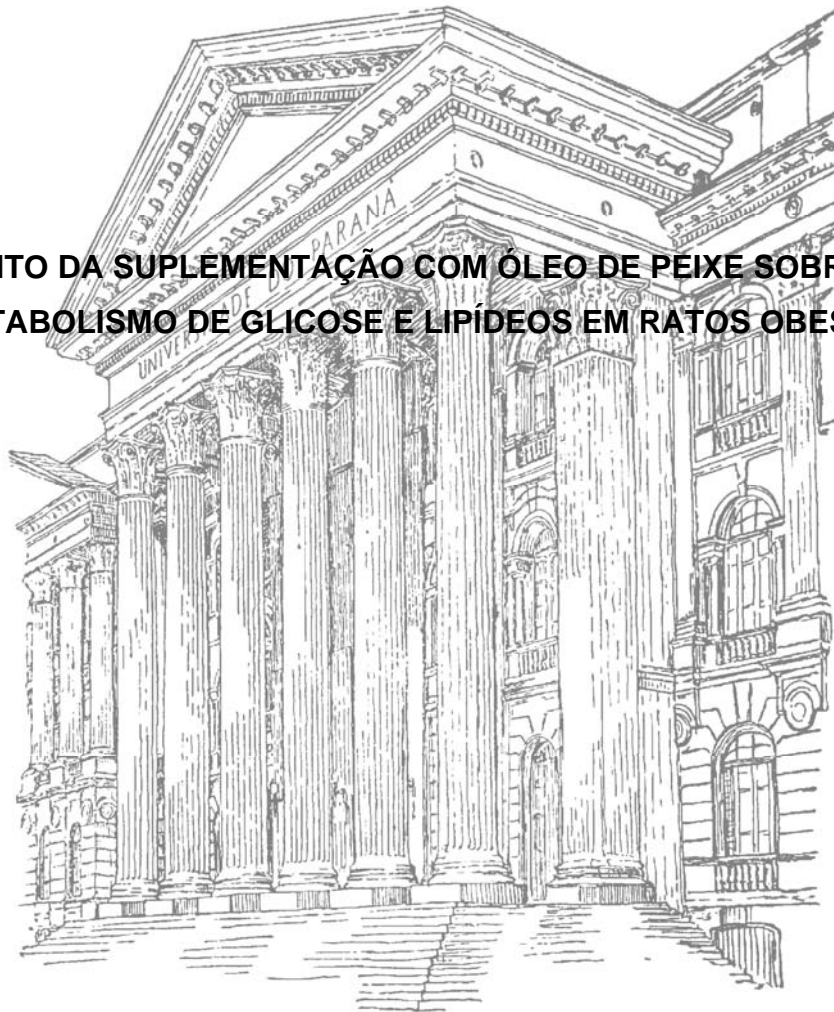


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RICARDO KEY YAMAZAKI

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE SOBRE O
METABOLISMO DE GLICOSE E LÍPIDEOS EM RATOS OBESOS**



CURITIBA

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

RICARDO KEY YAMAZAKI

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE SOBRE O
METABOLISMO DE GLICOSE E LIPÍDEOS EM RATOS OBESOS**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de doutor em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

CURITIBA

2010

“Nossa recompensa se encontra no esforço e não no resultado. Um esforço total é uma vitória completa.”

Mahatma Gandhi (1869 -1948)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo Prof^o Dr. Luiz Cláudio Fernandes. Obrigado pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório nestes últimos 10 anos, período o qual pude realizar o estágio voluntário, iniciação científica, mestrado e, finalmente, o doutorado. Muito obrigado por tudo, principalmente pelos ensinamentos e pela amizade durante todos estes anos.

Ao meu pai Dr. Isac. Obrigado pai pelo seu total apoio em todos estes anos de estudo.

À minha mãe Mônica Kazue Yamazaki (*in memoriam*) pelo seu amor.

À minha esposa Bia, amor da minha vida, pelo apoio, confiança e dedicação durante estes quatro anos de doutorado.

Aos amigos do labmetab. Todo este trabalho só foi possível ser realizado com a ajuda de toda equipe do nosso laboratório. Um obrigado a todos: Gleisson, Everson, Dani, Isa, Júlia, Adri, Marcelo, Dalton, Juliano, Ricelli, Gina, Marcelo, Thiago, Cíntia, Sandro e Katya. Foi muito bom trabalhar com todos vocês.

Aos professores da banca pelas críticas ao trabalho.

Aos funcionários do biotério Cândido e Luizão por toda ajuda relacionada à manutenção dos animais.

Ao Nino e equipe do laboratório de histotecnologia pelo preparo das lâminas para microscopia.

À professora Dorly pelo auxílio na análise das lâminas de microscopia.

À CAPES e CNPq pelo financiamento da pesquisa.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido araquidônico

AG – Ácido Graxo

AgRP – Peptídeo relacionado ao agouti

CART – Transcrição regulada pela cocaína e anfetamina

COX – Ciclooxigenase

DAG – Diacilglicerol

EPA – Ácido eicosapentaenóico

GLUT – Transportador de glicose

HDL – Lipoproteína de alta densidade

ICAM-1 – Molécula de adesão intracelular-1

IL-6 – Interleucina 6

IMC – Índice de massa corpórea

IRS – Substrato do receptor de Insulina

LOX – Lipoxigenase

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno

MCP-1 – Proteína quimioatrativa de monócito – 1

NO – Óxido Nítrico

NPY – Neuropeptídeo Y

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAI-1 – Inibidor do ativador de plasminogênio-1

PCR – Proteína C reativa

PG – Prostaglandina

PI3K – Fosfatidil inositol 3 quinase

PKC – Proteína quinase C

POMC – Pro-opiomelanocortina

PPAR – Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos

RBP4 – Proteína ligadora de retinol 4

TAG – Triacilglicerol

TLR – Receptor Toll-like

TNF- α – Fator de necrose tumoral – α

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Relação entre risco de obesidade, atividade física e restrição calórica (adaptado de HILL e PETERS, 1998)	4
Figura 2: Esquema dos efeitos gerais da insulina (adaptado de SALTIEL e KAHN, 2001)	6
Figura 3: Esquema da sinalização da insulina (adaptado de SALTIEL; KAHN, 2001)	8
Figura 4: Relação entre obesidade e resistência à insulina (adaptado de ROSEN; SPIEGELMAN, 2006)	9
Figura 5: Infiltração de macrófagos no tecido adiposo (adaptado de WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2003)	13
Figura 6: Diferentes tipos de linfócitos e macrófagos ativados em indivíduos obesos e não obesos (adaptado de LUMENG <i>et al.</i> , 2009)	13
Figura 7: "Crosstalking" entre via de sinalização da insulina e inflamatória (adaptado de DE LUCA; OLEFSKY, 2008)	14
Figura 8: Formação de eicosanóides a partir do AA e EPA (adaptado de SIMOPOULOS, 2010)	17
Figura 9: Percentual de energia a partir de ácidos graxos ingerida pelo homem desde a época paleolítica até a atualidade (adaptado de SIMOPOULOS, 1999)	18
Figura 10: Relação entre o consumo de gorduras na dieta e a prevalência de diabetes tipo II (adaptado de SIMOPOULOS, 1999)	19
Figura 11: Esquema do protocolo experimental	25
Figura 12: A. Kitt dos animais com 90 dias; B. Kitt dos animais com 120 dias. * quando comparado com o grupo C (teste "t" student); # quando comparado com o grupo Ob (One way ANOVA com pós-teste de Tukey).	32
Figura 13: A. Peso do tecido adiposo epididima dos grupos C (n=17), OP (n=17), GC (n=20), Ob (n=18), ObOP (n=20), ObGC (n=20); B. Peso do tecido adiposo retroperitoneal dos grupos C (n=18), OP (n=19), GC (n=20), Ob (n=18), ObOP (n=21), ObGC (n=20). * quando comparado com o grupo C (teste "t" student).....	33
Figura 14: A. Glicemia dos grupos C (n=17), OP (n=20), GC (n=20), Ob (n=17), ObOP (n=20), ObGC (n=20); B. HDL dos grupos C (n=14), OP (n=17), GC (n=18), Ob (n=17), ObOP (n=20), ObGC (n=20); C. Colesterolemia dos grupos C (n=15), OP (n=18), GC (n=18), Ob (n=11), ObOP (n=16), ObGC (n=20); D. Triacilglicerolemia dos grupos C (n=12), OP (n=17), GC (n=11), Ob (n=11), ObOP (n=13), ObGC (n=17). * quando comparado com o grupo C (teste "t" student e One way ANOVA com pós-teste de Tukey); # quando comparado com o grupo Ob (One way ANOVA com pós-teste de Tukey).	34
Figura 15: Produção de lactato pelo músculo incubado dos grupos C (n=31), OP (n=32), GC (n=32), C+I (n=31), OP+I (n=32), GC+I (n=32) Ob (n=26), ObOP (n=37), ObGC (n=36), Ob+I (n=25), ObOP+I (n=35), ObGC+I (n=44). * quando comparado com seu respectivo grupo controle (One way ANOVA com pós-teste de Tukey); # quando comparado com seu respectivo grupo sem estímulo (teste "t" student).	36
Figura 16: Síntese de glicogênio no músculo sóleo incubado dos grupos C (n=31), OP (n=32), GC (n=32), C+I (n=31), OP+I (n=32), GC+I (n=32) Ob (n=26), ObOP (n=37), ObGC (n=36), Ob+I (n=25), ObOP+I (n=35), ObGC+I (n=44). * quando comparado com seu respectivo grupo controle (One way ANOVA com pós-teste de Tukey); # quando comparado com seu respectivo grupo sem estímulo (teste "t" student).....	38

Figura 17: Descarboxilação do músculo sóleo incubado dos grupos C (n=21), OP (n=25), GC (n=21), C+I (n=22), OP+I (n=18), GC+I (n=21) Ob (n=16), ObOP (n=32), ObGC (n=19), Ob+I (n=19), ObOP+I (n=31), ObGC+I (n=31). * quando comparado com seu respectivo grupo controle (One way ANOVA com pós-teste de Tukey); # quando comparado com seu respectivo grupo sem estímulo (teste “t” student).	39
Figura 18: Produção de lactato pelo tecido adiposo epididimal incubado dos grupos C (n=29), OP (n=30), GC (n=34), C+I (n=32), OP+I (n=36), GC+I (n=43) Ob (n=33), ObOP (n=34), ObGC (n=31), Ob+I (n=34), ObOP+I (n=35), ObGC+I (n=44). * quando comparado com seu respectivo grupo controle (One way ANOVA com pós-teste de Tukey); # quando comparado com seu respectivo grupo sem estímulo (teste “t” student).	40
Figura 19: Diâmetro médio dos adipócitos dos grupos C (n=255), OP (n=255), GC (n=255), Ob (n=200), ObOP (n=200), ObGC (n=200). * quando comparado com o grupo C (teste “t” student e One way ANOVA com pós-teste de Tukey); # quando comparado com o grupo Ob (One way ANOVA com pós-teste de Tukey).	41
Figura 20: Lipólise do tecido adiposo epididimal incubado dos grupos C (n=9), OP (n=11), GC (n=14), C+A (n=9), OP+A (n=9), GC+A (n=14) Ob (n=16), ObOP (n=14), ObGC (n=16). # quando comparado com o grupo seu respectivo grupo sem estímulo (teste “t” student); * quando comparado com o grupo C + A (One way ANOVA com pós-teste de Tukey).	42
Figura 21: Concentração de insulina plasmática em jejum incubado dos grupos C (n=6), OP (n=6), GC (n=6), Ob (n=10), ObOP (n=8), ObGC (n=8). * quando comparado com o grupo Ob (teste “t” student).	43
Figura 22: Microscopia óptica do tecido adiposo epididimal (aumento de 100x). A. Controle; B. Obeso.	44
Figura 23: Microscopia óptica do tecido adiposo epididimal (aumento de 400x). A. Controle; B. Obeso.	44
Figura 24: Porcentagem de células CD4 ⁺ incubado dos grupos C (n=6), OP (n=6), GC (n=6), Ob (n=4), ObOP (n=4), ObGC (n=4). * quando comparado com os respectivos grupos não obesos (teste “t” student).	45
Figura 25: Porcentagem de células CD8 ⁺ dos grupos C (n=4), OP (n=6), GC (n=6), Ob (n=6), ObOP (n=8), ObGC (n=8). * quando comparado com o grupo C (One way ANOVA com pós-teste de Tukey); # quando comparado com o grupo Ob (One way ANOVA com pós-teste de Tukey).	46
Figura 26: Porcentagem de células Mac ⁺ dos grupos C (n=10), OP (n=12), GC (n=14), Ob (n=10), ObOP (n=12), ObGC (n=12). * quando comparado com o grupo C (teste “t” student). # quando comparado com o grupo Ob (One way ANOVA com pós-teste de Tukey).	47
Figura 27: Expressão de COX-2 em tecido adiposo epididimal dos grupos C (n=4), OP (n=4), GC (n=4), Ob (n=4), ObOP (n=4), ObGC (n=4).	48

RESUMO

A obesidade encontra-se normalmente associada a várias alterações fisiológicas como diabetes, doenças cardiovasculares e câncer. O aumento da incidência de indivíduos obesos e diabéticos está diretamente relacionado ao estilo de vida atual, marcado principalmente pelo sedentarismo e pela dieta ocidental. Os ácidos graxos poliinsaturados ω -3 são capazes de modular a concentração de lipídeos plasmáticos, função imunitária e sinalização da insulina. O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito da suplementação de óleo de peixe sobre o metabolismo de glicose e lipídeos em tecido muscular e tecido adiposo em ratos obesos. A indução de obesidade por glutamato monossódico (4 mg/g) foi confirmada pelo índice Lee e pelo aumento de 2,5 vezes no tecido adiposo epididimal e retroperitoneal. Através do teste de sensibilidade à insulina (Kitt), apenas o grupo obeso suplementado com óleo de peixe (ObOP) apresentou sensibilidade semelhante à dos animais controle. Não houve alteração na glicemia e concentração de colesterol-HDL entre os grupos. A suplementação com óleo de peixe promoveu redução da colesterolemia (30%) e da triacilglicerolemia (33%) nos animais obesos. Na presença da insulina, o músculo sóleo incubado do grupo obeso suplementado com óleo de peixe apresentou aumento de 10% na produção de lactato, 38% na síntese de glicogênio e 39% na descarboxilação da glicose quando comparado ao grupo obeso (Ob) sem suplementação. Também na presença de insulina, o tecido adiposo epididimal do grupo ObOP apresentou aumento de 17% na produção de lactato quando comparado ao grupo Ob. Os grupos suplementados com óleo de peixe, não obeso e obeso, apresentaram diâmetro médio dos adipócitos menor em 15% e 11% quando comparados aos seus respectivos grupos controle C e Ob. O tecido adiposo foi incubado com colagenase 1 mg/mL, e as células estromais vasculares do tecido adiposo foram separadas dos adipócitos por centrifugação. Estas células foram marcadas com anticorpos específicos para marcar células positivas para CD4⁺, CD8⁺ e macrófagos e analisadas por citometria de fluxo. A população de linfócitos CD4⁺ nos grupos obesos sem suplementação elevou-se em 2,6 vezes, suplementado com óleo de peixe em 4 vezes e com gordura de coco em 3,9 vezes, quando comparados aos seus respectivos controles. A suplementação com óleo de peixe no grupo obeso promoveu redução de 2,7 vezes na população de células CD8⁺ e foi capaz de retornar a quantidade de macrófagos aos valores do grupo controle. Portanto, a suplementação crônica de óleo de peixe promoveu melhora da dislipidemia, da resistência à insulina e do metabolismo de glicose nos tecidos muscular e adiposo em ratos obesos. Também promoveu reversão da inflamação ao reduzir a quantidade de macrófagos presentes no tecido adiposo dos animais obesos.

ABSTRACT

Obesity is commonly associated with diabetes, cardiovascular diseases and cancer. The increasing number of obese and diabetic individuals is directly related to the modern life style, marked by low physical activity and western diet. Fatty acids ω -3 are capable to modulate blood lipids levels, immune function and insulin signaling. The aim of this work was determinate the effect of fish oil supplementation on glucose and lipids metabolism in muscular and adipose tissue of obese rats. Obesity was induced by glutamate monosodium (4 mg/g) injection and confirmed by the Index Lee and the increase of 2,5 fold of epididymal and retroperitoneal adipose tissue. The insulin sensitivity test (Kitt) showed that only the obese group supplemented with fish oil presented sensitivity similar to control animals. There were no changes in glucose and HDL-cholesterol levels between groups. Fish oil supplementation showed reduction of the cholesterol and triacylglycerol levels by 30 and 33%, respectively, in obese animals. In the presence of insulin, the soleus muscle incubated from fish oil supplemented rats increased 10% on lactate production, 38% on glycogen synthesis and 39% on oxidation of glucose when compared to the obese group (Ob). Also in the presence of insulin, the epididymal adipose tissue incubated from ObOP group increased 17% the production of lactate when compared to Ob group. The groups supplemented with fish oil, obese and non obese, presented their adipocyte diameters reduced in 15% and 11% when compared to their respective control groups C and Ob. Stromal vascular cells were separated from adipocytes after incubation in collagenase 1mg/mL followed by centrifugation. The stromal vascular cells were marked separately with CD4⁺, CD8⁺ and macrophages antibodies and analyzed by flow citometry. Lymphocyte population was 2.6 higher on obese group without supplementation, 4 fold higher on the group supplemented with fish oil and 3.9 fold higher on the group supplemented with coconut oil when compared with their respective groups. The fish oil supplementation on obese group reduced 2.7 fold the population of CD8 cells and also presented macrophage values similar to control group. Therefore, fish oil supplementation improved dyslipidemia, insulin resistance and glucose metabolism of muscular and adipose tissues of obese rats. It also promoted reversion of inflammation by reducing macrophages quantity on adipose tissue of obese rats.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Obesidade e Diabetes	2
1.1.1 Modelo de obesidade induzido por Glutamato Monossódico	5
1.2 Ação e sinalização da insulina.....	6
1.4 Inflamação	11
1.5 Ácidos graxos	14
1.6 Dieta e resistência à insulina	17
1.7 Justificativa	20
2 OBJETIVO	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Animais.....	24
3.2 Ácidos graxos	24
3.3 Métodos.....	24
3.3.1 Indução de obesidade	24
3.3.2 Protocolo experimental.....	24
3.3.3 Teste de tolerância à insulina	25
3.3.4 Índice Lee	26
3.3.5 Efeito sobre o metabolismo de glicose em músculo sóleo	26
3.3.6 Efeito sobre o metabolismo de glicose em tecido adiposo	26
3.3.7 Análises plasmáticas	27
3.3.8 Expressão protéica	28
3.3.9 Lipólise	28
3.3.10 Diâmetro médio dos adipócitos.....	29
3.3.11 Isolamento e marcação das células estromais vasculares do tecido adiposo	29
3.3.12 Microscopia óptica	29
3.4 Análise estatística.....	29
4 RESULTADOS	31
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO	57
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada uma epidemia pelo fato de crescer em altas proporções em, praticamente, todos os continentes nas últimas décadas (KOPELMAN, 2000). Doenças como diabetes e doença coronariana, além de promover usualmente hipertensão e alterações metabólicas como dislipidemia e resistência à insulina encontram-se comumente associadas à obesidade (PI-SUNYER, 2002). Recentemente, manifestações metabólicas como resistência à insulina, obesidade abdominal, dislipidemia e hipertensão foram agrupadas em uma única síndrome denominada síndrome metabólica (MOLLER; KAUFMAN, 2005).

O termo “obeso” refere-se ao aumento na quantidade de tecido adiposo no organismo de um indivíduo. O desequilíbrio entre a ingestão de nutrientes e o gasto energético é uma das principais causas de obesidade tendo como consequência várias alterações metabólicas (WISSE *et al.*, 2007). Este crescente número de indivíduos obesos no mundo é resultado, principalmente, de alterações no estilo de vida como aumento no consumo de alimentos industrializados e redução da atividade física.

A gordura na dieta é um nutriente altamente energético e, portanto, considerada uma das responsáveis pelo desenvolvimento da obesidade. Entretanto, estudos recentes têm chamado atenção ao perfil de ácidos graxos na gordura da dieta, uma vez que ácidos graxos monoinsaturados ω -9, poliinsaturados, ω -6 e ω -3 podem apresentar vários efeitos benéficos. Estudos revisados por Rivellesse & Lilli (2003) demonstraram forte relação positiva entre o consumo de gordura saturada e a incidência de diabetes tipo 2 e correlação inversa entre o consumo de gordura poliinsaturada e a incidência da doença (RIVELLESE; LILLI, 2003). Os ácidos graxos poliinsaturados vêm despertando interesse por apresentarem efeitos benéficos em pacientes cardíacos e dislipidêmicos (PHILLIPS, 2008). Em especial, os ácidos graxos poliinsaturados ω -3 apresentam diversos efeitos fisiológicos podendo modular a concentração de lipídeos plasmáticos, função imunitária, sinalização da insulina, desenvolvimento neuronal e acuidade visual (JUMP, 2002). Esses ácidos graxos apresentam efeitos benéficos em indivíduos portadores de doenças do coração, hipertensão, diabetes tipo 2, doença renal, artrite reumatóide,

colite ulcerativa, doença de Chron e doença pulmonar obstrutiva crônica (SIMOPOULOS, 1999).

Também foi demonstrado que os ácidos graxos (AGs) ω -3 possuem capacidade em modular a ação da insulina em tecidos-alvo, atraindo interesse, principalmente, para doenças associadas ao estado de resistência à insulina. Alteração na composição da membrana lipídica com conseqüente alteração da função de receptores ou canais de membrana, efeitos na translocação e atividade de GLUT-4, interações com diacilglicerol (DAG) - proteína quinase C (PKC), produção de óxido nítrico (NO), armazenamento de triacilglicerol (TAG) no músculo são algumas das várias hipóteses que vêm sendo aventadas para explicar os mecanismos por trás dos efeitos dos AGs poliinsaturados na redução da resistência à insulina (STORLIEN *et al.*, 1996; ZIERATH *et al.*, 1997; KRSSAK *et al.*, 1999). O consumo de AGs ω -3 é capaz de induzir várias alterações bioquímicas benéficas ao indivíduo diabético, como redução do TAG plasmático e aumento nas concentrações de HDL (FRANCESCHINI *et al.*, 1991). Estes AGs são considerados potentes ativadores de PPARs (receptores ativados por proliferadores peroxissomos), que por sua vez, controlam a expressão de genes envolvidos no metabolismo de glicose, lipídio, e adipogênese (SIRTORI; GALLI, 2002; LOMBARDO; CHICCO, 2006).

1.1 Obesidade e Diabetes

A obesidade é diagnosticada através do índice de massa corpórea (IMC), o qual é definido pelo peso em quilogramas dividido pela altura ao quadrado em metros (Kg/m^2). O indivíduo com IMC acima de 25 é considerado com sobrepeso e o indivíduo com IMC acima de 30 é considerado obeso. Atualmente, mais de 1 bilhão de adultos estão com sobrepeso e pelo menos 300 milhões são obesos (OMS).

Aproximadamente 85% dos indivíduos diabéticos são tipo 2, e destes, 80% apresentam sobrepeso ou são obesos. A obesidade está associada a várias complicações como aumento do risco de diabetes, doenças cardiovasculares, câncer, doenças gastrointestinais e artrite, além de conseqüências psicológicas como baixa auto-estima e depressão (SMYTH; HERON, 2006). Sua associação com o desenvolvimento de diabetes tipo 2 ocorre devido ao excesso de tecido adiposo

que gera um estado de resistência à insulina. O indivíduo obeso encontra-se em estado de resistência à insulina por três principais alterações provocadas pelo tecido adiposo: (1) excesso de ácidos graxos livres na circulação; (2) liberação de citocinas; e (3) acúmulo de ácidos graxos em outros tecidos como músculo, fígado e pâncreas (DESPRES; LEMIEUX, 2006). As células β pancreáticas são responsáveis por liberar insulina de acordo com a glicemia plasmática. Em indivíduos obesos, estas células aumentam a secreção e liberação de insulina em resposta ao estado de resistência à insulina (KAHN *et al.*, 2006). A transição do estado de obesidade para diabetes tipo 2 ocorre no momento em que as células β pancreáticas perdem a capacidade de funcionar corretamente em resposta às concentrações glicêmicas (MUOIO; NEWGARD, 2008).

