



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA

ROSANA QUEZADO

**EFEITOS DE SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM MISTURA DE ÓLEOS ÔMEGA 3; 6
E 9 SOBRE AS ADIPOCINAS PLASMÁTICAS EM CAMUNDONGOS COM
*DIABETES MELLITUS***

FORTALEZA- CEARÁ
2012

ROSANA QUEZADO

EFEITOS DE SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM MISTURA DE ÓLEOS ÔMEGA 3; 6
E 9 SOBRE AS ADIPOCINAS PLASMÁTICAS EM CAMUNDONGOS COM
DIABETES MELLITUS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Cirurgia. Área de concentração: Metabolismo do Estresse.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Nasser Hissa

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

Q56e

Quezado, Rosana.

Efeitos de suplementação oral com mistura de óleos ômega 3; 6 e 9 sobre as adipocinas plasmáticas em camundongos com *diabetes mellitus*. – 2012.

113f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Departamento de Cirurgia, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Mestrado em Ciências Médico Cirurgias, Fortaleza, 2012.

Área de concentração: Metabolismo do Estresse.

Orientação: Prof. Dr. Miguel Nasser Hissa.

1. *Diabetes Mellitus*. 2. Adipocinas. 3. Ácidos Graxos. 4. Inflamação. I. Título.

CDD 616.462

ROSANA QUEZADO

EFEITOS DE SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM MISTURA DE ÓLEOS ÔMEGA 3; 6 E 9
SOBRE AS ADIPOCINAS PLASMÁTICAS EM CAMUNDONGOS COM *DIABETES*
MELLITUS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médico Cirúrgicas. Área de concentração: Metabolismo do Estresse.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Nasser Hissa

Banca Examinadora

Prof. Dr. Miguel Nasser Hissa
Universidade Federal do Ceará –UFC

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará -UFC

Dra. Ana Augusta Monteiro Cavalcante
Nutrimed Industrial Ltda

FORTALEZA – CEARÁ

2012

À minha família, em especial a Arnaldo e a Mariana, amores de minha vida e exemplos de bondade, dedicação e competência, cujo brilho do olhar diante de minhas conquistas me faz seguir em frente!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, Presença sentida constantemente em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor MIGUEL NASSER HISSA, Associado do Departamento de Medicina Clínica e do Programa de Pós-Graduação de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela diligente orientação deste trabalho e, em especial, pelo constante estímulo a meu desenvolvimento profissional.

Ao Professor Doutor PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, Titular do Departamento de Cirurgia, Coordenador do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* de Cirurgia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelos determinantes referenciais deste estudo.

Ao Professor Doutor SERGIO BOTELHO GUIMARÃES, Coordenador do Laboratório de Cirurgia Experimental e professor do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* de Cirurgia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará pela criteriosa contribuição científica na análise do manuscrito.

À Doutora ANA AUGUSTA MONTEIRO CAVALCANTE pelo rigor atencioso na análise do manuscrito contribuindo sobremaneira para sua melhor adequação científica.

À Doutora LÚCIA LIBANEZ BESSA CAMPELO pela disponibilidade em participar da banca qualificadora e pela importante contribuição científica na análise do manuscrito.

À NUTRIMED INDUSTRIAL LTDA pelo fornecimento dos óleos, e em especial à nutricionista ALINE MATOS CUNHA pelo preparo desses óleos e pela contínua disposição em esclarecer dúvidas e fornecer dados.

Ao Professor Doutor BRUNO GELONEZE, Coordenador do Laboratório de Investigação em Metabolismo e Diabetes e à Professora Doutora MARCIANE MILANSKI, do Curso de Nutrição, da Universidade Estadual de Campinas, por suas significativas recomendações no projeto de pesquisa.

Aos Estudantes de Medicina ARTHUR ALCÂNTARA LIMA e CAROLINA MEDEIROS DA FROTA RIBEIRO, bolsistas de pesquisa, pelo dedicado empenho e disciplina, significativos para o êxito deste trabalho.

Aos PROFESSORES do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela qualidade do ensino.

Às Senhoras MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA e MAGDA MARIA GOMES FONTENELE funcionárias do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela acolhida e cuidado dispensados aos pós-graduandos.

Ao Senhor BENTO FRANCISCO DE OLIVEIRA, técnico do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelo indispensável e dedicado apoio e pelas lições no trato dos animais de experimento.

Aos COLEGAS do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela partilha de nossas experiências.

Aos AMIGOS, colegas do SERVIÇO DE ENDOCRINOLOGIA E DIABETES do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará, pela compreensão e pronto apoio nos momentos mais difíceis.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro ao projeto, aprovado no Edital MCT/CNPq 14/2010-Universal - Faixa A.

Ocorre com a medicina o mesmo que com todas as técnicas. É uma atividade que tem raízes no esforço espontâneo do ser vivo para dominar o meio e organizá-lo segundo seus valores de ser vivo. (...) Portanto, existe medicina, em primeiro lugar porque os homens se sentem doentes. É apenas em segundo lugar que os homens, pelo fato de existir uma medicina, sabem em que consiste sua doença.

(George Cangilhem – O Normal e o Patológico)

RESUMO

EFEITOS DE SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM MISTURA DE ÓLEOS ÔMEGA 3; 6 E 9 SOBRE AS ADIPOCINAS PLASMÁTICAS EM CAMUNDONGOS COM *DIABETES MELLITUS*. ROSANA QUEZADO. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação (Stricto Sensu) em Ciências Médico Cirurgias. Orientador: Prof. Dr. Miguel Nasser Hissa.

O *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), doença multifatorial, heterogênea, resulta de suscetibilidade genética associada a fatores ambientais, especialmente sedentarismo e dieta rica em gorduras saturadas, e a obesidade. Caracteriza-se por resistência à insulina (RI) e pela diminuição da secreção desse hormônio. Inflamação moderada e crônica no tecido adiposo branco disfuncional, denominada “meta-inflamação”, parece ser o elo entre obesidade, RI e DM2. Papel de adipocinas produzidas pelo tecido adiposo nessas afecções vem sendo investigado. Objetiva-se neste estudo verificar se suplementação oral (SO) de mistura de óleos (MXO) com relação de ômega 9 / ômega 6 ($\omega 9/\omega 6$) elevada e de ômega 6 / ômega 3 ($\omega 6/\omega 3$) baixa, de diferentes fontes de $\omega 3$, interfere em adipocinas plasmáticas de camundongos com DM2. Depois de alimentados *ad libitum* com dieta da AIN-93G até ficarem adultos, camundongos Swiss (CSW) machos receberam, por onze semanas, dieta AIN-93HA, hiperlipídica adaptada, para indução de DM2, confirmado em 90% deles. Mantida a dieta AIN-93HA, os CSW com DM2 receberam, em grupos, por sete dias, SO com MXO: GA: água (controle nulo); GB: MXO [$\omega 9:\omega 3$ 0,4:1; $\omega 6:\omega 3$ 8:1 (controle neutro)]; GC: MXO [$\omega 9:\omega 3$ 3,7:1; $\omega 6:\omega 3$ -ALA 1,4:1]; GD: MXO [$\omega 9:\omega 3$ 3,7:1; $\omega 6:\omega 3$ -EPA+DHA de peixe 1,4:1]; GE: MXO [$\omega 9:\omega 3$ 3,7:1; $\omega 6:\omega 3$ -DHA de algas 1,4:1]. Por imunoensaios, realizou-se dosagem plasmática de insulina e de adipocinas, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α); interleucina-6 (IL-6); interleucina-1 beta (IL-1 β); fator ativador de monócitos (MCP-1); resistina (RES); leptina (LEP); inibidor do fator ativador de plasminogênio 1 (PAI-1) e adiponectina (AdipoQ). Houve diferença estatística significativa de adipocinas do grupo GE ($\omega 3$ -DHA de algas), em relação aos outros grupos, com aumento de IL-6 em relação ao GC e GD; diminuição de LEP em relação ao GA; aumento de TNF- α em relação aos grupos GB, GC e GD; e diminuição de AdipoQ em relação ao GB; assim como de RES entre os grupos GC ($\omega 3$ -ALA) e GD ($\omega 3$ -EPA+DHA). Não houve diferença estatística significativa em nenhuma das variáveis entre grupos controles. A Continuidade de dieta rica em gordura saturada pode ter comprometido a eficácia da suplementação de MXO ricos em $\omega 3$ e $\omega 9$.

Palavras Chaves: DM2, Adipocinas, Ácidos graxos saturados, Ácidos graxos ômega 3, 6 e 9 e “meta-inflamação”.

ABSTRACT

EFFECTS OF ORAL SUPPLEMENTATION WITH OIL MIXTURE OMEGA 3, 6 AND 9 ON PLASMA ADIPOKINES IN MICE WITH DIABETES MELLITUS. ROSANA QUEZADO.

Dissertation (Master). Graduate Program (stricto sensu) in Medical Sciences Surgeries.

Advisor: Prof. Dr. Miguel Nasser Hissa

Type 2 *diabetes mellitus* (T2DM), a multifactorial, heterogenic disease, results from associated genetic susceptibility to environmental factors, especially sedentary lifestyle and a diet rich in saturated fats, and obesity. It is characterized by insulin resistance (IR) and by a decrease of the secretion of this hormone. Moderate and chronic inflammation in dysfunctional white adipose tissue, called "meta-inflammation," seems to be the link between obesity, IR and T2DM. The role of adipokines produced by adipose tissue in these diseases has been investigated. The objective of this study was to verify whether oral supplementation (OS) of oil blend (MXO) with high relation of omega 9 / omega 6 ($\omega 9/\omega 6$) and low relation of omega 6 / omega 3 ($\omega 6/\omega 3$), from different sources of $\omega 3$, interferes with adipokines plasma of mice with T2DM. After fed *ad libitum* with AIN-93G diet until they become adult, Swiss mice (SWM) males received during eleven weeks, an adapted AIN-93HA and hyperlipidic diet, to induce T2DM which were confirmed in 90% of them. Maintained the AIN-93HA diet, the SWM with T2DM received, in groups, during seven days, MXO OS: GA: water (null control) GB: MXO [$\omega 9$: $\omega 3$ 0.4:1; $\omega 6$: $\omega 3$ 8: 1 (neutral control)]; GC: MXO [$\omega 9$: 3.7:1 $\omega 3$, $\omega 6$: $\omega 3$ -ALA 1.4:1]; GD: MXO [$\omega 9$: 3.7:1 $\omega 3$, $\omega 6$: $\omega 3$ -EPA + DHA from fish 1.4:1]; GE: MXO [$\omega 9$: $\omega 3$ 3.7:1; $\omega 6$: $\omega 3$, DHA from algae 1.4:1]. Plasma insulin, adipokines, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 beta (IL-1 β), monocyte activating factor (MCP-1), resistin (RES), leptin (LEP), an inhibitor of plasminogen activator 1 (PAI-1) and adiponectin (AdipoQ) were **analyzed** by immunotests assays. It was found a statistically significant difference between adipokines group GE ($\omega 3$ -DHA from algae), and the other groups, concerning an increased IL-6 compared to GC and GD, fewer LEP compared to GA; increase of TNF- α in relation to groups GB, GC and GD, and AdipoQ decrease compared to GB, as well as RES between GC ($\omega 3$ -ALA) and GD ($\omega 3$ -EPA + DHA). There was no statistically significant difference in any of the variables between control groups. The maintenance of high saturated fat diet may have compromised the effectiveness of supplementation MXO rich in $\omega 3$ and $\omega 9$.

Keywords: T2DM, Adipokines, saturated fatty acids, omega fatty acids 3, 6 and 9 and "meta-inflammation".

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Sinalização da insulina	28
Figura 2	Via de sinalização da insulina e da leptina no hipotálamo	29
Figura 3	Esquema simplificado da interação metabolismo e inflamação	33
Quadro 1	Adipocinas e mecanismos chaves relacionados com o desenvolvimento do DM2.	43
Figura 4	Estrutura química dos ácidos graxos ω 3, ω 6 e ω 9	44
Figura 5	Metabolismo de ácidos graxos ω 3, ω 6 e ω 9	47
Figura 6	Ácidos Graxos e formação de prostaglandinas e leucotrienos	48
Figura 7	Evolução histórica do consumo de gorduras na dieta humana	49
Quadro 2	Delineamento do experimento	55
Figura 8	Coleta de microgota de sangue por pequena incisão na porção distal da cauda do CSW	61
Figura 9	Anestesia via peritoneal dos CSW	62
Figura 10	Punção Cardíaca dos CSW	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição de Nutrientes da dieta AIN-9356
Tabela 2	Composição do Mix de Vitaminas da dieta AIN-93G, AIN-93M e AIN-93HA	56
Tabela 3	Composição do Mix de Minerais das dietas AIN-93G, AIN-93M e AIN-93HA	57
Tabela 4	Composição do MXO 1	58
Tabela 5	Composição do MXO 2	58
Tabela 6	Composição do MXO 3	58
Tabela 7	Composição do MXO 4	58
Tabela 8	Evolução do peso (média \pm EPM) dos CSW sob dieta AIN-93 até o início da SO	67
Tabela 9	Diferença entre Peso_A e Peso_D dos CSW sob suplementação de MXO diferenciada	67
Tabela 10	Diferença entre as glicemias dos CSW em jejum de 12h <i>overnight</i> _A e _D; e de 4h matinal_A da suplementação de MXO diferenciada e ainda sob dieta AIN-93HA	69
Tabela 11	Glicemias e Insulina (média \pm EPM)	70
Tabela 12	Adipocinas plasmáticas (média \pm EPM)	70
Tabela 13	Correlação de Spearman entre as adipocinas não paramétricas IL-6 e RES. e as demais variáveis	77
Tabela 14	Correlações de Pearson entre Glicemias em jejum de 12h_A e 12h_D <i>overnight</i> e de 4h matinal, IL-1 β , insulina, LEP e demais variáveis	78
Tabela 15	Correlações de Pearson entre, MCP-1, PAI-1, TNF- α , AdipoQ e Peso e demais variáveis	79

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Percentual de CSW com DM2 na 11 ^o semana de dieta AIN-93-HA	65
Gráfico 2	Evolução das glicemias (média ± EPM) em jejum de 4h matinal dos CSW sob dieta AIN-93HA	66
Gráfico 3	Correlação de Pearson glicemias em jejum de 4h e de 12 h de jejum _A da suplementação de MXO diferenciada	66
Gráfico 4	Evolução do peso (média ± EPM) dos CSW sob dieta AIN-93 e sob suplementação de MXO diferenciada	68
Gráfico 5	Comparação entre Peso (média ± EPM) dos CSW sob dieta AIN-93 e sob suplementação de MXO diferenciada _A e _D	68
Gráfico 6	Evolução da glicemia (média ± EPM) dos CSW em jejum de 12 h <i>overnight</i> e sob dieta AIN-93HA e suplementação de MXO diferenciada (a partir da 11 ^a semana)	69
Gráfico 7	Comparação entre as glicemias (média ± EPM) dos CSW em jejum de 12h <i>overnight</i> _A e de 4h matinal intergrupos e entre grupos	71
Gráfico 8	Comparação entre as glicemias (média ± EPM) dos CSW em jejum de 12h <i>overnight</i> _A e _D da suplementação de MXO diferenciada; intergrupos e entre grupos	71
Gráfico 9	Concentração plasmática da Insulina (média ± EPM) nos grupos de CSW diabéticos com suplementação de MXO diferenciada	72
Gráfico 10	Concentração plasmática da IL-6 (média ± EPM) nos grupos de CSW diabéticos com suplementação de MXO diferenciada	72
Gráfico 11	Concentração plasmática da IL-1β (média ± EPM) nos grupos de CSW diabéticos com suplementação de MXO diferenciada	73
Gráfico 12	Concentração plasmática da LEP (média ± EPM) nos grupos de CSW diabéticos com suplementação de MXO diferenciada	73
Gráfico 13	Concentração plasmática da MCP-1 (média ± EPM) nos grupos de CSW diabéticos com suplementação de MXO diferenciada)	74
Gráfico 14	Concentração plasmática da PAI-1 (média ± EPM) nos grupos de CSW diabéticos com suplementação de MXO diferenciada	74
Gráfico 15	Concentração plasmática da RES (média ± EPM) nos grupos de CSW diabéticos com suplementação de MXO diferenciada)	75
Gráfico 16	Concentração plasmática da TNF-α (média ± EPM) nos grupos de CSW diabéticos com suplementação de MXO diferenciada	75
Gráfico 17	Concentração plasmática da AdipoQ (média ± EPM) nos grupos de CSW diabéticos com suplementação de MXO diferenciada	76

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS / SÍMBOLOS

_A	Antes da suplementação orogástrica (logo antes)
AA	Ácido araquidônico
ACC	Acetil CoA carboxilase
ACoA	Acetil coenzima A
A160 Rab	Proteína ativadora da RabGTPase de 160 kDa
AdipoQ	Adiponectina
AdipoR-1	Receptor 1 da adiponectina
AdipoR-2	Receptor 2 da adiponectina
AG	Ácidos graxos
AGLs	Ácidos graxos livres
AGS	Ácido graxo sintetase
AIN-93G	American Intitute of Nutrition-93 <i>Growth</i> (dieta para crescimento)
AIN-93HA	American Intitute of Nutrition-93 <i>hyperlipid adapted</i> (dieta hiperlipídica adaptada)
AIN-93M	American Intitute of Nutrition-93 <i>maintenance</i> (dieta de manutenção)
Akt	Proteína kinase tirosina isoforma
Akt-1	Proteína kinase tirosina isoforma 1
Akt-2	Proteína kinase tirosina isoforma 2
Akt-3	Proteína kinase tirosina isoforma 3
ALA	Ácido alfa-linolênico
AL	Ácido linoleico
α	Alfa
AMP-cíclico	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
β	Beta
CAP	<i>Cbl-associated protein</i>
CAP/Cbl	Via <i>Cbl-associated protein</i>
Cbl	<i>Casitas B- lineage lynfoma</i> : gene codificador de várias proteínas
CCAAT	Citidina-citidina-adenosina-adenosina-timidina
CCL2	Proteína quimiotáxica de macrófagos também chamada de MPC-1
C/EBP	CCAAT/ <i>enhancer binding protein</i>
CEPA/UFC	Comitê de Ética de Pesquisas em Animais da UFC

COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	Enzima ciclooxigenase
COX-2	Enzima ciclooxigenase-2
CrkII	Proteína adaptadora da membrana plasmática com potencial oncogênico
C3G	Proteína liberadora de guanina
CSW	Camundongos Swiss
_D	Depois da suplementação orogástrica
DAG	Diacilglicerol
DHA	Ácido Docosahexaenoico
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM1	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM2	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Etilenodiaminotetracético – anticoagulante
ELISA	Enzima linked immuno sorbent assay
EPA	Ácido eicosapentaenóico
EPM	Erro padrão da média
ERK	Kinase ativada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ETA	Ácido Eicosatrienóico
EUA	Estados Unidos da América
FoxO	<i>Forkhead box class O</i>
FoxO1	<i>Forkhead box class O</i> 1
FRI	Fator regulador do interferon ou IRF
Gab-1	Proteína ligante -1de Grb-2
GA	Grupo A: Grupo de estudo controle nulo com camundongos diabéticos em dieta AIN-93HA e suplementação de água
GB	Grupo B: Grupo de estudo controle neutro com camundongos diabéticos em dieta AIN-93HA e suplementação de mistura de óleos (ω 9: ω 6 - 0,4:1; ω 6: ω 3 8:1)
GC	Grupo C: Grupo de estudo com camundongos diabéticos em dieta AIN-93HA e suplementação de mistura de óleos (ω 9: ω 6 - 3,7:1; ω 6: ω 3 -ALA- 1,4:1)
GD	Grupo D: Grupo de estudo com camundongos diabéticos em dieta AIN-93HA e suplementação de mistura de óleos (ω 9: ω 6 - 3,7:1; ω 6: ω 3 Peixe- 1,4:1)
GDP	Guanosina difosfato

GE	Grupo E: Grupo estudo com camundongos diabéticos em dieta AIN-93HA e suplementação de mistura de óleos (ω 9: ω 6 - 3,7:1; ω 6: ω 3 Algas- 1,4:1) por intubação orogástrica
GLP-1	Proteína similar ao glucagon-1
GLUT	Transportadores de glicose
GLUT 2	Transportadores de glicose-2
GLUT-4	Transportadores de glicose-4
Grb	<i>Growth factor receptor-binding</i>
GS	Glicogênio sintetase
GSK-3	Glicogênio sintase kinase-3
G-6-Pase	Glicose - 6 –fosfatase
GTP	Guanosina trifosfato
HA	Hiperlipídica adaptada
IDF	International Diabetes Federation
IFN γ	Interferon γ
IgAc	Instituto Genese de Análises Científicas
IGF-1	Fator de crescimento similar à insulina
ikB	Kinase inibidora do fator nuclear kappa B
IKK	Inibidor da ikB kinases
IKK α	Inibidor da ikB kinases alfa
IKK β	Inibidor da ikB kinases beta
IKK γ	Inibidora da ikB kinases gama
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintetase-induzida
IP	Intraperitoneal
IR	Receptor de insulina
IR β	Receptor intracelular de insulina beta
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
IRR	Receptor órfão conhecido como receptor relacionado ao receptor de insulina
IRS	Substrato para receptor de insulina
IRS-1	Substrato para receptor de insulina isoforma -1
IRS-2	Substrato para receptor de insulina isoforma-2
IRS-3	Substrato para receptor de insulina isoforma-3

IRS-4	Substrato para receptor de insulina isoforma-4
IRSs	Substratos para receptor de insulina
JAK	Janus kinase (enzima de duas faces)
JAK/IRS-1/PI3-k	Via de sinalização envolvendo a enzima Janus kinase, o substrato do receptor de insulina 1 e a fosfatidilinositol 3-kinase
JAK/STAT	Via de sinalização Janus kinase/ <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
JAK-2/STAT-3	Via de sinalização Janus kinase-2/ <i>Signal Transducers and Activators of Transcription-3</i>
JNK	Jun N-terminal kinase ou Janus N terminal kinase
LEP	Leptina
LEP-ObRb	Ligação da leptina a seu receptor isoforma longa
LOX	Lipooxigenase
LPL	Lipase lipoproteica
LPS	Lipopolissacarídeos
LT	Leucotrienos
LT4	Leucotrienos série 4
LT5	Leucotrienos série 5
LTB4	Leucotrienos série B4
LXR	<i>Ligand of liver X receptor</i>
κ	Kappa
Kcal	Kilocaloria
KDa	KiloDaltons - Unidade de massa em kilogramas
M	Manutenção
MADPK-71K-7	Kit para ensaio e dosagem de analitos através do aparelho Luminex® com capacidade de dosar 7 analitos ao mesmo tempo.
MADPK71K-ADPN	Kit para ensaio e dosagem de adiponectina através do aparelho Luminex®
Malonil CoA	Malonil coenzima A
MAP	<i>Multiple Analyte Profiling</i> (perfil de múltiplos analitos)
MAPK	Proteína kinase ativada por mitógenos
MAP4K4	Proteína kinase 4 ativada por mitógenos 4
MCP-1	Proteína quimiotaxia de monócitos-1
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i> . Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MUFA	Ácido graxo monoinsaturado

MUFAs	Ácidos graxos monoinsaturados
MXO	Mistura de Óleos
n	Número; utilizado também no sistema de denominação dos ácidos graxos poliinsaturados e monoinsaturados
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótideo fosfato reduzido
NF- κB	Fator nuclear kappa B
Ob	Gene da obesidade descrito em camundongos
ob/ob	Gene da obesidade em homozigose
ObR	Receptor da leptina
ObRb	Receptor da leptina isoforma longa
ω-3	Ômega-3
ω-6	Ômega-6
ω-9	Ômega-9
OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	Óxido nítrico
PLAG	Proteína ligante de ácido graxo
PAI-1	Inibidor do fator ativador de plasminogênio 1
PCR	Proteína C reativa
PDE3B	Fosfodiesterase AMP cíclico específica
PDK-1	Kinase 1 dependente de fosfoinosítido
PEPCK	Fosfoenolpiruvato-carboxikinase
PF-1	Proteína fosfatase-1
PFA	Proteínas de fase aguda
PG	Prostaglandinas
pg	Picogramas
PG/TX	Prostaglandinas/tromboxanos
PG/TX3	Prostaglandinas/tromboxanos série 3
PG/TX5	Prostaglandinas/tromboxanos série 5
PGC-1	Coativador do <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PI3-T	Fosfatidilinositol-3-fosfato
PI3,4-T2	Fosfatidilinositol-3,4-difosfato
PI3,4,5T ₃	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

PI- 3k	Fosfatidilinositol 3–kinase
PKA	Proteína kinase A
PKB	Proteína kinase B ou Akt
PKC	Proteína kinase C
PKCa	Proteína kinase C atípica
PKCa λ	Proteína Kinase C atípica lambda
PKCa ζ	Proteína kinase C atípica zelta
PKR	Proteína kinase R
PLRFC 2	Proteína ligante do receptor do fator de crescimento tipo 2
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PrA-1	Proteína adaptadora-1
PrAS	Proteínas adaptadoras
PUFAS	Ácidos graxos poli-insaturados
RE	Retículo endoplasmático
RELM	<i>Resistin like molecules</i>
RES	Resistina
RI	Resistência à insulina
RNA	Ácido ribonucleico
RNA m	Ácido ribonucleico mensageiro
RTKs	Receptores tirosina kinases
S	Sulfato
Sar	Proteína isolada do sarcoma de rato
Se	Selênio
SH2	<i>Sarcoma (Src) Homology 2</i> . domínios homólogos a Src 2, uma oncoproteína
SH3	<i>Sarcoma (Src) Homology 3</i> . domínios homólogos a Src 2, uma oncoproteína
SHC	Src de “ <i>sarc</i> ” <i>colagen homology</i> . Proteína homóloga ao colágeno
SHP2	Src de “ <i>sarc</i> ”- <i>colagen homology protein 2</i>
SIRP	<i>Signal regulated protein</i> . Proteína reguladora de sinal
SO	Suplementação oral
SOCS-1	<i>Suppressor of cytokine signaling-1</i>
SOCS-3	<i>Suppressor of cytokine signaling -3</i>

SOCS-6	<i>Suppressor of cytokine signaling -6</i>
SOS	<i>Son-of-sevenless</i> : nucleotídeo de guanina
Src	“Sarc” nome reduzido de sarcoma. Protooncogene
SREBPs	<i>Sterol regulatory element-binding proteins</i>
SPSS	<i>Statistical Analysis Sistem</i>
STAT3	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription 3</i> - proteína ativadora de transcrição nuclear-3 por transdução de sinal da superfície celular ao núcleo
TA	Tecido adiposo
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TC10	Tampão 10 do AMPc
TK	Tirosina kinase
TLRs	<i>Toll –like receptors</i>
TLR-4	<i>Toll –like receptors-4</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR1	Receptor do fator de necrose tumoral tipo 1
TNFR2	Receptor do fator de necrose tumoral tipo 2
TX	Tromboxanos
TUG	<i>Tether, containing a UBX domain, for GLUT-4</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
UGDP	Uridina glicose difosfato
UI	Unidade internacional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Vias da sinalização da insulina	23
1.2	Resistência à Insulina e Inflamação	30
1.3	Tecido adiposo disfuncional - o elo entre obesidade, resistência à insulina e <i>diabetes mellitus</i> tipo 2	35
1.4	Adipocinas	37
1.4.1	Fator de necrose tumoral- α	37
1.4.2	Interleucina -6	38
1.4.3	Interleucina-1 β	39
1.4.4	Fator atrativo de monócitos-1	39
1.4.5	Inibidor da ativação do plasminogênio -1	40
1.4.6	Adiponectina	40
1.4.7	Leptina	41
1.4.8	Resistina	42
1.5	Ácidos Graxos	43
2	OBJETIVO	51
3	MÉTODO	52
3.1	Aspectos éticos	52
3.2	Delineamento do experimento	52
3.3	Procedimentos	59
4	RESULTADOS	65
4.1	Fase 1 - Crescimento	65
4.2	Fase 2 - Indução de <i>diabetes mellitus</i> tipo 2	65
4.3	Fase 3 - Suplementação oral de ácidos graxos insaturados	67
5	DISCUSSÃO	80
6	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	90
	APÊNDICES	103
	ANEXO	113

1 INTRODUÇÃO

Alusões a uma doença com perda excessiva de urina adocicada, sede intensa e perda corporal importante, remontam à antiguidade. Ao longo dos anos essa doença foi-se denominando *diabetes mellitus* (DM)¹, conceito que atualmente distingue um grupo heterogêneo de distúrbios caracterizado por hiperglicemia crônica, com alterações no metabolismo de carboidratos, de lipídeos e de proteínas, resultantes de defeitos na secreção ou na ação da insulina, ou em ambas. Esse estado de hiperglicemia crônico está associado a complicações macro e microvasculares evidenciadas como as principais causas de morbidade e de mortalidade nessa doença (BROWNLEE, 2001). A maioria dos casos de DM é classificada em duas categorias etiopatogênicas amplas, atualmente chamadas de *diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) e *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), mas a extensão da heterogeneidade entre esses tipos permanece incerta (BENNET; KNOWLER, 2009)

Estima-se que o número de pessoas no mundo, com idade entre 20 e 79 anos, acometidas de DM aumentará de 336 milhões em 2011, 8,3% dos adultos, para 552 milhões em 2030, um em cada dez adultos, se nenhuma medida de urgência for adotada. Na faixa etária de 40 a 59 anos está o maior número de pessoas e três quartos dessas (179 milhões) vivem em países de baixa e média renda. Na América do Sul e Central, 25,1 milhões de pessoas têm DM e há perspectiva de aumento próximo a 60% em 2030. O Brasil lidera esta região com 12,4 milhões de pessoas com essa doença. Acredita-se ainda que muitas pessoas estejam sem diagnóstico de DM (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2012). Mais prevalente, o DM2 é considerado um dos maiores desafios no âmbito da saúde pública em todo mundo em função do aumento de sua incidência em proporções epidêmicas.

