish oil supplement in rat offspring of low-protein pregnancies.* Life Sci, 2006. **80**(3): p. 219-29.

10. Leaf, A., et al., *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. **107**(21): p. 2646-52.

11. Leaf, A., et al., *Membrane effects of the n-3 fish oil fatty acids, which prevent fatal ventricular arrhythmias.* J Membr Biol, 2005. **206**(2): p. 129-39.

12. Storlien, L.H., et al., *Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats.* Science, 1987. **237**(4817): p. 885-8.

13. Podolin, D.A., et al., *Menhaden oil prevents but does not reverse sucrose-induced insulin resistance in rats.* Am J Physiol, 1998. **274**(3 Pt 2): p. R840-8.

14. Soria, A., et al., *Dietary fish oil reverse epididymal tissue adiposity, cell hypertrophy and insulin resistance in dyslipemic sucrose fed rat model small star, filled.* J Nutr Biochem, 2002. **13**(4): p. 209-218.

15.Ford, E.S., W.H. Giles, and W.H. Dietz, *Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey.* JAMA, 2002. **287**(3): p. 356-9.

16.Ford, E.S. and W.H. Giles, *A comparison of the prevalence of the metabolic syndrome using two proposed definitions.* Diabetes Care, 2003. **26**(3): p. 575-81.

17.Lombardo, Y.B. and A.G. Chicco, *Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review.* J Nutr Biochem, 2006. **17**(1): p. 1-13.

18.Clamp, A.G., et al., *The influence of dietary lipids on the composition and membrane fluidity of rat hepatocyte plasma membrane.* Lipids, 1997. **32**(2): p. 179-84.

19.Clark, R.B., et al., *The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses.* J Immunol, 2000. **164**(3): p. 1364-71.

20.Scharf, M.T. and R.S. Ahima, *Gut peptides and other regulators in obesity.* Semin Liver Dis, 2004. **24**(4): p. 335-47.

21.Fox, C.S., et al., *Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study.* Circulation, 2007. **116**(1): p. 39-48.

22.Dizdar, O. and E. Alyamac, *Obesity: an endocrine tumor?* Med Hypotheses, 2004. **63**(5): p. 790-2.

23.Lopez, I.P., et al., *High-fat feeding period affects gene expression in rat white adipose tissue.* Mol Cell Biochem, 2005. **275**(1-2): p. 109-15.

24.Deckelbaum, R.J. and C.L. Williams, *Childhood obesity: the health issue.* Obes Res, 2001. **9 Suppl 4**: p. 239S-243S.

25.Hirsch, J., *Can we modify the number of adipose cells?* Postgrad Med, 1972. **51**(5): p. 83-6.

26.Siiteri, P.K., *Adipose tissue as a source of hormones.* Am J Clin Nutr, 1987. **45**(1 Suppl): p. 277-82.

27.Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.* Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.

28.Trayhurn, P. and J.H. Beattie, *Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ.* Proc Nutr Soc, 2001. **60**(3): p. 329-39.

29.Arner, P., *The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones.* Trends Endocrinol Metab, 2003. **14**(3): p. 137-45.

30.Arner, P., *Free fatty acids--do they play a central role in type 2 diabetes?* Diabetes Obes Metab, 2001. **3 Suppl 1**: p. S11-9.

31. Lofgren, P., et al., *Secretion of tumor necrosis factor-alpha shows a strong relationship to insulin-stimulated glucose transport in human adipose tissue.* Diabetes, 2000. **49**(5): p. 688-92.

32. Greenberg, A.S. and M.L. McDaniel, *Identifying the links between obesity, insulin resistance and beta-cell function: potential role of adipocyte-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes.* Eur J Clin Invest, 2002. **32 Suppl 3**: p. 24-34.

33. Chandran, M., et al., *Adiponectin: more than just another fat cell hormone?* Diabetes Care, 2003. **26**(8): p. 2442-50.