Atualmente considerada a doença do século XXI, a diabetes é a 4^a causa principal de mortes nos países desenvolvidos e é considerada epidemia global que acomete 221 milhões de pessoas no mundo neste ano de 2010, aumento de aproximadamente 80% quando comparado ao ano de 1997 (BJORK, 2001). Estimativas indicam que este número chegará a 300 milhões até o ano de 2025 (OMS e Federação Internacional de Diabetes). Em paralelo ao crescimento da incidência de diabetes tipo 2, a obesidade e a síndrome metabólica crescem em números alarmantes em todo mundo e, como consequência, maior ocorrência de doenças cardiovasculares e de mortes prematuras. Estudos recentes demonstraram que os gastos relacionados à saúde são cinco vezes maiores em indivíduos diabéticos quando comparados aos dos não diabéticos. Isto ocorre porque diabéticos apresentam complicações a longo prazo como ataque cardíaco, derrame, cegueira, falência renal e amputações (YACH *et al.*, 2006). Estimativas sugerem o gasto anual destinado ao tratamento da diabetes é de, aproximadamente, 22 bilhões de dólares para o Brasil e de 65 bilhões de dólares para toda América Latina (OMS). Portanto, com o intuito de diminuir gastos futuros no tratamento da diabetes, maiores investimentos destinados à prevenção e desenvolvimento de novos e mais eficazes tratamentos contra a diabetes se fazem necessários (BJORK, 2001). Dada a relevância desta doença, o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH) tem aumentado exponencialmente seus recursos em pesquisas relacionadas à obesidade e diabetes (SPIEGEL; NABEL, 2006).

O aumento de indivíduos obesos e diabéticos está associado a alterações no estilo de vida atual, marcado principalmente pelo sedentarismo (HANDSCHIN; SPIEGELMAN, 2008) e pela dieta ocidental (ROCHE *et al.*, 2005). O fácil acesso a alimentos mais palatáveis e a redução no custo dos alimentos também são fatores que contribuíram para o aumento de indivíduos obesos no mundo. Portanto, indivíduos que realizam atividade física e que consomem baixa quantidade de calorias na dieta possuem menor risco de desenvolver obesidade (HILL; PETERS, 1998) (Figura 1). Ao mesmo tempo, as drogas desenvolvidas para reduzir o peso corpóreo não têm apresentado efeitos satisfatórios além de apresentarem diferentes efeitos colaterais. Portanto, estudos que promovam maior esclarecimento na função endócrina do tecido adiposo, no processo inflamatório associado à obesidade e nos processos envolvidos na regulação da ingestão alimentar e no gasto energético são importantes para contribuir no desenvolvimento de novos agentes farmacológicos que combatam a obesidade de maneira mais satisfatória (PI-SUNYER, 2003). Estudo recente demonstrou que indivíduos que seguiram dieta saudável e realizaram atividade física com frequência por determinado período apresentaram redução na incidência de diabetes tipo 2 (KNOWLER *et al.*, 2002).

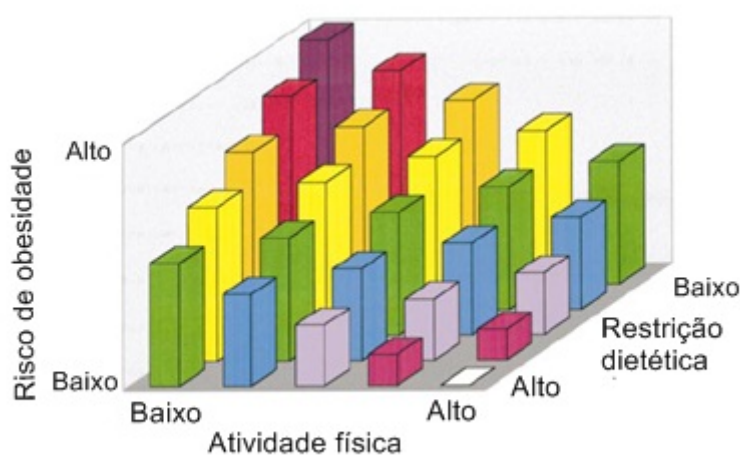


Figura 1: Relação entre risco de obesidade, atividade física e restrição calórica (adaptado de HILL e PETERS, 1998)

1.1.1 Modelo de obesidade induzido por Glutamato Monossódico

A indução de obesidade pelo tratamento com glutamato monossódico causa destruição de neurônios hipotalâmicos, principalmente no núcleo arqueado (HOLZWARTH-MCBRIDE *et al.*, 1976). Em consequência, uma série de alterações neuroendócrinas e metabólicas são encontradas neste modelo. Estudos anteriores demonstraram que estes animais apresentam aumento do tecido adiposo (REMKE *et al.*, 1988; NASCIMENTO CURI *et al.*, 1991) e redução da massa muscular (RIBEIRO *et al.*, 1997; PARK *et al.*, 2007), resistência à insulina e hiperinsulinemia (HIRATA *et al.*, 1997), e redução na liberação de GH (MAITER *et al.*, 1991). Entretanto, algumas características como a glicemia e o consumo alimentar destes animais ainda são controversas. Alguns estudos encontraram glicemia normal (ZORAD *et al.*, 1997; HIRATA *et al.*, 2003) ou moderada hiperglicemia (PAPA *et al.*, 1997; PARK *et al.*, 2007) e em relação ao consumo de ração, estes animais podem ser hiperfágicos (DINIZ *et al.*, 2005), normofágicos (PARK *et al.*, 2007) ou hipofágicos (SCALLET; OLNEY, 1986; MORRIS *et al.*, 1998).

A obesidade pode ocorrer tanto pelo aumento da ingestão alimentar quanto por redução do gasto energético. A ativação do sistema nervoso simpático aumenta a termogênese e a lipólise, os quais promovem aumento do gasto energético e, conseqüentemente, redução da obesidade (COLLINS; SURWIT, 2001). Park *et al.* demonstraram que animais obesos induzidos por glutamato monossódico apresentam redução da atividade simpática (PARK *et al.*, 2007), dado este que sugere como estes animais desenvolvem obesidade mesmo não sendo hiperfágicos. Outra alteração encontrada neste modelo animal e que pode contribuir para o desenvolvimento da obesidade é a redução na síntese e secreção de catecolaminas pelas glândulas adrenais (MARTINS *et al.*, 2004). As altas concentrações de corticosterona encontradas neste modelo é um fator determinante na redução da massa muscular, pois atuam inibindo a síntese protéica e estimulando a proteólise (DOLNIKOFF *et al.*, 1988).

O estudo das proteínas envolvidas na sinalização da insulina é uma importante ferramenta no estudo da resistência à insulina. Foi verificado aumento da expressão da fosfatase PTP1B em fígado, músculo e tecido adiposo de animais obesos induzidos por GMS, proteína esta envolvida por regular negativamente a

sinalização da insulina (HIRATA *et al.*, 2003). O transportador GLUT-4 parece ter importante papel na resistência à insulina e foi encontrado redução da expressão deste transportador em animais obesos induzidos por GMS com 7 meses de idade (DE CARVALHO PAPA *et al.*, 2002).

Portanto, este modelo animal é considerado uma boa ferramenta para o estudo da obesidade, principalmente, por apresentar resistência à insulina e excesso do depósito de gordura (ZHANG *et al.*; HIRATA *et al.*, 1997; DOLNIKOFF *et al.*, 2001; LARSEN *et al.*, 2001; SERAPHIM *et al.*, 2001; DE CAMPOS *et al.*, 2007; GRASSIOLLI *et al.*, 2007; FURUYA *et al.*, 2010).

1.2 Ação e sinalização da insulina

O hormônio insulina promove a síntese e armazenamento de carboidratos, lipídios e proteínas além de inibir a quebra e liberação dos mesmos para a corrente sanguínea (Figura 3) (SALTIEL; KAHN, 2001).

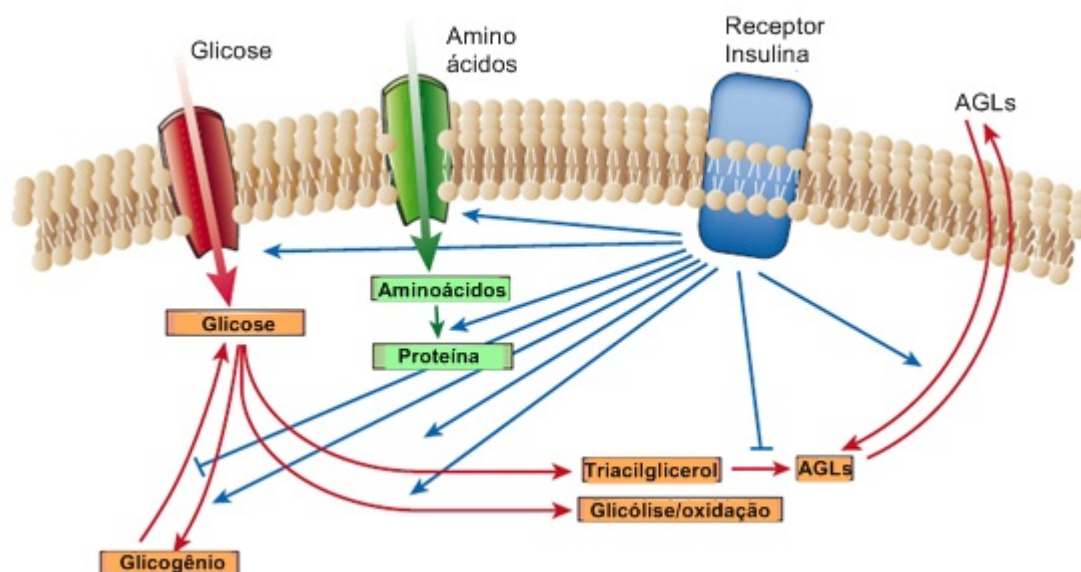


Figura 2: Esquema dos efeitos gerais da insulina (adaptado de SALTIEL e KAHN, 2001)

O receptor da insulina faz parte da família de receptores que estimulam atividade da proteína tirosina quinase, a qual atua via fosforilação em resíduos de tirosina. O receptor é composto por duas subunidades α (localizadas na porção extracelular e responsáveis pela ligação da insulina ao receptor) e duas β (encontradas na porção intracelular e responsáveis pela atividade tirosina quinase).

A via de sinalização da insulina (figura 5) é iniciada quando a insulina se liga ao receptor heterotetrâmico ativando, assim, a atividade tirosina quinase. A fosforilação cruzada ocorre nos domínios tirosina 1158/62/63 na porção citosólica do receptor (KIDO *et al.*, 2001). Os resíduos fosforilados do receptor atuam como sítios de interação para várias proteínas (IRS, GAB e DOK) permitindo, por sua vez, a fosforilação e interação das mesmas com outras proteínas que possuem domínio SH2. As três principais vias ativadas por proteínas IRS, são as vias da PI3K, da CAP/Cbl/Tc10 e da MAPK (PIROLA *et al.*, 2004). A PI-3K ativada aumenta as concentrações de fosfatidilinositol 3, 4, 5- trifosfato (PtdIns (3,4,5)P₃), que regulam, por sua vez, a atividade de diferentes proteínas serina quinases como a proteína quinase B (PKB ou Akt), PDK-1 e as PKCs atípicas ζ/λ (PIROLA *et al.*, 2004). A ativação da via da PI3K encontra-se envolvida com o transporte de glicose (translocação de GLUT4 para a membrana plasmática), síntese de glicogênio e lipogênese (Figura 4). Uma via paralela envolvida com a captação de glicose e recentemente descrita, é a via da CAP/Cbl/Tc10, iniciada pela associação da Cbl com o receptor da insulina através da proteína adaptadora CAP. O complexo CAP-Cbl encontra-se associado a “balsas” lipídicas e à proteína caveolar flotilina (PIROLA *et al.*, 2004). A via da MAPK também é ativada pela insulina através da associação SHC com o receptor de insulina e da Grb2. As MAPK ou ERKs (Extracellular signal-regulated kinases) não possuem papel principal nas respostas metabólicas, embora aumento na atividade basal de MAPK parece contribuir com o desenvolvimento da resistência à insulina (PIROLA *et al.*, 2004).

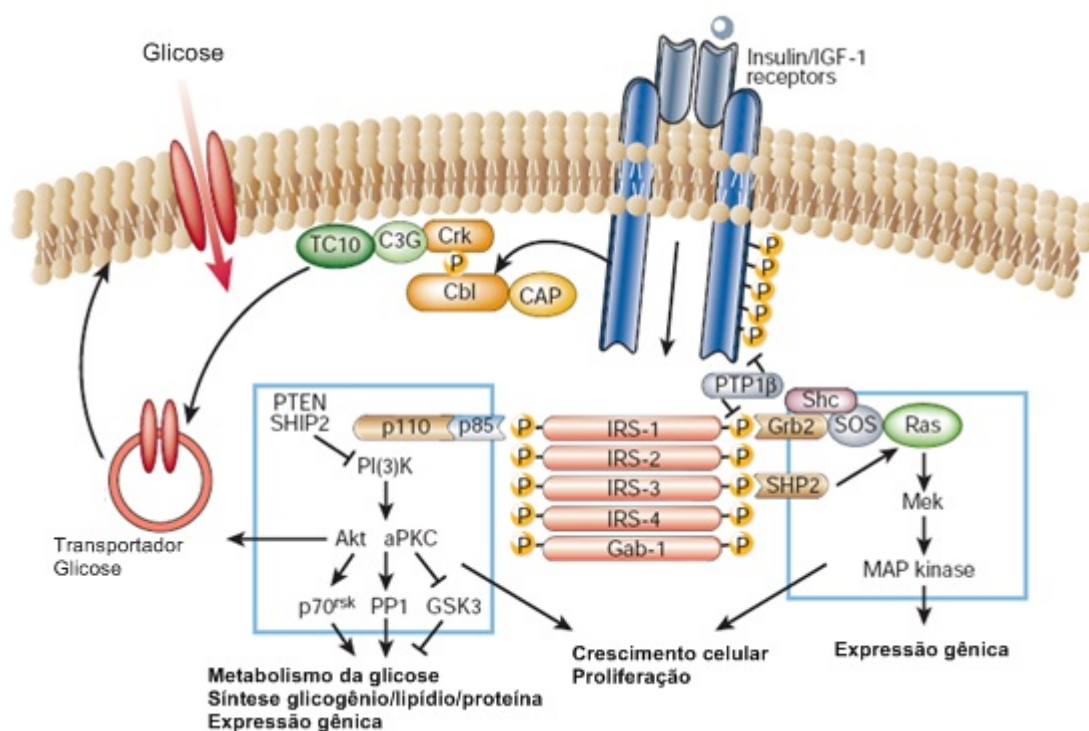


Figura 3: Esquema da sinalização da insulina (adaptado de SALTIEL; KAHN, 2001)

1.3 Resistência à Insulina

A resistência à insulina é manifestada por redução no transporte e metabolismo da glicose no tecido adiposo e músculo esquelético além de aumentar a liberação da mesma pelo fígado. Estas alterações são decorrentes de modificações na sinalização da insulina (KAHN; FLIER, 2000).

A obesidade induzida pelo excesso da ingestão alimentar resulta em maior síntese de triacilgliceróis tendo como consequência aumento do tamanho do adipócito. A hipertrofia dos adipócitos modifica o perfil de secreção e liberação de adipocinas, por exemplo, aumentando a secreção de MCP-1 (proteína quimioatrativa de monócito – 1) que, por sua vez, provoca aumento da infiltração de macrófagos dando início, assim, a um estado pró-inflamatório. A citocina TNF- α , produzida e secretada pelo macrófago infiltrado no tecido adiposo, exerce efeitos inibitórios sobre a sinalização da insulina através do aumento da fosforilação das proteínas IRS (substrato do receptor de insulina) em resíduos serina e treonina. Esta mesma citocina está envolvida com o aumento da expressão de proteínas como a JNK-1, ERK-1,2 e MAP4K4 (GUILHERME *et al.*, 2008). O TNF- α também é capaz de

estimular a lipólise, aumentando assim a concentração de ácidos graxos na corrente sanguínea.

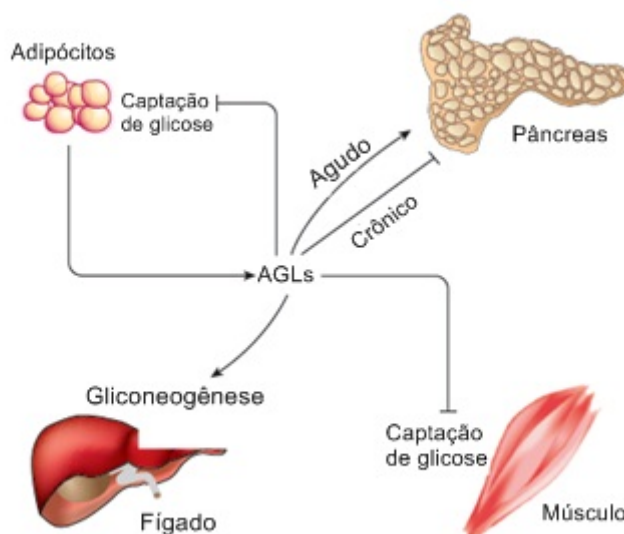


Figura 4: Relação entre obesidade e resistência à insulina (adaptado de ROSEN; SPIEGELMAN, 2006)

Os AGs livres ligados à albumina são provenientes, principalmente, dos depósitos de triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo e são liberados pela ação da enzima lipase sensível a hormônio. O aumento de AGs livres na circulação está relacionado à expansão do tecido adiposo e hipertrofia dos adipócitos, comumente encontrado em indivíduos obesos ou com diabetes tipo 2, os quais atuam como substrato energético em diferentes tecidos. Os AGs livres na circulação reduzem a captação de glicose no tecido adiposo e no músculo e promovem a liberação da mesma pelo fígado, via neoglicogênese (ROSEN; SPIEGELMAN, 2006) (Figura 2). Esta condição também promove a produção de triacilgliceróis, apolipoproteína B e VLDL pelo fígado (MOORADIAN, 2009). Randle *et al.* (1963) foram os primeiros a propor a existência de competição entre os substratos lipídio e carboidrato, onde o aumento da concentração plasmática de ácidos graxos reduz a captação e metabolismo da glicose estimulada pela insulina (RANDLE *et al.*, 1963). Os mecanismos pelos quais os ácidos graxos modificam o metabolismo da glicose estão associados a alterações na atividade de diferentes proteínas como GLUT-4 (transporte de glicose), hexoquinase (fosforilação da glicose), glicogênio fosforilase (glicogenólise), fosfofrutoquinase (glicólise), piruvato desidrogenase (razão acetil-CoA/CoA) (SILVEIRA *et al.*, 2008). A exposição crônica de ácidos graxos livres

causa inibição de proteínas envolvidas na sinalização da insulina, efeitos estes envolvidos no desenvolvimento da resistência à insulina (BODEN; SHULMAN, 2002). Interessantemente, a exposição aguda de ácidos graxos aumenta a síntese de glicogênio e a oxidação de glicose (HIRABARA *et al.*, 2007).

Atualmente, sabe-se que o tecido adiposo secreta uma série de proteínas bioativas, conhecidas como adipocinas, as quais modulam o balanço energético, apetite, hemostase, pressão sanguínea, metabolismo de glicose e lipídio, sensibilidade à insulina, angiogênese, processo inflamatório e resposta imunitária (TRAYHURN; WOOD, 2004). Interessantemente, a síntese e liberação destas adipocinas encontram-se alteradas em indivíduos obesos, diabéticos tipo 2 e com síndrome metabólica (ANTUNA-PUENTE *et al.*, 2008). A adiponectina é uma adipocina capaz de aumentar a captação de glicose e oxidação de gordura no músculo, reduzir a produção de glicose hepática, e melhorar a sensibilidade à insulina. Interessantemente, as concentrações de adiponectina encontram-se reduzidas em indivíduos obesos (RABE *et al.*, 2008). A adiponectina também apresenta efeitos anti-aterogênicos por inibir a adesão de monócitos, a transformação de macrófagos em células “espumosas” ou “*foam cells*” e a ativação de células endoteliais (RONTI *et al.*, 2006). A leptina é outra adipocina importante por regular a ingestão alimentar e o gasto energético, estimular a lipólise e melhorar a sensibilidade à insulina em tecidos periféricos. A ativação do receptor de leptina inibe as vias orexígenas (neuropeptídeo Y - NPY e peptídeo relacionado ao agouti – AgRP) e ativa as vias anorexígenas (pro-opiomelanocortina – POMC e transcrição regulada pela cocaína e anfetamina – CART). As adipocinas resistina, RBP4 (Proteína ligadora de retinol 4), TNF- α e IL-6 possuem ação pró-inflamatória e encontram-se diretamente associadas à resistência à insulina (RONTI *et al.*, 2006; RABE *et al.*, 2008). Portanto, as adipocinas possuem importante papel no desenvolvimento do processo pró-inflamatório e da resistência à insulina em indivíduos obesos e diabéticos tipo 2.

Estudo recente verificou que a ausência de tecido adiposo, condição conhecida como lipodistrofia, também pode causar alterações metabólicas devido à ausência de leptina além de aumentar o depósito de lipídios em outros tecidos como fígado e músculo esquelético o que, conseqüentemente, contribui para o estado de

resistência à insulina em ambos tecidos (REITMAN; GAVRILOVA, 2000). O aumento da ingestão alimentar juntamente com a redução de atividade física contribuem para a hipertrofia dos adipócitos, os quais exercem principal função no armazenamento de triacilgliceróis. Quando a capacidade de armazenamento dos adipócitos é excedida, os lipídios começam a ser armazenados em outros tecidos como músculo esquelético e fígado, fenômeno conhecido como “gordura ectópica”, e seus metabólitos interferem na sinalização da insulina, no transporte e fosforilação da glicose e síntese de glicogênio muscular, além de aumentar a neoglicogênese hepática (BAYS *et al.*, 2004). As células precursoras de adipócitos com baixa capacidade de proliferação e/ou diferenciação apresentam maior susceptibilidade a formar adipócitos de maior tamanho (HEILBRONN *et al.*, 2004).

1.4 Inflamação

A inflamação pode ser compreendida como resposta aguda do nosso organismo contra lesões e é caracterizada pelas seguintes características: tumor, rubor, dor e calor. A obesidade e diabetes tipo 2 apresentam um estado de inflamação crônico que envolve moléculas e vias de sinalização semelhantes ao processo de inflamação classicamente conhecido. Este estado inflamatório é caracterizado pela elevação nas concentrações plasmáticas da proteína C-reativa (PCR), interleucina-6 (IL-6) e do inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1). O consumo crônico e excessivo de nutrientes altamente calóricos favorece a formação de metabólitos oxidantes e pró-inflamatórios (DANDONA *et al.*, 2004). Interessantemente, a insulina exerce efeitos anti-inflamatórios ao reduzir a geração de espécies reativas de oxigênio por células mononucleares, suprimir a expressão da NADPH oxidase e do fator nuclear NF- κ B, induzir a expressão de I κ B e suprimir as concentrações plasmáticas de ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) e MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) (DANDONA *et al.*, 2001). Portanto, uma inibição na transdução do sinal da insulina pode desencadear, por si só, o desenvolvimento de um estado pró-inflamatório.

O tecido adiposo e fígado são constituídos tanto por células envolvidas no metabolismo (adipócitos e hepatócitos) quanto por células imunitárias (macrófagos e linfócitos), as quais encontram-se em contato próximo com redes de vasos capilares.