Doença multifatorial e heterogênea em muitos aspectos, o DM2 é resultado de suscetibilidade genética, particularmente em determinados grupos étnicos, associada a fatores ambientais e comportamentais tais como o sedentarismo, a

¹ “Hipócrates, o pai da medicina, fez referências, embora não específicas, mas consistentes, ao *diabetes mellitus*. Na época, há relatos de raros casos em que a perda excessiva de urina e a emaciação eram evidentes. Galeno, discípulo de Hipócrates, chegou a descrever a doença como ‘diarréia urinária’ e ‘doença da sede’. Logo depois Areteu usou pela primeira vez o termo ‘diabetes’ que do grego significa sifão. Thomas Willis, em 1674, sugeriu que o *diabetes* era principalmente uma doença do sangue e não dos rins e a doença já não era mais considerada rara. O adjetivo *mellitus*, do latim mel, foi acrescentado somente no século dezoito por Cullen” (SANDERS, 2002).

alimentação hipercalórica rica em carboidratos e gorduras saturadas, e a obesidade (ZIMMET *et al.*, 2001). Caracteriza-se por resistência à insulina (RI) e também pela diminuição da secreção de insulina pelas células beta (β) pancreáticas. De influências hereditárias e/ou adquiridas, a RI é classicamente definida como um estado de menor resposta metabólica aos níveis circulantes de insulina (CARVALHEIRA, ZECCHIN; SAAD; 2002).

Dentre outras etiologias a obesidade é a causa mais comum de RI, principalmente em países desenvolvidos. Como e porque a obesidade causa a RI ainda não está completamente esclarecido. Há um primeiro relato associando essas condições à inflamação, demonstrando aumento da expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), uma citocina pró-inflamatória, no tecido adiposo de camundongos obesos (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993). A partir de então e nesta perspectiva, vários estudos vem sendo realizados observando também o papel de outras substâncias produzidas no tecido adiposo, ditas adipocinas, como fatores inflamatórios e no desenvolvimento da resistência à insulina e do diabetes (SAMAD *et al.*, 1999; NELLS *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2008).

Compreender a cadeia de eventos relacionada com a RI constitui-se premissa para a concepção de modos efetivos de prevenir e tratar o DM2 e há muitos anos vem sendo alvo de diversos estudos (CARVALHEIRA, ZECCHIN; SAAD; 2002; RABE *et al.*, 2008; GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011). Esta pesquisa experimental se justifica porquanto se alinha ao propósito de ampliar essa compreensão.

Nesta introdução são abordados temas de fundamento para este estudo: vias de sinalização da insulina; resistência à insulina e inflamação; tecido adiposo disfuncional como elo entre obesidade, resistência à insulina e DM2; adipocinas; ácidos graxos e DM2. Em sequência são apresentados o método aplicado, os resultados obtidos, a discussão e a conclusão.

1.1 Vias da sinalização da insulina

A insulina é uma proteína produzida pelas células β das ilhotas pancreáticas a partir de molécula precursora, a pré-proinsulina, por tradução de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) no retículo endoplasmático rugoso seguida de decomposição pré-proinsulina a proinsulina por enzimas mitocondriais. A pró-insulina é então transportada para o complexo de Golgi aonde é embalada em grânulos. A maturação do grânulo está associada à perda do revestimento e à conversão de pró-insulina em insulina e em peptídeo C (MASHSRANI; GERMAN, 2007). Constituída de duas cadeias de polipeptídeos, a insulina é responsável pela homeostase da glicose e interfere no crescimento e na diferenciação celular (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). Incluem-se ainda como funções desse potente hormônio anabólico, o aumento da produção do óxido nítrico (ON) no endotélio, a prevenção da apoptose celular e o controle da ingestão alimentar pelo hipotálamo (CAVALHEIRA *et al.*, 2001).

A secreção da insulina é regulada de forma bifásica por sinais nutricionais e hormonais e o nível sérico de glicose exerce papel de destaque. Por difusão passiva facilitada, a glicose passa através da membrana das células β conduzida por proteína específica do tipo transportador de glicose (GLUT-2) e promove a secreção de insulina (HABER *et al.*, 2001). Fisiologicamente, mudanças nos níveis de glicemia, resultantes de alterações na produção ou utilização da glicose, são percebidas e resultam no ajuste da secreção de insulina, restabelecendo novo equilíbrio com a normalização dos níveis de glicose no sangue (FUJIMOTO, 2000). Outros secretagogos de insulina tais como ácidos graxos livres, aminoácidos ou a incretina peptídeo-1 similar ao glucagon (GLP-1), agem como potenciadores, requerendo nível limiar de glicose na corrente sanguínea (MUOIO; NEWGARD, 2008).

Em condições fisiológicas, a ação da insulina se inicia após a sua ligação a receptores específicos e localizados nos órgão alvos. Essa ligação desencadeia uma série de eventos chamada de cascata de sinalização² de insulina.

O receptor de insulina (IR) assim como o do fator de crescimento similar à insulina (IGF-1) e aquele conhecido como receptor órfão relacionado ao receptor de

² Sinalização celular: complexo sistema de comunicação que controla e coordena as atividades e funções celulares.

insulina (IRR) pertencem à família de receptores tirosina kinases (RTKs) (WHITE, 1997). Podem formar híbridos funcionais entre si e a mutação de qualquer um deles pode inibir a atividade dos outros. Receptores homólogos da insulina/IGF-1 têm sido identificados em organismos inferiores como *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* e *Metazoan marine sponges*³. Estas estruturas simples usam o mesmo mecanismo de sinalização das células dos mamíferos (SALTIEL; KAHN, 2001).

Duas subunidades alfa (α) e duas β , ligadas por pontes dissulfeto, compõem o receptor de insulina (KUBAR; ROCHET, 1990). Enquanto a subunidade α é totalmente extracelular e responsável pela ligação com a insulina, a β começa na membrana celular e se estende até o citoplasma aonde tem atividade tirosina kinase intrínseca. A subunidade α inibe a atividade da tirosina kinase da subunidade β , efeito este suprimido quando a insulina se liga a seu receptor. Essa ligação promove fosforilação de várias proteínas, denominadas de substratos, em tirosina (WHITE, 1997). Isto ocorre com alteração conformacional e autofosforilação dos resíduos de tirosina específicos na subunidade β do receptor da insulina, aumentando ainda mais a atividade kinase do receptor e consequente fosforilação em tirosina de importantes substratos proximais incluindo os substratos de receptores de insulina (IRS-1, 2, 3 e 4); a proteína cuja estrutura se assemelha àquela do colágeno (Shc); a proteína reguladora de sinal (SIRP); proteína ligante-1 de *Growth factor receptor-binding-2* (Grb-2) (Gab-1); a proteína protooncogênica - *Casitas B- lineage lymphoma* (Cbl); as proteínas adaptadoras (PrAS) (PESSIN; SATIEL, 2000) e a enzima Janus⁴ kinase-2 (JAK-2) (SAAD *et al.*, 1996).

Nas últimas duas décadas, as funções das proteínas IRS-1 e IRS-2 foram estabelecidas por intermédio de estudos em camundongos *knockout* (sem os genes que codificam esses receptores de insulina). A não expressão do IRS-1 foi relacionada com RI e restrição do crescimento, mas não com hiperglicemia, por provável aumento compensatório da secreção de insulina (ARAKI *et al.*, 1994). Já em camundongos sem a expressão do IRS-2 ocorreu acentuada hiperglicemia devido a anormalidades na ação da insulina nos tecidos periféricos e a falência da atividade secretora de insulina pelas células β do pâncreas acompanhada de

³ *Drosophila* (mosca de fruta); *Caenorhabditis elegans* (nematódeo) e *Metazoan marine sponges* (metazoários esponjosos de ambiente marinho)

⁴ Janus era um Deus romano que possuía duas faces contrárias e daí a origem do nome janeiro para o primeiro mês do ano.

redução da massa pancreática. Esses dados apontam que o substrato IRS-2 tem papel essencial na regulação da proliferação, sobrevivência e neoformação de células β pancreáticas (WITHERS *et al.*, 1998). Mais recentemente, um estudo utilizando animais em heterozigose⁵ para os genes das proteínas IRS-1 e IRS-2, evidenciou diferentes níveis de ação dessas proteínas em tecidos específicos, mediante estímulo da insulina. O IRS-1 com ação mais proeminente no músculo esquelético e o IRS-2 no fígado (KIDO *et al.*, 2000). Noutros, crescimento e metabolismo da glicose próximos ao normal foram constatados em camundongos *knockout* para o IRS-3 e IRS-4 (LIU *et al.*, 1999; FANTIN *et al.*, 2000). Com a fosforilação dos IRS-1 e IRS-2 em tirosina, esses substratos ativam moléculas contendo domínios *sarcoma* (Src) *homology* 2 (SH2) existentes nas vias da fosfatidilinositol 3-kinase (PI3-k), da Cbl *associated protein* (CAP/Cbl) e da proteína kinase ativada por mitógenos (MAPK), resultando em importantes ações biológicas (RIBON; SATIEL, 1997; KITAMURA *et al.*, 1998; CZECH; CORVERA, 1999).

Considerada essencial no transporte de glicose e na síntese de glicogênio, a enzima PI3-k é composta por duas subunidades, uma catalítica (110 kDa) e outra reguladora (85 kDa) que contém duas porções SH2 e uma *src homology* 3 (SH3) (BACKER *et al.*, 1992). A PI3-k é responsável pela ativação de outras proteínas como a proteína kinase B (PKB), mais conhecida como Akt, e as isoformas atípicas da proteína kinase, zeta e lambda (PKCa ζ e λ), e promove a fosforilação dos fosfoinosítídeos de membrana na posição 3 do anel de inositol produzindo fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3-T), fosfatidilinositol-3,4-difosfato (PI3,4-T2) e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PI3,4,5T₃). Pela ligação aos domínios *pleckstrin homology* (PH) presentes em diversas moléculas, o PI3,4,5T₃ promove alteração das atividades e de suas localização. Esse mesmo PI3,4,5T₃ pode ainda regular a kinase 1 dependente de fosfoinosítídeo (PDK-1), uma serina/treonina kinase que fosforila e ativa outra serina/treonina kinase, a Akt (CZECH; CORVERA, 1999). Há evidências de que a PDK-1 seja também capaz de fosforilar e ativar as PKCa envolvidas na síntese proteica e no transporte de GLUT-4, mas seu papel sobre esse último é ainda impreciso (KOTANI *et al.*, 1998).

⁵ Condição em que o indivíduo possui alelos diferentes para um determinado gene; indicador da diversidade genética de uma população determinado a partir da frequência de heterozigotos para um determinado gene.

A Akt está presente no citoplasma em três isoformas: Akt-1, -2 e -3 (WHITEMAN, CHO, BIRNBAUM, 2002). Destaca-se a Akt-2 por ser responsável aproximadamente por 70% da propagação do sinal da insulina. Em estudo experimental com células adiposas foi demonstrado que a Akt-1 pode também contribuir nessa sinalização (JIANG *et al.*, 2003).

A fosforilação de Akt em tirosina favorece a propagação do sinal da insulina através de uma série de eventos a seguir relatados: (1) promovendo a captação de glicose no músculo e no tecido adiposo pela proteína ativadora da Rab GTPase (A160 Rab) (SANO *et al.*, 2003; KARLSSON *et al.*, 2005), que por sua vez sensibiliza pequenas proteínas - *tether, containing a UBX domain, for GLUT-4* (TUG) ao redor do transportador de glicose (GLUT-4), assim auxiliando sua translocação até a membrana celular (BOGAN *et al.*, 2003); (2) bloqueando, no músculo e no fígado, a atividade da enzima glicogênio sintase kinase-3 (GSK-3), que por sua vez cessa a atividade da enzima glicogênio sintase (GS), que então liberada se fosforila e permite que uridina glicose difosfato (UGDP) passe a glicogênio (glicogênese) (CROSS *et al.*, 1995); (3) fosforilando um fator de transcrição nuclear da subfamília *forkhead box class O* (FoxO), o FoxO1, fazendo com que ele migre para o citoplasma e sofra degradação proteossômica, assim reduzindo, possivelmente, a transcrição de genes⁶ tais como o da enzima fosfoenolpiruvato-carboxikinase (PEPCK) que promove a produção de glicose (gliconeogênese) e de enzimas glicolíticas (glicokinase e piruvato kinase) (PILKIS; GRANNER, 1992; CAVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002; PERROT; RECHLER, 2005);

A Akt também ativa a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), integradora celular presente em diversas células, a qual recebe sinais de fatores de crescimento, de nutrientes e do metabólitos da via energética, resultando em atividades como transcrição, tradução, *turnover* do RNAm, estabilização proteica, biogênese, regulação do tamanho celular, autofagia e organização de cito esqueleto (PESSIN; SATIEL, 2000) e inibe a atividade da proteína kinase A (PKA) pela ativação da enzima fosfodiesterase de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) específica (PDE3B), assim reduzindo a lipólise nos adipócitos (ANTHONSEN *et al.*, 1998; KITAMURA *et al.*, 1999).

⁶ A regulação desses genes envolve além da Akt e do FoxO1, o coativador do PPAR γ (receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma), PGC-1, embora não esteja ainda totalmente esclarecida (CAVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002)

Fatores de transcrição⁷ denominados *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBPs) são estimulados pela insulina e responsáveis pela síntese de lipídeos por ativação de aproximadamente 30 genes que promovem a síntese e captação de colesterol, ácidos graxos, triglicerídeos e fosfolipídeos, bem como da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), cofator requerido pela síntese dessas moléculas. Na produção de lipídeos (lipogênese), preferencialmente de ácidos graxos, o fígado, sobretudo quando submetido à carga excessiva de carboidratos, aumenta a expressão de genes de produtos como a acetil CoA carboxilase (ACC), que converte a acetil coenzima A (acetilCoA) em malonil coenzima A (malonil CoA), e a ácido graxo sintetase (AGS), que transforma a malonil CoA em palmitato (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002)

Em paralelo e aparentemente independente da PI3-k, a via CAP/Cbl envolve a fosforilação em tirosina do Cbl que associado à proteína adaptadora CAP se dirige para a membrana celular onde se liga a outra proteína adaptadora, a CrkII⁸ (FELLER, 2001), que por sua vez faz o ajuste entre os sinais da via CAP/Cbl com a proteína liberadora de guanina (C3G), que catalisa a troca da guanosina difosfato (GDP) por guanosina trifosfato (GTP) da proteína tampão 10 da AMPc (TC10). A TC10 ativada sinaliza para a translocação de vesículas contendo GLUT-4 para a membrana celular e consequente captação de glicose (BAUMANN *et al.*, 2000; CHIANG *et al.*, 2001).

Responsável pela regulação da expressão de alguns genes de crescimento e diferenciação celular, a via da MAPK inicia seu papel com fosforilação das proteínas IRS e/ou Shc que interagem com a proteína do receptor do fator de crescimento-2 (PRFC-2). A PRFC-2 está indispensavelmente associada à proteína *son-of-sevenless* (SOS) que, pela troca do GDP por GTP da proteína do sarcoma de rato (Sar)⁹, promove a ativação dessa última. A proteína citoplasmática contendo domínio SH2 (SHP-2) participa dessa ativação. A ativação da Sar promove a fosforilação da cascata da MAPK em serina favorecendo a ações envolvidas, acima descritas (SALTIER; KAHN, 2001). A via da MAPK também pode, possivelmente, contribuir para a translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática (FURTADO *et al.*,

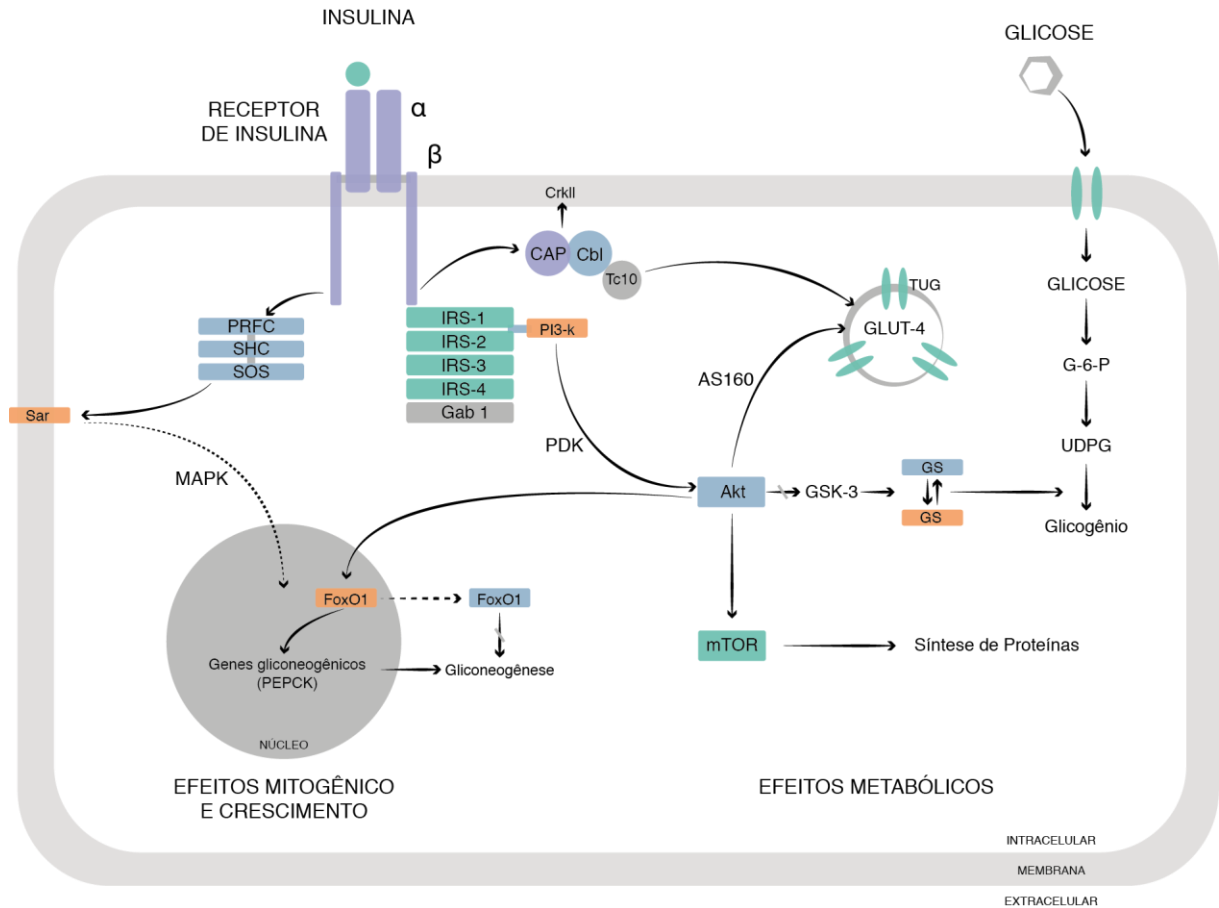
⁷ Transcrição é a síntese de um ácido ribonucleico (RNA) a partir de uma dupla hélice de DNA. Ao ligar-se a um sítio específico codificante de uma proteína localizado no ácido desoxirribonucleico (DNA), ativa a transcrição genética. (DARMON; DEVERNEUIL, 1936).

⁸ CrkII: novo oncogene que parece ativar a tirosina quinase nas células. Crk = *chicken tumor virus*.

⁹ Assim chamada por ter sido isolada a partir de um sarcoma de rato, do inglês, *rat sarcoma tumor*

2003); e ativar a proteína fosfatase-1 (PF-1) responsável pela desfosforilação e ativação da enzima GS (YANO *et al.*, 1993). (Figura 1)

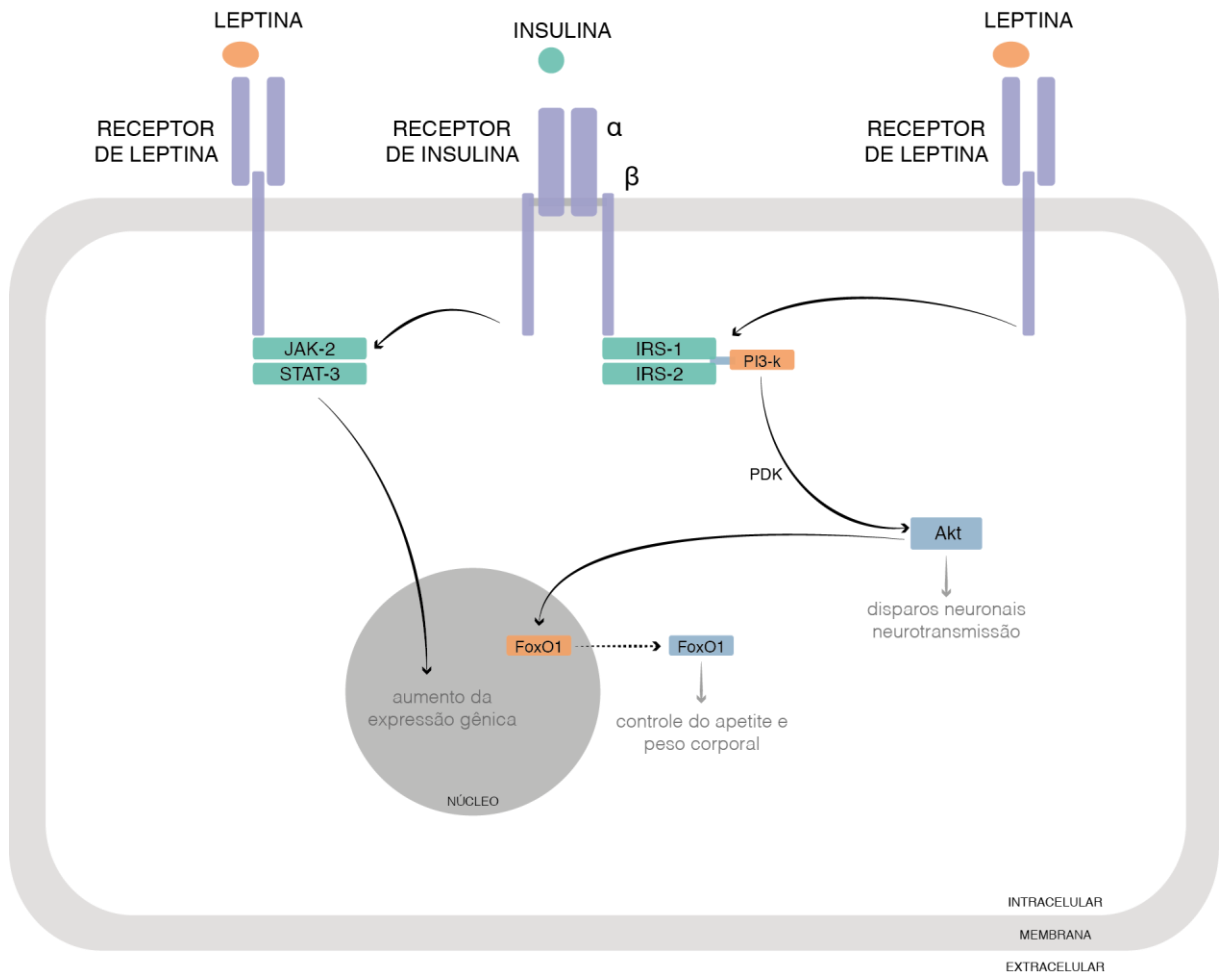
Figura 1 - Sinalização da insulina



Adaptada de Mashrani; German (2007).

No hipotálamo, ocorre a mesma reação de fosforilação com a saída do FoxO1 do núcleo, pela via IRS/PI-3k-Akt, já reportada anteriormente, além da via JAK-2/STAT-3 mediada pelo conjunto insulina-leptina. Ambas as vias apresentam importante papel no controle da ingestão alimentar e do peso corporal (CARVALHEIRA *et al.*, 2001; VELLOSO, 2006) (Figura 2)

Figura 2 - Via de sinalização da insulina e da leptina no hipotálamo



Adaptada de Velloso (2006).

Depreende-se, até aqui, que distorção no receptor de insulina *per si* não é fator preponderante na sensibilidade a esse hormônio e que a não ativação de alguma das proteínas intracelulares envolvidas em sua sinalização pode implicar em resistência a ele. E ainda, que a deficiência de insulina ou o bloqueio de suas ações promovem profunda desordem do metabolismo e do crescimento e redução da sobrevivência celular resultando, entre outras alterações, na elevação das glicemias de jejum e pós-prandiais e dos níveis de lipídeos circulantes.