34. Hall, J.E., D.A. Hildebrandt, and J. Kuo, *Obesity hypertension: role of leptin and sympathetic nervous system.* Am J Hypertens, 2001. **14**(6 Pt 2): p. 103S-115S.

35. Flier, J.S., *Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic.* Cell, 2004. **116**(2): p. 337-50.

36. McClenaghan, N.H., *Physiological regulation of the pancreatic {beta}-cell: functional insights for understanding and therapy of diabetes.* Exp Physiol, 2007. **92**(3): p. 481-96.

37. Surwit, R.S., et al., *Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice.* Metabolism, 1995. **44**(5): p. 645-51.

38. Petro, A.E., et al., *Fat, carbohydrate, and calories in the development of diabetes and obesity in the C57BL/6J mouse.* Metabolism, 2004. **53**(4): p. 454-7.

39. Pacini, G., K. Thomaseth, and B. Ahren, *Contribution to glucose tolerance of insulin-independent vs. insulin-dependent mechanisms in mice.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **281**(4): p. E693-703.

40. Boden, G. and G.I. Shulman, *Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction.* Eur J Clin Invest, 2002. **32 Suppl 3**: p. 14-23.

41. Matsuzawa, Y., T. Funahashi, and T. Nakamura, *Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances.* Ann N Y Acad Sci, 1999. **892**: p. 146-54.

42. Wolf, G., *Adiponectin: a regulator of energy homeostasis.* Nutr Rev, 2003. **61**(8): p. 290-2.

43. Havel, P.J., *Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism.* Diabetes, 2004. **53 Suppl 1**: p. S143-51.

44. Hu, E., P. Liang, and B.M. Spiegelman, *AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity.* J Biol Chem, 1996. **271**(18): p. 10697-703.

45. Hotta, K., et al., *Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(6): p. 1595-9.

46.Fruebis, J., et al., *Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 2005-10.

47.Yamauchi, T., et al., *Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase.* Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1288-95.

48.Combs, T.P., et al., *Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30.* J Clin Invest, 2001. **108**(12): p. 1875-81.

49.Yamauchi, T., et al., *The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity.* Nat Med, 2001. **7**(8): p. 941-6.

50.Yamauchi, T., et al., *Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects.* Nature, 2003. **423**(6941): p. 762-9.

51.Kharroubi, I., et al., *Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **312**(4): p. 1118-22.

52.Rakatzi, I., et al., *Adiponectin counteracts cytokine- and fatty acid-induced apoptosis in the pancreatic beta-cell line INS-1.* Diabetologia, 2004. **47**(2): p. 249-58.

53.Harper, C.R. and T.A. Jacobson, *The fats of life: the role of omega-3 fatty acids in the prevention of coronary heart disease.* Arch Intern Med, 2001. **161**(18): p. 2185-92.

54.O'Keefe, J.H., Jr. and W.S. Harris, *From Inuit to implementation: omega-3 fatty acids come of age.* Mayo Clin Proc, 2000. **75**(6): p. 607-14.

55.Ferretti, A. and V.P. Flanagan, *Antithromboxane activity of dietary alpha-linolenic acid: a pilot study.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1996. **54**(6): p. 451-5.

56.Hirafuji, M., et al., *Cardiovascular protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids with special emphasis on docosahexaenoic acid.* J Pharmacol Sci, 2003. **92**(4): p. 308-16.

57.Lee, K.W. and G.Y. Lip, *The role of omega-3 fatty acids in the secondary prevention of cardiovascular disease.* QJM, 2003. **96**(7): p. 465-80.

58.Covington, M.B., *Omega-3 fatty acids.* Am Fam Physician, 2004. **70**(1): p. 133-40.

59.Engler, M.M., et al., *Effects of docosahexaenoic acid on vascular pathology and reactivity in hypertension.* Exp Biol Med (Maywood), 2003. **228**(3): p. 299-307.

60.Lombardo, Y.B., et al., *Dietary fish oil normalize dyslipidemia and glucose intolerance with unchanged insulin levels in rats fed a high sucrose diet.* Biochim Biophys Acta, 1996. **1299**(2): p. 175-82.