Deste modo, ambos os tecidos formam um ambiente propício para a existência de comunicações dinâmicas entre respostas imunitárias e metabólicas e também com outros tecidos como músculo e pâncreas (HOTAMISLIGIL, 2006). A ligação entre inflamação e metabolismo pode ser evidenciada no tecido adiposo onde adipócitos em expansão secretam e liberam moléculas quimiotáticas envolvidas no recrutamento de células imunitárias, como por exemplo, o macrófago. Nutrientes, principalmente ácidos graxos, podem ativar ou inibir os fatores de transcrição das famílias PPAR (Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos) e LXR (Receptor X do fígado) os quais são capazes de inibir a expressão de vários genes envolvidos na resposta inflamatória dos adipócitos e macrófagos (HOTAMISLIGIL, 2006). O consumo excessivo de nutrientes também resulta em alteração funcional do retículo endoplasmático, o qual, por sua vez, através das proteínas IRE-1 (inositol-requiring enzyme-1), PERK (PKR-like endoplasmic-reticulum kinase), pode ativar as vias inflamatórias via JNK e NF- κ B e assim, contribuir para o quadro de resistência à insulina (HOTAMISLIGIL, 2006). O tecido adiposo de indivíduos obesos é caracterizado por inflamação e infiltração de macrófagos. A secreção de MCP-1 por pré-adipócitos e/ou células endoteliais, o aumento da secreção de leptina pelos adipócitos e danos físicos ou oxidativos devido à hipertrofia dos adipócitos são alguns dos mecanismos capazes de promover a infiltração de macrófagos. Uma vez recrutados, os macrófagos do tecido adiposo aumentam a produção de citocinas pró-inflamatórias e alteram a função dos adipócitos, contribuindo assim, para o estado de resistência à insulina (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2003) (Figura 5). Recentemente, estudos começam a elucidar o papel dos linfócitos T no processo inflamatório do tecido adiposo de indivíduos obesos. Camundongos magros apresentam predomínio de linfócitos T_{reg} e TH₂ presentes no tecido adiposo. Estas células secretam IL-10, interleucina capaz de melhorar a sensibilidade à insulina e que possui ação anti-inflamatória. Em contraposição, em animais obesos, são as células CD8⁺ e TH₁ que aparecem em maior quantidade, favorecendo um ambiente mais pró-inflamatório via recrutamento de macrófagos (LUMENG *et al.*, 2009) (Figura 6).

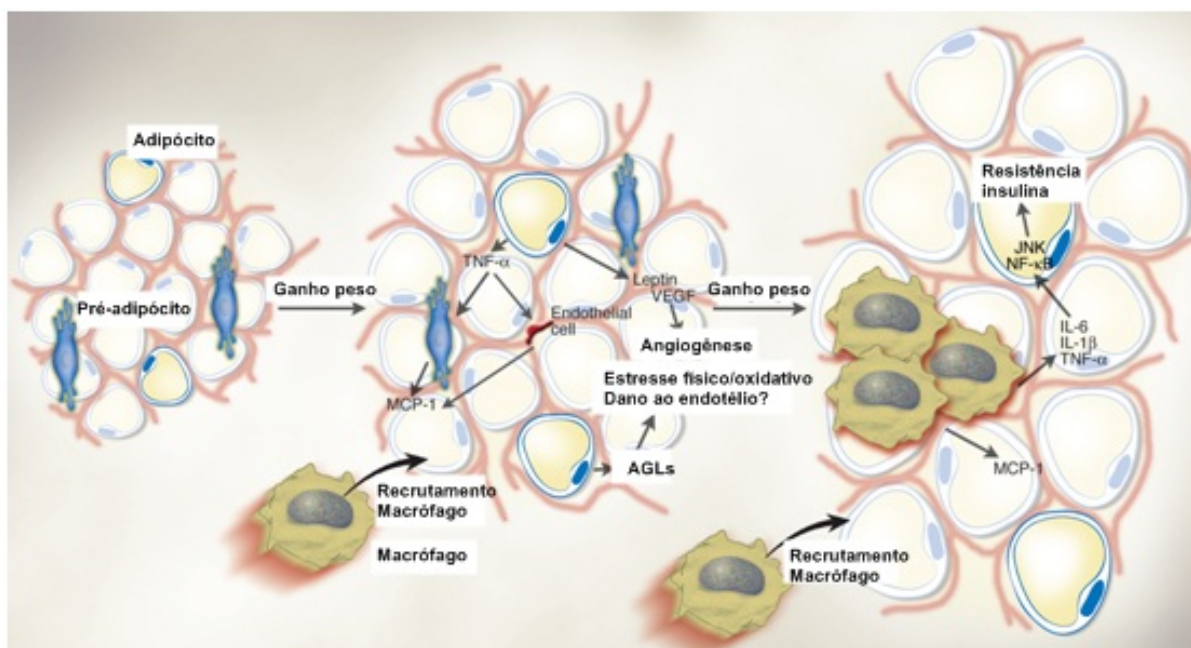


Figura 5: Infiltração de macrófagos no tecido adiposo (adaptado de WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2003)

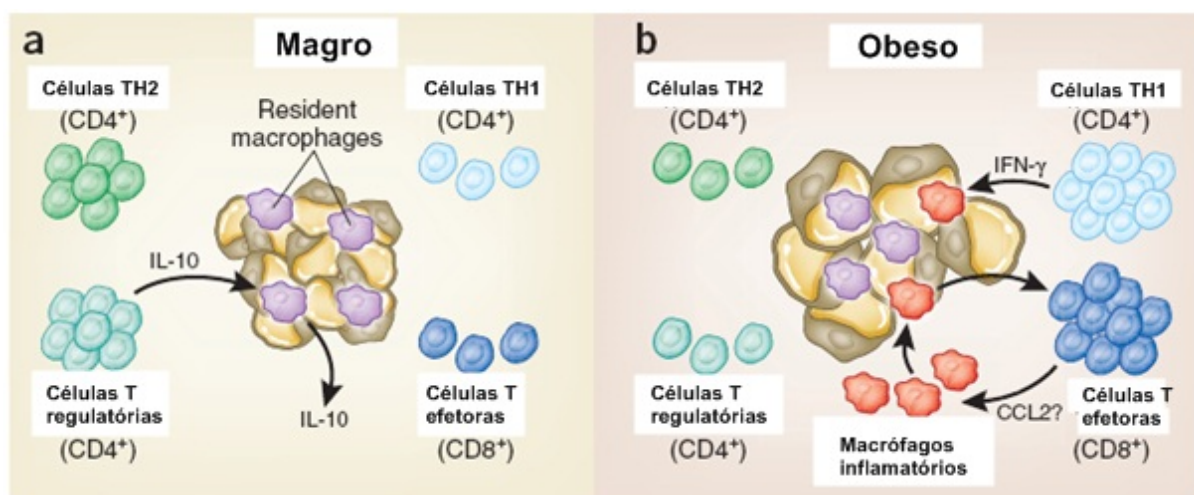


Figura 6: Diferentes tipos de linfócitos e macrófagos ativados em indivíduos obesos e não obesos (adaptado de LUMENG *et al.*, 2009)

A via de sinalização inflamatória envolve uma série de proteínas que fosforilam proteínas IRS em resíduos serina, incluindo JNK, IKK β , PKC θ , mTOR (mammalian target of rapamycin) e p70S6K. Estas proteínas quinases são moduladas por ácidos graxos e são contribuintes chave no desenvolvimento da resistência à insulina (DE LUCA; OLEFSKY, 2008; GUILHERME *et al.*, 2008)(Figura 8). A família de receptores TLR (Toll-like Receptor) possui importante papel no sistema imunitário

inato e é responsável por ativar vias inflamatórias em resposta a patógenos. Recentemente, Shi *et al.* (2006) demonstraram que ácidos graxos livres utilizam o receptor TLR4 para induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos, adipócitos e no fígado (SHI *et al.*, 2006) (Figura 7).

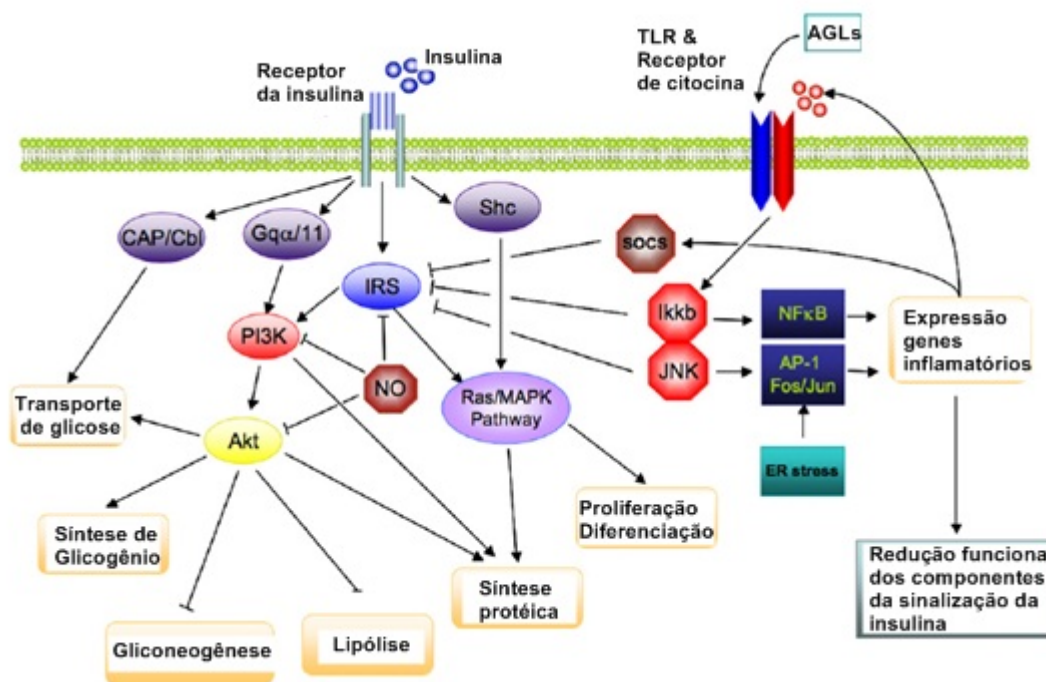


Figura 7: "Crosstalking" entre via de sinalização da insulina e inflamatória (adaptado de DE LUCA; OLEFSKY, 2008)

1.5 Ácidos graxos

Ácidos Graxos (AG) são ácidos carboxílicos compostos, na maioria das vezes, por uma cadeia hidrocarbônica longa, não ramificada e com número par de átomos de carbono. Os ácidos graxos podem ser saturados ou conter uma ou mais duplas ligações (insaturações) e são classificados como AG de cadeia curta (2 a 4 carbonos), média (6 a 10 carbonos) e longa (acima de doze carbonos)(CURI, 2002).

Os ácidos graxos saturados, que não possuem dupla ligação, apresentam conformação linear que permite melhor empacotamento dos mesmos na membrana plasmática. Quando o ácido graxo possui uma única dupla ligação, é denominado monoinsaturado, se contém duas ou mais duplas ligações, poliinsaturado (PUFAs). As duplas ligações têm grande importância, pois aumentam a flexibilidade da cadeia e conseqüentemente a fluidez das membranas biológicas. Os ácidos graxos saturados são normalmente encontrados na forma sólida (gordura) e em produtos de

origem animal. A exceção é feita para a gordura de coco, rica em ácidos graxos saturados, cuja fonte é de origem vegetal. Os monoinsaturados estão presentes em maior quantidade, principalmente, no óleo de oliva. Já os poliinsaturados são encontrados em óleos vegetais (girassol, milho, soja, algodão), óleos de peixe e em oleaginosas (castanha, amêndoa).

Os vários carbonos da cadeia hidrocarbônica dos ácidos graxos podem ser classificados através de letras gregas. O carbono α é o adjacente ao grupo carboxila, enquanto o carbono ω é o último carbono na extremidade metila. A distinção entre as famílias de ácidos graxos pode ser feita pela localização da dupla ligação a partir de sua extremidade metila. Assim, o ácido graxo ω -3 apresenta sua primeira dupla ligação entre os carbonos três e quatro, o ω -6 entre os carbonos seis e sete da cadeia hidrocarbônica e o ω -9 entre os carbonos 9 e 10. Existem três famílias importantes de ácidos graxos poliinsaturados: a ω -9, representada pelo ácido oléico; a ω -6, derivada do ácido linoléico (LA); e a ω -3, derivada do ácido α -linolênico (ALA). Os membros de ácidos graxos de uma mesma família podem ser biologicamente sintetizados a partir de um precursor. No entanto, um ácido graxo de uma determinada família não pode ser biologicamente convertido em outra família. Por exemplo, um ácido graxo da família ω -3 não pode ser convertido em um da família ω -6 (CURI, 2002).

Os ácidos graxos classificados como essenciais são aqueles ácidos graxos de extrema importância para o funcionamento do organismo (ex. participam no desenvolvimento do cérebro, células sanguíneas – eritrócitos e leucócitos e da pele). As duas famílias de AGs essenciais são os pertencentes à família ω -3 e ω -6, sendo seus precursores, respectivos, o ácido linoléico e o α -linolênico. Estes AGs não podem ser sintetizados no organismo de mamíferos, pois estes não possuem as enzimas dessaturases Δ 12 (inserção de insaturação entre carbonos 3-4) e Δ 15 (inserção entre carbonos 6-7), as quais são responsáveis pela síntese destes ácidos graxos poliinsaturados e, portanto, devem ser providos pela dieta. Embora não possam ser sintetizados por mamíferos, os AGs essenciais podem sofrer modificações relacionadas à porção carboxi-terminal por inserções de insaturações, inserção de pares de carbonos (no retículo endoplasmático) ou retirada de carbonos da cadeia (no peroxissomo). No entanto, as insaturações presentes na porção metila

do ácido graxo permanecem inalteradas (CURI, 2002). Neste contexto, ácidos graxos como linoléico (18:2n-6) e α -linolênico (18:3n-3) adquirem novas duplas ligações e sofrem alongamento de cadeia, dando origem a vários outros ácidos graxos de cadeia longa, entre eles o ácido araquidônico (AA 20:4n-6) proveniente do ácido linoléico, o ácido eicosapentaenóico (EPA 20:5n-3) e ácido docosahexaenóico (DHA 22:6n-3), provenientes do ácido α -linolênico (RATNAYAKE; GALLI, 2009).

Os ácidos graxos araquidônico (ω -6) e eicosapentaenóico (ω -3) são precursores dos eicosanóides prostaglandinas (PGs), tromboxanas (TXs), leucotrienos (LTs), ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETEs) e ácidos hidroxiperoxieicosatetraenóicos (HPETEs). A fosfolipase A2 é a primeira enzima envolvida na síntese de eicosanóides responsável por liberar os ácidos graxos poliinsaturados de 20 carbonos localizados nos fosfolipídios de membrana. As enzimas ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) são responsáveis pela conversão destes ácidos graxos nos diferentes eicosanóides. Existem duas importantes isoformas de COX: a COX-1, que é expressa constitutivamente em muitos tecidos; e a COX-2, associada a respostas inflamatórias e induzida por vários tipos de estímulos incluindo citocinas, promotores tumorais e fatores de crescimento (RATNAYAKE; GALLI, 2009).

O metabolismo do ácido araquidônico (AA) via COX, gera PGs e TXs da série 2 as quais causam processo inflamatório por apresentarem ação quimiotática, vasoconstritora e estimular agregação plaquetária. O ácido eicosapentaenóico (EPA) também é metabolizado pelas mesmas enzimas, mas gera PGs e TXs da série 3. Portanto, existe competição destes dois substratos pelas enzimas COX e LOX e, conseqüente, produção de eicosanóides diferentes de acordo com o substrato que encontra-se disponível na membrana celular. Interessantemente, os eicosanóides derivados do EPA são menos potentes quando comparados aos derivados do AA e, portanto, exercem menor efeito inflamatório (RATNAYAKE; GALLI, 2009) (Figura 8).

Os ácidos graxos ω -3 são encontrados principalmente em peixes (EPA e DHA), óleo de canola (ALA) e linhaça (ALA), bem como em folhas verdes escuras (ALA). Os AGs ω -6 são compostos principalmente de óleos vegetais e sementes, como milho (LA), girassol (LA), soja (LA), entre outros (RATNAYAKE; GALLI, 2009).

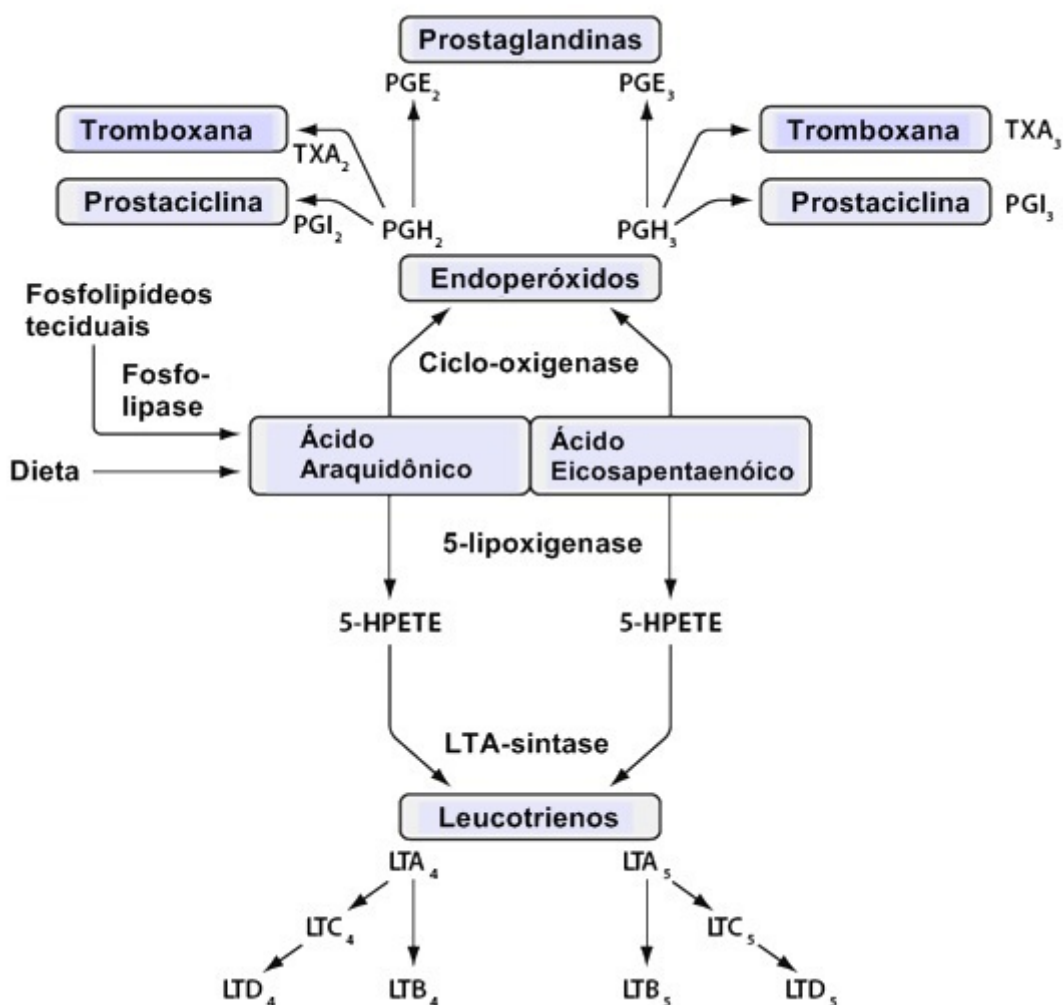


Figura 8: Formação de eicosanóides a partir do AA e EPA (adaptado de SIMOPOULOS, 2010)

1.6 Dieta e resistência à insulina

A origem das doenças está relacionada com dois fatores essenciais: o genético e o ambiental. Um dos fatores ambientais mais importantes é o tipo de alimento que comemos. Estudos em nutrigenética e nutrigenômica fornecem informações sobre a interação entre nutrientes e expressão gênica. O conhecimento gerado a partir destes estudos pode promover uma vida mais saudável e ajudar na prevenção e tratamento de doenças crônicas (SIMOPOULOS, 2010).

Em comparação a sociedades mais antigas, a sociedade atual apresenta uma dieta com maior ingestão de ácidos graxos saturados, poliinsaturados ω -6 e *trans* (Figura 9). Ao mesmo tempo o consumo de ácidos graxos ω -3 diminuiu

consideravelmente, principalmente a dieta do ocidente, onde a razão ω -6: ω -3 está entre 20 e 30:1. Esta redução no consumo ocorreu devido a redução no consumo de peixe e aumento de produtos industrializados, como carne de animais alimentados à base de grãos ricos em AGs ω -6 (Figura 9). À medida que a razão ω -6: ω -3 aumenta, a incidência de diabetes tipo 2 aumenta proporcionalmente, assim como doenças do coração, câncer e outras doenças inflamatórias e autoimunes (SIMOPOULOS, 1999; 2006) (Figura 10). Embora os efeitos anti-diabéticos dos AGs ω -3 ainda são controversos, estudos epidemiológicos demonstram baixa incidência de diabetes em populações com alto consumo de ω -3 (NETTLETON; KATZ, 2005; DE CATERINA *et al.*, 2007).

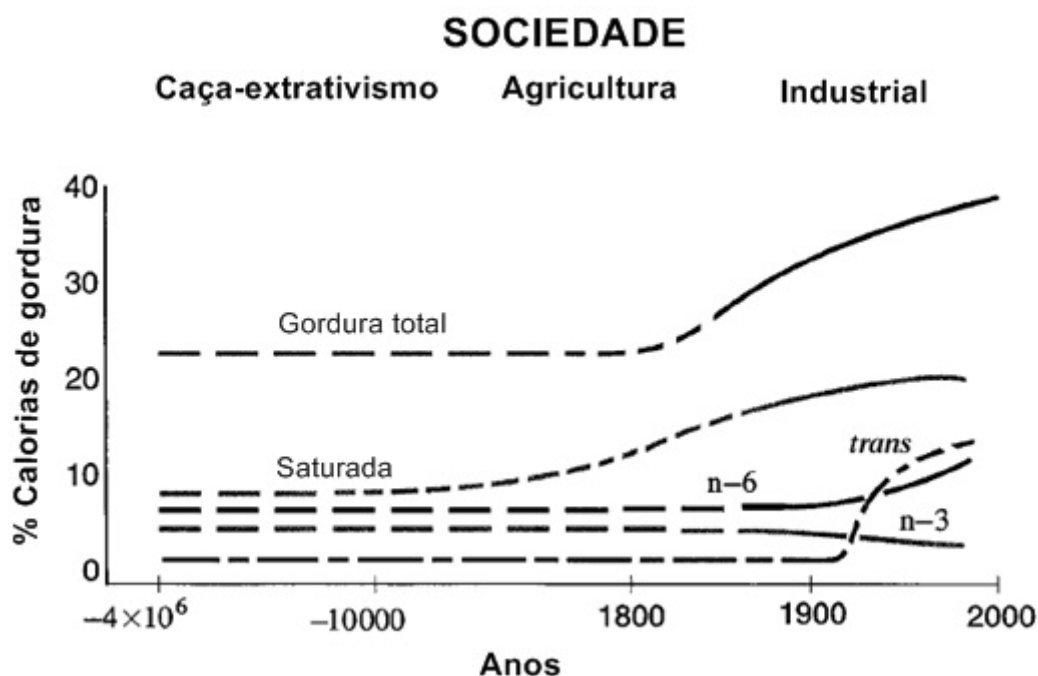


Figura 9: Percentual de energia a partir de ácidos graxos ingerida pelo homem desde a época paleolítica até a atualidade (adaptado de SIMOPOULOS, 1999)

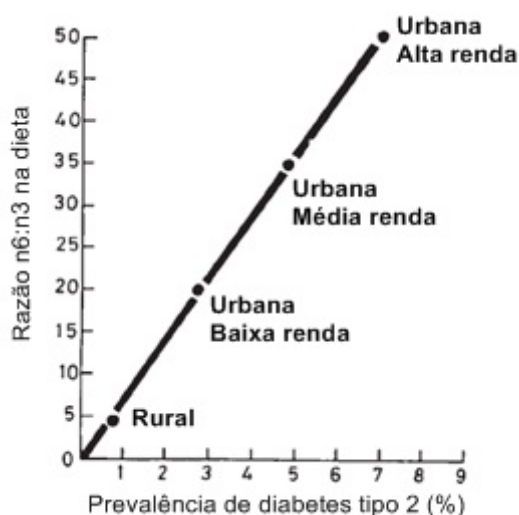


Figura 10: Relação entre o consumo de gorduras na dieta e a prevalência de diabetes tipo II (adaptado de SIMOPOULOS, 1999)

Em contraposição à dieta ocidental, a dieta do mediterrâneo, composta basicamente por cereais não refinados, muitos vegetais e frutas, óleo de oliva e peixe, está diretamente relacionada a diversos efeitos benéficos. A baixa quantidade de gordura saturada, alta concentração de ácidos graxos monoinsaturados, carboidratos complexos, fibras, beta-caroteno, vitaminas C e E são elementos-chave para uma dieta saudável e são comumente encontrados na dieta de povos que vivem próximos ao mar mediterrâneo (PANAGIOTAKOS; POLYCHRONOPOULOS, 2005).