1.2 Resistência à Insulina e Inflamação

A resistência à insulina é uma característica inerente do DM2, de acordo com diversos estudos. Está presente em mais de 80% dos diabéticos tipo 2 e pode preceder e acelerar a disfunção das células beta (GERICH, 1999), mas também pode surgir como resultado dessa disfunção (WEYER *et al.*, 1999; KAHN, 2001) e é comumente associada à obesidade, o que explicaria a ligação entre as incidências crescentes de obesidade e de DM2 (BALKAU *et al.*, 2002). Quando a RI precede a disfunção das células beta, o pâncreas reage a essa condição pelo aumento da secreção da insulina, na tentativa de controlar a concentração de glicose no sangue, com consequente estado de hiperinsulinemia. Se essa situação persiste, ocorre exaustão daquelas células, resultando em diminuição dos níveis de insulina e consequentemente hiperglicemia (FUJIMOTO, 2000).

Até há pouco tempo, a RI de forma adquirida era tida como consequência direta da obesidade e de excessos alimentares expondo os tecidos a produtos tóxicos do metabolismo. Estudos recentes, no entanto, têm demonstrado a importância de outros fatores como a ativação intracelular de resposta ao estresse metabólico; a comunicação entre órgãos através de hormônios peptídicos e de moléculas inflamatórias (citocinas) e a ativação do sistema imune inato (PICKUP, 2004; MUOIO; NEWGARD, 2008).

A homeostase metabólica é feita por meio de mecanismo minuciosamente coordenado entre o estoque, a mobilização e a utilização dos ácidos graxos e da glicose no tecido adiposo, no fígado e no músculo esquelético. Quando se rompe essa homeostase, há aumento dos níveis circulantes de glicose e de ácidos graxos e diminuição da sensibilidade à insulina.

A elevação dos níveis glicêmicos promove, por estresse oxidativo, um ambiente glicotóxico, ocorrendo distúrbio no transporte da glicose, por diminuição dos transportadores GLUT-2, nas células β pancreáticas, e GLUT-4, no músculo esquelético e no tecido adiposo, com diminuição de sua função de captar glicose do espaço extracelular e do aumento da glicação¹⁰ de algumas enzimas envolvidas no metabolismo da glicose como a glicocinase. Daí ocorre a perda da primeira fase de secreção de insulina e a piora da resposta a esse hormônio. Segue-se então

¹⁰ Ligação espontânea de glicose a proteínas, como ocorre, por exemplo, entre a glicose e a hemoglobina, de utilidade clínica atual, como *hemoglobina glicada*.

aumento do estresse celular, estabelecendo-se um “ciclo vicioso” (WEIR; BONNER-WEIR, 2004).

Elevados níveis sanguíneos de ácidos graxos livres (AGLs), quase sempre observados na obesidade central, na resistência à insulina, no DM2 e em condições de alta ingestão de gordura saturada, promovem “lipotoxicidade”¹¹ que está associada à diminuição da síntese de insulina e ao aumento do estresse metabólico nas células β pancreáticas (PEREIRA *et al.*, 2003). A estreita relação entre AGLs e RI tem sido relatada em vários estudos e está relacionada ao acúmulo de triacilgliceróis e de metabólitos derivados de ácidos graxos, tais como o diacilglicerol, a acetil-CoA e as ceramidas, no músculo e no fígado, e à diminuição da via glicolítica (RANDLE *et al.*, 1963; SHULMAN, 2000; MUOIO; NEWGARD, 2008). O aumento daqueles metabólitos no músculo é capaz de fosforilar o IR e os seus substratos (IRSs) em serina e bloquear a via PI3-k/Akt e ainda promover a ativação da proteína kinase C (PKC) e/ou do *complexo de inibidores* da kinase inibidora do NF- κ B (ikB) (IKK)¹², assim como da Jun N-Terminal kinase (JNK). Essas fosforilações inibitórias causam *feedback* negativo na sinalização da insulina e podem ser responsáveis pelo aumento da resistência à insulina (KAHN; FLIER, 2000; WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005). Fato interessante, acrescentado por outro estudo, é de que o aumento da expressão da IKK β , no fígado e no tecido adiposo, pode levar à resistência sistêmica à insulina, mas não faz o mesmo no músculo esquelético. A seletiva inibição da função NF- κ B no fígado e no tecido adiposo protege da RI em modelos animais geneticamente obesos ou obesos por hipernutrição (CAI *et al.*, 2005).

Nos adipócitos e macrófagos, lipídeos e citocinas, atuando como mediadores extracelulares por intermédio de receptores transmembrana ou de moléculas captadoras de nutrientes denominadas de *chaperones*, podem ativar a sinalização inflamatória, ocasionado pelo aumento direto da proteína kinase R (PKR) e das enzimas IKK e JNK (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011). Essas kinases se elevam também por estresse intracelular do retículo endoplasmático (RE) ou por excesso de

¹¹ Fenômeno ocasionado pelo acúmulo ectópico de gorduras levando a apoptose celular.

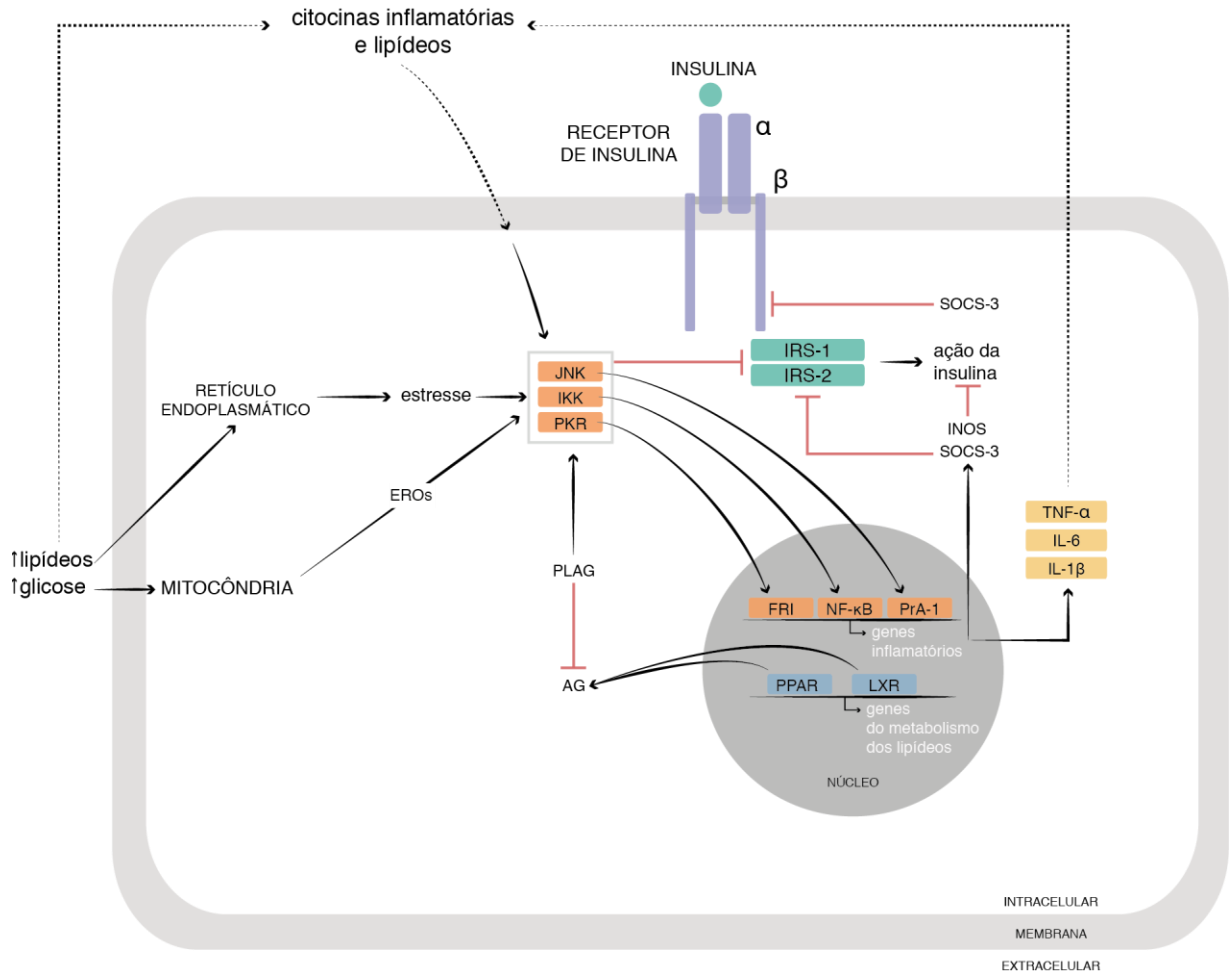
¹² Composto de duas unidades catalíticas IKK α e IKK β e uma subunidade regulatória IKK γ (inibidora da kinase do fator nuclear kappaB, - NF- κ B). No citoplasma de células não estimuladas, o fator de transcrição gênica NF- κ B se apresenta em forma de dímero e inativo pela associação com proteínas denominadas inibidores kB.

produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas mitocôndrias estimuladas por hiperglicemia e hiperlipemia. A PKR pode, por si, orquestrar a atividade da JNK e regular negativamente a sinalização da insulina nas células metabólicas, todos os sinais recebidos via dieta hiperlipídica. Outra proteína, a proteína ligante de ácido graxo (PLAG), sinalizada por lipídios intracelulares, também é capaz de estimular a produção de IKK e JNK. As enzimas JNK, IKK e PKR, formam um complexo que pode ser, de fato, o mecanismo de reconhecimento de sinais metabólicos que desencadeiam a inflamação. Uma disposição aumentada dessa tríade de enzimas fomenta o bloqueio direto da sinalização dos IRS-1 e -2, e, por regulação transcricional, produz mais mediadores inflamatórios. No núcleo de células acometidas desse processo inflamatório, ocorre bloqueio da transcrição da família de receptores *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR), conhecidos como principais reguladores da adipogênese (CAWTHORN; SETHI, 2008).

Há também aumento estimulado de outros fatores de transcrição tais como do fator nuclear de transcrição kappa B (NF- κ B), indiretamente pela IKK; da proteína adaptadora 1 (PrA-1) pela JNK e do fator regulador do interferon (FRI) pela PKR, os quais, aumentados, incentivam a produção de genes inflamatórios. Por outro lado, alguns lipídeos intracelulares podem atuar como anti-inflamatórios disparando os ativadores de PPAR, em especial o *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ) e de *ligand of liver X receptor* (LXR), receptores formados por oxiesterois¹³ e ácidos graxos, respectivamente, e ocasionando a supressão do NF- κ B (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005; GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011) (Figura 3).

¹³ Oxiesterois são moléculas com 27 carbonos resultantes da oxidação do colesterol que têm mostrado muitas e potentes atividades biológicas *in vitro*, e muitas delas têm sido implicadas na iniciação e/ou desenvolvimento da arteriosclerose (BROWN; JESSUP, 1999).

Figura 3 - Esquema simplificado da interação metabolismo e inflamação



Adaptada de Wellen; Hotamisligil (2005).

Estudos mostraram que, além dos processos acima, há outros que conduzem a resistência à insulina, por via de inflamação incorrida por citocinas, como aquele em que se envolve a família de moléculas *suppressors of cytokine signaling* (SOCS) e outro mediado pela enzima óxido nítrico sintetase-induzida (iNOS). São descritos sete membros da família SOCS, e pelo menos três deles os SOCS-1,-3,e -6, tem sido, implicados na inibição da sinalização da insulina, pela interferência da fosforilação em tirosina dos IRS-1 e IRS-2. A elevada produção de ON parece também contribuir no bloqueio da ação da insulina no músculo e na função da célula beta pancreática. A deleção iNOS previne o bloqueio da sinalização da insulina no músculo causada por dieta rica em gorduras (FURTADO *et al.*, 2001; MOONEY *et al.*, 2001; LIANGYOU *et al.*, 2002; UEKI; KONDO; KAHN, 2004; WELLEN, HOTAMISLIGIL, 2005).

Em acréscimo, a ativação da imunidade inata¹⁴ por alguns tipos de ácidos graxos promove reações imunológicas e inflamação de baixo grau em tecidos metabólicos (PICKUP, 2004; DE SOUZA *et al.*, 2005; TSUKUMO *et al.*, 2007). Proteínas de membrana celular da família dos receptores *toll-like receptors* (TLRs)¹⁵ são o ponto de partida da ativação das respostas imune e inflamatória (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000)

Atualmente são conhecidos treze TLRs em mamíferos, sendo o subtipo 4 (TLR-4) passível de ativação tanto por lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana de bactérias *gram*-negativas quanto por agonistas não bacterianos tais como alguns ácidos graxos saturados. Ativado, o TLR-4 relaciona-se com a resistência à insulina por indução de vias inflamatórias como a JNK, a IKK e o NF- κ B. (TSUKUMO *et al.*, 2007).

Desde o final do século passado, após a descoberta, em estudo com camundongos obesos, de que o tecido adiposo era também capaz de produzir o TNF- α , uma citocina inflamatória que prejudica a via de sinalização da insulina, pesquisas subsequentes têm demonstrado que uma série de citocinas inflamatórias como a interleucina 6 (IL-6), a interleucina 1 β (IL-1 β), a proteína 1 quimiotática de monócitos (MPC-1), dentre outras, também estão presentes no tecido adiposo obeso. Apesar de, na obesidade, ocorrer em maior abundância no tecido adiposo, a expressão de citocinas acontece também no pâncreas, no hipotálamo, no fígado e, às vezes, no músculo esquelético. São as principais estimuladoras da síntese hepática de proteínas de fase aguda (PFA), como a proteína C reativa (PCR), e promovem aumento da gliconeogênese, elevação de lipídeos sanguíneos, produção de hormônios catabólicos e diminuição da sensibilidade à insulina, representando, assim, fatores predisponentes ao desenvolvimento de obesidade, RI e DM2 (DE SOUZA *et al.*, 2005; DINARELLO; DONATH; MANDRUP-POULSEN, 2010; GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011).

Pelo exposto, metabolismo e imunidade estão profundamente ligados e interdependentes. Citocinas, proteínas de sinalização, fatores de transcrição e

¹⁴ Apresenta resposta rápida e é responsável pela primeira linha de defesa contra patógenos, diferentemente do sistema imune adaptativo. (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000)

¹⁵ Inicialmente detectados em *Drosophila*s que possuem estrutura rudimentar e apresentam uma massa branca chamado de corpo gorduroso responsável pela regulação de quase todas as funções orgânicas da mosca, inclusive dos sistemas metabólico e imune (MEDZHITOV, 2001).

lipídeos bioativos e hormônios podem desempenhar funções, tanto metabólicas como imunológicas, na manutenção da homeostase energética. Compartilhando alguns dos mecanismos celulares e vias de sinalização, esses sistemas também são capazes de regular um ao outro. (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2003).

1.3 Tecido adiposo disfuncional - o elo entre obesidade, resistência à insulina e *diabetes mellitus* tipo 2

Dado que 70 a 80% de todos os DM2 são obesos, torna-se crucial compreender melhor como a obesidade, especialmente a localizada na região intra-abdominal, pode levar a resistência à insulina nos tecidos alvos (HOTAMISLIGIL, 1999).

A obesidade é considerada atualmente uma doença crônica de causa multifatorial. A perda do equilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto energético é um dos mecanismos relacionados com o excessivo ganho de peso da população em todo o mundo. Fatores genéticos, ambientais, psicológicos e comportamentais interferem nesse balanço energético (SPIEGELMAN; FLIER, 2001). O aumento da prevalência e da incidência da obesidade, que a elevou a níveis de epidemia mundial, coincidem com o aumento do consumo de dieta hipercalórica, principalmente rica em lipídeos e com o crescente sedentarismo da vida moderna (KOPELMAN, 2000).

Em obesos ocorre hiperplasia/hipertrofia do tecido adiposo. Dois tipos de tecido adiposo (TA) são encontrados em mamíferos, o tecido adiposo branco (TAB) e marrom (TAM). O TAM está presente principalmente em fetos e neonatos, diminui com a idade e é importante na termogênese. O TAB é o mais farto. Além de abundante quantidade de adipócitos, compõe-se de pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos, leucócitos e macrófagos. Ainda que se constitua como sítio de armazenamento de energia, também é capaz de produzir várias substâncias conhecidas como adipocinas (TILG; MOSCHEN, 2006; FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2007). Conjunto de peptídeos e proteínas bioativos secretados pelo tecido adiposo, as adipocinas tem função endócrina e atuação moduladora do sistema imunológico. As adipocinas leptina (LEP), adiponectina (AdipoQ) e resistina (RES), dentre outras, desempenham função endócrina e o TNF- α , a interleucina - 6 (IL-6) e a interleucina-1 β (IL-1 β), a proteína 1 quimiotóxica de macrófago (MCP-1) e inibidor do fator

ativador de plasminogênio (PAI-1) são moduladores da respostas imune e inflamatória (HOTAMISLIGIL, 2000).

A resposta imune pode ser desencadeada por lipídeos, por alguns hormônios e pela produção de citocinas pró-inflamatórias, expressas em quantidade diretamente proporcional à massa de tecido adiposo (KERSHAW; FLIER, 2004). É esse aumento da massa de tecido adiposo que o torna disfuncional e está associado às alterações na produção de AdipoQ, de LEP e de RES, e com o aumento da expressão do TNF- α , da IL-6, da IL-1 β , da MCP-1 e do PAI-1 (ARNER, 2003; WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005; TILG; MOSCHEN, 2006; TSUKUMO *et al.*, 2007).

A inflamação e a infiltração progressiva de macrófagos no tecido adiposo, a partir do desenvolvimento da obesidade e de consequentes mudanças físicas dos adipócitos, são características do tecido adiposo obeso. A inflamação nos obesos caracteriza-se, não só por produção elevada daquelas citocinas, TNF- α , IL-6, IL-1 β e MPC-1 (SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006), assim como por aumento da síntese de reagentes de fase aguda, PCR, e a ativação das vias de sinalização pró-inflamatórias, JNK, IKK e PKR (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993; WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005). Assim, a inflamação crônica sistêmica tem sido vista como um importante papel na patogênese da obesidade associada com a RI e com o DM2.

Recentemente foi proposto o conceito de “meta-inflamação” para o processo inflamatório crônico e subclínico associado à obesidade, visando melhor esclarecimento e diferenciação entre esse estado e aqueles dos paradigmas clássicos de inflamação.¹⁶ A inflamação, induzida pela obesidade por resposta dessa natureza ao metabolismo celular de determinados nutrientes, é de baixo a moderado grau; tem expressão de mediadores inflamatórios locais disparada por sensores de estresse como a IKK e a JNK; promove alteração das células imunes favorecendo o

¹⁶ “Perde-se no tempo o interesse que a inflamação tem despertado no espírito dos mais curiosos. Desde a Mesopotâmia, passando pelo Egito antigo, por Celsus que viveu em torno dos anos 30 de nossa era, quando escreveu os quatro sinais clínicos característicos: rubor, tumefação, calor e dor, por Virchow (1859) que introduziu ‘a perda da função’, até nossos dias, quando Seyle a resumiu como sendo respostas a estímulos diversos, imediatas, não específicas, as quais denominou de ‘estresse localizado’ e mediatas, portanto, tardias e específicas. Muitos dos processos envolvidos na reação inflamatória são considerados efeitos de agentes químicos, liberados ‘in situ’, chamados mediadores externos, normalmente de origem bacteriana e, endógenos, originários tanto do plasma, quanto do tecido inflamado. Dentre estes últimos, destacam-se os sistemas de cininas, de complementos de coagulação, as aminas vasoativas, os derivados prostanoídes e eicosanóides e, principalmente, aqueles efetores da inflamação, de origem lisossômica” (RODRIGUES, 1986).

desenvolvimento de um tecido pró-inflamatório; é crônica e sem aparente resolução; e tem reduzida taxa metabólica (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011).

No tecido adiposo obeso, ocorre inicialmente a secreção de baixos níveis de TNF- α que assim mesmo consegue estimular os pré-adipócitos a produzirem MCP-1, também secretado pelas células endoteliais. A liberação da MCP-1 atrai mais macrófagos para o tecido adiposo. A secreção aumentada de LEP e/ou a diminuição de AdipoQ também podem contribuir para o excessivo acúmulo de macrófagos no tecido adiposo. É aceito ainda que os danos físicos ao endotélio, causados pelas mudanças de tamanho e apinhamento dos adipócitos, resultem em dano oxidativo e morte desses adipócitos e conseqüentemente maior atração de macrófagos para o tecido adiposo, resultando em um cenário cada vez mais lipolítico e menos sensível à insulina. Então, qualquer que seja o estímulo inicial a sua chegada ao tecido adiposo, os macrófagos, juntamente com os adipócitos e outros tipos de células, são arrolados num “ciclo vicioso” de recrutamento de mais macrófagos, produção de citocinas inflamatórias e comprometimento da função dos adipócitos (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2003; TILG; MOSCHEN, 2006; WEST, 2009).

1.4 Adipocinas

O termo adipocinas, como já foi dito, é dado ao conjunto de peptídeos e proteínas bioativos secretados pelo tecido adiposo branco. As adipocinas desempenham papel central na homeostase corporal pelo controle de vários processos biológicos e físicos como a ingestão alimentar, regulação do balanço energético, ação da insulina, metabolismo da glicose dos lipídeos, angiogênese e remodelação vascular e, regulação da pressão sanguínea e da coagulação (GUERRE-MILLO, 2004).

Estudos ao longo do tempo mostraram a existência de uma diversidade de adipocinas e, embora haja uma grande quantidade de informações acerca delas, aqui se faz uma descrição sumarizada de seus aspectos mais importantes e/ou de interesse para este estudo.

1.4.1 Fator de necrose tumoral- α

O TNF- α é uma citocina pluripotente produzida primariamente por células do sistema imune, mas expressão dessa proteína foi demonstrada também no tecido adiposo obeso de modelos animais e de humanos (HOTAMISLIGIL; SHARGILL;

SPIEGELMAN, 1993; HOTAMISLIGIL *et al.*, 1995). Após a sua liberação, age pela ligação a dois receptores localizados na membrana celular – TNFR1 e TNFR2. Ambos apresentam um domínio extracelular e intracelular. No entanto, a afinidade ao receptor TNFR1 é muito maior e permite, quando conectado, que o TNF- α , mesmo em pequenas concentrações, exerça ação autócrina e parácrina em células adjacentes. Quando em níveis elevados, o TNF- α age em tecidos distantes da região produtora (UYSAL; WIESBROCK; HOTAMISLIGIL, 1998; HOTAMISLIGIL, 1999).

A ligação do TNF- α ao TNFR1, no adipócito, sinaliza uma série de eventos intracelulares, com ativação de várias proteínas que possuem efeitos diretos ou indiretos, via IKK β , JNK, PKC, entre outras, na transcrição de fatores nucleares, que por sua vez induzem a expressão de importantes genes responsáveis pela ocorrência de efeitos como, morte celular, respostas imunológicas e inflamatórias, lipólise, disfunção mitocondrial e alteração da produção de adipocinas. Todos estes eventos, em grau acentuado pela obesidade, acabam por determinar intensa desordem na sinalização da insulina (UYSAL; WIESBROCK; HOTAMISLIGIL, 1998; HOTAMISLIGIL, 1999, RABE *et al.*, 2008; CAWTHORN; SEITHI, 2008).

Vários estudos em modelos animais obesos demonstraram que o TNF- α suprime, nos adipócitos, a expressão de diversas proteínas tais como o receptor de insulina; IRS-1; GLUT-4; complexo citidina-citidina-adenosina-adenosina-timidina/*enhancer binding protein* (CCAAT/C/EBP); PPAR γ ; AdipoQ; MAP4K4; genes EROs; SOCS-3, PAI-1 dentre outras (RUAN; LODISH, 2003; CAWTHORN; SEITHI, 2008). É também capaz de inibir a autofosforilação do receptor de insulina, de favorecer a fosforilação em resíduos de serina do IRS-1 além de reduzir as enzimas glicogênio sintetase, ácido graxo sintetase e lipase lipoproteica (LPL) (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993; HOTAMISLIGIL, 1999; CAWTHORN; SEITHI, 2008).

1.4.2 Interleucina-6

A IL-6, citocina produzida por adipócitos e também por outras células como fibroblastos, macrófagos e células endoteliais, se apresenta em níveis séricos extremamente elevados na obesidade. Ligando-se ao receptor tipo I das citocinas, em similaridade com o TNF- α , pode diminuir a sensibilidade à insulina por estimular as enzimas IKK β , JNK e pela ativação da via Janus kinase/*Signal Transducers and*

Activators of Transcription (JAK/STAT) a qual pode ativar tirosina fosfatase ou envolver o SOCS-3 com o receptor de insulina. Destaque-se que a IL-6 mostra diferentes funções tecido-específica, e dependendo do contexto fisiológico, pode até apresentar melhora do metabolismo da glicose-dependente da insulina, experimentalmente observada em miotubos, colocando-se IL-6 intraventricular. Especula-se que os efeitos da IL-6 se diferenciem pelas elevações sistêmicas, sejam elas agudas ou crônicas. A elevação transitória ou aguda pode contribuir para a normalização da homeostase da glicose, já as elevações persistentes estão associadas com a inflamação crônica presentes na RI, na obesidade e no DM2. Há uma forte relação entre a IL-6 contida no tecido adiposo e os níveis circulantes de IL-6 e PCR (SENN *et al.*, 2002; BASTARD; *et al.*, 2006; RABE *et al.*, 2008).

1.4.3 Interleucina-1 β

A IL-1 β é uma citocina pertencente à família IL-1 de ligantes e receptores altamente associados à inflamação e doenças autoimunes e são secretadas principalmente por macrófagos. Estudos em células humanas e em animais demonstraram a relação dessa citocina com o desenvolvimento de DM2. Ácidos graxos livres, glicose e adipocinas como a LEP, o TNF- α e a IL-6 podem provocar elevação dos níveis da IL-1 β nas ilhotas pancreáticas humanas. Em contrapartida, e como resposta imunológica, a IL-1 β estimula a síntese de citocinas nas células epiteliais, endoteliais e do sistema imune. Seu efeito mais marcante é a toxicidade que provoca nas ilhotas pancreáticas ocasionando maior aporte de macrófagos no local e conseqüente produção adicional da IL-1 β . Inflamação discreta nas ilhotas (insulinite) pode ainda ser causada pela ativação do sistema imune inato (DINARELLO; DONATH; MANDRUP-POULSEN, 2010).

1.4.4 Fator atrativo de monócitos-1

A MCP-1, expressa e secretada predominantemente por macrófagos e células endoteliais age, de acordo com estudos experimentais, no recrutamento de células do sistema imune, como monócitos e macrófagos, promovendo a infiltração dessas células no tecido adiposo obeso, causando inflamação e mais infiltração de macrófagos. Como já citado, os macrófagos também são secretores de citocinas como TNF- α , IL-6, IL-1 β e PAI-1 que irão perpetuar a resposta inflamatória nos tecidos e contribuir para a RI (KANDA *et al.*, 2006).