61.Damsgaard, C.T., H. Frokiaer, and L. Lauritzen, *The effects of fish oil and high or low linoleic acid intake on fatty acid composition of human peripheral blood mononuclear cells.* Br J Nutr, 2008. **99**(1): p. 147-54.

62.Couet, C., et al., *Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults.* Int J Obes Relat Metab Disord, 1997. **21**(8): p. 637-43.

63. Clarke, S.D., *Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome.* J Nutr, 2001. **131**(4): p. 1129-32.

64. Bishop-Bailey, D., *Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system.* Br J Pharmacol, 2000. **129**(5): p. 823-34.

65. Devchand, P.R., et al., *The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control.* Nature, 1996. **384**(6604): p. 39-43.

66. Reeves, P.G., F.H. Nielsen, and G.C. Fahey, 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. **123**(11): p. 1939-51.

67. Bock, T., B. Pakkenberg, and K. Buschard, *Increased islet volume but unchanged islet number in ob/ob mice.* Diabetes, 2003. **52**(7): p. 1716-22.

68. Gundersen, H.J., *Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson.* J Microsc, 1986. **143**(Pt 1): p. 3-45.

69. Kraegen, E.W., et al., *The role of lipids in the pathogenesis of muscle insulin resistance and beta cell failure in type II diabetes and obesity.* Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2001. **109 Suppl 2**: p. S189-201.

70. Storlien, L.H., et al., *Diet composition and insulin action in animal models.* Br J Nutr, 2000. **83 Suppl 1**: p. S85-90.

71. Flier, S.N., R.N. Kulkarni, and C.R. Kahn, *Evidence for a circulating islet cell growth factor in insulin-resistant states.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7475-80.

72. Sone, H. and Y. Kagawa, *Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice.* Diabetologia, 2005. **48**(1): p. 58-67.

73. Kim, Y., et al., *Effect of high-fat diet on the gene expression of pancreatic GLUT2 and glucokinase in rats.* Biochem Biophys Res Commun, 1995. **208**(3): p. 1092-8.

74. Sunehag, A.L., et al., *Effects of dietary macronutrient intake on insulin sensitivity and secretion and glucose and lipid metabolism in healthy, obese adolescents.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(8): p. 4496-502.

75. Luo, J., et al., *Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids improve adipocyte insulin action and glucose metabolism in insulin-resistant rats: relation to membrane fatty acids.* J Nutr, 1996. **126**(8): p. 1951-8.

76. Ahlgren, U., et al., *beta-cell-specific inactivation of the mouse Ipf1/Pdx1 gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes.* Genes Dev, 1998. **12**(12): p. 1763-8.

77. Waeber, G., et al., *Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor.* Mol Endocrinol, 1996. **10**(11): p. 1327-34.

78. Reimer, M.K. and B. Ahren, *Altered beta-cell distribution of pdx-1 and GLUT-2 after a short-term challenge with a high-fat diet in C57BL/6J mice*. Diabetes, 2002. **51 Suppl 1**: p. S138-43.

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCÂNTARA GOMES
COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

# CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEA/159/2006** sobre **"Efeitos da administração da dieta de alta densidade energética e suplementação com óleo de peixe sobre parâmetros cardiovasculares e renais em camundongos C57BL/6"** sob a responsabilidade de **Márcia Barbosa Águila** 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 **13/11/2006.** Este certificado expira em **13/11/2008.**

Rio de Janeiro, 13 de Novembro de 2006.

Antonio Carlos da Silva
Prof. Adjunto – Mat. 4392-2
Inst. Biologia UFRJ

Prof. Antonio Carlos da Silva
Coordenador – CEA/IBRAG/UERJ

Rua Prof. Manoel de Abreu, 48 - Maracanã - CEP. 20 550-170 - Rio de Janeiro, RJ - Brasil
Telefone 2587-6488