Recentemente, o perfil de lipídios da dieta tem sido considerado modulador da sensibilidade à insulina e, conseqüentemente, importante no desenvolvimento da diabetes. O conceito geral de que uma dieta rica em gordura resulta em obesidade têm sido ampliado e corrigido por estudos recentes. A ingestão de gordura saturada está diretamente relacionada à obesidade, enquanto a gordura poliinsaturada pode apresentar efeitos nulos ou até mesmo protetores (STORLIEN *et al.*, 2000).

Os ácidos graxos poliinsaturados da família ω -3 têm despertado interesse, principalmente por apresentarem efeitos antiarrítmicos, antitrombogênicos, hipotriacilglicerolemiantes (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002). Devido aos efeitos benéficos, estudos em modelos animais e clínicos investigaram a ação dos ácidos graxos ω -3 como possível tratamento na diabetes (SIRTORI; GALLI, 2002). Os ácidos graxos ω -3 exercem seus efeitos modulando 3 vias principais: 1) estrutura e função da membrana plasmática; 2) síntese de eicosanóides; e 3) expressão gênica

(JUMP, 2002). A incorporação dos ácidos graxos poliinsaturados AA, EPA e DHA na membrana do músculo esquelético é capaz de aumentar a fluidez de membrana, número de receptores de insulina na membrana plasmática e a ação da insulina (MARTIN DE SANTA OLALLA *et al.*, 2009).

O consumo de ácidos graxos ω -3 apresentam capacidade em reduzir a lipemia tanto em jejum quanto posprandial e a resposta pró-inflamatória associada em condições de hipercolesterolemia e obesidade (HASSANALI *et al.*, 2009). Estes ácidos graxos são considerados potentes ativadores de PPARs (DAYNES; JONES, 2002). Os PPARs são ligantes de fatores transcricionais pertencentes à superfamília de receptores hormonais nucleares. O PPAR- γ atua na diferenciação de adipócitos e modula o metabolismo e inflamação de células imunitárias (TONTONNOZ; SPIEGELMAN, 2008). A ativação do PPAR- γ também é capaz de aumentar a sensibilidade à insulina e, conseqüentemente, reduz a resistência à insulina. As tiazolidinedionas (TZDs) fazem parte de uma classe de medicamentos capazes de aumentar a ação da insulina e atuam como potentes ligantes de PPAR- γ (GUO; TABRIZCHI, 2006).

1.7 Justificativa

Vários estudos clínicos e em modelos animais demonstram efeitos benéficos dos ácidos graxos ω -3 em diferentes doenças crônicas. Dietas compostas por altas concentrações de ácidos graxos saturados, monoinsaturados ω -9 ou poliinsaturados ω -6 contribuem para o desenvolvimento da resistência à insulina em ratos. Interessantemente, este mesmo estudo mostrou normalização da ação de insulina, através do teste hiperinsulinêmico-euglicêmico, nos animais insulino resistentes induzidos por dieta rica em ácidos graxos saturados ao substituir 11% dos ácidos graxos poliinsaturados presentes na dieta por ácidos graxos ω -3 (STORLIEN *et al.*, 1991). A maioria dos estudos experimentais enfocam a importância do óleo de peixe na prevenção do desenvolvimento e estabelecimento da resistência à insulina e dislipidemia em animais alimentados com dietas hiperlipídica ou com alta concentração de sucrose (STORLIEN *et al.*, 1987; KLIMES *et al.*, 1993; PAGLIASSOTTI *et al.*, 1996; PODOLIN *et al.*, 1998; PEYRON-CASO *et al.*, 2002).

Menos estudos avaliaram o efeito do óleo de peixe na reversão do estado de resistência à insulina induzido pela dieta. Lombardo *et al.* demonstraram que dieta contendo 7% (7 g de lipídeo em 100 g de ração) de óleo de fígado de bacalhau por 30 dias foi capaz de reverter a hipertriacilglicerolemia em animais alimentados com dieta rica em sucrose (LOMBARDO *et al.*, 1996). D'Alessandro *et al.*, com este mesmo protocolo experimental, demonstraram capacidade do óleo de fígado de bacalhau em melhorar a oxidação e armazenamento da glicose no músculo gastrocnêmio de ratos insulino resistentes (D'ALESSANDRO *et al.*, 2000). Lombardo *et al.* foi o primeiro a mostrar reversão da resistência à insulina em ratos alimentados com alta concentração de sucrose após adição de óleo de peixe (7%) na dieta por 2 meses (LOMBARDO *et al.*, 2007). No entanto, a concentração de óleo de peixe nestes estudos é considerada alta e futuros estudos são necessários para determinar a eficácia de doses menores. Outros estudos apresentam dados discrepantes devido diferentes fatores, como concentração de ácidos graxos na dieta, tipo de modelo animal utilizado, relação entre os outros ácidos graxos saturado, monoinsaturado e poliinsaturados ω -6. Gillam *et al.* não encontraram efeitos benéficos dos ácidos graxos ω -3 em relação ao estado de resistência à insulina, função pancreática, concentração sérica de leptina e triacilglicerol em ratos Zucker fa/fa alimentados com dieta contendo 10% de óleo de linhaça ou menhadem após 8,5 semanas (GILLAM *et al.*, 2009). Em camundongos *ob/ob* alimentados com dieta hiperlipídica (45% da energia proveniente de lipídeos) rica em EPA ou DHA foi observado redução das concentrações plasmáticas de triacilglicerol e ácidos graxos livres, sem, no entanto, observar melhora na sensibilidade à insulina (MUSTAD *et al.*, 2006).

Os ácidos graxos ω -3 também apresentam importante papel na modulação da resposta imunitária, principalmente em indivíduos portadores de doenças inflamatórias como câncer, doenças do trato gastrointestinal, artrite reumatóide, etc (SIJBEN; CALDER, 2007). No entanto, poucos estudos investigaram a modulação destes ácidos graxos no estado inflamatório presente em indivíduos obesos e diabéticos. Todoric *et al.* foi o primeiro estudo a mostrar redução da inflamação do tecido adiposo em camundongos diabéticos *db/db* alimentados com dietas

hiperlipídicas contendo concentrados purificados de EPA ou DHA (TODORIC *et al.*, 2006).

Portanto, os estudos que utilizam diferentes abordagens como diferentes tipos de óleos, modelos animais, doses e períodos de suplementação, contribuem para o esclarecimento dos efeitos causados pelos ácidos graxos ω -3. Nosso estudo objetiva investigar os efeitos do óleo de peixe, rico em ácidos graxos ω -3, sobre o metabolismo e a inflamação de ratos obesos. A abordagem utilizada em nosso estudo se diferencia dos outros por utilizar uma concentração de óleo de peixe mais baixa (1 g/kg p.c.), por um período relativamente curto e um modelo de obesidade diferente do induzido por dieta ou geneticamente modificado.

2 OBJETIVO

Determinar o efeito da suplementação com óleo de peixe sobre o metabolismo de glicose e lipídeos em tecido muscular e adiposo de ratos obesos .

Para alcançar estes objetivos foram analisados:

1. A sensibilidade à insulina “*in vivo*” dos animais.
2. O perfil bioquímico plasmático da glicemia, triacilglicerolemia, colesterolemia e insulina.
3. A responsividade à insulina do músculo sóleo isolado “*ex vivo*”.
4. A responsividade à insulina do tecido adiposo “*ex vivo*”.
5. O diâmetro médio dos adipócitos e a lipólise do tecido adiposo “*ex vivo*”.
6. A expressão protéica de COX-2 no tecido adiposo.
7. A estrutura do tecido adiposo.
8. O perfil de células estromais vasculares no tecido adiposo positivas para CD4, CD8 e macrófagos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. albinus) obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12/12 horas), em ambiente com temperatura controlada de 22 ± 2 °C com água e ração (Nuvilab CR-1 – Nuvital, Colombo, Brasil) livres. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPR, protocolo n° 215 (ANEXO 1).

3.2 Ácidos graxos

O óleo de peixe foi cedido gentilmente pela Fundação Herbarium, contendo 1g/cápsula na proporção de 0,192 g de EPA e 0,124g de DHA e a gordura de coco da Indústria Brasileira Refino de Óleos do Brasil LTDA. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Celular no Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

3.3 Métodos

3.3.1 Indução de obesidade

Foram injetados em ratos recém-nascidos, via subcutânea, glutamato monossódico (4 mg/g) diluído em PBS, nos 5 primeiros dias pós-nascimento (DE FREITAS MATHIAS *et al.*, 2007). Os animais controle receberam uma dose de cloreto de sódio (1,25 g/kg) no mesmo período. Após 3 meses, os animais apresentaram intolerância à glicose, e aumento da lipogênese, características estas de animal obeso.

3.3.2 Protocolo experimental

Foram utilizados um total de 144 animais divididos em 6 experimentos. Após a indução de obesidade, os animais com 21 dias foram aleatoriamente divididos em dois grupos: não obeso e obeso. Após 90 dias, foram realizados testes de tolerância à insulina. Os animais foram subdivididos em seis subgrupos: não obeso e não

suplementado (C), não obeso suplementado com óleo de peixe (OP), não obeso suplementado com gordura de coco (GC), obeso não suplementado (Ob), obeso suplementado com óleo de peixe (ObOP) e obeso suplementado com gordura de coco (ObGC). A suplementação com óleo de peixe ou gordura de coco foi administrada por via oral, na dose de 1 g/kg, utilizando-se micropipetas. Após 4 semanas de suplementação os animais foram ortotanasiados, após jejum, por decaptação para coleta e análise dos tecidos. O sangue foi coletado em tubos contendo heparina, centrifugado a 300 x g por 10 min, e o plasma utilizado para análise do perfil bioquímico.



Figura 11: Esquema do protocolo experimental

3.3.3 Teste de tolerância à insulina

Animais em jejum foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg). Foi administrada insulina endovenosa (0,75 mU/Kg) e mensurada a glicemia nos tempos 0, 4, 8, 12 e 16 minutos (SERAPHIM *et al.*, 2001; TOMIE FURUYA *et al.*, 2005). Os

valores da glicemia foram utilizados para calcular a constante de decaimento da glicose (Kitt) descrito anteriormente (BONORA *et al.*, 1989).

3.3.4 Índice Lee

O índice Lee [$\text{peso corpóreo (g)}^{1/3}/\text{comprimento naso-anal (cm)} \times 1000$] é um parâmetro utilizado para indicar o grau de obesidade do animal (BERNARDIS; PATTERSON, 1968).

3.3.5 Efeito sobre o metabolismo de glicose em músculo sóleo

O músculo sóleo foi isolado e incubado como previamente descrito (CRETIAZ *et al.*, 1980; CHALLISS *et al.*, 1983). Os ratos foram anestesiados, seus músculos sóleos isolados, pesados e pré-incubados em tampão bicarbonato de Krebs-Ringer contendo 5,6 mM de glicose, pH 7,4, por 30 min em banho aquecido a 37° C, 95% O₂ e 5% CO₂, com agitação contínua (120 rpm). Após este período, os músculos foram transferidos para outros frascos contendo o mesmo tampão, porém acrescido de 0,3 µCi/mL de [U-¹⁴C]-D-glicose. Feniletilamina (0,4 mL), diluída em metanol (1:1, v/v), foi adicionada em compartimento separado para absorção do ¹⁴CO₂. Os músculos foram incubados na ausência ou presença de insulina na concentração de 10.000 µU/mL, por 1 hora, nas mesmas condições. Ao final da incubação, os músculos foram digeridos em solução KOH 1M. Em seguida, foram mensuradas síntese de [14C]-glicogênio, produção de lactato e descarboxilação de [U-¹⁴C]-D-glicose, segundo os métodos descritos por ESPINAL *et al.* (ESPINAL *et al.*, 1983), ENGEL & JONES (ENGEL; JONES, 1978) e LEIGHTON *et al.* (LEIGHTON; COOPER, 1988), respectivamente.

3.3.6 Efeito sobre o metabolismo de glicose em tecido adiposo

O tecido adiposo epididimal foi isolado, pesado aproximadamente 100 mg, e incubado em tampão Krebs-Ringer, como descrito acima. Os tecido foram incubados na ausência ou presença de insulina na concentração de 1.000 µU/mL, por 1 hora, nas mesmas condições. Ao final da incubação, a produção de lactato foi mensurada segundo método descrito por ENGEL & JONES (ENGEL; JONES, 1978).

3.3.7 Análises plasmáticas

O sangue foi coletado após jejum, aproximadamente às 9 horas da manhã.

a) Mensuração da Glicemia

A glicose foi quantificada por método colorimétrico, utilizando-se sistema comercial Glicose E enzimática da labtest. Os ensaios foram realizados segundo as instruções do fabricante. A leitura foi feita em espectrofotômetro de placa a 505 nm.

c) Determinação do Colesterol Total

Foi determinado por método enzimático, conforme sistema comercial Colesterol COD-ANA da Labtest. As amostras foram preparadas segundo as instruções do fabricante com posterior leitura em absorvância de 500 nm, e a concentração de colesterol em foi expressa mg/dL.

d) Determinação do Colesterol HDL

Foi utilizado o sistema para precipitação das lipoproteínas de baixa e de alta densidade (LDL e VLDL) e determinação do colesterol HDL no sobrenadante após centrifugação utilizando-se o sistema comercial enzimático Colesterol HDL – precipitante em associação com o sistema comercial Colesterol COD-ANA da Labtest, com leitura de absorvância a 500nm. Após a medida da absorvância em 500nm, foi calculada a concentração de colesterol HDL em mg/dL.

e) Determinação dos Triacilgliceróis (TAGs)

Foi determinado pelo método enzimático colorimétrico que utiliza quatro enzimas, conforme o sistema comercial TRIGLICÉRIDES GPO-ANA da Labtest. As amostras foram preparadas seguindo-se as instruções do fabricante, e após a leitura da absorvância em 540nm, a concentração de triacilgliceróis foi expressa em mg/dL.

f) Determinação da insulina

Alíquotas do plasma foram congeladas (-80° C) para posterior análise. A concentração de insulina foi determinada por imunoensaio enzimático de competição

e expressa em ng/mL conforme metodologia descrita pelo fabricante (SPI-Bio Bertin Pharma – Montigny le Bretonneux; France).

3.3.8 Expressão protéica

a) Quantificação protéica

Os músculos congelados foram homogeneizados em tampão de lise na proporção 1:7 com o auxílio de um homogeneizador Politron (25.000 rpm/min), centrifugados por 5 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante coletado. A quantificação protéica foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Após a dosagem protéica as amostras foram diluídas em tampão laemmli 5X, na concentração de 3 µg/mL e submetidas à eletroforese SDS-PAGE seguido por Imunoblotting.

b) Eletroforese: método “SDS-PAGE” (Dodecil de sulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida)

Foram aplicados 45 µg de proteína por “lane” no gel. A corrida foi mantida em 160 V por aproximadamente 1 hora (Bio-rad Mini-PROTEAN).

c) Imunoblotting

O imunoblotting (ou "Western blotting") foi realizado como descrito anteriormente (TOWBIN *et al.*, 1979). A transferência foi realizada a 25 V por 1 hora em equipamento semi-dry (Biorad trans-blot). Foram utilizados anticorpos policlonais para COX-2 na diluição de 1:500 (incubação por 3 horas). O anticorpo secundário conjugado com HRP (Horseradish peroxidase) foi diluído 1:10.000. A detecção foi realizada pela adição do substrato quimiluminescente. As imagens foram analisadas por densitometria pelo programa Image J.

3.3.9 Lipólise

Aproximadamente 100 mg do tecido adiposo epididimal foi cortado em pequenos fragmentos e incubados por 1 h em tampão Krebs-Ringer a 37 C. Os tecidos foram incubados na presença ou ausência de adrenalina (10 µg/mL). Após, os fragmentos

foram removidos e a concentração de glicerol foi determinada por ensaio enzimático colorimétrico. Os dados foram expressos como % do controle.

3.3.10 Diâmetro médio dos adipócitos

Aproximadamente 2 g do tecido adiposo epididimal foi cortado em pequenos pedaços e digerido por 30 min a 37 C em meio DMEM contendo colagenase (1mg/mL) e BSA (4%). Após filtração do tecido digerido em filtro de nylon (100 µm), o filtrado foi centrifugado a 400 g por 1 min. As frações das células estromais vasculares e de adipócitos foram obtidas através do “*pellet*” e do sobrenadante, respectivamente. A fração dos adipócitos foi analisada utilizando-se uma lente graduada. Foram mensurados o diâmetro de 100 células para cada grupo

3.3.11 Isolamento e marcação das células estromais vasculares do tecido adiposo

Após seguir o procedimento descrito acima, a fração das células estromais vasculares foram incubadas em solução hemolítica, a 37°C por 30 min. O restante das células foi marcado com os anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e anti-mac (aproximadamente 40 µL – $2,5 \times 10^5$ células) . As células positivas para cada anticorpo foram quantificados por citometria de fluxo utilizando-se o aparelho FACSCalibur (BD Biosciences).

3.3.12 Microscopia óptica

O tecido adiposo foi isolado e fixado por imersão em solução ALFAC (álcool 80° foramldeído 40% ácido acético glacial na proporção 85:10:5) por 8 horas. O material passou pelos processos de desidratação, diafanização e inclusão. A microtomia foi feita em cortes de 5µm de espessura. A coloração foi hematoxilina/eosina. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz nos aumentos de 100x e 400x.

3.4 Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Foi utilizado o teste de normalidade D’Agostinho Pearson para a verificação da distribuição normal. A análise de variância de uma via (one way-ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey foi utilizada para avaliar os grupos controle e obeso em relação às

diferentes suplementações. Para comparação de situações onde existiam grupos estimulados e não estimulados ou controle e obeso, foi empregado o teste “t” de student para confirmação da eficácia do estímulo ou do modelo de obesidade. O valor de $P < 0,05$ foi adotado como nível de significância. As análises estatísticas e a confecção dos gráficos foram realizadas em software graphpad prism v.5.01 (Graphpad Inc.; La Jolla, USA).

4 RESULTADOS

De acordo como o índice Lee, o grupo obeso apresentou maior grau de obesidade quando comparado ao dos animais controle, mesmo apresentando menor peso corpóreo (tabela 1). Ainda nesta tabela, é possível observar que estes animais consomem a mesma quantidade de ração que os animais controle, ou seja, são normofágicos. Em contraposição, apresentam quantidade de tecido adiposo visceral (epididimal e retroperitoneal), aproximadamente, 2,5 vezes maior que o do grupo Controle (tabela 1). As suplementações com óleo de peixe e gordura de coco não apresentaram diferenças significativas em relação aos parâmetros índice de Lee, peso corpóreo e consumo de ração.

Grupo	Índice Lee	Peso (g)	Consumo de ração (g/100g)	TA epididimal (g/100g)	TA retroperitoneal (g/100g)
C	314,00±2,89 (n=16)	367,50±7,50 (n=22)	7,27±0,11 (n=39)	0,85±0,06 (n=17)	0,96±0,10 (n=18)
OP	314,7±2,44 (n=17)	371,70±6,70 (n=23)	7,03±0,11 (n=39)	1,00±0,05 (n=17)	1,10±0,07 (n=19)
GC	313,00±2,17 (n=17)	375,00±6,31 (n=24)	7,18±0,15 (n=39)	0,89±0,06 (n=17)	1,02±0,09 (n=20)
Ob	326,60±4,19* (n=16)	311,00±8,14* (n=23)	7,16±0,19 (n=39)	2,06±0,15* (n=18)	2,45±0,12* (n=18)
ObOP	332,00±3,87 (n=16)	310,00±10,19 (n=26)	6,73±0,16 (n=39)	2,02±0,12 (n=20)	2,50±0,13 (n=21)
ObGC	325,40±2,74 (n=17)	312,90±7,10 (n=25)	6,96±0,18 (n=38)	2,13±0,13 (n=20)	2,70±0,14 (n=20)

TABELA 1 – Parâmetros dos animais com 120 dias (Teste “t” student).

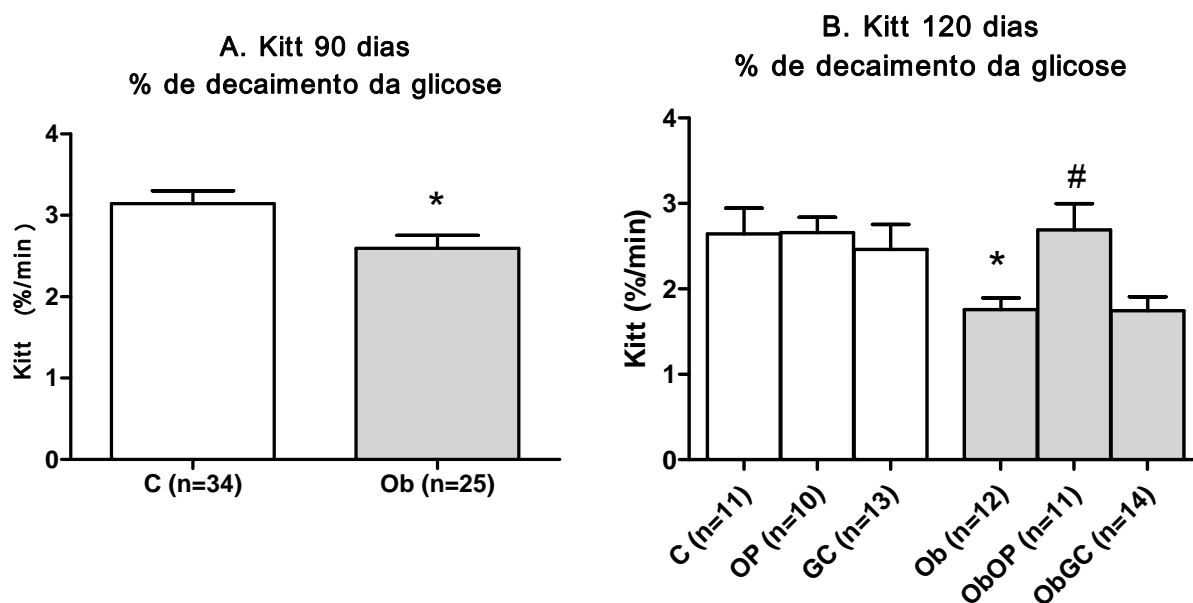


Figura 12: A. Kitt dos animais com 90 dias; B. Kitt dos animais com 120 dias. * quando comparado com o grupo C (teste “t” student); # quando comparado com o grupo Ob (One way ANOVA com pós-teste de Tukey).