1.4.5 Inibidor da ativação do plasminogênio-1

O PAI-1, cuja ação fisiológica primária é inibir a fibrinólise, tem se mostrado elevado em vários subgrupos, se revelando como importante característica do DM2 e da síndrome metabólica, segundo amplos estudos epidemiológicos. Sintetizado parcialmente pelo adipócito, sua atividade é diretamente proporcional à obesidade central e está relacionada à alta mortalidade do DM2 por eventos arterioscleróticos. Às vezes, antes mesmo do DM2 ser detectado, havendo níveis elevados de PAI-1, já ocorre disfunção no sistema fibrinolítico e endotelial, causando risco de doenças relacionadas com o aumento da coagulação sanguínea. Polimorfismo do gene PAI-1, desencadeado por vários fatores, implica em incremento da atividade dessa citocina, que em altos níveis séricos pode indicar o desenvolvimento do DM2 independente de haver resistência à insulina (LYON; LAW; HSUEH, 2003; AL-HAMODI *et al.*, 2011).

1.4.6 Adiponectina

A AdipoQ é a proteína mais secretada pelo tecido adiposo, mas também pode ser expressa em células do músculo esquelético, em miócitos cardíacos e em células endoteliais. Vários estudos em modelos animais e em humanos mostram que existe uma correlação inversa entre os níveis circulantes dessa proteína e o risco de obesidade, resistência à insulina e doenças cardiovasculares. No DM2 e na obesidade, foram demonstrados níveis séricos de AdipoQ significativamente diminuídos.

Atualmente são conhecidos dois receptores transmembrana da adiponectina, os AdipoR-1 e AdipoR-2 (YAMAGUCHI N *et al.*, 2005). Os dois receptores se expressam em adipócitos maduros e estão presentes em vários tecidos de camundongos, sendo que a expressão do primeiro é principalmente no músculo esquelético, e a do segundo, no fígado. A ação da AdipoQ depende da sua concentração sanguínea, do seu peso molecular e da especificidade tecidual.

A melhora da sensibilidade à insulina, atribuída a esse hormônio, deve-se provavelmente a: (1) controle da inflamação e da imunidade pela modulação do NF- κ B, pela redução da produção de TNF- α e pela supressão da ativação do TLR por ligantes como TNF- α , IL-6, NF- κ B e lipopolissacarídeos (LPS), e pela redução da expressão do interferon gama (IFN γ); (2) bloqueio da fosforilação dos resíduos de

serina do IRS-1 e aumento da captação da glicose pelo GLUT-4; (3) controle da gliconeogênese pela redução da expressão das enzimas PEPCK e glicose-6-fosfatase (G-6-Pase); (4); aumento da β oxidação dos ácidos graxos. (5) melhora da sensibilidade à insulina mediada pelo PPAR γ . A ação da adiponectina sobre o endotélio, diminuindo a adesão molecular, e sua relação inversa com PCR indicam que se trata de um hormônio antagonista do desenvolvimento de arteriosclerose e inflamação vascular (TILG; MOSCHEN, 2006).

1.4.7 Leptina

A LEP é um polipeptídeo com características funcionais e estruturais de hormônio e de citocina. Além do tecido adiposo, outros tecidos podem produzir a LEP como a placenta, a medula óssea, o estômago, o músculo esquelético e possivelmente o cérebro. Em estudos com modelos experimentais e com humanos obesos, observou-se que a elevação da LEP era diretamente proporcional à quantidade de tecido adiposo branco. A relação da leptina com a massa corporal foi primeiramente observada em camundongos obesos que tiveram mutação natural do gene *ob*. Desde então, vários estudos utilizando animais homocigóticos (*ob/ob*) tem avançado no entendimento da LEP e de seus receptores (GUERRE-MILLO, 2004).

Este peptídeo é responsável pela regulação da ingestão alimentar, do peso corporal, do gasto energético, da função neuroendócrina (VELLOSO; 2006). Níveis elevados de insulina e de citocinas inflamatórias aumentam também a transcrição da leptina. Pertencente à família dos receptores de citocinas, o receptor da leptina (ObR) é encontrado em várias isoformas, arranjadas em três classes: secretada, curta e longa. A isoforma longa (ObRb) apresenta domínios extracelular, transmembrana e citoplasmático, se expressa predominantemente no núcleo arqueado do hipotálamo, e parece ser a mais importante na sinalização da LEP. A ligação LEP-ObRb, no hipotálamo, promove a ativação das vias JAK2/STAT3, as quais controlam a transcrição de genes como os da MAPK e da cinase ativada por sinal extracelular (ERK); e da via JAK/IRS-1,-2/PI3-k, a qual regula a liberação de neurotransmissores da fome e da termogênese; bem como estimula a produção do SOCS-3 (FRÜHBECK, 2006; KNOBELSPIES *et al.*; 2010; DONATO JR; FRAZÃO; ELIAS; 2010).

Estudos com modelos animais, e também com humanos, mostram relação da LEP com a obesidade e com a resistência à insulina. A administração exógena de

leptina recombinante a camundongos obesos deficientes desse hormônio promoveu redução de ingesta alimentar, diminuição do tecido adiposo branco e perda de peso. Estas manifestações não ocorreram em camundongo *ob/ob* (GUERRE-MILLO, 2004). Noutro estudo, com modelos animais transgênicos que não expressavam a SOCS-3, observou-se que, apesar da dieta hipercalórica e hiperlipídica, não houve desenvolvimento de obesidade. Então, a leptina pode estimular de forma moderada ou elevada, dependendo dos seus níveis circulantes, a expressão da SOCS-3 pela via JAK/STAT, que irá regular negativamente a intensidade de sinal desse hormônio (FRÜHBECK, 2006).

1.4.8 Resistina

A RES, secretada por adipócitos e monócitos, é uma citocina pertencente à família de proteínas secretórias ricas em resíduos de cisteínas chamadas de *resistin like molecules* (RELM). É vigorosamente expressa durante a diferenciação dos adipócitos, mas seus receptores ainda não são conhecidos (RABE *et al.*, 2008). Estudos experimentais em roedores demonstraram que esta citocina tem sua expressão e secreção aumentada pela ingestão alimentar rica em gorduras, indicando que a resistina, na obesidade, estaria intimamente envolvida na resistência à insulina (SHOJIMA *et al.*, 2002).

Avaliando os efeitos da resistina em células musculares esqueléticas isoladas, verificou-se redução da oxidação de ácidos graxos associada a acúmulo de gordura intracelular e resistência à insulina. Outro mecanismo da resistina que implica em RI se daria pela atenuação de efeitos da insulina (a fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1; a ativação da PI3-k e da Akt; e produção de $PI3,4,5T_3$) e ainda pelo aumento da expressão do SOCS-3, reconhecido inibidor da sinalização da insulina (STEPPAN *et al.*, 2005). Foi confirmado em outro estudo que em células do músculo esquelético de ratos, a exposição da RES promove diminuição da fosforilação em tirosina do IRS-1 e da Akt-1, mas ao contrário do estudo de Steppan *et al.* (2005), não houve alteração no receptor de insulina e sua fosforilação. Ocorreu ainda a diminuição da síntese de glicogênio, da translocação do GLUT-4 e da captação de glicose em resposta à insulina (PALANÍVEL *et al.*, 2006).

Como algumas citocinas, a resistina parece possuir atividade pró-inflamatória assim como pode ser estimulada por outros fatores inflamatórios tais como IL-1 β , IL-

6, TNF- α , LPS e homocisteína. Esta última pode promover RI por ativação, nos adipócitos, da via EROs-PKC-NF- κ B a qual leva ao aumento da expressão e da secreção de RES, conforme demonstrado em recente estudo (LI *et al.*, 2008). Embora a indução da RI e do DM2 pela RES esteja bem demonstrada em modelos experimentais, esse papel, em humanos, ainda não está bem esclarecido. Ações e efeitos de adipocinas de interesse para este estudo estão sintetizados no Quadro 1.

Quadro 1- Adipocinas* e mecanismos chaves relacionados com o desenvolvimento do DM2

Adipocinas	Ações/Efeitos
Adiponectina	↑sensibilidade à insulina/ controle da gliconeogênese ↓ NF- κ B, TNF, IL-6 Auxilia a oxidação dos AG Atenua a progressão da arteriosclerose
Leptina	↑ Produção de citocinas ↑ quimiotaxia e fagocitose de macrófagos Controle ingestão alimentar/termogênese hipotálamo Resistência à insulina
Resistina	Resistência à insulina (camundongos) DM2 (camundongos)
IL-6	Resistência à insulina ↑ Lipólise ↑ PCR Obesidade
MCP-1	Resistência à insulina/↓ Captação de glicose Atrai monócitos e macrófagos/ promove infiltração de macrófagos Aterogênica Infiltração de macrófagos
PAI-1	Inibe a ativação do plasminogênio/Bloqueia a fibrinólise ↑ Risco cardiovascular Inversamente proporcional a adiponectina Fator preditor de DM2 mesmo na ausência de RI
TNF- α	Resistência à insulina ↓ Captação de glicose ↑ Produção de citocinas ↓ LPL Aterogênica
IL-1 β	↑ Citocinas insulinite

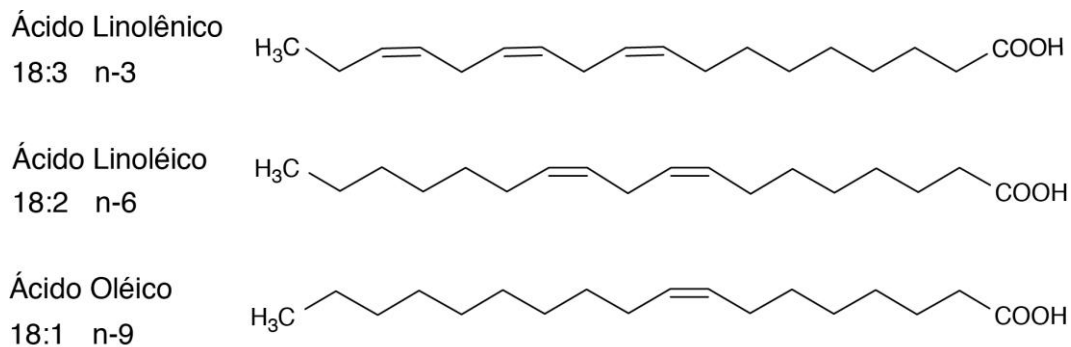
*De interesse para este estudo.

1.5 Ácidos Graxos

Compostos de ácidos carboxílicos em cadeia de hidrocarbonetos sendo um grupo metil numa extremidade e um grupo carboxil noutra, os ácidos graxos (AG), são componentes lipídicos. Derivada do grego *lipos*, a palavra lipídeo significa

gordura. Eles podem estar saturados ou insaturados. Os saturados como o próprio nome diz apresenta saturação molecular sendo destituídos de duplas ligações. Já os insaturados, que podem ser poli-insaturados (PUFAs) como os n-3 e n-6 também denominados ω 3 e ω 6, respectivamente, e monoinsaturados (MUFAs) como o n-9 (ω 9), apresentam duplas ligações, e recebem nome de acordo com a posição da primeira dupla ligação a partir do terminal metil da cadeia carbônica tais como ω 3, ω 6 e ω 9 (GRAZIOLA; SOLIS; CURI, 2002) (Figura 4). Os principais componentes da família dos PUFAs ω 3 são os ácidos α -linolênico (ALA, 18:3 n3), eicosapentanóico (EPA, 20:5 n3), e o docosahexaenóico (DHA, 22:6 n3), mais encontrados em plantas, principalmente os fitoplanctons e as algas; em animais marinhos, como peixes de águas frias e profundas (cavala, sardinha, salmão e truta) e em óleos vegetais como os de linhaça e de canola. Os PUFAs ω 6 são o ácido α linoléico (AL, 18:2n-6) e o ácido araquidônico (AA, 20:4n-6), encontrados em abundância nas sementes de plantas oleaginosas como soja, milho, girassol. O ácido oleico (18:1n-9), um MUFA ω 9, é encontrado em maiores proporções no azeite de oliva e em nozes (ANDRADE; DO CARMO, 2006).

Figura 4 – Estrutura química dos ácidos graxos ω 3, ω 6 e ω 9



Os AG podem ser adquiridos pela dieta, mas também podem ser produzidos pelo próprio organismo, pela lipogênese, processo pelo qual há liberação via endógena dessas substâncias. Esse processo ocorre pela mobilização de estoques de lipídeos principalmente no fígado, rim e glândulas mamárias, mas também nas células adiposas, pulmonares e cerebrais. A síntese “de novo” de AG acontece no citoplasma celular envolvendo a enzima secretada pela mitocôndria a acetil-CoA,

cuja atividade é controlada pelos hormônios insulina, glucagon e epinefrina, numa série de reações enzimáticas para formar ácidos graxos. Entretanto, alguns AG não são sintetizados pelo organismo e por serem imprescindíveis são denominados de “essenciais”. Estes tipos de AG precisam ser adquiridos via exógena (VERLENIA; DE LIMA, 2002). É importante salientar que uma família de AG pertence a uma classe, sendo que os membros de cada família podem ser sintetizados biologicamente a partir dos oferecidos na dieta. No entanto, o AG de uma determinada classe não pode ser, na natureza, biologicamente convertido em outra classe, ou seja, nenhum membro da família $\omega 9$ pode ser convertido em $\omega 6$ (GRAZIOLA; SOLIS; CURI, 2002).

Não podendo ser sintetizados pelos mamíferos, os AG ALA e AL são considerados “estritamente essenciais” e devem ser fornecidos pela dieta. Os AG são importantes componentes de membranas celulares de plantas e de animais e são liberadas pela enzima fosfolipase A_2 para as reações a seguir descritas (CALDER, 2006; MARTIN *et al.*, 2006). Por reações de dessaturação e alongação, o ALA precede o EPA e o DHA, e o ácido araquidônico procede do AL. O ALA e o AL possuem efeitos opostos, tendo o primeiro, ação anti-inflamatória e o segundo, em altas concentrações, pode induzir resposta inflamatória (CALDER, 2002; TAPIERO *et al.*, 2002; RUXTON, 2004).

Os PUFAs EPA e AA são precursores de eicosanóides: prostaglandinas (PG) e tromboxanos (TX); leucotrienos (LT); e epóxidos, os quais são gerados, respectivamente, pelas vias da enzima ciclooxigenase (COX); da lipooxigenase (LOX); e do citocromo 450. O EPA produz as séries ímpares, PG/TX série 3 e LT série 5, com propriedades anti-inflamatórias, e o AA as séries pares, PG/TX2 e LT4, pró-inflamatórias. Os PUFAs EPA e DHA também podem elevar mediadores lipídicos anti-inflamatórios como as resolvinas RE e RD, respectivamente, e como as protectinas. Esses mediadores podem direta ou indiretamente suprimir a atividade de alguns fatores de transcrição nuclear como o NF- κ B. Os eicosanóides pares agem ao contrário promovendo a ativação desses fatores de transcrição. A ativação desses fatores de transcrição podem elevar as citocinas IL-1 β , TNF- α e a IL-6 que exercem importante papel na promoção da resposta inflamatória (KANG; WEYLANDT, 2008).

Saliente-se que os ácidos graxos ω 3 competem com os ácidos graxos ω 6 (especialmente com o AA), no processo de incorporação à membrana celular e também na produção de eicosanóides, competindo por enzimas (Δ 5 e Δ 6 dessaturases e elongase) envolvidas nesse metabolismo. Os eicosanóides provenientes do AA, mesmo em pequenas quantidades, são mais ativos do que aqueles que provem do EPA e os ω 6, e se ingeridos em excesso, levam a desordens inflamatórias, imunológicas e aterogênicas (CALDER, 2006, 2007). Observa-se, então, que o excesso de ácido graxo de uma série pode inibir a dessaturação de um ácido graxo, em menor quantidade, de outra série. Sabe-se também que quando há inadequação no suprimento dietético do ALA e do AL, pode ocorrer captação de ácidos ω 9 (oleico e/ou palmitoleico) que, dessaturados e alongados, formam ácidos eicosatrienóicos que por sua vez bloqueiam a produção do leucotrieno B₄ (LTB₄) (JAMES; GIBSON; CLELAND, 2000; CALDER *et al.*, 2002; ANDRADE; DO CARMO, 2006) (Figuras 5 e 6).

O MUFA ácido oleico (ω 9), considerado um lipídeo estável, embora com menos estudos em relação ao ω 3, surge atualmente como importante elemento, atuando de forma surpreendente como anti-inflamatório. Ele pode aumentar a transcrição da potente interleucina-10 (IL-10) que é transcrita em conjunto com outras moléculas pró-inflamatórias como as interleucinas IL-6 e IL-1 β e a citocina TNF- α . O ácido oleico pode elevar de tal forma a transcrição da IL-10 que pode promover um mecanismo modulador com supressão das moléculas pró-inflamatórias, mas a razão entre a produção de substância anti e pró-inflamatórias ainda não é claramente elucidada (MORARI *et al.*, 2010). Estudo de larga escala utilizando dieta rica em ω 9, como é a do mediterrâneo, o *The ATTICA Study*, demonstrou diminuição significativa dos níveis da PCR, da IL-6 e do fibrinogênio, e diminuição limítrofe do TNF- α , achados esses que podem explicar seus efeitos benéficos nas populações que ingerem essa dieta (CHRYSOHOOU *et al.*, 2004) (Figura 5 e 6).

Figura 5 - Metabolismo de ácidos graxos ω 3, ω 6 e ω 9

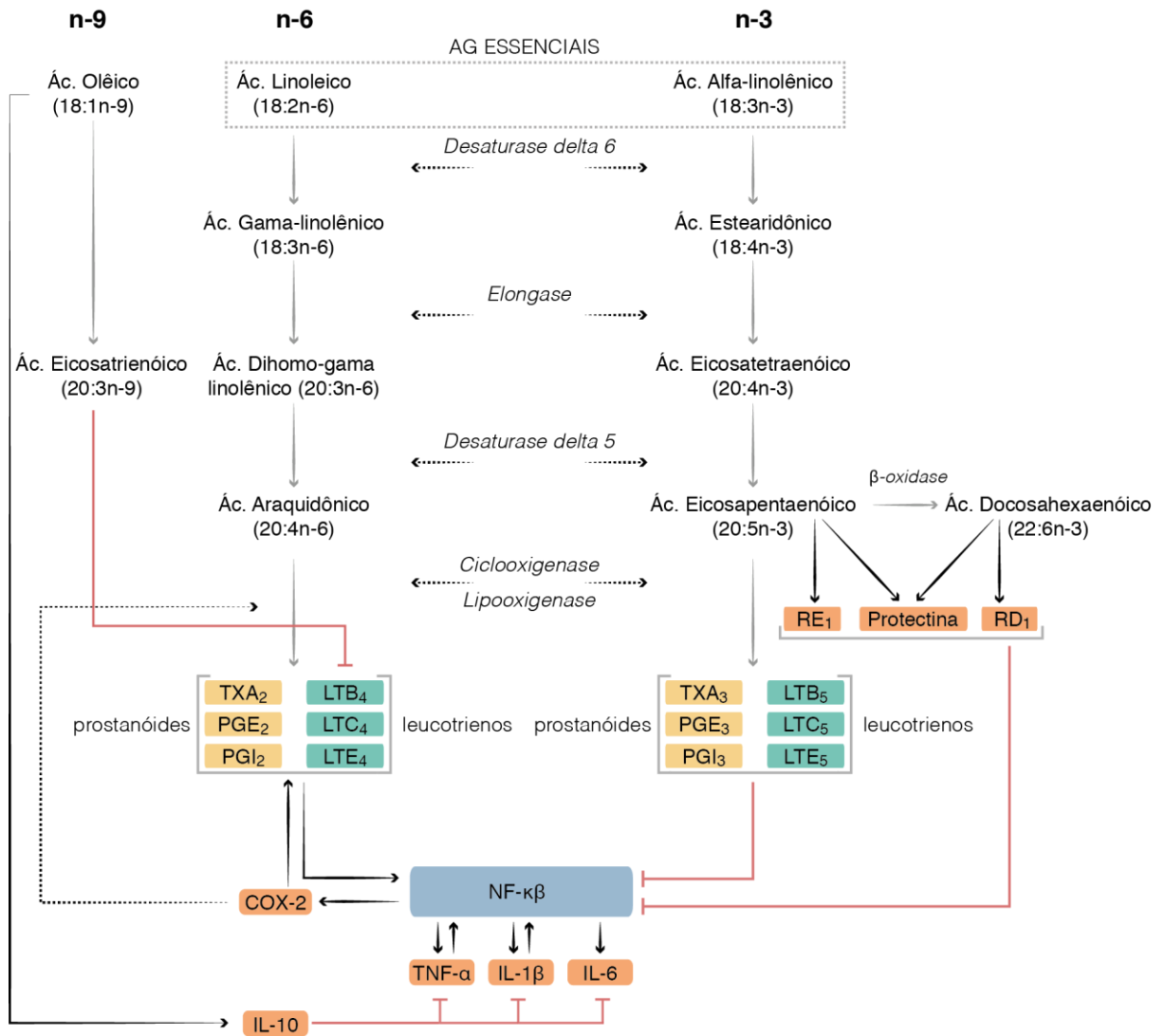
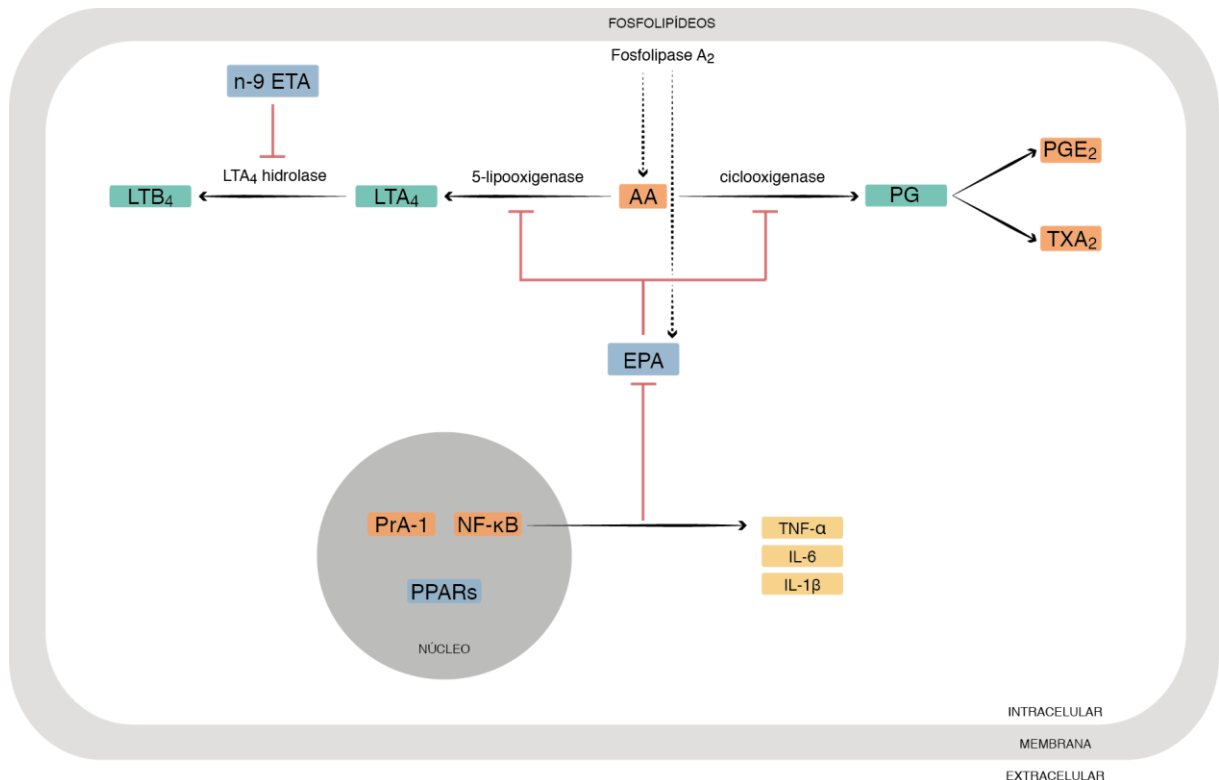


Figura 6 – Ácidos graxos e formação de prostaglandinas e leucotrienos



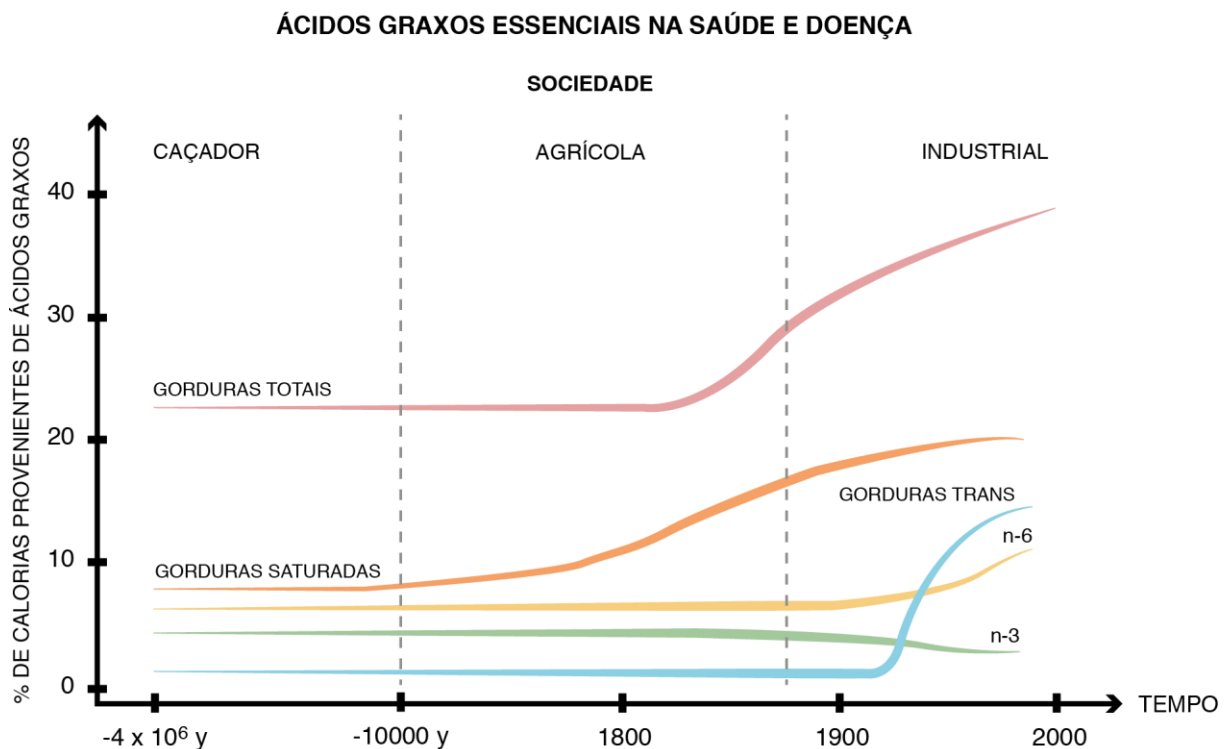
Adaptada de James; Gibson; Cleland, (2000).

Atualmente, com a evolução de técnicas de biologia molecular, sabe-se que influências ambientais como a dieta alimentar podem afetar indivíduos geneticamente suscetíveis a determinadas doenças. Grandes mudanças na nutrição da humanidade têm sido observadas, especialmente no tipo e na quantidade de gorduras e de antioxidantes ingeridos.