Os animais obesos com 90 dias foram considerados resistentes à insulina por apresentarem menor taxa de decaimento da glicose no teste de tolerância à insulina ($p < 0,05$ C vs. Ob) (Figura 12A). Após o período de suplementação, podemos observar que apenas o grupo ObOP apresentou sensibilidade à insulina semelhante à dos animais controle ($p > 0,05$ C vs. Ob) (figura 12B).

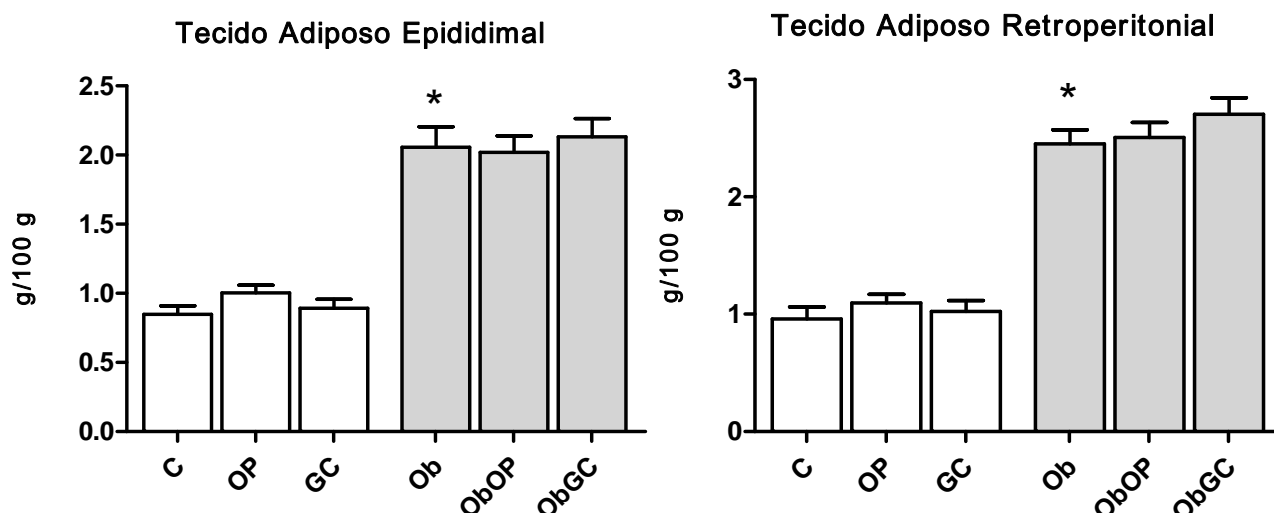


Figura 13: A. Peso do tecido adiposo epididimal dos grupos C (n=17), OP (n=17), GC (n=20), Ob (n=18), ObOP (n=20), ObGC (n=20); B. Peso do tecido adiposo retroperitoneal dos grupos C (n=18), OP (n=19), GC (n=20), Ob (n=18), ObOP (n=21), ObGC (n=20). * quando comparado com o grupo C (teste "t" student).

Nas figuras 13A e 13B estão apresentados os dados referentes ao peso do tecido adiposo epididimal (A) e retroperitoneal (B). Devido à obesidade, houve elevação de, aproximadamente, 2,5 vezes de massa epididimal (A) e retro peritoneal (B), quando comparada à dos animais controle ($p < 0,05$ Ob vs. C). A suplementação com gordura de coco ou óleo de peixe não modifica a massa adiposa ($p > 0,05$), sendo similar à do grupo não suplementado.

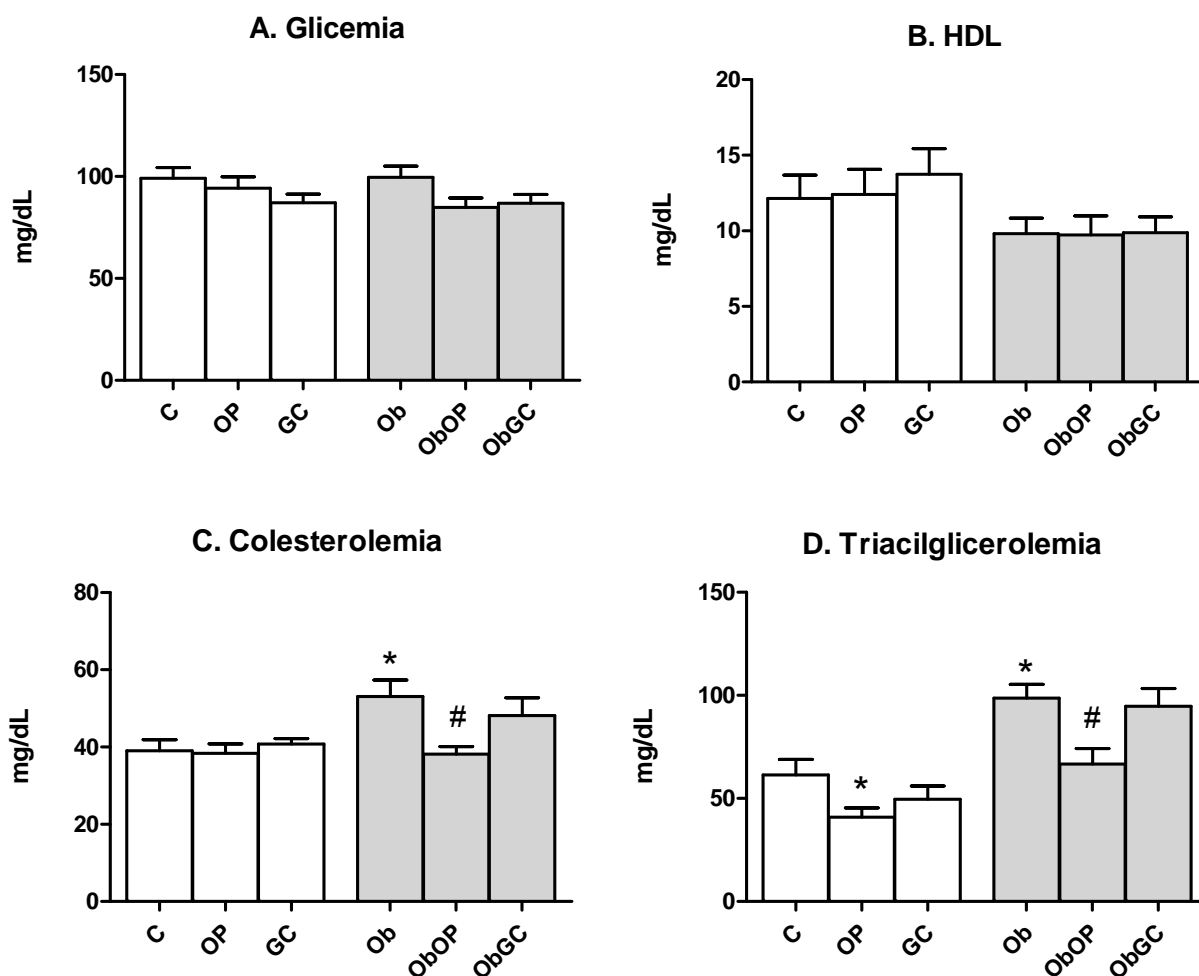


Figura 14: A. Glicemia dos grupos C (n=17), OP (n=20), GC (n=20), Ob (n=17), ObOP (n=20), ObGC (n=20); B. HDL dos grupos C (n=14), OP (n=17), GC (n=18), Ob (n=17), ObOP (n=20), ObGC (n=20); C. Colesterolemia dos grupos C (n=15), OP (n=18), GC (n=18), Ob (n=11), ObOP (n=16), ObGC (n=20); D. Triacilglicerolemia dos grupos C (n=12), OP (n=17), GC (n=11), Ob (n=11), ObOP (n=13), ObGC (n=17). * quando comparado com o grupo C (teste “t” student e One way ANOVA com pós-teste de Tukey); # quando comparado com o grupo Ob (One way ANOVA com pós-teste de Tukey).

Em relação ao perfil bioquímico plasmático, não houve alteração entre os grupos, na glicemia e na concentração de colesterol-HDL (Figuras 14A e 14B). A concentração de colesterol circulante estava elevada nos animais obesos sem suplementação ($p < 0,05$; Ob vs. C). A suplementação com óleo de peixe no grupo obeso (ObOP) promoveu redução (30%) da colesterolemia ($p < 0,005$; ObOP vs. Ob), apresentando valores similares aos dos grupos não obesos (Figura 14C). A suplementação com gordura de coco não promoveu este efeito sendo similar à do Ob ($p > 0,05$). A triacilglicerolemia no grupo não obeso e suplementado com óleo de peixe (OP) estava significativamente menor quando comparada à do grupo controle ($p < 0,05$; OP vs. C) (Figura 14D). A gordura de coco não tem a habilidade de reduzir

a triacilglicerolemia ($p > 0,05$; GC vs. C). A obesidade elevou a concentração de triacilglicerol em, aproximadamente, 2 vezes ($p < 0,05$; Ob vs. C). Os animais obesos suplementados com óleo de peixe (ObOP) tiveram redução de 34% na triacilglicerolemia quando comparados aos obesos ($p < 0,05$; ObOP vs. Ob), atingindo valor próximo ao do grupo não obeso ($p > 0,05$; ObOP vs. C), mas ainda significativamente maior que à do grupo não obeso e suplementado com óleo de peixe ($p < 0,05$; ObOP vs. OP).

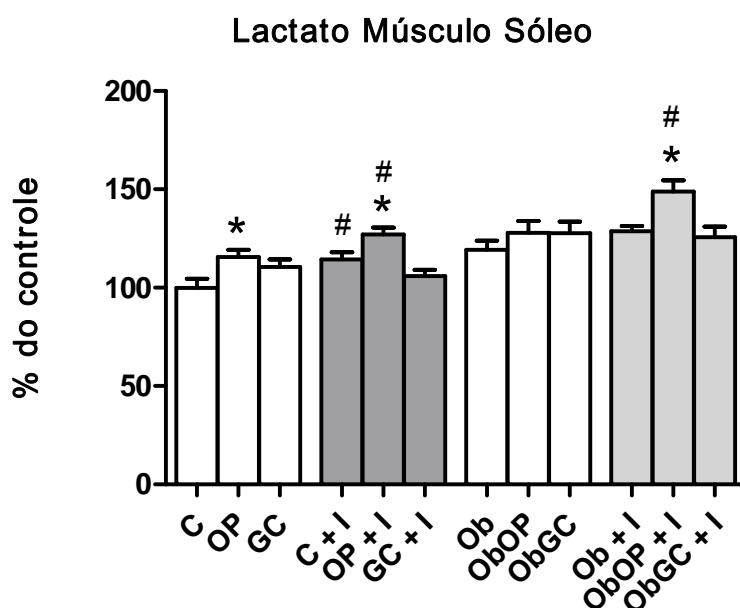


Figura 15: Produção de lactato pelo músculo incubado dos grupos C (n=31), OP (n=32), GC (n=32), C+I (n=31), OP+I (n=32), GC+I (n=32) Ob (n=26), ObOP (n=37), ObGC (n=36), Ob+I (n=25), ObOP+I (n=35), ObGC+I (n=44). * quando comparado com seu respectivo grupo controle (One way ANOVA com pós-teste de Tukey); # quando comparado com seu respectivo grupo sem estímulo (teste “t” student).

Nos animais não obesos e suplementados com óleo de peixe a produção de lactato, a partir de glicose, pelo músculo esquelético (ME) incubado na ausência de estímulo (OP) foi 15% maior que à do grupo controle ($p < 0,05$ vs. C). A suplementação com gordura de coco não modificou a produção de lactato pelo ME (GC) quando comparada à do controle ($p > 0,05$). A indução de obesidade não alterou a produção de lactato nos grupos sem (Ob) e com suplementação (OP e GC) quando comparado aos seus respectivos controles ($p > 0,05$) (figura 15).

O estímulo com insulina elevou a produção de lactato pelo ME do grupo controle (C+I) em 14% e em 10% no grupo suplementado com óleo de peixe (OP+I) quando comparado à ausência de estímulo. Não houve alteração no grupo suplementado com gordura de coco (GC+I). Interessantemente, somente no grupo obeso suplementado com óleo de peixe e estimulado com insulina (ObOP+I) houve resposta significativa do ME, que foi na ordem de 10% quando comparado ao seu respectivo grupo controle ($p < 0,05$; ObOP+I vs. ObOP). Ausência de suplementação (Ob+I) e com gordura de coco (ObGC+I) quando estimulados com insulina não

modificaram a produção de lactato quando comparados aos seus respectivos grupos controle ($p > 0,05$ vs. Ob e ObGC) (figura 15).

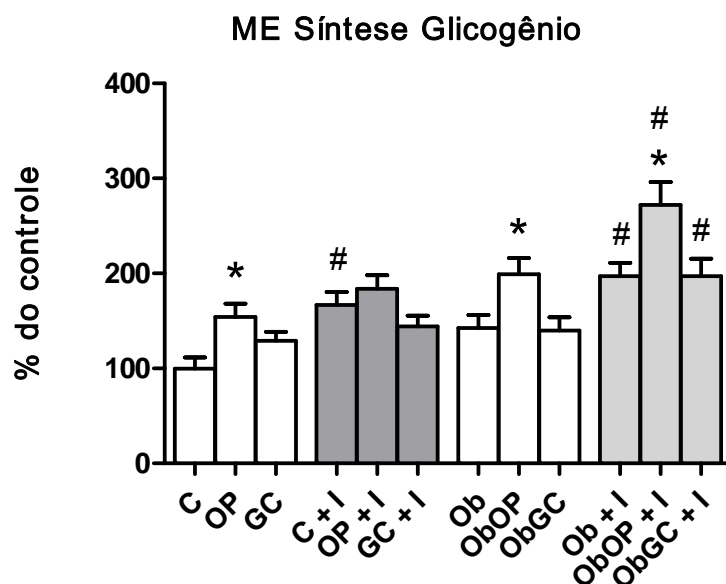


Figura 16: Síntese de glicogênio no músculo sóleo incubado dos grupos C (n=31), OP (n=32), GC (n=32), C+I (n=31), OP+I (n=32), GC+I (n=32) Ob (n=26), ObOP (n=37), ObGC (n=36), Ob+I (n=25), ObOP+I (n=35), ObGC+I (n=44). * quando comparado com seu respectivo grupo controle (One way ANOVA com pós-teste de Tukey); # quando comparado com seu respectivo grupo sem estímulo (teste "t" student).

A suplementação com óleo de peixe aos ratos não obesos (OP) elevou a síntese de glicogênio em 50% na condição sem estímulo ($p < 0,05$; OP vs. C). Suplementação com gordura de coco também incrementou a síntese de glicogênio, mas não foi diferente à do controle ($p > 0,05$). No grupo obeso sem suplementação (Ob), a síntese de glicogênio não foi diferente da do controle ($p < 0,05$). No grupo obeso e suplementado com óleo de peixe (ObOP), a síntese de glicogênio foi 40% maior que a do grupo Ob sem suplementação ($p < 0,05$; ObOP vs. Ob). A presença de insulina incrementou a síntese de glicogênio no grupo controle em 66% (C+I). No grupo suplementado com óleo de peixe (OP+I), como em situação basal a síntese de glicogênio já estava elevada, a presença de insulina não causou efeito adicional quando comparado à situação basal ($p > 0,05$). No grupo gordura de coco com insulina (GC+I) a síntese foi similar à condição basal ($p > 0,05$). No grupo obeso não suplementado e estimulado com insulina (Ob+I) a síntese de glicogênio aumentou em 38% quando comparada à condição basal ($p < 0,05$). No grupo suplementado com óleo de peixe e gordura de coco, esta elevou-se em 36% e 45%, respectivamente, quando comparada à ausência de estímulo ($p < 0,05$) (figura 16).

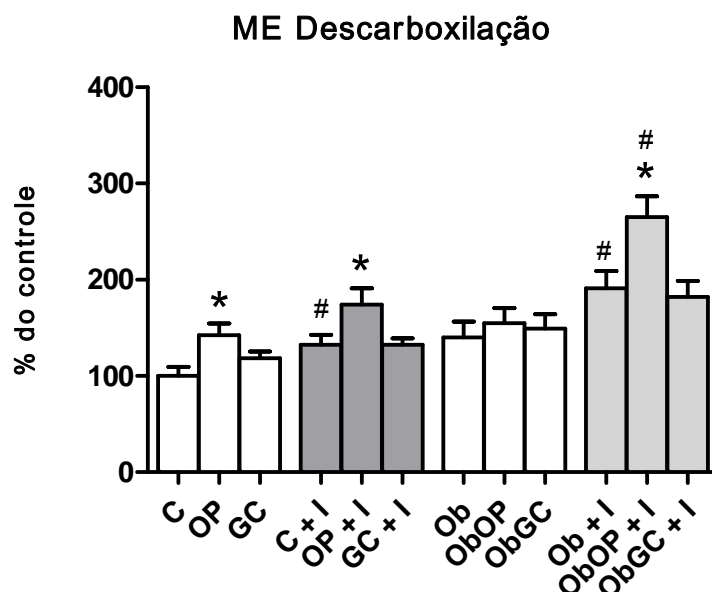


Figura 17: Descarboxilação do músculo sóleo incubado dos grupos C (n=21), OP (n=25), GC (n=21), C+I (n=22), OP+I (n=18), GC+I (n=21) Ob (n=16), ObOP (n=32), ObGC (n=19), Ob+I (n=19), ObOP+I (n=31), ObGC+I (n=31). * quando comparado com seu respectivo grupo controle (One way ANOVA com pós-teste de Tukey); # quando comparado com seu respectivo grupo sem estímulo (teste “t” student).

A descarboxilação de glicose pelo ME dos grupos estudados está na figura 17. A suplementação com óleo de peixe elevou a descarboxilação da glicose em situação basal em 42% quando comparada à do grupo controle ($p < 0,05$). A gordura de coco não causou nenhum efeito ($p > 0,05$) assim como a condição de obesidade nos animais sem ou com suplementação ($p > 0,05$). A presença de insulina incrementou em 32% a descarboxilação da glicose pelo ME dos animais não obesos e sem suplementação (C+I) quando comparada à situação basal ($p < 0,05$). A suplementação com óleo de peixe elevou a descarboxilação da glicose pelo ME na presença de insulina em 31% ($p < 0,05$) e a suplementação com gordura de coco não causou nenhum efeito ($p < 0,05$). Nos animais obesos sem suplementação, a presença de insulina (Ob+I) elevou a descarboxilação em 45% pelo ME quando comparada à situação basal ($p < 0,05$; Ob+I vs. Ob). A suplementação com óleo de peixe na presença de insulina também causou elevação adicional da descarboxilação da glicose em 71% quando comparada ao seu respectivo grupo controle ($p < 0,05$; ObOP+I vs. ObOP) e elevou em 52% quando comparada à situação não obesa estimulado pela insulina ($p < 0,05$; ObOP+I vs. OP+I) (figura 17).

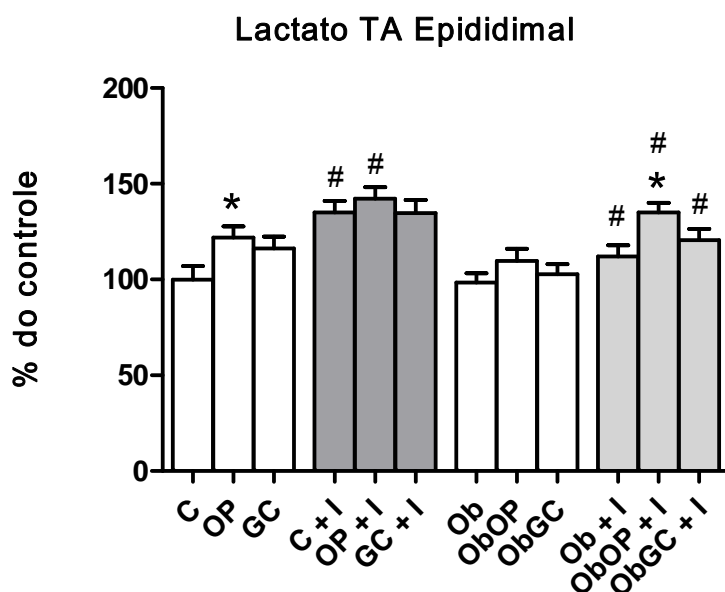


Figura 18: Produção de lactato pelo tecido adiposo epididimal incubado dos grupos C (n=29), OP (n=30), GC (n=34), C+I (n=32), OP+I (n=36), GC+I (n=43) Ob (n=33), ObOP (n=34), ObGC (n=31), Ob+I (n=34), ObOP+I (n=35), ObGC+I (n=44). * quando comparado com seu respectivo grupo controle (One way ANOVA com pós-teste de Tukey); # quando comparado com seu respectivo grupo sem estímulo (teste “t” student).

A produção de lactato a partir da glicose pelo TA epididimal está apresentado na figura 18. Na situação basal, a suplementação com óleo de peixe (OP) elevou a produção de lactato em 22% quando comparada à do grupo não suplementado ($p < 0,05$ vs. C). A suplementação com gordura de coco apresentou tendência em elevar a produção de lactato, mas não foi diferente significativamente ($p > 0,05$ vs. C). Nos grupos obesos, sem e com suplementação, em condição basal, a produção de lactato não foi diferente da dos grupos controles ($p > 0,05$). O estímulo com insulina incrementou, no grupo controle (C+I) a produção de lactato em 35% e no grupo óleo de peixe (OP+I) em 16% ($p < 0,05$ vs. sem estímulo). Não houve alteração no grupo com gordura de coco ($p > 0,05$ vs. GC). No grupo obeso sem suplementação o estímulo com insulina (Ob+I) elevou a produção em 14% ($p < 0,05$ vs. Ob). A suplementação com óleo de peixe (ObOP+I) e gordura de coco (ObGC+I) aumentaram a produção de lactato em 23% e 17% quando comparada à dos grupos ObOP e ObGC, respectivamente ($p < 0,05$).

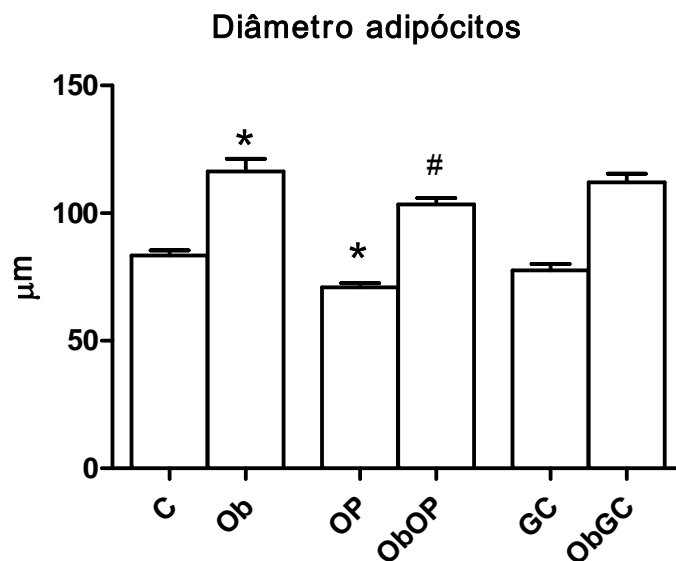


Figura 19: Diâmetro médio dos adipócitos dos grupos C (n=255), OP (n=255), GC (n=255), Ob (n=200), ObOP (n=200), ObGC (n=200). * quando comparado com o grupo C (teste “t” student e One way ANOVA com pós-teste de Tukey); # quando comparado com o grupo Ob (One way ANOVA com pós-teste de Tukey).

A indução de obesidade (Ob) promoveu aumento de 1,4 vezes no diâmetro do adipócito quando comparado ao do controle ($p < 0,05$). Por outro lado a suplementação com óleo de peixe no grupo não obeso reduziu em 15% o diâmetro do adipócito quando comparado ao C ($p < 0,05$). No grupo obeso suplementado com óleo de peixe (ObOP) o diâmetro dos adipócitos foi 11% menor quando comparado ao grupo obeso sem suplementação (Ob) ($p < 0,05$). O diâmetro do adipócito no grupo não suplementado (C) e obeso (Ob) não foram diferentes quando comparados aos respectivos grupos suplementado com gordura de coco (GC) e obeso suplementado com gordura de coco (ObGC) (C e Ob vs. GC e ObGC; $p > 0,05$) (Figura 19).

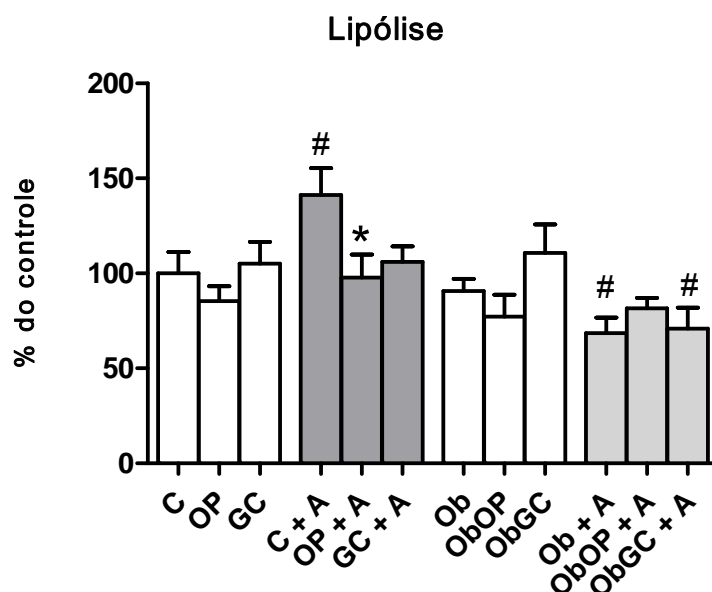


Figura 20: Lipólise do tecido adiposo epididimal incubado dos grupos C (n=9), OP (n=11), GC (n=14), C+A (n=9), OP+A (n=9), GC+A (n=14) Ob (n=16), ObOP (n=14), ObGC (n=16). # quando comparado com o grupo seu respectivo grupo sem estímulo (teste “t” student); * quando comparado com o grupo C + A (One way ANOVA com pós-teste de Tukey).

Na situação sem estímulo, no grupo controle (C) não suplementado e suplementado com gordura de coco ou óleo de peixe não houve alteração na lipólise ($p > 0,05$). A adição de noradrenalina incrementou em 41% a lipólise no grupo controle ($p < 0,05$). Por outro lado, nos grupos suplementados com óleo de peixe (OP+A) ou gordura de coco (GC+A) não houve alteração da lipólise quando comparada à situação sem estímulo ($p > 0,05$). Nos grupos obesos sem suplementação (Ob), suplementado com óleo de peixe (ObOP) ou gordura de coco (ObGC) a lipólise não foi diferente da dos seus respectivos controles ($p > 0,05$ vs. C, OP e GC). Interessantemente, a adição de noradrenalina promoveu redução na lipólise em 25% no grupo obeso (Ob+A) e 36% no grupo obeso suplementado com gordura de coco (ObGC+A) ambos significativamente diferentes quando comparados à dos grupos Ob e ObGC ($p < 0,05$). Não houve alteração no grupo obeso suplementado com óleo de peixe estimulado com noradrenalina quando comparado ao grupo não estimulado ($p > 0,05$ ObOP) (figura 20).

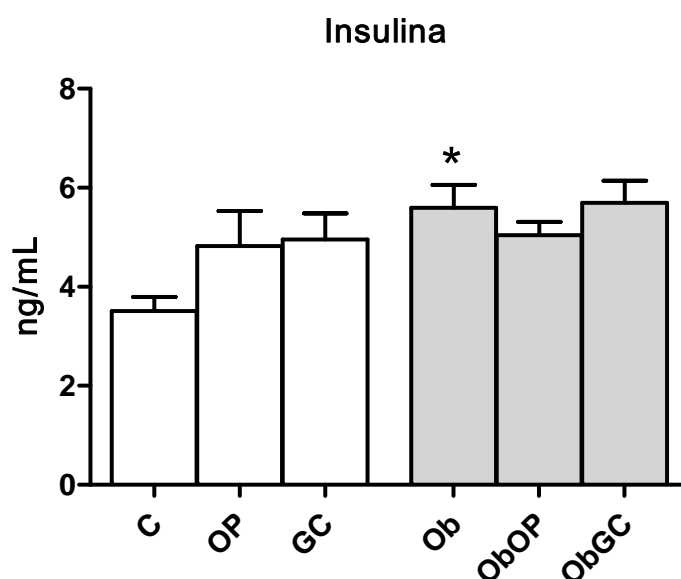
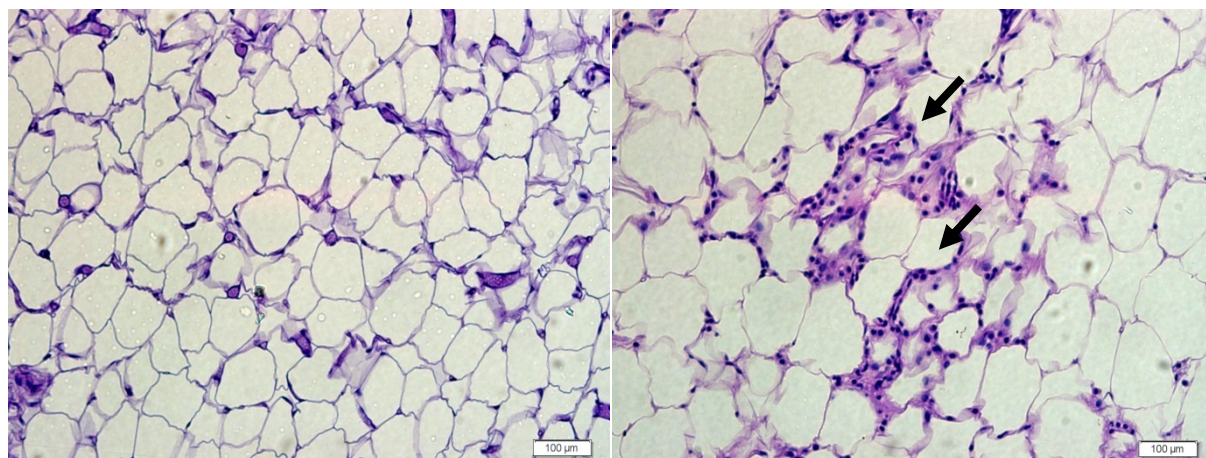


Figura 21: Concentração de insulina plasmática em jejum incubado dos grupos C (n=6), OP (n=6), GC (n=6), Ob (n=10), ObOP (n=8), ObGC (n=8). * quando comparado com o grupo Ob (teste “t” student).

Os animais do grupo obeso (Ob) apresentaram concentração plasmática de insulina 59% acima do valor encontrado no grupo controle (C) ($p < 0,05$). Embora exista uma tendência de aumento nos grupos suplementados com óleo de peixe (OP) e com gordura de coco (GC) quando comparado ao grupo C, não houve diferença significativa entre os grupos (C vs. OP e GC; $p > 0,05$). O grupo obeso suplementado com óleo de peixe (ObOP) apresentou tendência em reduzir a concentração plasmática de insulina, mas não houve diferença significativa entre os grupos (Ob vs. ObOP; $p > 0,05$). A concentração entre os grupos suplementados com gordura de coco (GC e ObGC) não foi diferente ($p > 0,05$).

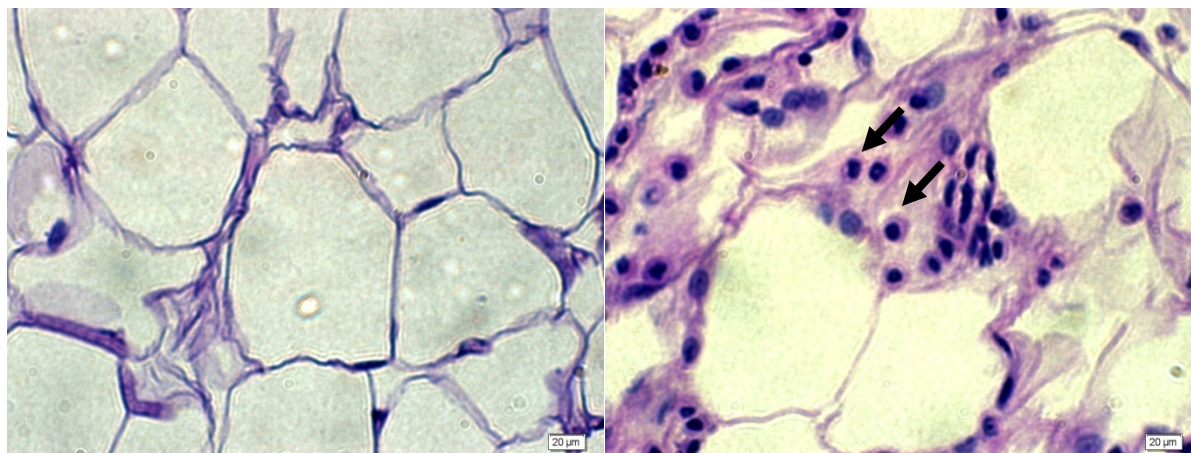


A. Controle

B. Obeso

Figura 22: Microscopia óptica do tecido adiposo epididimal (aumento de 100x). A. Controle; B. Obeso.

Através da microscopia óptica (Figura 22), pode-se observar maior infiltrado celular no tecido adiposo dos animais obesos quando comparados ao dos animais controle.



A. Controle

B. Obeso

Figura 23: Microscopia óptica do tecido adiposo epididimal (aumento de 400x). A. Controle; B. Obeso.

Em aumento de 400x pode-se observar a presença de vários macrófagos (setas) localizados na periferia dos adipócitos do tecido adiposo dos animais obesos. Interessantemente, no grupo controle não foi verificada a presença destas células (Figura 23).

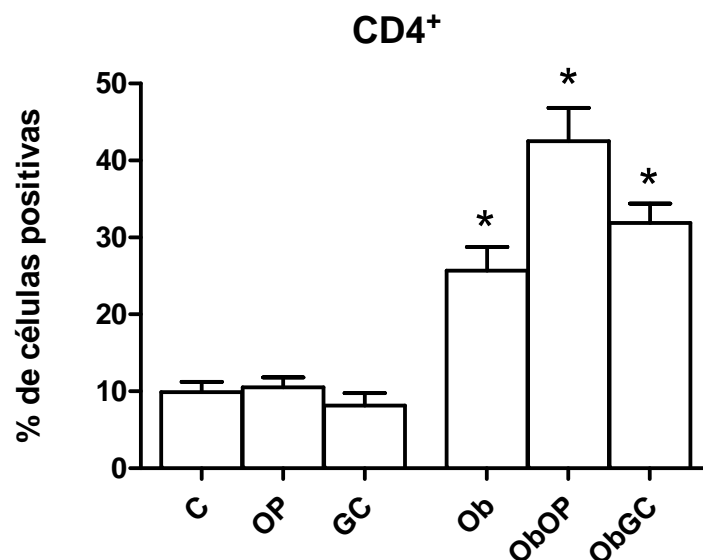


Figura 24: Porcentagem de células CD4⁺ incubado dos grupos C (n=6), OP (n=6), GC (n=6), Ob (n=4), ObOP (n=4), ObGC (n=4). * quando comparado com os respectivos grupos não obesos (teste "t" student).

A população de linfócitos CD4⁺ nos grupos obesos sem suplementação (Ob) elevou-se em 2,6 vezes, suplementado com óleo de peixe em 4 vezes e com gordura de coco em 3,9 vezes, quando comparados aos seus respectivos controles ($p < 0,05$ vs. C, OP e GC, respectivamente). Nos animais não obesos, suplementados ou não (C, OP e GC) não houve alteração na população CD4⁺ quando comparado os grupos entre si ($p > 0,05$) (Figura 24).

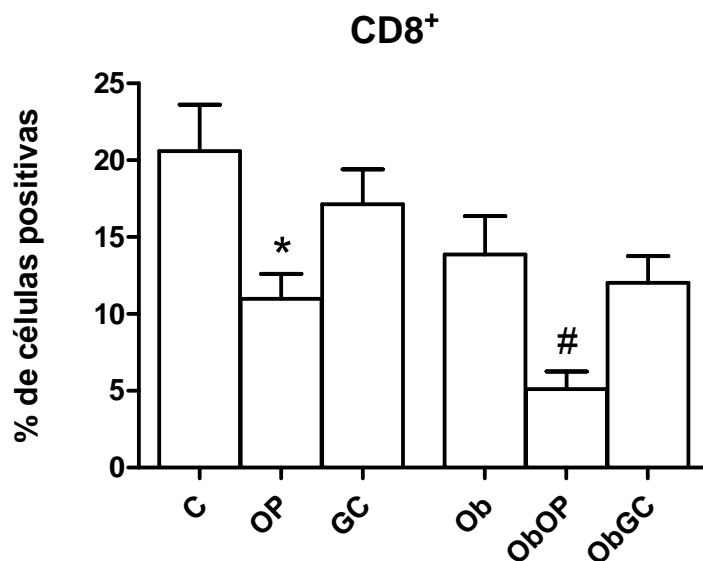


Figura 25: Porcentagem de células CD8⁺ dos grupos C (n=4), OP (n=6), GC (n=6), Ob (n=6), ObOP (n=8), ObGC (n=8). * quando comparado com o grupo C (One way ANOVA com pós-teste de Tukey); # quando comparado com o grupo Ob (One way ANOVA com pós-teste de Tukey).

A população de linfócitos CD8⁺ estava reduzida em 50% no grupo não obeso suplementado com óleo de peixe ($p < 0,05$ vs. C). A suplementação com gordura de coco apresentou tendência em reduzir a % de células positivas para CD8⁺, mas esta não foi significativa da do controle ($p < 0,05$). No grupo obeso não suplementado (Ob), a população de células linfocitárias CD8⁺ foi similar à do grupo C ($p > 0,05$). A suplementação com óleo de peixe no grupo obeso (ObOP) promoveu redução ainda maior que a observada no seu contraparte ($p < 0,05$ vs. OP), sendo 2,7 vezes menor quando comparada à do grupo Ob ($p < 0,05$). Não houve alteração da % de CD8⁺ no grupo obeso suplementado com gordura de coco (ObGC) quando comparado à do Ob (Figura 25).

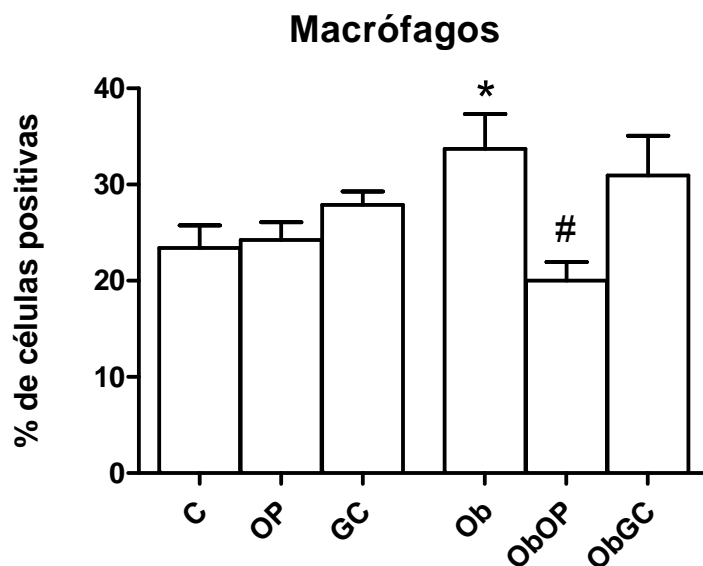


Figura 26: Porcentagem de células Mac⁺ dos grupos C (n=10), OP (n=12), GC (n=14), Ob (n=10), ObOP (n=12), ObGC (n=12). * quando comparado com o grupo C (teste “t” student). # quando comparado com o grupo Ob (One way ANOVA com pós-teste de Tukey).

A população de macrófagos no TA epididimal nos grupos não obesos (C, OP e GC) não se alterou em razão das diferentes suplementações ($p > 0,05$). A indução do estado de obesidade (Ob) elevou a população de macrófagos em 44% ($p < 0,05$) e a suplementação com óleo de peixe (ObOP) fez com que a quantidade de macrófagos do TA epididimal retornasse aos valores do controle (C e OP; $p < 0,05$). Em contrapartida, a suplementação com gordura de coco nos animais obesos não teve efeito, permanecendo similar à do grupo obeso não suplementado ($p > 0,05$). (Figura 24).

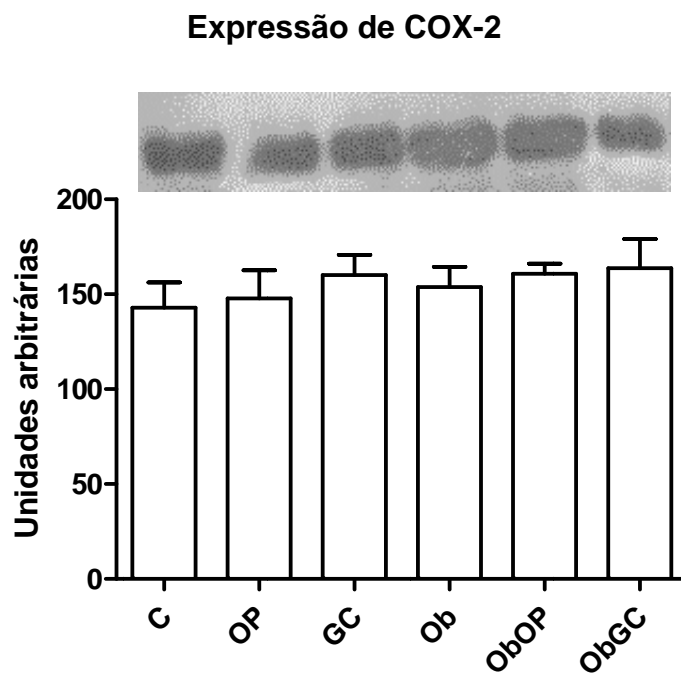


Figura 27: Expressão de COX-2 em tecido adiposo epididimal dos grupos C (n=4), OP (n=4), GC (n=4), Ob (n=4), ObOP (n=4), ObGC (n=4).

Os dados da figura 27 demonstram que a expressão protéica da enzima COX-2 não foi modificada pelas suplementações ou estado de obesidade ($p > 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Os animais obesos apresentaram maior índice de Lee, aumento de depósito de gordura e da resistência à insulina e glicemia normal (Tabela 1). Estes resultados confirmam a obesidade induzida por glutamato monossódico e corroboram os dados de estudos anteriores (MACHO *et al.*, 2000; GRASSIOLLI *et al.*, 2007). Estas várias alterações metabólicas são, principalmente, provenientes de lesões no hipotálamo, mais especificamente do núcleo arqueado (DE ANDRADE *et al.*, 2006). As conseqüências destas lesões resultam em alterações na sinalização da insulina e da leptina além de reduzir a liberação do hormônio liberador de hormônio de crescimento (GHRH). Esta redução na liberação do GHRH está associada à redução do tamanho corporal (TAMURA *et al.*, 2002), o que explica o fato dos animais obesos apresentarem o peso corpóreo menor que o dos animais controle (Tabela 1). Estes animais também apresentam redução da atividade simpática (PARK *et al.*, 2007) e da atividade da HSL (Lipase hormônio sensível), enzima responsável pela hidrólise dos triacilgliceróis armazenados nos adipócitos (DOLNIKOFF *et al.*, 2001), que pode explicar o aumento do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal dos animais obesos (Figura 13). A redução na sensibilidade à insulina de indivíduos obesos resulta em aumento da secreção de insulina pelas células β - pancreáticas (KAHN *et al.*, 2006). O estado de resistência à insulina também é constatado pela hiperinsulinemia presente nos animais obesos (Figura 20), dado este que corrobora estudos anteriores (HIRATA *et al.*, 1997; GRASSIOLLI *et al.*, 2007).

Estudo utilizando dieta isocalórica hiperlipídica (59% de gordura) contendo 8% de óleo de peixe demonstrou ser capaz de melhorar a sensibilidade à insulina no fígado ao empregar, como metodologia, o “clamp” hiperinsulinêmico-euglicêmico (NESCHEN *et al.*, 2007). Este mesmo estudo também demonstrou que a dieta contendo AGs ω -3 foi capaz de aumentar as concentrações plasmáticas de adiponectina. Andersen *et al.* (2008) obtiveram como resultados redução da glicemia plasmática e das concentrações de insulina e melhora da sensibilidade à insulina, constatado pelo teste HOMA, após suplementação de 0,5 g/kg de EPA ou DHA por 8 semanas (ANDERSEN *et al.*, 2008). Em humanos, também foi demonstrado melhora da resistência à insulina após 8 semanas de suplementação de indivíduos

obesos que consumiram 6 cápsulas (500 mg) de óleo de peixe por dia ou indivíduos que consumiram 150 g de salmão pelo menos 3 vezes por semana (RAMEL *et al.*, 2008). Este mesmo estudo constatou que os efeitos obtidos foram independentes das alterações no peso corpóreo, concentração de triacilglicerol plasmático, presença de EPA/DHA na membrana e da concentração de adiponectina. Através do teste de tolerância à insulina (Kitt), nosso estudo demonstrou a capacidade do óleo de peixe em manter a sensibilidade à insulina “*in vivo*” similar à dos animais não obesos após suplementação por 4 semanas na dose de 1g/Kg/dia (Figura 12B). Este teste é baseado na mensuração da glicemia nos tempos 0, 4, 8, 12 e 16 min após injeção endovenosa de insulina. Neste período de tempo utilizado para verificar a ação da insulina sobre a glicemia não há a ação de hormônios contra-regulatórios como glucagon, catecolaminas, hormônio de crescimento e cortisol (DUSEJA *et al.*, 2007). Em contraposição, Gillam e colaboradores (2009) não encontraram nenhum efeito do óleo de peixe adicionado em 10% à dieta em ratos obesos *fa/fa* por 9 semanas em relação a resistência à insulina, função pancreática, metabolismo da glicose e de lipídeos (GILLAM *et al.*, 2009). A dislipidemia, caracterizada por aumento das concentrações plasmáticas de triacilgliceróis e colesterolis totais e redução da concentração de HDL, ocorre comumente em indivíduos obesos e diabéticos e é considerada importante fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose (MOORADIAN, 2009). Lipoproteínas ricas em triacilgliceróis também apresentam papel importante no desenvolvimento do processo inflamatório via ativação do NFκB (LIBBY, 2007). Um dos efeitos mais freqüentemente descritos na literatura em relação aos AGs ω-3 é sua capacidade em reduzir as concentrações plasmáticas de triacilgliceróis. Qi *et al.* mostraram que animais alimentados com dieta hiperlipídica rica em ω-3 (18% de gordura) por 4 meses apresentam a atividade da LPL (Lipase de lipoproteínas) aumentada, o que explica a redução das concentrações plasmáticas de triacilgliceróis (QI *et al.*, 2008). Mais especificamente, a atividade da LPL encontra-se aumentada no tecido muscular, local onde o TAG estaria mais envolvido no processo de oxidação do que armazenamento (TAI; DING). Outro estudo recente que utilizou dieta isocalórica rica em ácidos graxos poliinsaturados ω-3 (5% e 10%) durante 3 semanas no modelo animal obeso (*cp/cp*) da linhagem JCR-LA-*cp* obteve como resultados a redução da concentração

plasmática de triacilgliceróis, colesterol totais, do marcador inflamatório LBP (Proteína ligante de lipopolissacarídeo) e da leptina (HASSANALI *et al.*, 2009). Em humanos também foi encontrada redução da concentração de triacilgliceróis e da secreção de lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (VLDL e LDL) (MICALLEF; GARG, 2009). Alguns estudos encontraram correlação positiva entre a concentração plasmática de triacilgliceróis e a incidência de doenças cardiovasculares (ROCHE; GIBNEY, 2000). Nossos dados corroboram os estudos anteriores ao demonstrar a redução da triacilglicerolemia após suplementação com óleo de peixe (Figura 14D). A redução na concentração plasmática do colesterol total nos animais obesos suplementados com óleo de peixe (Figura 14C) também é importante resultado do nosso estudo, uma vez que a hipercolesterolemia está envolvida no aumento da expressão de moléculas de adesão e, conseqüentemente, aumento da adesão de monócitos no endotélio vascular, os quais atuam no processo aterogênico (STEINBERG, 2002). Interessantemente, nosso estudo é pioneiro ao demonstrar os efeitos da suplementação com óleo de peixe utilizando uma dose mais baixa e por um período relativamente mais curto quando comparado a outros trabalhos publicados até o momento.