Estudos tem detectado baixa incidência de doenças relacionadas com inflamação e com desordens da imunidade em populações como Esquimós da Groelândia, que consomem abundantemente frutos do mar ricos em ω 3; como povos do mediterrâneo, especialmente da área rural, que ingerem alto teor de ω 9, pelo significativo consumo de azeite de oliva e de nozes, além de ω 3 e antioxidantes presentes em outros alimentos de sua dieta. Realçam a importância da ingestão do ácido graxo oleico ω 9 e do equilíbrio na relação dos ácidos graxos ω 6/ ω 3 ingeridos (DE LORGERIL *et al.*, 1994; SIMOPOULOS, 1999; CHRYSOHOOU *et al.*, 2004; SIMOPOULOS, 2008; THE INTERACT CONSORTIUM, 2011).

A agricultura, como negócio, e a industrialização dos alimentos têm importante papel em significativas alterações na dieta alimentar ocorridas na história da humanidade. A agropecuária moderna é estimulada a produzir alimentos com baixo teor de $\omega 3$ como vegetais de folhas verdes, animais confinados e alimentados com $\omega 6$ e até peixes de criadouros, e a indústria tem produzido alimentos processados, afastados de sua condição natural, pobre em fibras, de fácil acesso e atrativo sabor, com alto teor de gordura saturada; de gordura trans e de ácidos graxos $\omega 6$. A cultura ocidental adotou um estilo de vida “mais fácil”, consumindo preferencialmente esses produtos (SIMOPOULOS, 1999, 2008) (Figura 7). Essa histórica mudança alimentar, com desequilíbrio da relação $\omega 6/\omega 3$ ¹⁷, tem sido difundida pelo fenômeno da globalização e tem-se observado no mundo todo um aumento da incidência de doenças crônicas não transmissíveis, cardiovasculares; hipertensão arterial sistêmica; DM2 (SIMOPOULOS, 2002, 2008).

Figura 7- Evolução histórica do consumo de gorduras na dieta humana



Adaptada de Simopoulos (1999)

¹⁷ Dieta no período paleolítico ($\omega 6/\omega 3$: 1,5:1); dieta da era industrial ($\omega 6/\omega 3$: 15-20:1).

Dado o impacto do equilíbrio na relação $\omega 6/\omega 3$ assim como do teor de ômega-9 na dieta alimentar sobre o desempenho de várias ações orgânicas dos lipídeos, faz-se necessário e premente estabelecer proporções adequadas de consumo de cada ácido graxo ($\omega 6$, $\omega 3$ e $\omega 9$) para a prevenção e o controle de doenças relacionadas com imunidade e inflamação, tais como o DM2.

2 OBJETIVO

Verificar efeitos da suplementação oral de três misturas de óleos (MXO) ricos em ômega-3 e ômega-9, contendo ômega-6, com elevada relação $\omega 9:\omega 6$ e baixa relação $\omega 6:\omega 3$, todas com proporção de $\omega 9:\omega 6$ - 3,7:1 e $\omega 6:\omega 3$ - 1,4:1, e diferenciadas pela composição de ácido graxo ômega-3 (ALA; EPA + DHA de peixe; e DHA de algas), sobre as adipocinas séricas em camundongos com DM2 induzido por dieta rica em gordura saturada.

3 MÉTODO

3.1 Aspectos Éticos

A pesquisa foi realizada de acordo com as Normas Internacionais para Pesquisa Biomédica em Animais (**Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciências Médicas, 1990**) e de acordo com a Lei Federal nº 6.638 que estabelece normas para prática didático-científica com animais, de 8 de maio de 1979, e liberada pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará- CEPA/UFC, sob protocolo nº 106/09, em reunião datada de 07 de abril de 2010.

3.2 Delineamento do experimento

Foram utilizados 50 camundongos *Swiss* (CSW) albinos (espécie: *Mus musculus*, ordem *Rodentia*, família *Muridae*, raça *Swiss*) machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, com 25 dias de vida, após desmame, e pesando entre 10,5-14g. Os animais foram separados aleatoriamente em grupos, Grupo A (GA), Grupo B (GB), Grupo C (GC) e Grupo D (GD), com 10 CSW em cada grupo e alojados em gaiolas de polipropileno com tampa de arame galvanizado com zinco, forradas com maravalhas de *pinus* e mantidos no laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Permaneceram alojados em ambiente com ar condicionado, sob umidade relativa do ar em torno de 50% e temperatura média de 24° C e iluminação com turnos de 12h claro/escuro. Receberam água e dieta *ad libitum*.

Indução de obesidade, resistência à insulina e diabetes experimental por dieta hipercalórica/hiperlipídica nos CSW é objeto de vários estudos experimentais. Esta espécie de animal apresentou resistência à insulina e diabetes após oito semanas expostos dieta hiperlipídica. A definição operacional para o diagnóstico de diabetes foi glicemia de jejum de 4 horas matinal maior que 150 mg/dl, em pelo menos duas amostras (PITOMBO *et al.*, 2006).

A pesquisa foi desenvolvida em três fases. Na primeira fase, foi administrada dieta laboratorial purificada de Reeves, Nielsen e Fahey Jr. (1993), a American Institute of Nutrition-Growth (AIN-93G), iniciada após o desmame, para o crescimento saudável até completarem sete semanas de vida (uso da AIN-93 por 4

semanas). Na segunda, com os animais já adultos, foi ofertada, por 11 semanas, a dieta purificada AIN-93 de manutenção (AIN-93M) modificada pela introdução da banha, a qual é rica em gordura saturada (31,4%), para ganho de peso e desenvolvimento de diabetes, passando a se chamar de dieta hiperlipídica adaptada (AIN-93HA) (Tabelas 1, 2 e 3). Na terceira fase, com dieta AIN-93HA, hiperlipídica, mantida *ad libitum* bem como a oferta de água, foi administrada como suplementação oral, por meio de intubação orogástrica, água (controle nulo) ou uma mistura de óleos¹⁸ (MXO) de diferentes fontes de ω 3, dependendo do grupo de inclusão de cada animal, por sete dias seguidos (Tabelas 4, 5, 6 e 7).

Além dos quatro CSW que não se tornaram diabéticos até o final da segunda fase, foram excluídos oito animais que apresentaram lesões de mordedura nas orelhas e na base da cauda e seis outros que morreram no decorrer do experimento. Assim, da amostra inicial de 50 animais, foi constituída uma de 30 animais para os procedimentos de análise.

A quantidade de água ou de MXO, administrada a cada animal, foi de 0,1 ml para cada 10 g de peso $_A$ ¹⁹ e mantida a mesma em todos os sete dias dessa fase de suplementação oral (Quadro 2).

Quanto a composição das misturas de óleo, em cada 0,1 ml de óleo da MXO 1 (controle neutro) havia 6,76 mg de ω 3 – ALA, 54,28 mg de ω 6 e de 24,04 mg de ω 9, na proporção ω 9: ω 6 - 0,4:1; ω 6: ω 3: 8:1. Nas outras três misturas, MXO 2, 3 e 4, em cada 0,1 ml de óleo, havia a mesma quantidade de ω 9 - 60mg e de ω 6 – 16 mg, na proporção ω 9: ω 6 - 3,7:1; ω 6: ω 3 - 1,4:1, mas quantidades diferentes de ω 3: MXO 2 com 11,6 mg de ω 3 – ALA; MXO 3 com 3,53 mg de ω 3 – ALA; 4,84 mg de ω 3 – EPA e 3,23 mg de ω 3 – DHA; e MXO 4 com 9,69 de ω 3 – ALA e 1,91 de ω 3 – DHA. As fontes utilizadas foram óleos de milho, soja, canola, linhaça, oliva, peixe e algas (Tabelas 4, 5, 6 e 7).

¹⁸ Patenteada pela Nutrimed Industrial Ltda, sediada em Fortaleza-Ceará-Brasil. Recentemente similar mistura de óleo foi utilizada no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC) em modelo animal com isquemia e reperfusão cerebral (PINHEIRO, 2011), mas como suplementação dietética a base de óleos com baixa relação ω 6/ ω 3 e elevada relação ω 9/ ω 6 em modelo animal com DM2 não havia sido empregada até o momento.

¹⁹ Volume máximo para administração de solução oral em roedores (PAIVA; MAFFILLI; SANTOS, 2005).

A suplementação oral foi experimentada em cada grupo de animais como se detalha a seguir:

GA - Grupo de estudo experimental com CSW diabéticos. Cada animal, em dieta AIN-93HA, recebeu suplementação oral de 0,1 ml /10 g (média = 0,56 ml) de água, por intubação orogástrica, diariamente, durante uma semana. No dia seguinte, encerrada a suplementação orogástrica, foi submetido a coleta de sangue por punção cardíaca, sob anestesia e analgesia, e morto por choque hipovolêmico.

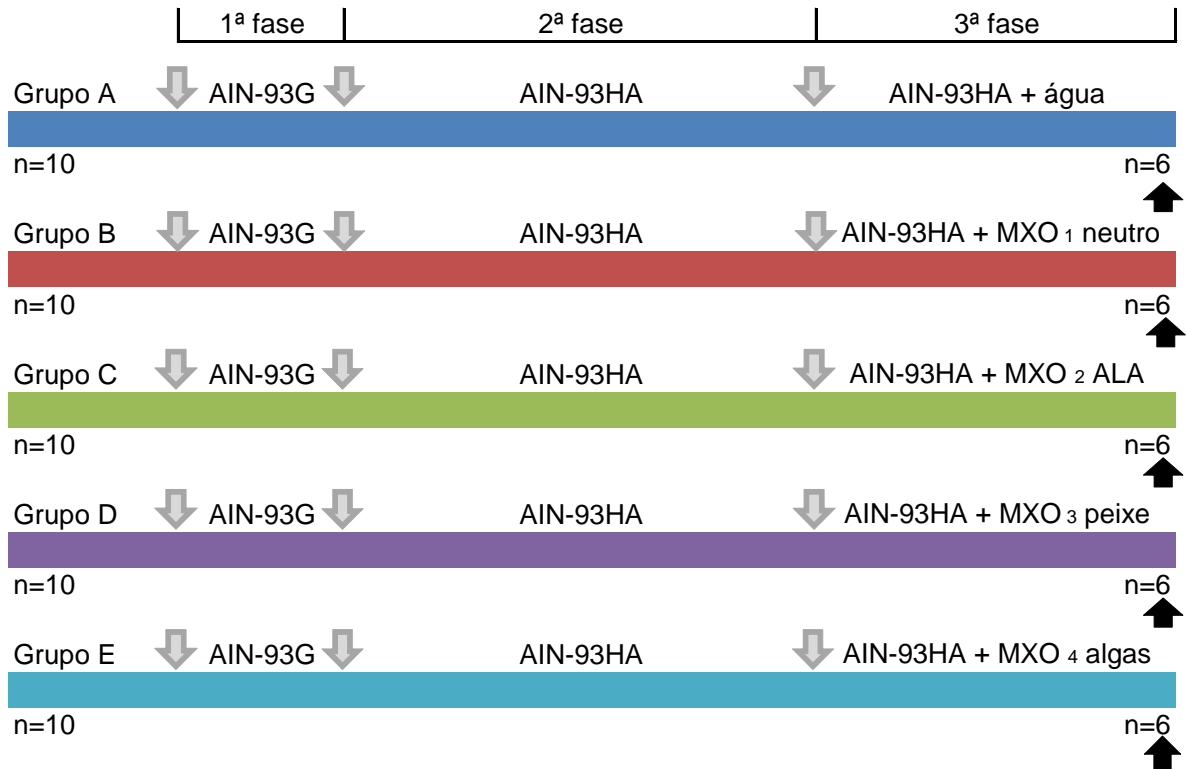
GB - Grupo de estudo experimental com CSW diabéticos. Cada animal, em dieta AIN-93HA, recebeu suplementação oral de 0,1 ml /10 g de MXO 1 [ω 9: ω 6 - 0,4:1; ω 6: ω 3 (fonte: Milho e Soja): 8:1], por intubação orogástrica, diariamente, durante uma semana. No dia seguinte, encerrada a suplementação orogástrica, foi submetido a coleta de sangue por punção cardíaca, sob anestesia e analgesia, e morto por choque hipovolêmico.

GC - Grupo de estudo experimental com CSW diabéticos. Cada animal, em dieta AIN-93HA, recebeu suplementação oral de 0,1 ml /10 g de MXO 2 [ω 9: ω 6 - 3,7:1; ω 6: ω 3 - ALA: 1,4:1 (fonte: canola, linhaça e oliva)], por intubação orogástrica, diariamente, durante uma semana. No dia seguinte, encerrada a suplementação orogástrica, foi submetido a coleta de sangue por punção cardíaca, sob anestesia e analgesia, e morto por choque hipovolêmico.

GD - Grupo de estudo experimental com CSW diabéticos. Cada animal, em dieta AIN-93HA, recebeu suplementação oral de 0,1 ml /10 g de MXO 3 [ω 9: ω 6 - 3,7:1; ω 6: ω 3 - peixe:1,4:1 (fonte: canola, oliva e EPA + DHA de peixe)], por intubação orogástrica, diariamente, durante uma semana. No dia seguinte, encerrada a suplementação orogástrica, foi submetido a coleta de sangue por punção cardíaca, sob anestesia e analgesia, e morto por choque hipovolêmico.

GE - Grupo de estudo experimental com CSW diabéticos. Cada animal, em dieta AIN-93HA, recebeu suplementação oral de 0,1 ml /10 g de MXO 4 [ω 9: ω 6 - 3,7:1; ω 6: ω 3 - algas: 1,4:1 (fonte: canola, linhaça, oliva e DHA de algas)], por intubação orogástrica, diariamente, durante uma semana. No dia seguinte, encerrada a suplementação orogástrica, foi submetido a coleta de sangue por punção cardíaca, sob anestesia e analgesia, e morto por choque hipovolêmico.

Quadro 2- Delineamento do experimento



1ª Fase: 4 semanas; 2ª Fase: 11 semanas; 3º Fase: 1 semana

GA: CSW diabéticos/ AIN-93HA + água (controle nulo); GB: CSW diabéticos/AIN-93HA + MXO 1: [ω9:ω3- 0,4:1; ω6:ω3 - milho e soja- 8:1 (controle neutro)]; GC: CSW diabéticos/AIN-93HA + MXO 2: [ω9:ω3- 3,7:1; ω6:ω3 – com ω3 ALA -1,4:1(fonte: canola, linhaça e oliva)]; GD: CSW diabéticos/AIN-93HA + MXO 3: [ω9:ω3- 3,7:1; ω6:ω3 – com ω3 de peixe - 1,4:1 (fonte: canola, oliva e EPA + DHA de peixe)]; GE: CSW diabéticos/AIN-93HA + MXO 4: [ω9:ω3- 3,7:1; ω6:ω3 – com ω3 de algas - 1,4:1 (fonte: canola, linhaça, oliva e DHA de algas)]. ↓: início das 1ª, 2ª e 3ª fases. ↑: final do experimento.

Tabela 1 - Composição de Nutrientes da dieta AIN-93

Dieta	AIN-93 G*	AIN-93 M*	AIN-93 HA**
Nutrientes	g/kg de dieta	g/kg de dieta	g/kg de dieta
Amido	397,5	465,7	115.5
Caseína	200	140	200
Dextrina	132	155	132
Sacarose	100	100	100
Óleo de soja	70	40	40
Banha	0	0	312
Fibra	50	50	50
Minerais	35	35	35
Vitaminas	10	10	10
Cistina	3	1,8	3
Colina	2.5	2.5	2.5
Kcal/1000g	3766	3798	5358

*Dieta de manutenção com nutrientes balanceados para a vida adulta.

**Dieta modificada com adição de gordura saturada em forma de banha, aumento da caseína e da cistina e diminuição da dextrina em relação à dieta de manutenção recomendada por Reeves, Nielsen e Fahey Jr (1993).

Tabela 2 - Composição do Mix de Vitaminas das dietas AIN-93G, AIN-93M e AIN-93HA

Mix de Vitaminas	AIN-93G, AIN-93M e AIN-93HA (g/Kg)
Ácido nicotínico	3
Pantotenato de cálcio	1,6
Piridoxina-HCl	0,7
Tiamina-HCl	0,6
Riboflavina	0,6
Ácido fólico	0,2
d-Biotina	0,02
Vitamina B12 0,1% (cianocobalamina) em manitol	2,5
Vitamina E (acetato de α -tocoferol) (500UI/g)	15
Vitamina A (retinil palmitato) (500.000 UI/g)	0,8
Vitamina D3 (colecalfiferol) (400.000 UI/g)	0,25
Vitamina K (filoquinose)	0,075
Sacarose	974,655
TOTAL	1000

Tabela 3 - Composição do Mix de Minerais das dietas AIN-93G, AIN-93M e AIN-93HA

Mix de Minerais	AIN-93G, AIN-93M e AIN-93 HA (g/Kg)
Elementos Minerais Essenciais	
Carbonato de Cálcio anidro (40,04% Ca)	357
Fosfato de potássio monobásico (22,76% P; 23,73% K)	196
Citrato de potássio tribásico monohidratado (36,16% K)	70,78
Cloreto de sódio (39,34% Na; 60,66% Cl)	74
Sulfato de potássio (44,87% K; 18,39% S)	46,6
Óxido de magnésio (60,32% Mg)	24
Citrato férrico (16,5% Fe)	6,06
Carbonato de zinco (52,14% Zn)	1,65
Carbonato manganoso (47,79% Mn)	0,63
Carbonato cúprico (57,47% Cu)	0,3
Iodato de potássio (59,3% I)	0,01
Selenato de sódio anidro (41,79% Se)	0,01025
Paramobilidato de amônio 4H ₂ O (54,34% Mo)	0,00795
Elementos Minerais Potencialmente Benéficos	
Metasilicato de sódio 12H ₂ O	1,45
Sulfato de crômio e potássio 12 H ₂ O (10,42% Cr)	0,275
Cloreto de lítio (16,38% Li)	0,0174
Ácido bórico (17,5% B)	0,0815
Fluoreto de sódio (45,24% F)	0,0635
Carbonato de níquel (45% Ni)	0,0318
Vanadato de amônio (43,55% V)	0,0066
Sacarose	221,026
TOTAL	1000

Tabela 4 - Composição do MXO 1

MXO 1	ômega (mg/0,1ml)
ω 3 - ALA	6,76
ω 6	54,28
ω 9	24,04

Relação: [ω 9: ω 3- 0,4:1; ω 6: ω 3 8:1], Grupo B: controle neutro. Fontes: milho e soja

Tabela 5 – Composição do MXO 2

MXO 2	ômega (mg/0,1ml)
ω 3 - ALA	11,6
ω 6	16
ω 9	60

Relação: [ω 9: ω 3- 3,7:1; ω 6: ω 3 – ALA -1,4:1]. Grupo C: ALA. Fontes: canola, linhaça e oliva.

Tabela 6 – Composição do MXO 3

MXO 3	ômega (mg/0,1ml)
ω 3 - ALA	3,53
ω 3 - EPA	4,84
ω 3 - DHA	3,23
ω 6	16
ω 9	60

Relação: [ω 9: ω 3- 3,7:1; ω 6: ω 3 – Peixe -1,4:1]. Grupo D: EPA +DHA. Fontes: canola, peixe e oliva.

Tabela 7 - Composição do MXO 4

MXO 4	ômega (mg/0,1ml)
ω 3 - ALA	9,69
ω 3 - DHA	1,91
ω 6	16
ω 9	60

Relação: [ω 9: ω 3- 3,7:1; ω 6: ω 3 – DHA -1,4:1]. Grupo E: DHA. Fontes: canola, linhaça, oliva e DHA de algas.

3.2 Procedimentos

3.2.1 Peso e identificação dos animais

Todos os CSW foram pesados e marcados na base da cauda com caneta permanente, na chegada ao laboratório de pesquisa, e depois a cada três dias, sempre no mesmo horário (10:30h) até o dia determinado para a coleta de sangue. Este procedimento foi realizado utilizando sempre a mesma balança (balança analítica Ohaus AS 2600).

3.2.2 Alimentação

O preparo das dietas purificadas foi feito de acordo com a fórmula de Reeves, Nielsen e Fahey Jr. (1993), para a dieta AIN-93G e para a AIN-93HA em substituição à AIN-93M conforme descrito anteriormente (Tabelas 1, 2 e 3).

A dieta AIN-93G permaneceu sob refrigeração em geladeira até o momento da pesagem e posterior oferta aos animais, quando foi colocada sobre as grades superiores das gaiolas porções de inicialmente 50g/dia por grupo de animais. As porções foram depois reajustadas conforme o consumo.

A dieta AIN-93HA foi mantida no congelador a 20 graus centígrados negativos até o momento da retirada para pesagem e posterior oferta aos animais através da disposição sobre as grades superiores das gaiolas. Inicialmente foi colocado 50 g/dia por grupo de animais e depois reajustado conforme o consumo.

As dietas AIN-93G e AIN-93HA foram trocadas diariamente sempre no mesmo horário (10:45h-11:00), e as sobras foram pesadas para avaliar o consumo alimentar.

3.2.3 Mistura de óleos

Os óleos foram preparados e fornecidos para fins de pesquisa científica pela Nutrimed Industrial Ltda. Os óleos foram conservados em frascos de vidro pasteurizados e mantidos em temperatura ambiente e protegidos da luz por invólucro de papel de alumínio (Tabelas 4, 5, 6 e 7).

3.2.4 Intubação orogástrica

Todos os animais (n=30) foram submetidos à intubação orogástrica na terceira fase do experimento através de agulha apropriada (IC 800) para camundongos, utilizando-se uma agulha distinta para cada grupo de animais.

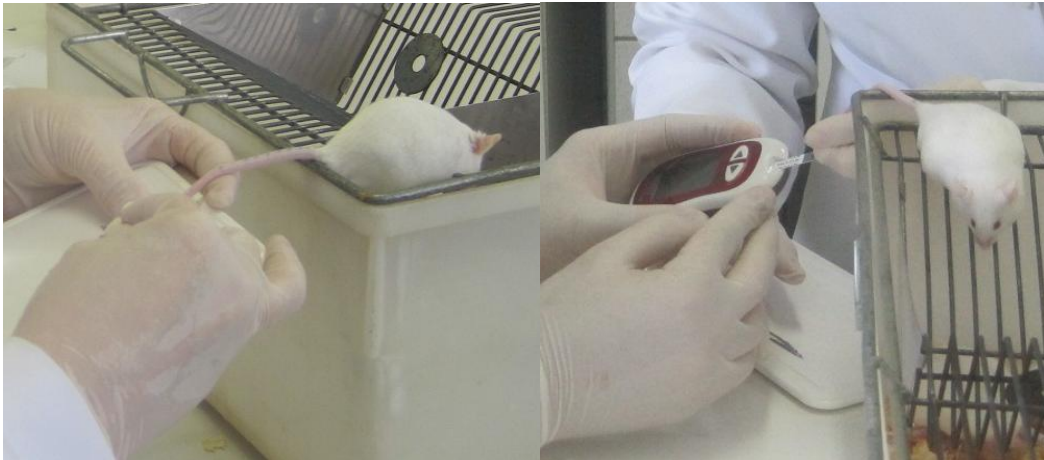
3.2.5 Avaliação Geral

Os animais foram avaliados diariamente. Comportamento (reatividade, imobilidade), contrações involuntárias, respiração, diarreia, mudança comportamento alimentar, pilo-ereção, queda de pelos e ulcerações foram averiguados.

3.2.6 Glicemias

As glicemias dos camundongos foram medidas utilizando fitas reativas para glicosímetro Accu - Chek® Performa (acurácia: 0.94 e 1.06; imprecisão média < 2.3%; coeficiente de variação: 1.9%; limite de detecção de glicose: 10 – 600 mg/dl). Uma microgota de sangue fresco foi colhida através de pequena incisão, ou pela retirada de tampão já formado, na porção distal da cauda do animal, no dia do início da AIN-93HA, com 8 semanas de dieta e a partir de então a cada semana para as dosagens de glicemias. Foram feitas glicemias com 4 horas de jejum matinal, a fim de confirmação diagnóstica de DM. De acordo com a recomendação do laboratório de que a coleta de sangue para as dosagens plasmáticas das adipocinas e da insulina deveria ser em jejum de 12 horas *overnight* (amostras hiperlipidêmicas não seriam adequadas), também foram feitas glicemias com 12 horas de jejum *overnight* no início da dieta AIN-93HA, na 8^a, na 11^a e na 12^a semanas (ao final do experimento), para, oportunamente, se observar a evolução dessa glicemia e sua correlação com a glicemia de 4h de jejum matinal. As glicemias foram sempre coletadas às 9 horas da manhã para o jejum *overnight*, e às 11 horas para o jejum matinal. (Figura 9)

Figura 8 – Coleta de microgota de sangue por pequena incisão na porção distal da cauda do CSW



Disposição do CSW (grupo A; CSW 1) para coleta de sangue indolor para o CSW e segura para o coletor. Glicosímetro Accu-Chek® Performa e fita reativa Accu-Chek® Performa

3.2.7 Coleta de sangue

Os animais foram mantidos apenas com água *ad libitum* por 12-14 horas antes do procedimento. Antes da coleta de sangue, foram anestesiados com xilazina 2% na dose de 0,005 ml/10g (10 mg/kg) e ketamina 10% na dose de 0,010 ml/10 g (100 mg/kg), misturados na mesma seringa, por via intraperitoneal (Figura 9). Após a perda dos reflexos das córneas e da cauda, o animal foi colocado em decúbito dorsal sobre a prancha de madeira e em seguida realizada a punção cardíaca com seringa de 3 ml, previamente lavada com o anticoagulante etilenodiaminotetracético (EDTA) com pH 8, via trans-torácica para retirada de sangue (1,5 a 2,0 ml) para análise (Figura 10).

Figura 9 – Anestesia via peritoneal dos CSW



Aplicação da mistura de ketamina 2% e xilazina 10% via intraperitoneal

Figura 10 - Punção Cardíaca dos CSW



Retirada de sangue por punção cardíaca trans-torácica com o CSW anestesiado e sem reflexos da cauda e da córnea

As amostras de sangue coletadas foram colocadas em microtubos tipo Eppendorf (identificadas por número), já com 0,8ml de EDTA, com capacidade máxima de dois mililitros e imediatamente dispostos em isopor com gelo. Em período menor que 30 minutos após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas

em centrífuga gelada a 4 graus centígrados, a 1.000 rpm por 15 minutos. Em seguida o plasma de cada animal foi dividido em duas amostras devidamente identificadas e organizadas em duas caixas gradeadas e apropriadas para serem colocadas em congelamento. Todas as amostras de plasma foram conservadas no congelador a 20° C negativos até o momento do transporte, quando as caixas contendo as amostras de plasma foram colocadas em isopor com oito quilos de gelo seco. No dia seguinte (período inferior a 24 horas) as amostras de plasma, ainda congeladas, foram entregues, em mão, ao Instituto Gênese de Análises Científicas (IgAc- São Paulo-SP) para análise. Todas as variáveis foram analisadas em duplicata, exceto a IL1- β , pois para análise dessa última variável era preciso maior quantidade de plasma.