D'Alessandro *et al.* demonstraram que animais normais alimentados com dieta contendo 7% de ácidos graxos ω -3 aumentam a sensibilidade à insulina em músculo esquelético, havendo preponderância da via glicolítica sobre a síntese de glicogênio e via oxidativa (D'ALESSANDRO *et al.*, 2002). A diferença encontrada entre nossos dados e este estudo (Figuras 15, 16 e 17) pode ser explicada por diferenças nos parâmetros analisados e tipos de tecidos estudados. D'Alessandro *et al.* utilizaram o músculo gastrocnêmio como foco de estudo e mensuraram as atividades da glicogênio sintase e da piruvato desidrogenase envolvidas no metabolismo da glicose do músculo. Nosso estudo utilizou o músculo sóleo, mensurando a via de síntese de glicogênio e via oxidativa através da glicose radiomarcada no tecido incubado. Em contraste com o efeito deletério dos ácidos graxos saturados sobre a sensibilidade à insulina no músculo esquelético, os ácidos graxos ω -3 são capazes de manter a atividade do IR, IRS-1, PI-3K, assim como o conteúdo total de GLUT-4 (TAOUIIS *et al.*, 2002).

Em relação ao metabolismo de glicose do tecido adiposo, Luo *et al.* observaram que o tecido adiposo incubado de ratos alimentados com dieta rica em AG ω -3 (30%), durante 6 semanas, apresentou aumento na captação, oxidação e incorporação da glicose em lipídios quando estimulado com insulina (LUO *et al.*, 1996). A análise da composição de ácidos graxos da membrana plasmática dos adipócitos realizada neste estudo sugere uma correlação positiva entre o índice de insaturação e o estímulo da insulina sobre o metabolismo de glicose. A incorporação de DHA e EPA nos fosfolipídeos foi encontrada em menores proporções que as encontradas na dieta. Este dado sugere que os ácidos graxos provenientes da dieta contendo óleo de peixe podem estar, preferencialmente, sendo oxidados ao invés de armazenados (LUO *et al.*, 1996). Nossos dados corroboram este estudo ao demonstrar aumento do metabolismo de glicose via produção de lactato pelo tecido adiposo incubado de animais suplementados com óleo de peixe (Figura 18).

O aumento do diâmetro dos adipócitos é freqüentemente encontrado em indivíduos obesos, pré-diabéticos e diabéticos tipo 2 e vem sendo relacionado ao estado de resistência à insulina (GOOSSENS, 2008). Os resultados de Huber *et al.* (2007) demonstraram, em ratos diabéticos (*db/db*), que uma dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos ω -3 (40%) administrada durante 6 semanas é capaz de reduzir a hipertrofia dos adipócitos (HUBER *et al.*, 2007). Nossos dados corroboram este estudo ao demonstrarmos menor diâmetro médio dos adipócitos dos animais obesos suplementados com óleo de peixe (Figura 19). Em contraposição, Saraswathi *et al.* (2007) verificaram que o óleo de peixe suplementado em 6% na dieta de camundongos deficientes para o receptor de LDL por 12 semanas induziu a hipertrofia dos adipócitos. No entanto, este mesmo estudo demonstrou capacidade do óleo de peixe em aumentar a concentração plasmática de adiponectina e reduzir a expressão de marcadores inflamatórios como MAC-1 e TNF- α (SARASWATHI *et al.*, 2007). O ácido araquidônico (ω -6) favorece a produção de prostaciclina que por sua vez, aumenta a produção de AMPc, e resulta em ativação da PKA (Proteína Kinase A), proteína esta envolvida no processo de adipogênese. Interessantemente, os ácidos graxos EPA e DHA não favorecem a elevação de AMPc e, conseqüentemente, inibem a adipogênese (AILHAUD *et al.*, 2006).

Os adipócitos são responsáveis pelo fornecimento de substrato energético através da lipólise, para outros tecidos, principalmente, durante jejum e exercício. Deste modo, alterações no funcionamento destas células podem resultar em alterações metabólicas. A redução da taxa lipolítica pode contribuir para o aumento do acúmulo de triacilglicerol e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de obesidade (JAWORSKI *et al.*, 2007). Nossos resultados (Figura 20) corroboram o estudo de Ribeiro *et al.* o qual demonstrou redução da taxa de lipólise frente ao estímulo com noradrenalina em animais obesos induzidos por GMS (RIBEIRO *et al.*, 1997). Este modelo de obesidade apresenta função das glândulas adrenais alterada com redução na síntese e liberação de catecolaminas (MARTINS *et al.*, 2004). Esta condição resulta em aumento do recrutamento de receptores α_2 adrenérgicos, os quais inibem a lipólise via proteínas Gi (proteína G inibitória) e, conseqüente, diminuição da concentração de AMPc (CURI, 2002). Evidências apontam para uma correlação entre aumento na expressão de receptores adrenérgicos α_2 e/ou redução de β_3 e o estado de obesidade (LLADO *et al.*, 2002). Interessantemente, a lipólise de animais obesos suplementados com óleo de peixe não apresentaram o mesmo efeito inibitório da noradrenalina encontrado nos animais obesos sem suplementação e com gordura de coco (Figura 20).

A concentração de insulina plasmática não apresentou diferença nos grupos suplementados, sugerindo que os efeitos do óleo de peixe encontrados sobre o metabolismo do músculo e tecido adiposo não são decorrentes de alterações na liberação da insulina (Figura 20). Lombardo *et al.* (2007) também verificaram que as concentrações plasmáticas de insulina não se alteraram em animais resistentes à insulina alimentados com óleo de peixe (7%) durante 2 meses (LOMBARDO *et al.*, 2007). No entanto, Pérez-Matute *et al.* (2007) demonstraram que a suplementação oral (1g/Kg/dia) de ácido eicosapentaenóico (EPA) por 5 semanas reduziu a concentração plasmática de insulina em animais alimentados com dieta hiperlipídica (PEREZ-MATUTE *et al.*, 2007).

Além dos adipócitos, o tecido adiposo é composto por células estromais e vasculares, incluindo fibroblastos, células endoteliais e células inflamatórias. Podemos observar, por microscopia óptica, a maior infiltração de células no tecido adiposo epididimal dos animais obesos (Figura 21). Recentemente o aumento de

macrófagos infiltrados no tecido adiposo de indivíduos obesos, em modelos animais e humanos, foi uma importante descoberta para o melhor entendimento entre obesidade e inflamação (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2003; XU *et al.*, 2003). A hipertrofia dos adipócitos desencadeia uma série de alterações no tecido adiposo que resultam na infiltração de macrófagos e, conseqüentemente, secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2003). Recentemente, o papel dos linfócitos neste tecido, bem como sua relação com condições patológicas, começa a ser esclarecida. Alguns estudos demonstraram a participação do sistema imunitário adaptativo na regulação da obesidade, distribuição de gordura e resistência à insulina que até o momento eram desconhecidos. As células T CD4⁺ podem ser subdivididas em células pró-inflamatórias (TH₁), anti-inflamatórias (TH₂) e reguladoras (Foxp3⁺). Winer *et al.* (2009) encontraram em modelo animal obeso induzido por dieta e em humanos que a razão de células T CD4⁺ TH₁:TH₂ e TH₁:Foxp3⁺ encontra-se aumentada nos indivíduos obesos (WINER *et al.*, 2009). As células TH₁ ativam macrófagos pró-inflamatórios, via INF- γ , os quais liberam IL-1, IL-6 e TNF- α . Em contraposição, as células TH₂, secretoras de IL-4 e IL-13, assim como as células T reguladoras, modificam a função dos macrófagos e os diferenciam em uma população de macrófagos anti-inflamatórios, secretores de IL-10, e conhecidos como M2 ou macrófagos “ativados por modo alternativo”. Estes macrófagos, caracterizados pela abundante expressão na membrana de receptores de manose e por alta atividade enzima intracelular arginase, têm sido capazes de normalizar algumas das alterações metabólicas causadas pela obesidade induzida pela dieta. Nossos dados demonstram aumento de células CD4⁺ no tecido adiposo dos animais obesos (Figura 22). Entretanto, não realizamos um estudo mais aprofundado para identificar a proporção de células TH₁ e TH₂ presentes nesta população. Nishimura *et al.* demonstraram que linfócitos T CD8⁺ presentes no tecido adiposo secretam fatores humorais envolvidos na migração e ativação de macrófagos. Portanto, estas células são importantes para o início e propagação da resposta inflamatória no tecido adiposo (NISHIMURA *et al.*, 2009). Este mesmo estudo demonstrou que a depleção de células T CD8⁺ com anticorpos anti-CD8 foi capaz de reduzir a infiltração de macrófagos no tecido. Interessantemente, a suplementação com óleo de peixe foi

capaz de reduzir a quantidade de células CD8⁺ nos animais obesos e não obesos (Figura 23). O processo inflamatório crônico associado à obesidade ocorre, principalmente, devido à infiltração de macrófagos no tecido adiposo tanto de humanos obesos quanto em modelos animais induzidos geneticamente ou por dieta hiperlipídica (WEISBERG *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2003). E interessante, evidências recentes sugerem o processo inflamatório, resultado da infiltração de macrófagos, está diretamente relacionada às alterações metabólicas decorrentes da obesidade. Nosso estudo é o primeiro a mostrar redução na quantidade de macrófagos infiltrados no tecido adiposo de animais obesos suplementados na dose de óleo de peixe (1 g/Kg p.c.) por um período de 4 semanas (Figura 24). Todoric *et al.* (2006) demonstraram que animais alimentados com dieta hiperlipídica (30% das calorias) apresentam maior infiltração de macrófagos, identificados pelos marcadores F4/80 e/ou MAC-2 e que a adição de um extrato altamente concentrado de EPA e DHA re-esterificados em triacilgliceróis na dieta é capaz de evitar o processo de infiltração (TODORIC *et al.*, 2006). Este resultado é importante, pois vários estudos recentes relacionam a presença destas células no tecido adiposo com o desenvolvimento da resistência à insulina, obesidade e diabetes tipo 2 (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005).

Os efeitos dos AGs ω -3 encontrados neste estudos podem ser explicados por diferentes mecanismos. Recentemente, várias evidências demonstraram que a ativação crônica de vias pró-inflamatórias estão fortemente relacionadas ao desenvolvimento da resistência à insulina (OLEFSKY; GLASS). Os receptores *Toll like* são capazes de ativar a via do NF- κ B e, conseqüentemente, atuam na produção de citocinas inflamatórias. Os AGs saturados atuam na ativação enquanto os AGs ω -3 inibem os receptores TLR-2 e TLR-4 (LEE *et al.*, 2004). Os AGs ω -3 (EPA e DHA) reduzem a produção de eicosanóides inflamatórios provenientes do AA via competição com as enzimas COX e LOX e por reduzir a liberação do AA por inibir a fosfolipase-2 (MARTIN, 1998). Nossos dados mostram que a suplementação do óleo de peixe não modificou a expressão da proteína COX-2 no tecido adiposo de animais obesos e não obesos (Figura 27). Embora não tenha sido observado alteração na expressão da COX-2, não podemos descartar a hipótese de que a atividade desta enzima esteja alterada nos animais suplementados com óleo de

peixe. Mesmo não modificando a expressão da COX-2, o óleo de peixe pode apresentar efeitos anti-inflamatórios através dos metabólitos provenientes dos ácidos graxos EPA e DHA, conhecidos como resolvinas E e D (SERHAN *et al.*, 2008). Outro possível mecanismo de ação dos ácidos graxos ω -3 é a regulação de vários genes envolvidos no metabolismo de carboidratos e lipídeos, uma vez que estes AGs modulam a atividade de fatores transcricionais como PPAR (Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos), SREBP-1c (Sterol regulatory element binding protein-1c), HNF (Hepatic nuclear factors), RXR (Retinoid X receptors) e LXR (Liver X receptor). Outros mecanismos envolvidos incluem redução de triacilgliceróis circulantes, fluidez de membrana e sinalização celular (FEDOR; KELLEY, 2009).

Os dados encontrados aqui mostram que o óleo de peixe, administrado por via oral na dose de 1 g/Kg por 4 semanas, melhora a dislipidemia, a ação da insulina “*in vivo*”, e metabolismo da glicose nos tecidos muscular esquelético e adiposo em animais obesos induzidos por GMS. O óleo de peixe também reverteu o processo inflamatório ao reduzir a quantidade de macrófagos presentes no tecido adiposo dos animais obesos. No entanto, estudos futuros ainda são necessários para o esclarecimento das principais vias de sinalização intracelular envolvidas no mecanismo de ação dos ácidos graxos ω -3.

6 CONCLUSÃO

A suplementação com óleo de peixe melhora a dislipidemia, resistência à insulina e metabolismo de glicose nos tecidos muscular e adiposo em ratos obesos induzidos por GMS. Também foi capaz de reverter a inflamação ao reduzir a quantidade de macrófagos presentes no tecido adiposo dos animais obesos. Deste modo, o óleo de peixe apresenta potencial no tratamento de indivíduos obesos e diabéticos por apresentar efeitos que possam impedir o desenvolvimento ou até mesmo reverter o estado de resistência à insulina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AILHAUD, G.; F. MASSIERA; P. WEILL; P. LEGRAND; J. M. ALESSANDRI; P. GUESNET. Temporal changes in dietary fats: role of n-6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development and relationship to obesity. **Prog Lipid Res**, v.45, n.3, May, p.203-36. 2006.

ANDERSEN, G.; K. HARNACK; H. F. ERBERSDOBLER; V. SOMOZA. Dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid are more effective than alpha-linolenic acid in improving insulin sensitivity in rats. **Ann Nutr Metab**, v.52, n.3, p.250-6. 2008.

ANTUNA-PUENTE, B.; B. FEVE; S. FELLAHI; J. P. BASTARD. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. **Diabetes Metab**, v.34, n.1, Feb, p.2-11. 2008.

BAYS, H.; L. MANDARINO; R. A. DEFRONZO. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. **J Clin Endocrinol Metab**, v.89, n.2, Feb, p.463-78. 2004.

BERNARDIS, L. L.; B. D. PATTERSON. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J Endocrinol**, v.40, n.4, Apr, p.527-8. 1968.

BJORK, S. The cost of diabetes and diabetes care. **Diabetes Res Clin Pract**, v.54 Suppl 1, Nov, p.S13-8. 2001.

BODEN, G.; 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**, v.32 Suppl 3, Jun, p.14-23. 2002.

BONORA, E.; P. MOGHETTI; C. ZANCANARO; M. CIGOLINI; M. QUERENA; V. CACCIATORI; A. CORGNATI; M. MUGGEO. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J Clin Endocrinol Metab**, v.68, n.2, Feb, p.374-8. 1989.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

CHALLISS, R. A.; J. ESPINAL; E. A. NEWSHOLME. Insulin sensitivity of rates of glycolysis and glycogen synthesis in soleus, stripped soleus, epitrochlearis, and hemi-diaphragm muscles isolated from sedentary rats. **Biosci Rep**, v.3, n.7, Jul, p.675-9. 1983.

COLLINS, S.; R. S. SURWIT. The beta-adrenergic receptors and the control of adipose tissue metabolism and thermogenesis. **Recent Prog Horm Res**, v.56, p.309-28. 2001.

CRETTAZ, M.; M. PRENTKI; D. ZANINETTI; B. JEANRENAUD. Insulin resistance in soleus muscle from obese Zucker rats. Involvement of several defective sites. **Biochem J**, v.186, n.2, Feb 15, p.525-34. 1980.

CURI, R. P., C; MIYASAKA, CK; PROCOPIO, J. Entendendo a gordura. Barueri - SP: Manole. 2002

D'ALESSANDRO, M. E.; A. CHICCO; L. KARABATAS; Y. B. LOMBARDO. Role of skeletal muscle on impaired insulin sensitivity in rats fed a sucrose-rich diet: effect of moderate levels of dietary fish oil. **J Nutr Biochem**, v.11, n.5, May, p.273-80. 2000.

D'ALESSANDRO, M. E.; Y. B. LOMBARDO; A. CHICCO. Effect of dietary fish oil on insulin sensitivity and metabolic fate of glucose in the skeletal muscle of normal rats. **Ann Nutr Metab**, v.46, n.3-4, p.114-20. 2002.

DANDONA, P.; A. ALJADA; A. BANDYOPADHYAY. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends Immunol**, v.25, n.1, Jan, p.4-7. 2004.

DANDONA, P.; A. ALJADA; P. MOHANTY; H. GHANIM; W. HAMOUDA; E. ASSIAN; S. AHMAD. Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappaB and stimulates IkappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, n.7, Jul, p.3257-65. 2001.

DAYNES, R. A.; D. C. JONES. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. **Nat Rev Immunol**, v.2, n.10, Oct, p.748-59. 2002.

DE ANDRADE, I. S.; J. C. GONZALEZ; A. E. HIRATA; G. CARNEIRO; D. AMADO; E. A. CAVALHEIRO; M. S. DOLNIKOFF. Central but not peripheral glucoprivation is impaired in monosodium glutamate-treated rats. **Neurosci Lett**, v.398, n.1-2, May 1, p.6-11. 2006.

DE CAMPOS, K. E.; Y. K. SINZATO; P. PIMENTA WDE; M. V. RUDGE; D. C. DAMASCENO. Effect of maternal obesity on diabetes development in adult rat offspring. **Life Sci**, v.81, n.19-20, Oct 27, p.1473-8. 2007.

DE CARVALHO PAPA, P.; A. M. VARGAS; J. L. DA SILVA; M. T. NUNES; U. F. MACHADO. GLUT4 protein is differently modulated during development of obesity in monosodium glutamate-treated mice. **Life Sci**, v.71, n.16, Sep 6, p.1917-28. 2002.

DE CATERINA, R.; R. MADONNA; A. BERTOLOTTO; E. B. SCHMIDT. n-3 fatty acids in the treatment of diabetic patients: biological rationale and clinical data. **Diabetes Care**, v.30, n.4, Apr, p.1012-26. 2007.

DE FREITAS MATHIAS, P. C.; S. GRASSIOLLI; D. N. ROCHA; D. X. SCOMPARIN; C. GRAVENA. Transplantation of pancreatic islets from hypothalamic obese rats corrects hyperglycemia of diabetic rats. **Transplant Proc**, v.39, n.1, Jan-Feb, p.193-5. 2007.

DE LUCA, C.; J. M. OLEFSKY. Inflammation and insulin resistance. **FEBS Lett**, v.582, n.1, Jan 9, p.97-105. 2008.

DESPRES, J. P.; I. LEMIEUX. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, v.444, n.7121, Dec 14, p.881-7. 2006.

DINIZ, Y. S.; L. A. FAINE; C. M. GALHARDI; H. G. RODRIGUES; G. X. EBAID; R. C. BURNEIKO; A. C. CICOGNA; E. L. NOVELLI. Monosodium glutamate in standard and high-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. **Nutrition**, v.21, n.6, Jun, p.749-55. 2005.

DOLNIKOFF, M.; A. MARTIN-HIDALGO; U. F. MACHADO; F. B. LIMA; E. HERRERA. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.25, n.3, Mar, p.426-33. 2001.

DOLNIKOFF, M. S.; C. E. KATER; M. EGAMI; I. S. DE ANDRADE; M. R. MARMO. Neonatal treatment with monosodium glutamate increases plasma corticosterone in the rat. **Neuroendocrinology**, v.48, n.6, Dec, p.645-9. 1988.

DUSEJA, A.; K. K. THUMBURU; A. DAS; R. K. DHIMAN; Y. K. CHAWLA; S. BHADADA; A. BHANSALI. Insulin tolerance test is comparable to homeostasis model assessment for insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Indian J Gastroenterol**, v.26, n.4, Jul-Aug, p.170-3. 2007.

ENGEL, P. C.; J. B. JONES. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD⁺ in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamate, L-lactate, and other metabolites. **Anal Biochem**, v.88, n.2, Aug 1, p.475-84. 1978.

ESPINAL, J.; R. A. CHALLISS; E. A. NEWSHOLME. Effect of adenosine deaminase and an adenosine analogue on insulin sensitivity in soleus muscle of the rat. **FEBS Lett**, v.158, n.1, Jul 11, p.103-6. 1983.

FEDOR, D.; D. S. KELLEY. Prevention of insulin resistance by n-3 polyunsaturated fatty acids. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.12, n.2, Mar, p.138-46. 2009.

FRANCESCHINI, G.; L. CALABRESI; P. MADERNA; C. GALLI; G. GIANFRANCESCHI; C. R. SIRTORI. Omega-3 fatty acids selectively raise high-density lipoprotein 2 levels in healthy volunteers. **Metabolism**, v.40, n.12, Dec, p.1283-6. 1991.

FURUYA, D. T.; A. C. POLETTO; R. R. FAVARO; J. O. MARTINS; T. M. ZORN; U. F. MACHADO. Anti-inflammatory effect of atorvastatin ameliorates insulin resistance in monosodium glutamate-treated obese mice. **Metabolism**, v.59, n.3, Mar, p.395-9. 2010.

GILLAM, M.; A. NOTO; P. ZAHRADKA; C. G. TAYLOR. Improved n-3 fatty acid status does not modulate insulin resistance in fa/fa Zucker rats. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.81, n.5-6, Nov-Dec, p.331-9. 2009.

GOOSSENS, G. H. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. **Physiol Behav**, v.94, n.2, May 23, p.206-18. 2008.

GRASSIOLLI, S.; C. GRAVENA; P. C. DE FREITAS MATHIAS. Muscarinic M2 receptor is active on pancreatic islets from hypothalamic obese rat. **Eur J Pharmacol**, v.556, n.1-3, Feb 5, p.223-8. 2007.

GUILHERME, A.; J. V. VIRBASIUŠ; V. PURI; M. P. CZECH. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.9, n.5, May, p.367-77. 2008.

GUO, L.; R. TABRIZCHI. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a drug target in the pathogenesis of insulin resistance. **Pharmacol Ther**, v.111, n.1, Jul, p.145-73. 2006.

HANDSCHIN, C.; B. M. SPIEGELMAN. The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. **Nature**, v.454, n.7203, Jul 24, p.463-9. 2008.

HASSANALI, Z.; B. AMETAJ; C. J. FIELD; S. D. PROCTOR; D. F. VINE. Dietary supplementation of n-3 PUFA reduces weight gain and improves postprandial lipaemia and the associated inflammatory response in the obese JCR:LA-cp rat. **Diabetes Obes Metab**, Nov 16. 2009.

HEILBRONN, L.; S. R. SMITH; E. RAVUSSIN. Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.28 Suppl 4, Dec, p.S12-21. 2004.

HILL, J. O.; J. C. PETERS. Environmental contributions to the obesity epidemic. **Science**, v.280, n.5368, May 29, p.1371-4. 1998.

HIRABARA, S. M.; L. R. SILVEIRA; F. ABDULKADER; C. R. CARVALHO; J. PROCOPIO; R. CURI. Time-dependent effects of fatty acids on skeletal muscle metabolism. **J Cell Physiol**, v.210, n.1, Jan, p.7-15. 2007.