3.2.8 Tecnologia Luminex™ Corporation's xMAP (Multiple Analyte Profiling, x= variável)²⁰

Utilizou-se o kit Lincoplex para as dosagens plasmáticas de insulina, LEP, PAI-1, IL-6, TNF- α , MCP-1 e RES por imunoensaio Multiplex - Painel Adipocina Sérica de Camundongo (MADPK-71K - 7). Para a dosagem da AdipoQ foi utilizado o kit MADPK- 71K-ADPN. Controle catalogado # LMA=6071.

Trata-se de um processo exclusivo de imunoensaio tipo “sanduiche” que cora internamente microesferas de poliestireno (anticorpos) com dois fluorocromos espectrais distintos. Cada esfera é conjugada a um anticorpo analito específico e tem um “código de cor” e sua assinatura. O plasma é incubado com as microesferas e depois se adiciona ao conjunto o anticorpo de detecção biotilado (conjugado com biotina, uma vitamina com alta afinidade por estreptoavidina, que emite sinal fluorescente). As microesferas são lidas no equipamento chamado Luminex® através de um sistema duplo de lasers que incide sob as microesferas à medida que essas fluem pelo fluxo celular (citometria de fluxo). Um feixe de laser detecta a microesfera (pelo código de cor específico para o ensaio) e o outro quantifica o sinal em cada microesfera e faz a contagem das variáveis separadamente. O teste tem controle de qualidade e, para cada variável, tem curva controle diferente.

²⁰ Tecnologia de detecção simultânea de múltiplos analitos com pequena quantidade de amostras baseada na combinação de diferentes conceitos tecnológicos de comprovada resolução.

3.2.9 Ensaio *Enzima linked immuno sorbent assay* (ELISA)

Foi utilizado o ensaio ELISA (imunoenzimático), cuja técnica baseia-se na ligação do antígeno ao anticorpo ligado a uma enzima, para as dosagens de IL-1 β (kit CAT#E90563 hu para camundongos - fornecedor USCNK – teste: IL1 β mouse sensibilidade 7,2 pg/ml).

3.2.10 Morte

Em completa anestesia e analgesia e verificados ausência de reflexos das córneas e da cauda, foi feita a coleta de sangue dos CSW através de punção cardíaca dos animais os quais, após a retirada do sangue apresentaram choque hipovolêmico seguido de morte.

3.2.11 Avaliação estatística

Para o estudo estatístico das variáveis foi utilizado o *software* SPSS v.19.0 “for Windows”. Utilizou-se inicialmente o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis que apresentaram distribuição gaussiana foram submetidas à análise de variância (ANOVA) a fim de definir quais variáveis tinham diferenças entre grupos e a seguir se desvelou os grupos com diferentes médias e se utilizou o pós-teste de Tukey. Para as variáveis que não seguiram a curva de normalidade com distribuições gaussianas, foi utilizada análise de variância não paramétrica (teste de Kruskal-Wallis), seguido do pós teste não paramétrico de Mann-Whitney. O teste T de *Student* pareado foi realizado para a comparação, entre grupos, de médias de glicemias, em jejum de 12 horas *overnight*, logo antes da suplementação oral das MXO (_A); em jejum de 4 horas _A; e em jejum de 12 horas, logo após os sete dias de suplementação oral das MXO (_D), e de médias dos pesos _A e _D. Para a correlação das variáveis foram utilizadas as correlações de Spearman para as variáveis não gaussianas e de Pearson para as demais variáveis com distribuição normal. Utilizou-se, para a composição de tabelas e gráficos, a planilha eletrônica *Microsoft Office Excel* 2003. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) e com $p < 0,05$, considerados estatisticamente significantes. As ilustrações foram elaboradas em *Adobe Illustrator* CS5 e a edição de texto em *Microsoft Office Word* 2003.

4 RESULTADOS

4.1 Fase 1 – Crescimento: evolução clínica e peso dos CSW sob dieta AIN-93G

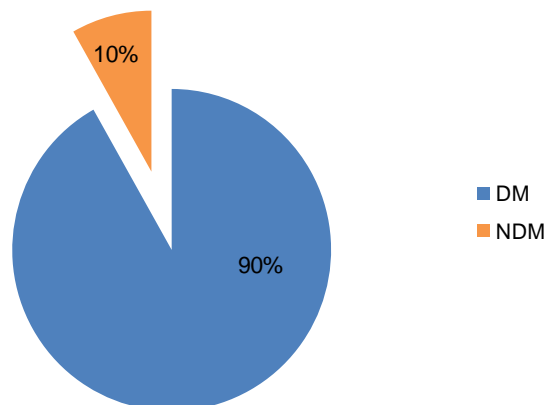
Os CSW alimentados com dieta AIN-93G aceitaram bem a dieta e tiveram crescimento e desenvolvimentos adequados, conforme a literatura (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007). Não apresentaram mudanças comportamentais como reatividade e imobilidade e clínicas como pilo-ereção e alterações respiratórias. Concluída a primeira fase, os animais ganharam, em média, 18,40 gramas (média \pm EPM: 11,60 \pm 0,14 inicial *versus* 30 \pm 0,31 final).²¹

4.2 Fase 2 – Indução de DM2: evolução clínica, peso e glicemia dos CSW sob dieta AIN-93HA

Na segunda fase já com os animais adultos e com a substituição da dieta AIN-93G pela dieta AIN-93HA, todos os CSW do estudo ganharam peso em média 22,4 gramas (média \pm EPM: 30 \pm 0,31 *versus* 52,4 \pm 0,71).

A partir da oitava semana da dieta AIN-93HA mais da metade (54%) dos CSW (n=27/50) já apresentavam glicemia > 150 mg/dl com 4 horas de jejum matinal, e na 11ª semana 90% foram confirmados diabéticos pela detecção de duas ou mais glicemias > 150 mg/dl (45/50) (Gráfico 1). Ainda nessa fase observou-se aumento da agressividade, lesões nas orelhas e nas caudas de alguns animais. Ocorreu aproximação persistente de formigas doces mesmo com as gaiolas higienizadas e a maravalha trocadas diariamente.

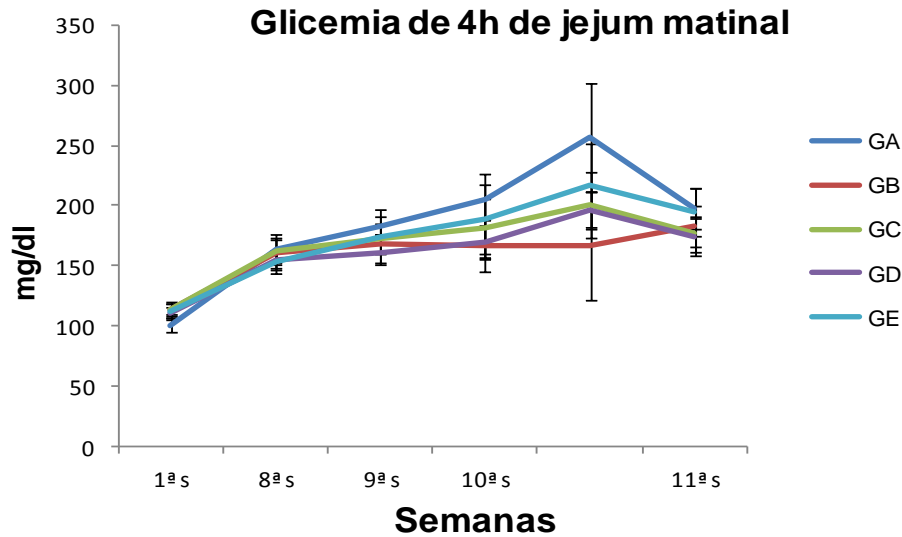
Gráfico 1 - Percentual de CSW com DM2 na 11ª semana de dieta AIN-93-HA



DM: *Diabetes mellitus*; NDM: não confirmado com *diabetes mellitus* na 11ª semana sob dieta AIN-93HA. n=50.

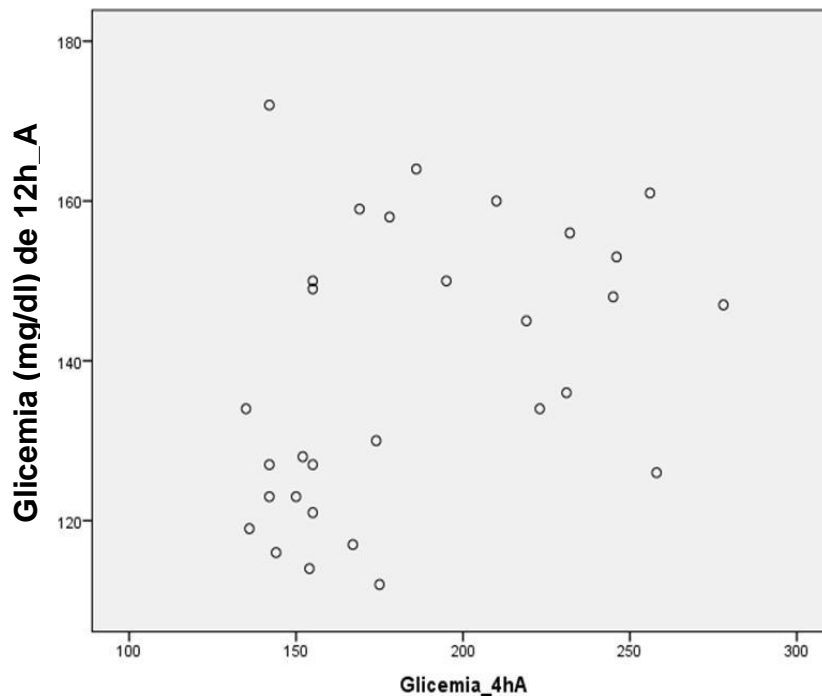
²¹ Para fins evolutivos, os dados foram restritos às amostras utilizadas na 3ª fase com 30 CSW.

Gráfico 2 Evolução das glicemias (média \pm EPM) em jejum de 4h matinal de CSW sob dieta AIN-93HA



Grupos predeterminados para a SO diferenciada. GA: suplementação com água; GB: suplementação com MXO 2 neutro; GC: suplementação com MXO 2 com ALA; GD: suplementação com MXO 3 com EPA+DHA de peixe; GE: suplementação com MXO 4 com DHA de algas. n=6 em todos os grupos

Gráfico 3 - Correlação de Pearson das glicemias dos CSW com jejum de 4h matinal e de 12 h *overnight*_A da suplementação de MXO diferenciada



Correlação positiva para glicemias dos CSW com jejum de 4h matinal e de 12 h *overnight*_A da suplementação oral da MXO. n=30

4.3 Fase 3 – Suplementação oral de ácidos graxos insaturados: evolução clínica, peso, glicemia, insulina e adipocinas dos CSW sob dieta AIN-93HA e sob suplementação de MXO diferenciada.

Foram selecionados os CSW sem lesões corporais e confirmados diabéticos (n=30) cujas médias de glicemia não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p: 0,13) (Gráfico 2, Tabela 11).

Tabela 8- Evolução do peso (média ± EPM) dos CSW sob dieta AIN-93 até o início da SO

		Pesos (g)		
	Dieta	Momento	Média ± EPM	Sig. (p)
1ª Fase	AIN-93G	Início	11,42 ± 0,26	0,000
		Final	30,12 ± 0,42*	
2ª Fase	AIN-93HA	Início	30,12 ± 0,42	0,000
		Final	52,26 ± 1,29*	

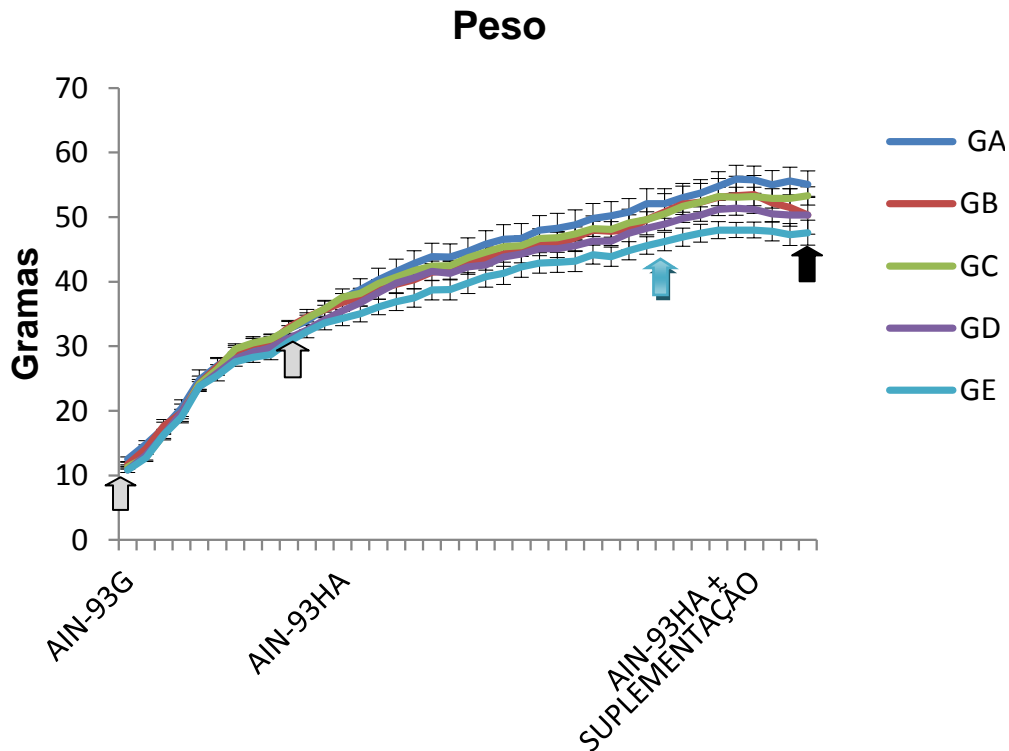
n total=30; n=6 por grupo em dieta AIN-93 com ou sem suplementação oral de água (GA); MXO neutro (GB); MXO com ω 3 de ALA (GC); MXO com ω 3 de peixe (GD); MXO com ω 3 de alga (GE). n=6 em todos os grupos. Aumento de peso significativo entre os animais alimentados com dieta AIN-93G e AIN-93HA até o início da SO. Teste T *Student*.

Tabela 9 – Diferença entre Peso_A e Peso_D dos CSW sob suplementação de MXO diferenciada

		Teste T Pareado							
		Diferenças Pareadas					t	df	Sig. (p)
3ª Fase		Média	Desvio Padrão	EPM	95% IC				
					abaixo	acima			
Par	Peso_A X Peso_D	,9833	1,9761	,3608	,2455	1,7212	2,726	29	,011

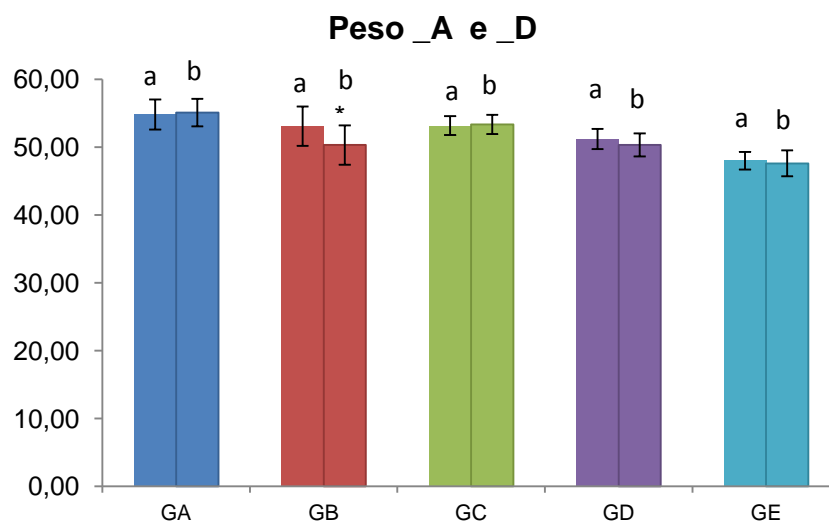
n=6 em todos os grupos. Teste T de *Student*. IC: Intervalo de Confiança. Teste T de *Student*.

Gráfico 4 - Evolução do peso (média \pm EPM) dos CSW sob dieta AIN-93 e sob suplementação de MXO diferenciada



GA: suplementação com água; GB: suplementação com MXO 2 neutro; GC: suplementação com MXO 2 com ALA; GD: suplementação com MXO 3 com EPA+DHA de peixe; GE: suplementação com MXO 4 com DHA de algas. \uparrow : início das dietas AIN-93. \uparrow : início suplementação MXO diferenciada. \blacksquare : final do experimento. n=6 em todos os grupos

Gráfico 5 - Comparação entre Peso (média \pm EPM) dos CSW sob dieta AIN-93 e sob suplementação de MXO diferenciada _A e _D



GA: suplementação com água; GB: suplementação com MXO 2 neutro; GC: suplementação com MXO 2 com ALA; GD: suplementação com MXO 3 com EPA+DHA de peixe; GE: suplementação com MXO 4 com DHA de algas. a = _A: antes da suplementação oral; b = _D: depois da suplementação

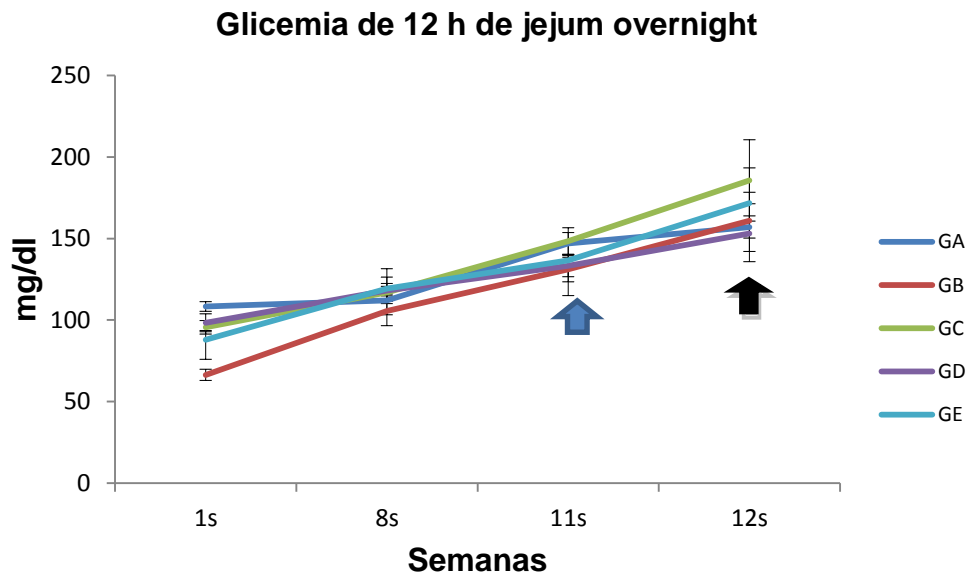
oral. n=6 em todos os grupos. Diferença estatística apenas no grupo B (intergrupo). * p: 0,044. Teste T de *Student*

Tabela 10 - Diferença entre as glicemias dos CSW em jejum de 12h *overnight* _A e _D; e de 4h matinal _A da suplementação de MXO diferenciada e ainda sob dieta AIN-93HA

		Teste Pareado					t	df	Sig. (p)
		Diferenças Pareadas							
		Média	DP	EPM	95% de IC				
					Abaixo	Acima			
Par 1	Glicemia 12h_A x Glicemia 12h_D	-21,067	44,801	8,180	-37,796	-4,338	-2,576	29	,015
Par 2	Glicemia 12h_A x Glicemia 4h_A	-46,667	39,789	7,265	-61,524	-31,809	-6,424	29	,000
Par 3	Glicemia 4h_A x Glicemia 12h_D	25,600	50,926	9,298	6,584	44,616	2,753	29	,010

n=6 em todos os grupos. Teste T de *Student*. IC: Intervalo de Confiança.

Gráfico 6 - Evolução da glicemia (média ± EPM) dos CSW em jejum de 12 horas *overnight*, sob dieta AIN-93HA e suplementação de MXO diferenciada.



↑: início da suplementação de MXO diferenciada a partir da 11ª semana de dieta AIN-93HA - GA: suplementação com água; GB: suplementação com MXO 2 neutro; GC: suplementação com MXO 2 com ALA; GD: suplementação com MXO 3 com EPA+DHA de peixe; GE: suplementação com MXO 4 com DHA de algas, a partir da 11ª semana de dieta AIN-93HA. ↑: final da SO diferenciada. n=6 em todos os grupos.

Tabela 11 – Glicemias e Insulina (média ± EPM)

	GA	GB	GC	GD	GE	Sig. (p)
Glicemia 12h_A (mg/dl)	149,00 ± 6,66	133,33 ± 7,33	148,50 ± 8,14	130,5 ± 6,55	131,83 ± 3,82	0,13
Glicemia 4h_A (mg/dl)	197,67 ± 17,40	183,17 ± 20,44	176,67 ± 15,06	174,33 ± 16,81	194,67 ± 21,83	0,86
Glicemia 12h_D (mg/dl)	157,33 ± 21,30	151,17 ± 10,52	177,67 ± 24,90	153,17 ± 10,87	159,17 ± 21,55	0,87
Insulina (pg/ml)	1439,67 ± 571,87	784,725 ± 256,85	1150,37 ± 289,38	1439,28 ± 464,71	866,65 ± 197,10	0,63

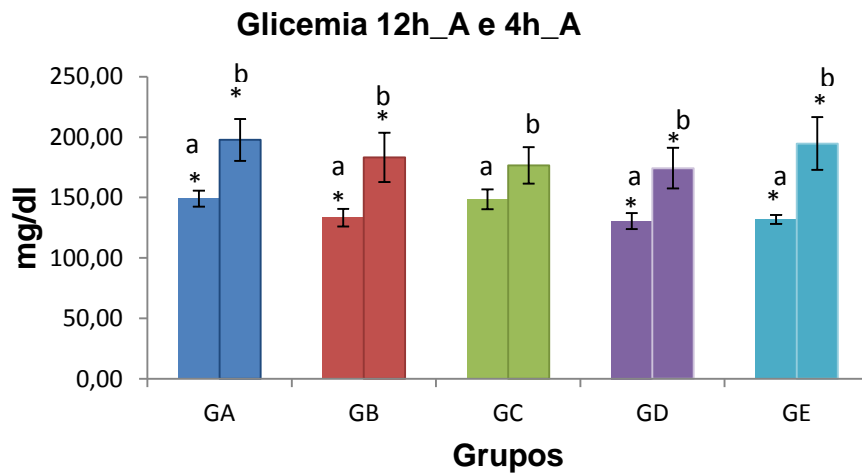
GA: suplementação com água; GB: suplementação com MXO 2 neutro; GC: suplementação com MXO 2 com ALA; GD: suplementação com MXO 3 com EPA+DHA de peixe; GE: suplementação com MXO 4 com DHA de algas. n=6 em todos os grupos. Sem diferenças estatisticamente significantes entre grupos. ANOVA.

Tabela 12 - Adipocinas plasmáticas (média ± EPM)

	GA	GB	GC	GD	GE
Adipocinas (pg/ml)	Média ± EPM				
IL-6	75,28 ± 70,81	33,01 ± 25,72	3,30 ± 0,96	15,25 ± 13,256	237,92 ± 133,74*
IL_1β	24,05 ± 6,25	24,23 ± 7,60	16,36 ± 9,39	9,34 ± 4,10	23,17 ± 8,25
LEP	38641,83 ± 10476,41	22942,12 ± 8065,28	25565,60 ± 6124,84	27021,19 ± 5996,31	8877,91 ± 2699,21*
MCP-1	58,21 ± 26,11	25,725 ± 4,59	15,04 ± 4,39	24,71 ± 9,90	45,62 ± 16,20
PAI-1	4583,82 ± 2856,40	7616,81 ± 2790,90	4250,79 ± 1187,06	6225,80 ± 1337,94	4785,71 ± 1642,30
RES	1481,12 ± 391,23	1114,37 ± 242,16	879,87 ± 102,25	1356,92 ± 160,23	733,22 ± 235,39
TNF-α	13,28 ± 2,56	7,2 ± 2,25	0,78 ± 0,40	2,75 ± 1,36	22,81 ± 7,22*
AdipoQ	4107515,71 ± 671135,55	5496031,08 ± 104512,85	4914512,75 ± 415394,60	4773415,46 ± 588864,63	2274695,34 ± 901990,95*

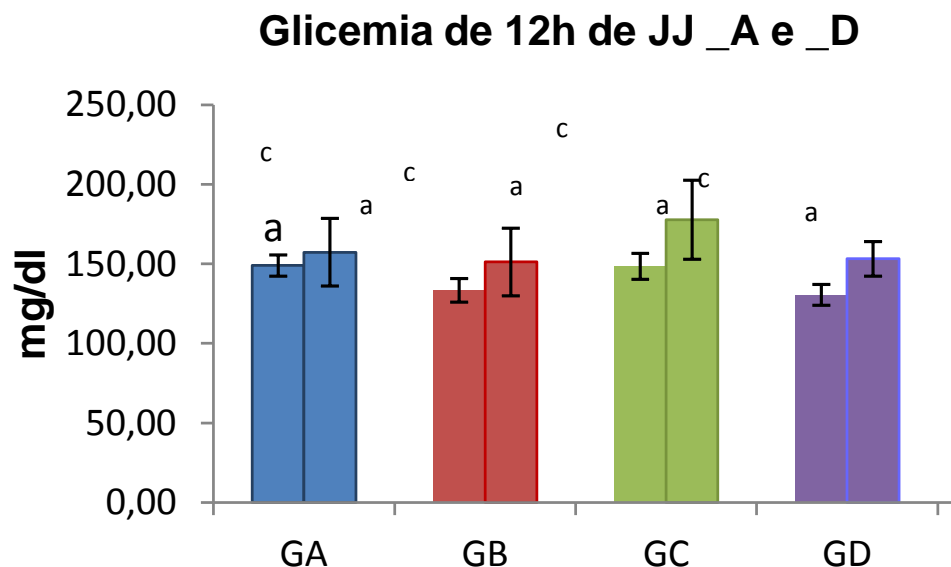
GA: suplementação com água; GB: suplementação com MXO 2 neutro; GC: suplementação com MXO 2 com ALA; GD: suplementação com MXO 3 com EPA+DHA de peixe; GE: suplementação com MXO 4 com DHA de algas n=6 em todos os grupos. *p<0,05. ANOVA.

Gráfico 7– Comparação entre as glicemias (média ± EPM) dos CSW em jejum de 12h *overnight*_A e de 4h_A matinal intergrupos e entre grupos



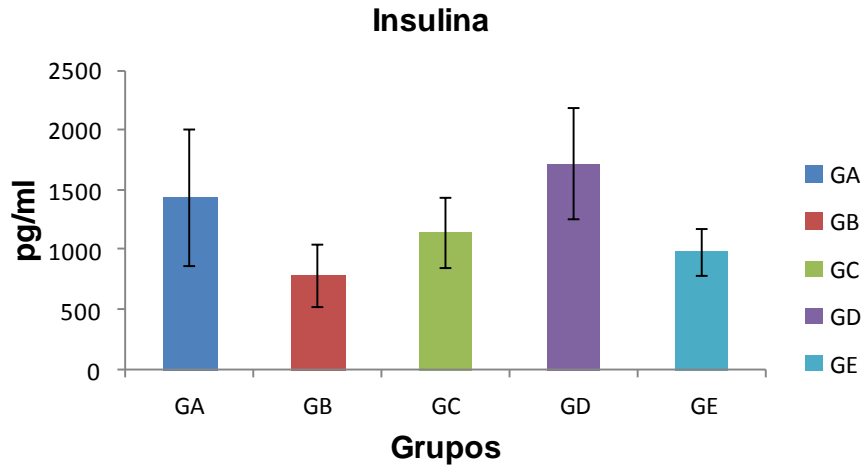
GA: suplementação com água; GB: suplementação com MXO 2 neutro; GC: suplementação com MXO 2 com ALA; GD: suplementação com MXO 3 com EPA+DHA de peixe; GE: suplementação com MXO 4 com DHA de algas a = 12h_A: antes da suplementação oral; b = 4h_A: antes da suplementação. n=6 em todos os grupos. * Diferenças significantes intergrupos ($p < 0,05$). Teste T de Student.

Gráfico 8– Comparação entre as glicemias (média ± EPM) dos CSW em jejum de 12h *overnight*_A e _D da suplementação de MXO diferenciada; intergrupos e entre grupos



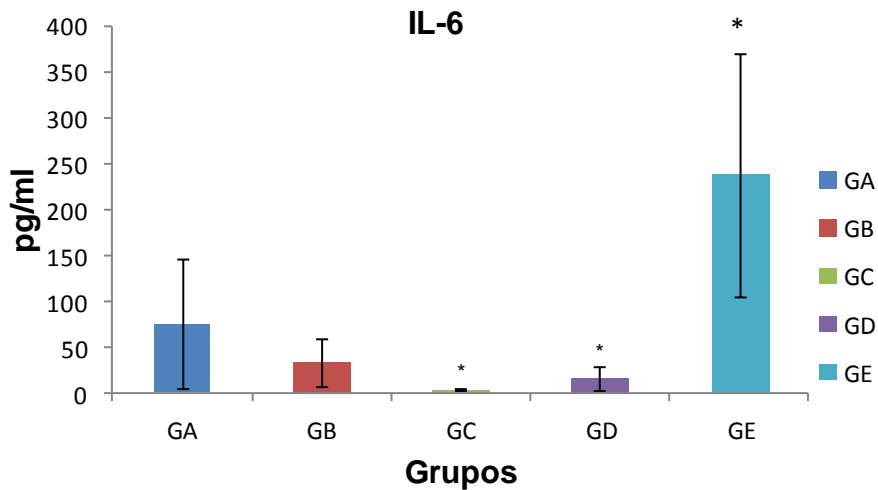
GA: suplementação com água; GB: suplementação com MXO 2 neutro; GC: suplementação com MXO 2 com ALA; GD: suplementação com MXO 3 com EPA+DHA de peixe; GE: suplementação com MXO 4 com DHA de algas. a = 12h_A: antes da suplementação oral; c = 12h_D: depois da suplementação. n=6 em todos os grupos. Sem diferença estatisticamente significativa intergrupos e entre grupos. Teste T de Student.

Gráfico 9 – Concentração plasmática da Insulina (média \pm EPM) nos grupos de CSW diabéticos com suplementação de MXO diferenciada



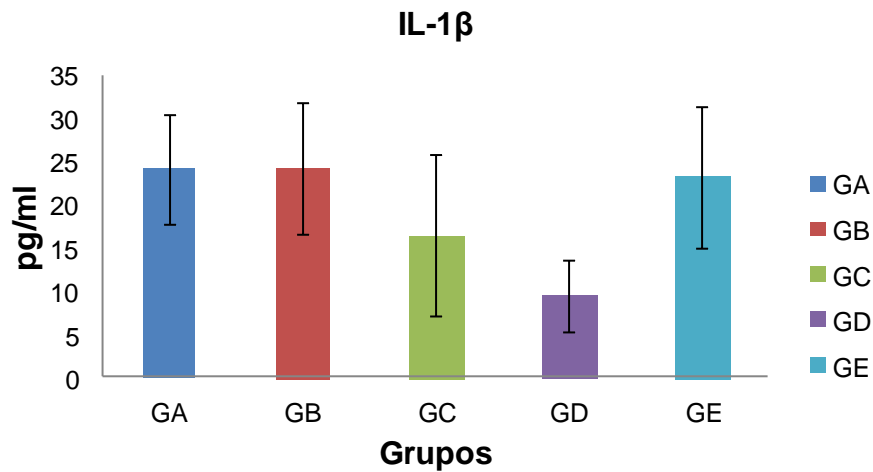
GA: suplementação com água; GB: suplementação com MXO 2 neutro; GC: suplementação com MXO 2 com ALA; GD: suplementação com MXO 3 com EPA+DHA de peixe; GE: suplementação com MXO 4 com DHA de algas. n=6 em todos os grupos. Sem diferença estatisticamente significativa entre grupos. ANOVA e Tukey.

Gráfico 10 – Concentração plasmática da IL-6 (média \pm EPM) nos grupos de CSW diabéticos com suplementação de MXO diferenciada



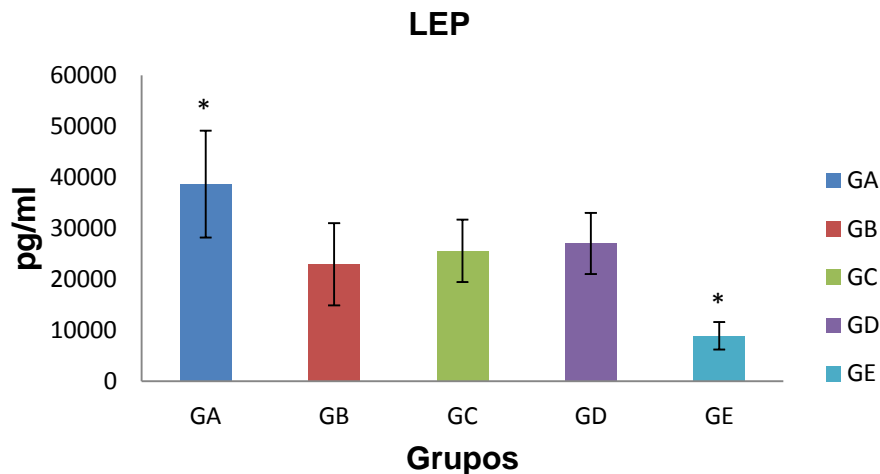
GA: suplementação com água; GB: suplementação com MXO 2 neutro; GC: suplementação com MXO 2 com ALA; GD: suplementação com MXO 3 com EPA+DHA de peixe; GE: suplementação com MXO 4 com DHA de algas. n=6 em todos os grupos. * Diferenças significantes entre GE e GD (p: 0,026) e GE e GC (p :0,041). Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

Gráfico 11- Concentração plasmática da IL-1 β (média \pm EPM) nos grupos de CSW diabéticos com suplementação de MXO diferenciada



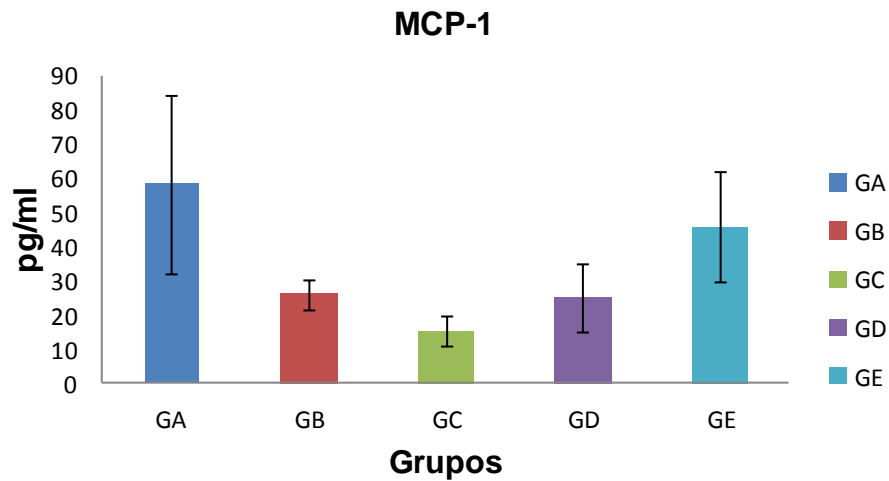
GA: suplementação com água; GB: suplementação com MXO 2 neutro; GC: suplementação com MXO 2 com ALA; GD: suplementação com MXO 3 com EPA+DHA de peixe; GE: suplementação com MXO 4 com DHA de algas. n=6 em todos os grupos. Sem diferença estatisticamente significativa entre grupos. ANOVA e Tukey.

Gráfico 12 – Concentração plasmática da LEP (média \pm EPM) nos grupos de CSW diabéticos com suplementação de MXO diferenciada



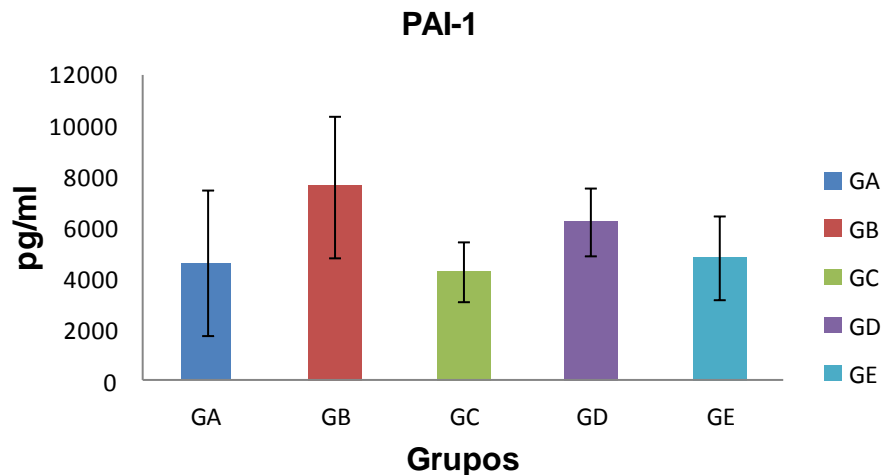
GA: suplementação com água; GB: suplementação com MXO 2 neutro; GC: suplementação com MXO 2 com ALA; GD: suplementação com MXO 3 com EPA+DHA de peixe; GE: suplementação com MXO 4 com DHA de algas. n=6 em todos os grupos. * Diferença estatisticamente significativa entre GE e GA ($p < 0,049$). ANOVA e Tukey.

Gráfico 13 – Concentração plasmática da MCP-1 (média \pm EPM) nos grupos de CSW diabéticos com suplementação de MXO diferenciada



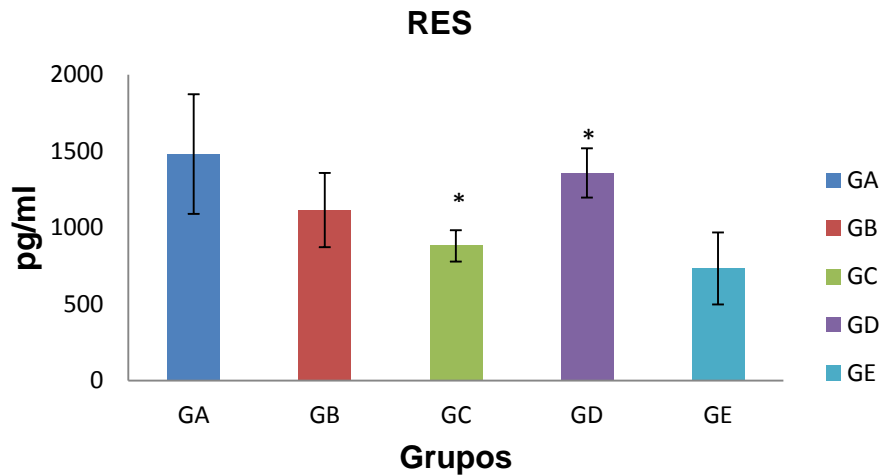
GA: suplementação com água; GB: suplementação com MXO 2 neutro; GC: suplementação com MXO 2 com ALA; GD: suplementação com MXO 3 com EPA+DHA de peixe; GE: suplementação com MXO 4 com DHA de algas. n=6 em todos os grupos. Sem diferença estatisticamente significativa entre grupos. ANOVA e Tukey.

Gráfico 14 – Concentração plasmática do PAI-1 (média \pm EPM) nos grupos de CSW diabéticos com suplementação de MXO diferenciada



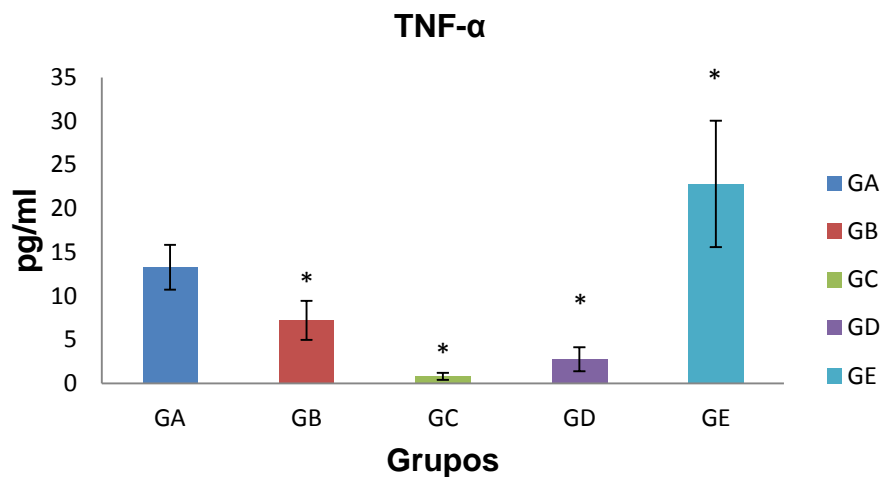
GA: suplementação com água; GB: suplementação com MXO 2 neutro; GC: suplementação com MXO 2 com ALA; GD: suplementação com MXO 3 com EPA+DHA de peixe; GE: suplementação com MXO 4 com DHA de algas. n=6 em todos os grupos. ANOVA e Tukey.

Gráfico 15 – Concentração plasmática da RES (média ± EPM) nos grupos de CSW diabéticos com suplementação de MXO diferenciada



GA: suplementação com água; GB: suplementação com MXO 2 neutro; GC: suplementação com MXO 2 com ALA; GD: suplementação com MXO 3 com EPA+DHA de peixe; GE: suplementação com MXO 4 com DHA de algas. n=6 em todos os grupos. * Diferença estatisticamente significativa entre GC e GD (p: 0,041). Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

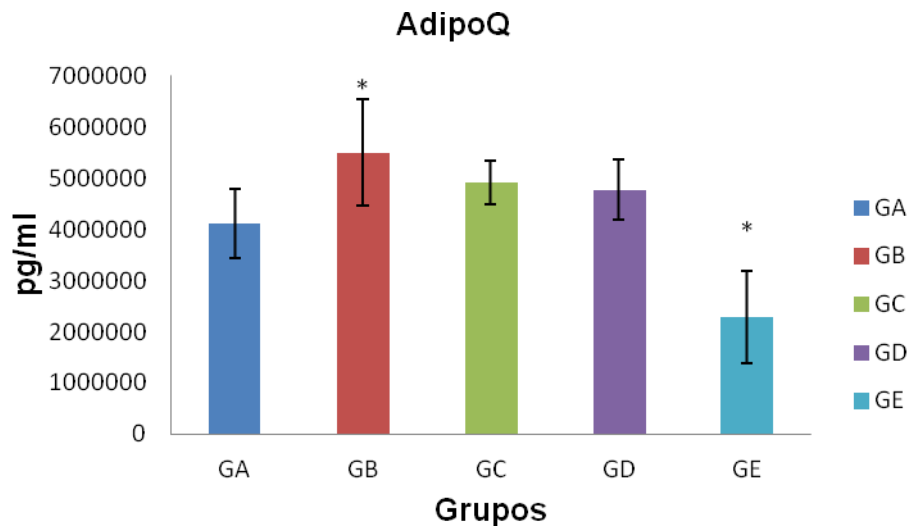
Gráfico 16 – Concentração plasmática do TNF- α (média ± EPM) nos grupos de CSW diabéticos com suplementação de MXO diferenciada



H

GA: suplementação com água; GB: suplementação com MXO 2 neutro; GC: suplementação com MXO 2 com ALA; GD: suplementação com MXO 3 com EPA+DHA de peixe; GE: suplementação com MXO 4 com DHA de algas. n=6 em todos os grupos. * Diferença estatisticamente significativa entre GE e GB (p: 0,040); GE e GC (p: 0,002); GE e GD (p: 0,005). ANOVA e Tukey.

Gráfico 17 – Concentração plasmática da AdipoQ (média ± EPM) nos grupos de CSW diabéticos com suplementação de MXO diferenciada



GA: suplementação com água; GB: suplementação com MXO 2 neutro; GC: suplementação com MXO 2 com ALA; GD: suplementação com MXO 3 com EPA+DHA de peixe; GE: suplementação com MXO 4 com DHA de algas. n=6 em todos os grupos. * Diferença estatisticamente significativa entre GE e GB (p: 0,043). ANOVA e Tukey.

A seguir são apresentadas as correlações de Spearman para as variáveis IL-6 e RES e de Pearson para as demais variáveis (Tabelas 13-16)

Tabela 13 – Correlação de Spearman entre as adipocinas não paramétricas IL-6 e RES e as demais variáveis

Correlação de Spearman		Glicemia 12h_A	Glicemia 12h_D	Glicemia 4h_A	IL-1 β	IL-6	Insulina	LEP	MCP-1	PAI-1	RES	TNF- α	AdipoQ	Peso_A	Peso_D
IL-6	Coeficiente de correlação	-,090	-,202	,282	0,409	1,000	,044	-,072	0,59	,217	,119	0,677	-,403	,076	,124
	P bicaudal	,638	,285	,131	,034		,818	,707	,001	,248	,530	,000	,027	,689	,514
	n	30	30	30	27	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
RES	Coeficiente de correlação	,163	-,303	,011	-,197	,119	0,408	0,574	-,156	0,65	1,000	-,212	0,488	0,488	,346
	P bicaudal	,389	,104	,952	,324	,530	,025	,001	,410	,000		,262	,006	,006	,061
	n	30	30	30	27	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
	p<0,05														
			p<0,01												

Tabela 14 – Correlações de Pearson entre glicemias em jejum de 12h_A e 12h_D *overnight* e de 4h matinal, IL-1 β e Insulina e Leptina e demais variáveis

		Correlações de Pearson											
		Glicemia 12h_A	Glicemia 12h_D	Glicemia 4h_A	IL-1 β	Insulina	LEP	MCP-1	PAI-1	TNF- α	AdipoQ	Peso_A	Peso_D
Glicemia 12h_A	Correlação Pearson	1	,188	,305	-,192	,368	,236	,096	,071	-,031	-,055	,294	,399
	Sig. P bicaudal		,320	,101	,336	,045	,209	,615	,708	,869	,772	,114	,029
	n	30	30	30	27	30	30	30	30	30	30	30	30
Glicemia 12h_D	Correlação Pearson	,188	1	,361	-,053	-,083	-,181	-,239	-,481	-,194	,035	,224	,412
	Sig. P bicaudal	,320		,050	,792	,662	,339	,204	,007	,304	,856	,234	,024
	n	30	30	30	27	30	30	30	30	30	30	30	30
Glicemia 4h_A	Correlação Pearson	,305	,361	1	,412	,309	,024	,423	,088	,129	-,249	,345	,354
	Sig. P bicaudal	,101	,050		,033	,097	,901	,020	,644	,497	,184	,062	,055
	n	30	30	30	27	30	30	30	30	30	30	30	30
IL-1 β	Correlação Pearson	-,192	-,053	,412	1	-,137	-,189	,408	,122	,377	-,405	,230	,092
	Sig. P bicaudal	,336	,792	,033		,497	,346	,035	,544	,053	,036	,249	,648
	n	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27
Insulina	Correlação Pearson	,368	-,083	,309	-,137	1	,519	,315	,434	-,293	,184	,287	,261
	Sig. P bicaudal	,045	,662	,097	,497		,003	,090	,017	,116	,331	,124	,163
	n	30	30	30	27	30	30	30	30	30	30	30	30
LEP	Correlação Pearson	,236	-,181	,024	-,189	,519	1	,297	,265	-,337	,317	,550	,546
	Sig. P bicaudal	,209	,339	,901	,346	,003		,110	,157	,068	,088	,002	,002
	n	30	30	30	27	30	30	30	30	30	30	30	30
	p<0,05		p<0,01										

Tabela 15 – Correlações de Pearson entre, MCP-1, PAI-1, TNF- α , AdipoQ e Peso

		Correlações de Pearson											
		Glicemia 12h_A	Glicemia 12h_D	Glicemia 4h_A	IL-1 β	Insulina	LEP	MCP-1	PAI-1	TNF- α	AdipoQ	Peso_A	Peso_D
MCP-1	Correlação Pearson	,096	-,239	,423	,408	,315	,297	1	,255	,406	-,350	,166	,122
	Sig. P bicaudal	,615	,204	,020	,035	,090	,110		,173	,026	,058	,381	,519
	n	30	30	30	27	30	30	30	30	30	30	30	30
PAI-1	Correlação Pearson	,071	-,481	,088	,122	,434	,265	,255	1	-,022	,270	,110	-,115
	Sig. P bicaudal	,708	,007	,644	,544	,017	,157	,173		,907	,149	,564	,545
	n	30	30	30	27	30	30	30	30	30	30	30	30
TNF- α	Correlação Pearson	-,031	-,194	,129	,377	-,293	-,337	,406	-,022	1	-,688	-,183	-,210
	Sig. P bicaudal	,869	,304	,497	,053	,116	,068	,026	,907		,000	,334	,266
	n	30	30	30	27	30	30	30	30	30	30	30	30
AdipoQ	Correlação Pearson	-,055	,035	-,249	-,405	,184	,317	-,350	,270	-,688	1	,193	,107
	Sig. P bicaudal	,772	,856	,184	,036	,331	,088	,058	,149	,000		,306	,573
	n	30	30	30	27	30	30	30	30	30	30	30	30
Peso_A	Correlação Pearson	,294	,224	,345	,230	,287	-,550	,166	,110	-,183	,193	1	-,940
	Sig. P bicaudal	,114	,234	,062	,249	,124	,002	,381	,564	,334	,306		,000
	n	30	30	30	27	30	30	30	30	30	30	30	30
Peso_D	Correlação Pearson	,399	,412	,354	,092	,261	-,546	,122	-,115	-,210	,107	-,940	1
	Sig. P bicaudal	,029	,024	,055	,648	,163	,002	,519	,545	,266	,573	,000	
	n	30	30	30	27	30	30	30	30	30	30	30	30
	p<0,05		p<0,01										

5 DISCUSSÃO

Com o importante aumento de sua incidência mundial, o DM é atualmente considerado uma das doenças não transmissíveis mais comuns do mundo e a maior causa de incapacidade, de redução de qualidade de vida e de morte, constituindo-se um grave problema de saúde pública (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2012). Como traços recentes e significativos da história, longevidade e mudanças comportamentais, tais como alteração do hábito alimentar e sedentarismo, vêm contribuindo para o crescente número de casos de DM2 (SCHIMDT, 2004).

Avanços nos estudos em nível molecular têm estabelecido um novo paradigma para a relação entre o DM2, a obesidade e a RI. Característica inerente do DM2, a RI está associada à inflamação crônica subclínica pelo aumento da produção de citocinas como o TNF- α e a IL-6 e pela ativação das vias de sinalização inflamatórias. Como parte da patogênese do DM2, a disfunção e a apoptose das células beta pancreáticas ocorrem em geral com a progressão da RI e estão associadas a níveis elevados da IL-1 β e do polipeptídeo amiloide das ilhotas, embora ainda não esteja bem esclarecido o porquê da pronta elevação da IL-1 β nos estágios iniciais de resistência à insulina (WEN; *et al.*, 2011).

Em roedores, a resistina mostra-se em íntima relação com a RI pela desregulação de vias metabólicas, mas também pelo processo inflamatório desencadeado por aumento da produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β , relatado anteriormente. Níveis plasmáticos elevados de RES são encontrados em camundongos transgênicos obesos e diabéticos e naqueles com obesidade induzida por dieta. No entanto, esses roedores apresentam concomitantemente baixos níveis de RNAm da RES, numa obscura discrepância entre os níveis circulantes de RES e o conteúdo de RNAm nos adipócitos (PALANÍVEL *et al.*, 2006). A AdipoQ tem sua ação anti-inflamatória demonstrada pela modulação de NF- κ B, e inibição do TNF- α e da IL-1 β . Ao contrário da RES, a AdipoQ e a LEP tem correlação positiva entre os níveis circulantes e a produção de RNAm nos adipócitos (FRÜHBECK, 2006; DENG; SCHERER, 2010).

Alto teor de gordura saturada na alimentação, característica da dieta ocidental, ativa os TLRs, especialmente o TLR4, e provoca estresse no retículo endoplasmático (RE estresse) em tecidos periféricos, de acordo com estudos em modelos animais (TSUKUMO *et al.*, 2007). Como a única que precede e determina o

RE estresse no hipotálamo, a ativação do TLR4 assume papel essencial, conforme demonstrado em recente estudo, para o desenvolvimento da obesidade, da RI e do DM induzidos por dieta hiperlipídica por acréscimo de gordura saturada (MILANKI *et al.*, 2009). O excesso de AG saturados na alimentação também está associado ao aumento de vários marcadores inflamatórios pela ativação do fator de transcrição NF- κ B e conseqüente aumento da expressão dos marcadores inflamatórios TNF- α , IL-1 β e IL-6 e pela diminuição da expressão do PPAR γ , outro fator de transcrição, e da AdipoQ (GERALDO, ALFENAS, 2008; BRESSAN *et al.*, 2009) Sabe-se que o TNF- α inibe a autofosforilação dos resíduos de tirosina do receptor de insulina e promove a fosforilação em serina do IRS-1 que por sua vez causa fosforilação em serina do receptor de insulina do adipócito; que a IL-6 promove bloqueio na sinalização da insulina no hepatócito, relacionando-se esse efeito com a proteína SOCS-3, cuja associação ao receptor de insulina inibe a autofosforilação; a fosforilação em tirosina do IRS-1; a associação da PI3-k ao IRS-1 e subseqüente ativação da Akt (DANDONA; AJMAD; BANDYOPADHYAY, 2004).

Em recente experimento, *in vitro*, com macrófagos submetidos a vários estímulos com ácido saturado palmítico (ASP); LPS e ácido oleico, mostrou-se que o ASP, diferente do MUFA, induz a ativação do *nucleotide-binding domain, leucine-rich repeats containing family, pyrin domain-containing-3* (NLRP3) que em composição com a *apoptotic speck protein containing* (ASC) constitui uma plataforma molecular, a NLRP3-ASC. Essa plataforma também chamada de *inflammasome* provoca a ativação catalítica da caspase-1 seguida pela clivagem e liberação da IL-1 β (WEN; *et al.*, 2011). Todos esses mecanismos indicam o efeito potencial desses ácidos graxos saturados no desenvolvimento da resistência à insulina e DM2.