HIRATA, A. E.; F. ALVAREZ-ROJAS; J. B. CARVALHEIRA; C. R. CARVALHO; M. S. DOLNIKOFF; M. J. ABDALLA SAAD. Modulation of IR/PTP1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats. **Life Sci**, v.73, n.11, Aug 1, p.1369-81. 2003.

HIRATA, A. E.; I. S. ANDRADE; P. VASKEVICIUS; M. S. DOLNIKOFF. Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. **Braz J Med Biol Res**, v.30, n.5, May, p.671-4. 1997.

HOLZWARATH-MCBRIDE, M. A.; J. R. SLADEK, JR.; K. M. KNIGGE. Monosodium glutamate induced lesions of the arcuate nucleus. II. Fluorescence histochemistry of catecholamines. **Anat Rec**, v.186, n.2, Oct, p.197-205. 1976.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v.444, n.7121, Dec 14, p.860-7. 2006.

HUBER, J.; M. LOFFLER; M. BILBAN; M. REIMERS; A. KADL; J. TODORIC; M. ZEYDA; R. GEYEREGGER; M. SCHREINER; T. WEICHHART; N. LEITINGER; W. WALDHAUSL; T. M. STULNIG. Prevention of high-fat diet-induced adipose tissue remodeling in obese diabetic mice by n-3 polyunsaturated fatty acids. **Int J Obes (Lond)**, v.31, n.6, Jun, p.1004-13. 2007.

JAWORSKI, K.; E. SARKADI-NAGY; R. E. DUNCAN; M. AHMADIAN; H. S. SUL. Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v.293, n.1, Jul, p.G1-4. 2007.

JUMP, D. B. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. **J Biol Chem**, v.277, n.11, Mar 15, p.8755-8. 2002.

KAHN, B. B.; J. S. FLIER. Obesity and insulin resistance. **J Clin Invest**, v.106, n.4, Aug, p.473-81. 2000.

KAHN, S. E.; R. L. HULL; K. M. UTZSCHNEIDER. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v.444, n.7121, Dec 14, p.840-6. 2006.

KIDO, Y.; J. NAKAE; D. ACCILI. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, n.3, Mar, p.972-9. 2001.

KLIMES, I.; E. SEBOKOVA; A. VRANA; L. KAZDOVA. Raised dietary intake of N-3 polyunsaturated fatty acids in high sucrose-induced insulin resistance. Animal studies. **Ann N Y Acad Sci**, v.683, Jun 14, p.69-81. 1993.

KNOWLER, W. C.; E. BARRETT-CONNOR; S. E. FOWLER; R. F. HAMMAN; J. M. LACHIN; E. A. WALKER; D. M. NATHAN. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. **N Engl J Med**, v.346, n.6, Feb 7, p.393-403. 2002.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v.404, n.6778, Apr 6, p.635-43. 2000.

KRIS-ETHERTON, P. M.; W. S. HARRIS; L. J. APPEL. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. **Circulation**, v.106, n.21, Nov 19, p.2747-57. 2002.

KRSSAK, M.; K. FALK PETERSEN; A. DRESNER; L. DIPIETRO; S. M. VOGEL; D. L. ROTHMAN; M. RODEN; G. I. SHULMAN. Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. **Diabetologia**, v.42, n.1, Jan, p.113-6. 1999.

LARSEN, P. J.; C. FLEDELIUS; L. B. KNUDSEN; M. TANG-CHRISTENSEN. Systemic administration of the long-acting GLP-1 derivative NN2211 induces lasting and reversible weight loss in both normal and obese rats. **Diabetes**, v.50, n.11, Nov, p.2530-9. 2001.

LEE, J. Y.; L. ZHAO; H. S. YOUN; A. R. WEATHERILL; R. TAPPING; L. FENG; W. H. LEE; K. A. FITZGERALD; D. H. HWANG. Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. **J Biol Chem**, v.279, n.17, Apr 23, p.16971-9. 2004.

LEIGHTON, B.; G. J. COOPER. Pancreatic amylin and calcitonin gene-related peptide cause resistance to insulin in skeletal muscle in vitro. **Nature**, v.335, n.6191, Oct 13, p.632-5. 1988.

LIBBY, P. Fat fuels the flame: triglyceride-rich lipoproteins and arterial inflammation. **Circ Res**, v.100, n.3, Feb 16, p.299-301. 2007.

LLADO, I.; S. RODRIGUEZ-CUENCA; E. PUJOL; M. MONJO; M. E. ESTRANY; P. ROCA; A. PALOU. Gender effects on adrenergic receptor expression and lipolysis in white adipose tissue of rats. **Obes Res**, v.10, n.4, Apr, p.296-305. 2002.

LOMBARDO, Y. B.; A. CHICCO; M. E. D'ALESSANDRO; M. MARTINELLI; A. SORIA; R. GUTMAN. Dietary fish oil normalize dyslipidemia and glucose intolerance with unchanged insulin levels in rats fed a high sucrose diet. **Biochim Biophys Acta**, v.1299, n.2, Jan 19, p.175-82. 1996.

LOMBARDO, Y. B.; 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**, v.17, n.1, Jan, p.1-13. 2006.

LOMBARDO, Y. B.; G. HEIN; A. CHICCO. Metabolic syndrome: effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity. **Lipids**, v.42, n.5, May, p.427-37. 2007.

LUMENG, C. N.; I. MAILLARD; A. R. SALTIEL. T-ing up inflammation in fat. **Nat Med**, v.15, n.8, Aug, p.846-7. 2009.

LUO, J.; S. W. RIZKALLA; J. BOILLOT; C. ALAMOWITCH; H. CHAIB; F. BRUZZO; N. DESPLANQUE; A. M. DALIX; G. DURAND; G. SLAMA. Dietary (n-3)

polyunsaturated fatty acids improve adipocyte insulin action and glucose metabolism in insulin-resistant rats: relation to membrane fatty acids. **J Nutr**, v.126, n.8, Aug, p.1951-8. 1996.

MACHO, L.; M. FICKOVA; JEZOVA; S. ZORAD. Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. **Physiol Res**, v.49 Suppl 1, p.S79-85. 2000.

MAITER, D.; L. E. UNDERWOOD; J. B. MARTIN; J. I. KOENIG. Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. **Endocrinology**, v.128, n.2, Feb, p.1100-6. 1991.

MARTIN DE SANTA OLALLA, L.; F. J. SANCHEZ MUNIZ; M. P. VAQUERO. N-3 fatty acids in glucose metabolism and insulin sensitivity. **Nutr Hosp**, v.24, n.2, Mar-Apr, p.113-27. 2009.

MARTIN, R. E. Docosahexaenoic acid decreases phospholipase A2 activity in the neurites/nerve growth cones of PC12 cells. **J Neurosci Res**, v.54, n.6, Dec 15, p.805-13. 1998.

MARTINS, A. C.; K. L. SOUZA; M. T. SHIO; P. C. MATHIAS; P. I. LELKES; R. M. GARCIA. Adrenal medullary function and expression of catecholamine-synthesizing enzymes in mice with hypothalamic obesity. **Life Sci**, v.74, n.26, May 14, p.3211-22. 2004.

MICALLEF, M. A.; M. L. GARG. Beyond blood lipids: phytosterols, statins and omega-3 polyunsaturated fatty acid therapy for hyperlipidemia. **J Nutr Biochem**, v.20, n.12, Dec, p.927-39. 2009.

MOLLER, D. E.; K. D. KAUFMAN. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. **Annu Rev Med**, v.56, p.45-62. 2005.

MOORADIAN, A. D. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab**, v.5, n.3, Mar, p.150-9. 2009.

MORRIS, M. J.; C. F. TORTELLI; A. FILIPPIS; J. PROIETTO. Reduced BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamate-treated rat. **Regul Pept**, v.75-76, Sep 25, p.441-7. 1998.

MUOIO, D. M.; C. B. NEWGARD. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.9, n.3, Mar, p.193-205. 2008.

MUSTAD, V. A.; S. DEMICHELE; Y. S. HUANG; A. MIKA; N. LUBBERS; N. BERTHIAUME; J. POLAKOWSKI; B. ZINKER. Differential effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on metabolic control and vascular reactivity in the type 2 diabetic ob/ob mouse. **Metabolism**, v.55, n.10, Oct, p.1365-74. 2006.

NASCIMENTO CURI, C. M.; M. R. MARMO; M. EGAMI; E. B. RIBEIRO; I. S. ANDRADE; M. S. DOLNIKOFF. Effect of monosodium glutamate treatment during neonatal development on lipogenesis rate and lipoprotein lipase activity in adult rats. **Biochem Int**, v.24, n.5, Jul, p.927-35. 1991.

NESCHEN, S.; K. MORINO; J. DONG; Y. WANG-FISCHER; G. W. CLINE; A. J. ROMANELLI; J. C. ROSSBACHER; I. K. MOORE; W. REGITTNIG; D. S. MUNOZ; J. H. KIM; G. I. SHULMAN. n-3 Fatty acids preserve insulin sensitivity in vivo in a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent manner. **Diabetes**, v.56, n.4, Apr, p.1034-41. 2007.

NETTLETON, J. A.; R. KATZ. n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: a review. **J Am Diet Assoc**, v.105, n.3, Mar, p.428-40. 2005.

NISHIMURA, S.; I. MANABE; M. NAGASAKI; K. ETO; H. YAMASHITA; M. OHSUGI; M. OTSU; K. HARA; K. UEKI; S. SUGIURA; K. YOSHIMURA; T. KADOWAKI; R. NAGAI. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. **Nat Med**, v.15, n.8, Aug, p.914-20. 2009.

OLEFSKY, J. M.; C. K. GLASS. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. **Annu Rev Physiol**, v.72, Mar 17, p.219-46.

PAGLIASSOTTI, M. J.; P. A. PRACH; T. A. KOPPENHAFER; D. A. PAN. Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats. **Am J Physiol**, v.271, n.5 Pt 2, Nov, p.R1319-26. 1996.

PANAGIOTAKOS, D. B.; E. POLYCHRONOPOULOS. The role of Mediterranean diet in the epidemiology of metabolic syndrome; converting epidemiology to clinical practice. **Lipids Health Dis**, v.4, p.7. 2005.

PAPA, P. C.; P. M. SERAPHIM; U. F. MACHADO. Loss of weight restores GLUT 4 content in insulin-sensitive tissues of monosodium glutamate-treated obese mice. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.21, n.11, Nov, p.1065-70. 1997.

PARK, S.; Y. KIM; J. DAN; J. Y. KIM. Attenuated Sympathetic Activity and Its Relation to Obesity in MSG Injected and Sympathectomized Rats. **Korean J Physiol Pharmacol**, v.11, p.155 - 161. 2007.

PEREZ-MATUTE, P.; N. PEREZ-ECHARRI; J. A. MARTINEZ; A. MARTI; M. J. MORENO-ALIAGA. Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha. **Br J Nutr**, v.97, n.2, Feb, p.389-98. 2007.

PEYRON-CASO, E.; S. FLUTEAU-NADLER; M. KABIR; M. GUERRE-MILLO; A. QUIGNARD-BOULANGE; G. SLAMA; S. W. RIZKALLA. Regulation of glucose transport and transporter 4 (GLUT-4) in muscle and adipocytes of sucrose-fed rats:

effects of N-3 poly- and monounsaturated fatty acids. **Horm Metab Res**, v.34, n.7, Jul, p.360-6. 2002.

PHILLIPS, C. M. T., A.C.; ROCHE, H.M. Gene-nutrient interactions in the metabolic syndrome. **Journal of nutrigenetics and nutrigenomics**, v.1, p.136-151. 2008.

PI-SUNYER, F. X. The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. **Obes Res**, v.10 Suppl 2, Dec, p.97S-104S. 2002.

PI-SUNYER, X. A clinical view of the obesity problem. **Science**, v.299, n.5608, Feb 7, p.859-60. 2003.

PIROLA, L.; A. M. JOHNSTON; E. VAN OBBERGHEN. Modulation of insulin action. **Diabetologia**, v.47, n.2, Feb, p.170-84. 2004.

PODOLIN, D. A.; E. C. GAYLES; Y. WEI; J. S. THRESHER; M. J. PAGLIASSOTTI. Menhaden oil prevents but does not reverse sucrose-induced insulin resistance in rats. **Am J Physiol**, v.274, n.3 Pt 2, Mar, p.R840-8. 1998.

QI, K.; C. FAN; J. JIANG; H. ZHU; H. JIAO; Q. MENG; R. J. DECKELBAUM. Omega-3 fatty acid containing diets decrease plasma triglyceride concentrations in mice by reducing endogenous triglyceride synthesis and enhancing the blood clearance of triglyceride-rich particles. **Clin Nutr**, v.27, n.3, Jun, p.424-30. 2008.

RABE, K.; M. LEHRKE; K. G. PARHOFER; U. C. BROEDL. Adipokines and insulin resistance. **Mol Med**, v.14, n.11-12, Nov-Dec, p.741-51. 2008.

RAMEL, A.; A. MARTINEZ; M. KIELY; G. MORAIS; N. M. BANDARRA; I. THORSDOTTIR. Beneficial effects of long-chain n-3 fatty acids included in an energy-restricted diet on insulin resistance in overweight and obese European young adults. **Diabetologia**, v.51, n.7, Jul, p.1261-8. 2008.

RANDLE, P. J.; P. B. GARLAND; C. N. HALES; E. A. NEWSHOLME. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, v.1, n.7285, Apr 13, p.785-9. 1963.

RATNAYAKE, W. M.; C. GALLI. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. **Ann Nutr Metab**, v.55, n.1-3, p.8-43. 2009.

REITMAN, M. L.; O. GAVRILOVA. A-ZIP/F-1 mice lacking white fat: a model for understanding lipotrophic diabetes. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.24 Suppl 4, Nov, p.S11-4. 2000.

REMKE, H.; A. WILSDORF; F. MULLER. Development of hypothalamic obesity in growing rats. **Exp Pathol**, v.33, n.4, p.223-32. 1988.

RIBEIRO, E. B.; C. M. DO NASCIMENTO; I. S. ANDRADE; A. E. HIRATA; M. S. DOLNIKOFF. Hormonal and metabolic adaptations to fasting in monosodium glutamate-obese rats. **J Comp Physiol B**, v.167, n.6, Aug, p.430-7. 1997.

RIVELLESE, A. A.; S. LILLI. Quality of dietary fatty acids, insulin sensitivity and type 2 diabetes. **Biomed Pharmacother**, v.57, n.2, Mar, p.84-7. 2003.

ROCHE, H. M.; M. J. GIBNEY. Effect of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on fasting and postprandial triacylglycerol metabolism. **Am J Clin Nutr**, v.71, n.1 Suppl, Jan, p.232S-7S. 2000.

ROCHE, H. M.; C. PHILLIPS; M. J. GIBNEY. The metabolic syndrome: the crossroads of diet and genetics. **Proc Nutr Soc**, v.64, n.3, Aug, p.371-7. 2005.

RONTI, T.; G. LUPATTELLI; E. MANNARINO. The endocrine function of adipose tissue: an update. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v.64, n.4, Apr, p.355-65. 2006.

ROSEN, E. D.; B. M. SPIEGELMAN. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. **Nature**, v.444, n.7121, Dec 14, p.847-53. 2006.

SALTIEL, A. R.; C. R. KAHN. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414, n.6865, Dec 13, p.799-806. 2001.

SARASWATHI, V.; L. GAO; J. D. MORROW; A. CHAIT; K. D. NISWENDER; A. H. HASTY. Fish oil increases cholesterol storage in white adipose tissue with concomitant decreases in inflammation, hepatic steatosis, and atherosclerosis in mice. **J Nutr**, v.137, n.7, Jul, p.1776-82. 2007.

SCALLET, A. C.; J. W. OLNEY. Components of hypothalamic obesity: bipiperidyl-mustard lesions add hyperphagia to monosodium glutamate-induced hyperinsulinemia. **Brain Res**, v.374, n.2, May 28, p.380-4. 1986.

SERAPHIM, P. M.; M. T. NUNES; U. F. MACHADO. GLUT4 protein expression in obese and lean 12-month-old rats: insights from different types of data analysis. **Braz J Med Biol Res**, v.34, n.10, Oct, p.1353-62. 2001.

SERHAN, C. N.; N. CHIANG; T. E. VAN DYKE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nat Rev Immunol**, v.8, n.5, May, p.349-61. 2008.

SHI, H.; M. V. KOKOEVA; K. INOUE; I. TZAMELI; H. YIN; J. S. FLIER. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **J Clin Invest**, v.116, n.11, Nov, p.3015-25. 2006.

SIJBEN, J. W.; P. C. CALDER. Differential immunomodulation with long-chain n-3 PUFA in health and chronic disease. **Proc Nutr Soc**, v.66, n.2, May, p.237-59. 2007.

SILVEIRA, L. R.; J. FIAMONCINI; S. M. HIRABARA; J. PROCOPIO; T. D. CAMBIAGHI; C. H. PINHEIRO; L. R. LOPES; R. CURI. Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle. **J Cell Physiol**, v.217, n.1, Oct, p.1-12. 2008.

SIMOPOULOS, A. P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **Am J Clin Nutr**, v.70, n.3 Suppl, Sep, p.560S-569S. 1999.

SIMOPOULOS, A. P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomed Pharmacother**, v.60, n.9, Nov, p.502-7. 2006.

SIMOPOULOS, A. P. Nutrigenetics/Nutrigenomics. **Annu Rev Public Health**, Jan 4. 2010.

SIRTORI, C. R.; C. GALLI. N-3 fatty acids and diabetes. **Biomed Pharmacother**, v.56, n.8, Oct, p.397-406. 2002.

SMYTH, S.; A. HERON. Diabetes and obesity: the twin epidemics. **Nat Med**, v.12, n.1, Jan, p.75-80. 2006.

SPIEGEL, A. M.; E. G. NABEL. NIH research on obesity and type 2 diabetes: providing the scientific evidence base for actions to improve health. **Nat Med**, v.12, n.1, Jan, p.67-9. 2006.

STEINBERG, D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. **Nat Med**, v.8, n.11, Nov, p.1211-7. 2002.

STORLIEN, L. H.; L. A. BAUR; A. D. KRIKETOS; D. A. PAN; G. J. COONEY; A. B. JENKINS; G. D. CALVERT; L. V. CAMPBELL. Dietary fats and insulin action. **Diabetologia**, v.39, n.6, Jun, p.621-31. 1996.

STORLIEN, L. H.; J. A. HIGGINS; T. C. THOMAS; M. A. BROWN; H. Q. WANG; X. F. HUANG; P. L. ELSE. Diet composition and insulin action in animal models. **Br J Nutr**, v.83 Suppl 1, Mar, p.S85-90. 2000.

STORLIEN, L. H.; A. B. JENKINS; D. J. CHISHOLM; W. S. PASCOE; S. KHOURI; E. W. KRAEGEN. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. **Diabetes**, v.40, n.2, Feb, p.280-9. 1991.

STORLIEN, L. H.; E. W. KRAEGEN; D. J. CHISHOLM; G. L. FORD; D. G. BRUCE; W. S. PASCOE. Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats. **Science**, v.237, n.4817, Aug 21, p.885-8. 1987.

TAI, C. C.; S. T. DING. N-3 polyunsaturated fatty acids regulate lipid metabolism through several inflammation mediators: mechanisms and implications for obesity prevention. **J Nutr Biochem**, v.21, n.5, May, p.357-63.

TAMURA, H.; J. KAMEGAI; T. SHIMIZU; S. ISHII; H. SUGIHARA; S. OIKAWA. Ghrelin stimulates GH but not food intake in arcuate nucleus ablated rats. **Endocrinology**, v.143, n.9, Sep, p.3268-75. 2002.

TAOUI, M.; C. DAGOU; C. STER; G. DURAND; M. PINAULT; J. DELARUE. N-3 polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.282, n.3, Mar, p.E664-71. 2002.

TODORIC, J.; M. LOFFLER; J. HUBER; M. BILBAN; M. REIMERS; A. KADL; M. ZEYDA; W. WALDHAUSL; T. M. STULNIG. Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. **Diabetologia**, v.49, n.9, Sep, p.2109-19. 2006.

TOMIE FURUYA, D.; R. BINSACK; M. E. ONISHI; P. MONTEIRO SERAPHIM; U. FABRES MACHADO. Low ethanol consumption induces enhancement of insulin sensitivity in liver of normal rats. **Life Sci**, v.77, n.15, Aug 26, p.1813-24. 2005.

TONTONOZ, P.; B. M. SPIEGELMAN. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. **Annu Rev Biochem**, v.77, p.289-312. 2008.

TOWBIN, H.; T. STAEHELIN; J. GORDON. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.76, n.9, Sep, p.4350-4. 1979.

TRAYHURN, P.; I. S. WOOD. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **Br J Nutr**, v.92, n.3, Sep, p.347-55. 2004.

WEISBERG, S. P.; D. MCCANN; M. DESAI; M. ROSENBAUM; R. L. LEIBEL; A. W. FERRANTE, JR. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, v.112, n.12, Dec, p.1796-808. 2003.

WELLEN, K. E.; G. S. HOTAMISLIGIL. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. **J Clin Invest**, v.112, n.12, Dec, p.1785-8. 2003.

WELLEN, K. E.; G. S. HOTAMISLIGIL. Inflammation, stress, and diabetes. **J Clin Invest**, v.115, n.5, May, p.1111-9. 2005.

WINER, S.; Y. CHAN; G. PALTZER; D. TRUONG; H. TSUI; J. BAHRAMI; R. DORFMAN; Y. WANG; J. ZIELENSKI; F. MASTRONARDI; Y. MAEZAWA; D. J. DRUCKER; E. ENGLEMAN; D. WINER; H. M. DOSCH. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. **Nat Med**, v.15, n.8, Aug, p.921-9. 2009.

WISSE, B. E.; F. KIM; M. W. SCHWARTZ. Physiology. An integrative view of obesity. **Science**, v.318, n.5852, Nov 9, p.928-9. 2007.

XU, H.; G. T. BARNES; Q. YANG; G. TAN; D. YANG; C. J. CHOU; J. SOLE; A. NICHOLS; J. S. ROSS; L. A. TARTAGLIA; H. CHEN. Chronic inflammation in fat

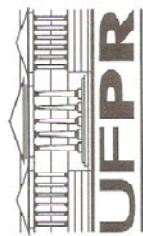
plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest**, v.112, n.12, Dec, p.1821-30. 2003.

YACH, D.; D. STUCKLER; K. D. BROWNELL. Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes. **Nat Med**, v.12, n.1, Jan, p.62-6. 2006.

ZHANG, N.; Y. HUAN; H. HUANG; G. M. SONG; S. J. SUN; Z. F. SHEN. Atorvastatin improves insulin sensitivity in mice with obesity induced by monosodium glutamate. **Acta Pharmacol Sin**, v.31, n.1, Jan, p.35-42.

ZIERATH, J. R.; K. L. HOUSEKNECHT; L. GNUDI; B. B. KAHN. High-fat feeding impairs insulin-stimulated GLUT4 recruitment via an early insulin-signaling defect. **Diabetes**, v.46, n.2, Feb, p.215-23. 1997.

ZORAD, S.; L. MACHO; D. JEZOVA; M. FICKOVA. Partial characterization of insulin resistance in adipose tissue of monosodium glutamate-induced obese rats. **Ann N Y Acad Sci**, v.827, Sep 20, p.541-5. 1997.



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA)



CERTIFICADO N.º 215

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIAN.º 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO N.º 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, e considerando o conteúdo no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos que utilizam animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075. 009026/2007-20

RO 03/2007 - 03/04/2007

APROVADO.

TÍTULO: Efeitos da suplementação do óleo de peixe sobre o metabolismo de glicose e lipídeos em ratos diabéticos

AUTORES: Luiz Cláudio Fernandes, Ricardo Key Yamazaki

DEPARTAMENTO:

Fisiologia

Curitiba,

04 de abril de 2007.

Profª Ana Maria Caliman Filadelfi
Coordenadora do CEEA

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)