Contribuindo sobremaneira para o avanço da ciência, a experimentação animal tem importância fundamental ao permitir descobertas significativas para a humanidade. Vários estudos em modelos animais, principalmente em roedores, utilizando dieta rica em gordura para o desenvolvimento do DM2 têm sido realizados (DE SOUZA *et al.*, 2005; PITOMBO *et al.*, 2006). O camundongo é o animal mais intensamente usado em pesquisas em geral e o mais cientificamente conhecido. Eles são considerados excelentes modelos experimentais pela sua similaridade genética com os humanos e ciclo de vida relativamente curto (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007). Dentre os modelos animais de indução de DM2 com

dieta hiperlipídica, o CSW tem se destacado por se tornar rapidamente diabético (DE SOUZA *et al.*, 2005).

Na primeira fase deste estudo, alimentados, após o desmame (21 dias de vidas), durante quatro semanas, com dieta AIN-93G, os animais, CSW machos, obtiveram, em média, acréscimo de 163,7% do peso inicial (desmame), atingindo 30,12 (\pm 0,34) g, na sétima semana de vida (adultos), inserindo-se na faixa característica para esse tipo de roedor (BIOTÉRIO CENTRAL UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, 2012) (Tabela 8).

Na fase seguinte, com dieta AIN-93HA, hiperlipídica adaptada, já como adultos, os animais engordaram, em média, mais 73,5% de peso, alcançando 52,26 (\pm 1,05) g (p 0,000) ao final dessa fase, aproximado daquele obtido em estudo, com a mesma espécie animal, naqueles sob dieta indutora de obesidade, e bem acima do que se registrou dentre os alimentados com dieta padrão, de 28,2 g, em média (PITOMBO *et al.*, 2006) (Tabela 8).

Por volta da oitava semana sob dieta hiperlipídica, AIN-93HA, glicemias de jejum de 4 horas matinal acima de 150 mg/dl já haviam sido constatadas em 54% (27/50) dos CSW, mas em nenhum deles, as glicemias de jejum de 12 horas *overnight* haviam ultrapassado esse nível, embora viessem mostrando padrão crescente e positivamente correlacionada com as glicemias de jejum de 4h matinal (Gráficos 2, 3, 6 e 7). Na 11ª semana, em consumo de AIN-93HA, introduzida na 7ª semana de vida, as glicemias de jejum de 12 horas *overnight* haviam suplantado 150 mg/dl em apenas 40% dos CSW, mas o diagnóstico de DM2 pôde ser confirmado, em 90% dos animais, pela constatação de glicemia maior que 150 mg/dl, em jejum de 4 horas matinal, em pelo menos duas medidas (Gráfico 1). No estudo de Pitombo *et al.* (2006), 100% dos CSW ficaram diabéticos já na oitava semana de dieta hiperlipídica, talvez por conta de sua introdução mais precoce, na 4ª semana de vida. Como os roedores tem hábito alimentar primariamente noturno (AYALA *et al.*, 2010) o jejum de 12 horas *overnight* pode significar deprivação alimentar muito mais extensa do que pretendida. Portanto, em modelo experimental de DM2, pressupõe-se que a dosagem de glicemia após jejum de 4 horas matinal seja a mais apropriada para que, obtido o diagnóstico dessa doença com mais brevidade, se viabilizem as etapas subsequentes em tempo hábil (Gráfico 7).

A detecção de níveis plasmáticos de insulina em todos os grupos, numa pressuposta situação de resistência à insulina e disfunção de células beta pancreáticas, mostra o diagnóstico de DM2 nos CSW anterior à exaustão dessas células (Tabela 11, Gráfico 9).

Cumprindo uma variedade de funções nas células imunes, os AG atuam como combustíveis na geração de energia; como componentes de membranas celulares; como modificadores covalentes da estrutura de proteínas, influenciando sua localização e função celular; como reguladores da expressão de genes; e como precursores de mediadores lipídicos bioativos como prostaglandinas, leucotrienos e resolvinas e protectinas (CALDER, 2008; SCHWAB *et al.*, 2007).

Como parte dos fosfolípidos²² que compõem as membranas celulares, os ácidos graxos PUFAs ($\omega 6$ - AA; $\omega 3$ - EPA e DHA) permitem a passagem de gradientes iônicos e modulam a passagem de hormônios, de substratos, de nutrientes e controlam a sinalização intracelular, sendo importantes mediadores de eventos nucleares como a específica expressão gênica envolvida no metabolismo da glicose e dos lipídeos e na adipogênese (PAN *et al.*, 1995; LOMBARDO; CHICCO, 2006). O DHA se destaca como componente maior das membranas fosfolípídicas do cérebro, como fator de importância nas funções neuronais e como protetor da integridade de membranas. Há particular atenção no aporte alimentar desse PUFA na gestação e no período de lactação para um adequado desenvolvimento do sistema nervoso e dos órgãos da visão do feto e do recém-nascido (VALENZUELA AB; NIETO, 2001). Estudos epidemiológicos indicam que uma alta ingestão de DHA pode ter propriedades protetoras contra doenças neurodegenerativas como a enfermidade de Alzheimer. Estas observações são confirmadas em estudos *in vivo* mostrando que dietas ricas em DHA reduzem lesões sinápticas e defeitos cognitivos induzidos pelo peptídeo β amiloide. Embora as bases moleculares propostas para explicar o efeito neuroprotetor ainda não estejam bem definidas, parece ocorrer regulação na expressão de genes potencialmente protetores, ativação de vias anti-inflamatórias, e modulação das propriedades

²² As membranas celulares são compostas de duas camadas de lipídeos ricos em fosfolípidos.

funcionais de membranas neuronais (VALENZUELA RB; BASCUÑAN; VALENZUELA AB, 2008).

Em estudos experimentais utilizando DHA e EPA isoladamente foram encontradas diferentes respostas celulares. Comparando o efeito de duas preparações de óleo de peixe contendo diferentes concentrações desses dois ácidos graxos foi observado que o EPA tem atividade antialérgica maior que o DHA (HUNG *et al.*, 1999). Noutro estudo, em um modelo animal de artrite em que os roedores foram alimentados utilizando fontes separadas de DHA e EPA, foi evidenciado que o EPA é mais efetivo na supressão da resposta inflamatória em relação ao DHA (VOLKER; FRITZGERALD; GARG, 2000). Recentemente, também utilizando modelo animal, foi investigado o efeito do EPA na prevenção e reversão da obesidade e da homeostase da glicose-insulina induzidos por dieta rica em gordura saturada. Concluiu-se que, em camundongos C57BL/6J, o EPA minimizava a resistência à insulina induzida pela dieta rica em ácidos graxos saturados e atribuíram esse achado, em parte, ao controle da secreção das adipocinas (KALUPAHANA *et al.*, 2010). Outros estudos mostram ainda que os ácidos graxos ω 3 de cadeia longa, provenientes principalmente do óleo de peixe, podem suprimir a produção de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-1 β); aumentar a adiponectina; modular as vias de associadas ao NF- κ B; ativar os receptores PPARs; e manter a via de sinalização da insulina PI3kinase/Akt e GLUT-4 (CALDER, 2002; CALDER, 2006; NESCHEN *et al.*, 2006; FRITSCHKE, 2006; SIMOPOULOS, 2008). A diminuição do risco cardiovascular com o uso de EPA e DHA e o efeito protetor do endotélio vascular pela inibição da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) pelo DHA também foi observada em estudos, parecendo interessante o uso desses ômega-3 como terapêutica complementar em diabéticos (DE CATERINA; MADONNA; MASSARO, 2004; MASSARO *et al.*, 2006).

Em recente estudo, utilizou-se óleo de linhaça rico em ALA na formulação dietética de roedores e foram verificados, nos ratos Zucker obesos, redução da hipertrofia dos adipócitos e dos marcadores inflamatórios TNF- α e MCP-1 comparados com aqueles com dieta de controle (BARANOWSKI *et al.*, 2012)

Conhecido como agente antioxidante, pois confere adequada proteção contra peroxidação lipídica e redução de radicais livres, o azeite de oliva, é o principal componente da dieta do Mediterrâneo, e contém quantidades significativas de MUFA- ácido oleico, vitamina E e diversos componentes fenólicos. Usado até há

pouco tempo como placebo em estudos investigativos sobre efeitos de óleos de peixe na função imunológica, o azeite de oliva mostrou ter, frequentemente, efeitos benéficos mais pronunciados nas doenças inflamatórias em relação aos grupos experimentais que utilizaram o óleo de peixe. Uma alimentação enriquecida de azeite de oliva contribui para a redistribuição da gordura corporal, para adequada eficiência lipolítica dos adipócitos, para a melhora do fluxo na membrana celular, para melhora da sensibilidade à insulina e para o aumento da expressão de adiponectina e a queda da leptina plasmática pós-prandiais (DE LA LASTRA *et al.*, 2001; ASSY *et al.*, 2009). Controle glicêmico, redução da inflamação sistêmica, diminuição do risco cardiovascular pela melhora do perfil lipídico, da função das plaquetas e pela queda da pressão arterial vem sendo frequentemente relatados com o uso dietético do azeite de oliva (BUCKLAND *et al.*, 2012).

Estimativas mostram que a dieta ocidental, da era industrial, exagerada em gorduras saturadas, é também deficiente em ácidos graxos $\omega 3$, com relação $\omega 6:\omega 3$ na razão de 15-20:1, muito elevada em relação àquela do período paleolítico ($\omega 6:\omega 3$: 1,5:1). Esta relação $\omega 6:\omega 3$ elevada e não só uma dieta rica em gorduras saturadas, parece contribuir com o aumento da incidência de várias doenças inflamatórias e cardiovasculares (SIMOPOULOS, 2002). É sugerido que a relação $\omega 6:\omega 3$ não ultrapasse 10 e que a proporção ideal entre esses ômega esteja entre 1:1 e 4:1 para que ocorra efeito anti-inflamatório (SIMOPOULOS, 2002; TODORIC *et al.*, 2006). Defende-se também que a razão $\omega 9:\omega 6$ seja maior que a unidade para que ocorra o efeito antioxidante (HART; GUPTA; VAN EVANOFF, 1997).

Como os camundongos são mamíferos que possuem a mesma rota de síntese dos ácidos graxos poli-insaturados dos humanos, usando enzimas elongases e desaturases (PERINI *et al.*, 2010) foram considerados adequados para a fase experimental propriamente dita. Apropriados de um modelo experimental de CSW diabéticos e obesos compatível com a “meta-inflamação”, desenhou-se então a terceira fase da pesquisa, em que foi administrado MXO com baixa relação de ácido graxos $\omega 6/\omega 3$ e elevada relação $\omega 9/\omega 6$ e com diferentes fontes de $\omega 3$. As MXO compostas de uma razão constante de $\omega 6:\omega 3$: 1,4:1 e $\omega 9:\omega 6$:3,7:1, diferenciada apenas pelo ácido graxo ômega-3 (ALA; EPA + DHA de peixe; e DHA de algas, respectivamente), foram utilizadas para a SO dos CSW nos grupos experimentais (GC, GD e GE). A água foi administrada como elemento nulo (GA) e

para o controle neutro (GB) foi utilizada a MXO 1 com relação $\omega_6:\omega_3$: 8:1 e $\omega_9:\omega_6$: 0,4:1 que não é elevada o bastante para promover inflamação e nem baixa o suficiente para desencadear efeito anti-inflamatório.

A correlação de Spearman foi utilizada para as variáveis não paramétricas IL-6 e RES e observadas correlações moderadamente positivas da IL-6 com a IL-1 β (p: 0,034), com a MCP-1 (p: 0,001) e com a TNF- α (p: 0,000) e negativa com a AdipoQ (p: 0,027); a RES teve correlações positivas com a insulina (p: 0,025), com a LEP (p: 0,001), com o PAI-1 (p: 0,000), com a AdipoQ (p: 0,006) e com o peso dos CSW (p: 0,006) antes da suplementações (Tabela 13). Aplicada a correlação de Pearson para as variáveis paramétricas, observou-se covariação moderadamente positiva: LEP e peso_D (p: 0,024), insulina e PAI-1 (p: 0,017); TNF- α e MCP-1 (p: 0,026); MCP-1 e IL-1 β (p: 0,035); covariação moderadamente negativa entre PAI-1 e glicemia de 12 horas de jejum_D (p: 0,026), entre AdipoQ e TNF- α (p: 0,000) e IL-1 β (p: 0,036); e correlação muito fortemente positiva entre os pesos antes e após a suplementação orogástrica (Tabela 14 e 15). Essas covariações foram compatíveis com todo o processo “meta-inflamatório” relatado neste trabalho.

Observou-se na análise da variável peso em gramas, pelo teste T pareado, que ao final de sete dias de suplementação, houve perda de peso (p: 0,011) (Tabela 9; Gráficos 4 e 5) e aumento das glicemias de jejum de 12 horas *overnight* entre os grupos _A e depois (_D) da suplementação orogástrica nos grupos controle e experimentais ($138,63 \pm 3,17$ versus $159,70 \pm 8,00$; p: 0,015) (Tabelas 10 e 11; Gráficos 6, 7 e 8). No entanto, quando comparadas as médias do peso intergrupo dos CSW, somente no GB foi verificada a perda de peso estatisticamente significativa (Gráfico 5) e como trata-se do grupo controle neutro a explicação mais provável é que foi o grupo que mais apresentou reação ao processo de intubação, embora o consumo alimentar não tenha se alterado. Na análise das médias das glicemias intergrupos, a elevação das glicemias posteriores à SO diferenciada nos grupos GA, GB, GC, GD E GE (Gráfico 8) não foram estatisticamente significantes em relação às glicemias anteriores à suplementação das MXO e do grupo controle nulo. Em estudo de revisão do uso dos ácidos graxos ω_3 no tratamento de diabéticos, observando apenas os randomizados: epidemiológicos; *in vitro*; em animais, destacou que, embora na década passada tenham surgido estudos mostrando distúrbio da homeostase da glicose com o aumento das glicemias de

jejum, das glicemias pós prandiais e da hemoglobina glicada em diabéticos que utilizaram esses ômega3, alerta que a maioria desses estudos tem problemas operacionais como a administração de doses muito elevadas de ω 3 (10-16 g/dia), e conclui que estudos de larga escala são necessários para definir o risco/benefício do uso de suplementação de ω 3 no DM (DE CATERINA *et al.*, 2007).

Houve diferença estatística significativa de: IL-6; LEP; TNF- α ; e AdipoQ do grupo GE (ω 3-DHA de algas), em relação aos outros grupos, com aumento de IL-6 em relação ao GC e GD (p: 0,026); diminuição de LEP em relação ao GA (p: 0,049); aumento de TNF- α em relação aos grupos GB (p: 0,040), GC (p: 0,002) e GD (p: 0,005); e diminuição de AdipoQ em relação ao GB (p: 0,043); assim como de RES entre os grupos GC (ω 3-ALA) e GD (ω 3-EPA+DHA)(p: 0,041). Não se observou diferença estatística significativa, entre os grupos controles (GA e GB), em nenhuma das variáveis experimentadas na terceira etapa desta pesquisa (Tabela 12; Gráficos 9 a 17).

As alterações das adipocinas do grupo suplementado com a MXO 4 contendo DHA de algas (GE) verificadas pelo aumento de TNF- α (inflamatório), em relação ao grupo controle neutro (GB) e aos grupos com ω 3 ALA (GC) e ω 3 de peixe (GD); e pelo aumento de IL-6 (inflamatória) em relação aos grupos GC e GD; e com a diminuição da AdipoQ (anti-inflamatória) em relação ao grupo controle neutro (GB), muito embora diminuída a LEP (inflamatória) em relação ao grupo controle nulo (GA), somadas ao fato de não ter havido, pela estatística, diferença significativa entre as adipocinas dos grupos controles (GA e GB) assim como das adipocinas TNF- α , IL-6 e AdipoQ do GE em relação ao grupo controle nulo (GA), interroga-se: o DHA de algas, na proporção utilizada, possuiria efeito “meta-inflamatório”?; Ou apenas que o DHA na dose utilizada não preveniria os efeitos adversos de uma dieta rica em gordura saturada mesmo com presença de ω 9 na MXO? (Gráficos 10, 12,16, e 17).

Não tendo havido diferença significativa da dosagem de RES dos grupos GC, GD e GE, suplementados com mix de óleo, em relação aos controles GA (água) e GB (óleo neutro), sua diminuição no grupo GC (ω 3 ALA) em relação ao grupo D (ω 3 de peixe), apesar de ser estatisticamente significativa, não confere ao mix contendo ω 3 ALA melhor eficácia anti-inflamatória do que aquele com ω 3 de peixe (Gráfico 15).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as variáveis IL-6, IL-1 β , MCP-1, PAI-1 e TNF- α plasmáticas dos grupos com suplementação do ω 3 ALA (GC) e dos ω 3 EPA + DHA (GD) e as dos grupos controles. Isso pode ter decorrido pelo fato de que todos os grupos permaneceram sob dieta hiperlipídica e/ou pela variabilidade intragrupo (Gráficos 10, 11, 13, 14 e 16).

Em estudo de revisão são resgatados os avanços na compreensão dos mecanismos moleculares e metabólicos relativos aos efeitos dietéticos dos PUFAs (óleo de peixe) com foco sobre a prevenção e/ou a melhora de dislipidemia; RI; alteração da homeostase da glicose; diabetes e obesidade em modelos experimentais animais com alguma extensão em humanos. A substituição parcial ou total de uma dieta rica em gorduras, seja ela saturada e/ou rica em ω 6, pelo óleo de peixe foi efetiva em melhorar a homeostase da glicose em vários estudos. Esses estudos demonstram também que há diferentes efeitos em tecidos específicos como o músculo, o fígado e o tecido adiposo (LOMBARDO; CHICCO, 2006). Daí se recomenda em pesquisas próximas que se mantenha um grupo em dieta normolipídica em fases experimentais posteriores a de crescimento, no modelo empregado. Estudos com tecnologia que permita a análise de proteínas e genes nos tecidos podem responder àquelas perguntas formuladas anteriormente.

Embora vários estudos observacionais, experimentais e clínicos tenham visado determinar o papel dos ácidos graxos em diversos processos saúde/doença, permanece pouco esclarecida a função biológica desses ácidos no complexo metabolismo do DM2. Não se encontrou na literatura científica, até o momento, estudos como este em que se utilizou suplementação dietética a base de óleos com baixa relação ω 6/ ω 3 e elevada relação ω 9/ ω 6 em modelo animal com DM2.

O “estado da arte” demanda outras investigações para que se esclareça o papel do DHA e de outros AG na “meta-inflamação”, muito embora dele já se depreenda que um equilíbrio inflamação/anti-inflamação, de lastro evolutivo, em processos saúde/doença, organicamente perscrutado do nível tecidual ao molecular, estaria se perturbando na vida humana, de dimensão histórica, por determinação social.

6 CONCLUSÃO

O grupo de CSW suplementado com MXO 4 contendo DHA de algas com relação $\omega 6:\omega 3$: 1,4:1 e $\omega 9:\omega 6$: 3,7:1 mostrou aumento significativo de adipocinas inflamatórias (TNF- α e IL-6) e diminuição de outra (AdipoQ) de natureza anti-inflamatória. A continuidade de uma dieta hiperlipídica, rica em gordura saturada, pode ter comprometido a eficácia da suplementação de MXO ricos em $\omega 3$ e $\omega 9$.

REFERÊNCIAS

- AI-HAMODI, Z.; ISMAIL, I. S.; SAIF-ALI, R.; AHMED, K. A.; MUNIANDY, S. Association of plasminogen activator inhibitor-1 and tissue plasminogen activator with type 2 diabetes and metabolic syndrome in Malaysian subjects. **Cardiovasc Diabetol**, v. 10, n.23, p. 1-9, 2011.
- ANDRADE, P. M. M.; DO CARMO, M. G. T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. **Rev Mn- Metabólica**, v. 8, n. 3, p. 135- 143, 2006.
- ANTHONSEN, M. W.; RÖNNSTRAND, L.; WERNSTEDT, C.; DEGERMAN, E. and HOLM, C. Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. **J Biol Chem**, v. 273, n. 1, p. 215-21, 1998.
- ARAKI, E.; LIPES, M. A.; PATTI, M-E.; BRÜNING, J. C.; HAAG III, B.; JOHNSON, R. S.; KAHN, C.R. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, v. 372, n. 6502, p. 186-90, 1994.
- ARNER, P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. **Trends Endocrinol Metabol**, v. 14, n. 3, p. 137-45, 2003.
- ASSY, N.; NASSAR, F.; NASSER, G.; GROSOVSKI, M. Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 15(15), p. 1809-1815, 2009.
- AYALA, J. E.; VARMAN, T.; SAMUEL, V. T.; MORTON, G. J.; OBICI, S.; CRONIGER, C. M.; SHULMAN, G. I.; DAVID, H.; WASSERMAN, D. H.; MCGUINNESS, O. P. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. **Dis Model Mech** v.3, p.525-534, 2010.
- BACKER, J. M.; MYERS JR, M. G.; SHOELSON, S. E.; CHIN, D. J.; SUN, X-J.; MIRALPEIX, M.; HU', P.; MARGOLIS, B.; SKOLNIK, E. Y.; SCHLESSINGER, J.; WHITE, M. F. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **EMBO J**, v. 11, n. 9, p. 3469-79, 1992.
- BALKAU, B.; CHARLES, M. A.; DRIVSHOLM, T.; BORCH-JOHNSEN, K.; WAREHAM, N.; YUDKIN, J. S.; MORRIS, R.; ZAVARONI, I.; VAN DAM, R.; FESKINS, E.; GABRIEL, R.;DIET, M.; NILSSON, P.; HEDBLAD, B. Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. **Diabetes Metab**, v. 28, n. 5, p. 364-76, 2002.
- BARANOWSKI, M.; ENNS, J.; BLEWETT, H.; YAKANDAWALA, U.; ZAHRADKA, P.; TAYLOR, C. G. Dietary flaxseed oil reduces adipocyte size, adipose monocyte chemoattractant protein-1 levels and T-cell infiltration in obese, insulin-resistant rats. **Cytokine**, v. 59, p. 382-391, 2012.
- BASTARD, J-P.; MAACHI, M.; LAGATHU, C., KIM, M. J.; CARON, M.; VIDAL, H.; CAPEAU, J.; FEVE, B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 17, n. 1, p. 4-12, 2006.

BAUMANN, C. A.; RIBON, V.; KANZAKI, M.; THURMOND, D. C.; MORA, S.; SHIGEMATSU, S.; BICKEL, P. E.; PESSIN, J. E.; SALTIEL, A.R. CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 202-7, 2000.

BENNET, P. H.; KNOWLER, W. C. Definição, Diagnóstico e Classificação do Diabetes Mellitus e da Homeostasia da Glicose. In: KAHN, C. R.; WEIR, G. C.; KING, G. L. et al. **Joslin: diabetes mellitus**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. p.345-346.

BIOTÉRIO CENTRAL UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ. Disponível em:<http://www.bioteriocentral.ufc.br/fisiologia_roedor.html>. Acesso em 15 jun. 2012.

BOGAN, J. S.; HENDON, N.; MCKEE, A. E.; TSAO, T. S.; LODISH, H. F. Functional cloning of TUG as a regulator of GLUT4 glucose transporter trafficking. **Nature**, v. 425, n. 6959, p. 727-33, 2003.

BRESSAN, J. Impacto hormonal e inflamatório de diferentes composições dietéticas: ênfase em padrões alimentares e fatores dietéticos específicos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 5, p. 572-581, 2009.

BROWN, A. J.; JESSUP, W. Oxysterols and atherosclerosis. **Atherosclerosis**. v.142, n.1, p.1-28, 1999.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813-20, 2001.

BUCKLAND, G.; MAYEN, A. L.; AGUDO, A.; TRAVIER, N.; NAVARRO, C.; HUERTA, J. M.; CHIRLAQUE, M. D.; BARRICARTE, A.; ARDANAZ, E.; MORENO-IRIBAS, C.; MARIN, P.; QUIRÓS, J. R.; REDONDO, M-L.; AMIANO, P.; DORRONSORO, M.; ARRIOLA, L.; MOLINA, E.; SANCHEZ, M-J.; GONZALEZ, C. A. Olive oil intake and mortality within the Spanish population (EPIC_SPAIN). **Am J Clin Nutr**, v. 96, p. 142-149, 2012.

CAI, D.; YUAN, M.; FRANTZ, D. F.; MELENDEZ, P. A.; HANSEN, L.; LEE, J.; SHOELSON, S. E. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. **Nat Med**, v. 11, n. 2, p. 183-90, 2005.

CALDER, P. C.; YAQOUB, P.; THIES, F; WALLACE F. A.; MILES E. A. Fatty acids and lymphocyte functions. **BJM**, v. 87 Suppl 1, p. 31-48, 2002.

CALDER, P. C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. **PLEFA**, v. 77, n. 5-6, p. 327-35, 2007.

_____. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 6, p. 1505-1519, 2006.

_____. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. **PLEFA**, v.79, p. 101-108, 2008.

- CARVALHEIRA, J. B. C.; SILOTO, R. M. P.; IGNACCHITTI, I.; BRENELLI, S. L.; CARVALHO, C. R. O.; LEITE, A.; VELLOSO, L. A.; GONTIJO, J. A.R.; SAAD, M. J. A. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. **FEBS Lett**, v. 500, n. 3, p. 119-24, 2001.
- CARVALHEIRA, J.B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.
- CARVALHO, M. H. C. ;DE COLAÇO, A. L.; FORTES, Z. B. Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n. 2, p. 304-312, 2006.
- CAWTHORN, W. P.; SETHI, J. K. TNF-alpha and adipocyte biology. **FEBS Lett**, v. 582, n. 1, p. 117-31, 2008.
- CHIANG, S. H; BAUMANN, C. A.; KANZAKI, M.; THURMONDI, D. C.; WATSON, R. T.; NEUDAUER, C. L.; MACARA, I. G.; PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. **Nature**, v. 410, n. 6831, p. 944-8, 2001.
- CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 28, n.1, p.11-23, 2007.
- CHRYSOHOOU, C.; PANAGIOTAKOS, D. B.; PITSAVOS, C.; DAS, V. N.; STEFANADIS, C. Adherence to the Mediterranean diet attenuates inflammation and coagulation process in healthy adultsThe Attica study. **J Am Coll Cardiol**, v. 4, n.1, p.152-158, 2004.
- CROSS, D. A.; ALESSI, D.R.; VANDENHEEDE, J. R.; MCDOWELL, H. E.; HUNDAL, H. S.; COHEN, P. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v. 378, n. 6559, p. 785-9, 1995.
- CZECH, M. P.; CORVERA, S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. **J Biol Chem** ,v. 274, n. 4, p. 1865-8, 1999.
- DANDONA, P.; AJMAD, A.; BANDYOPADHYAY, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends Immunol.** v. 25, n.1, p. 4-7, 2004.
- DARMON, M.; DE VERNEUIL, H. Transcrição. In: LAVOINNE, A.; DE VERNEUIL, H.; KAMON, P. **Bioquímica e biologia molecular**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 2006.
- DE CATERINA, R.; MANDONA, R.; BERTOLOTTO A.; SCHIMIDT, E. B. N3-Fatty Acids in the treatment of Diabetic Patients. **Diabetes Care**, v.40, n. 4, p.1012-1026, 2007.
- DE CATERINA, R., MADONNA, R., MASSARO, M. Effects of omega-3 fatty acids on cytokines and adhesion. **Curr Atheroscler Rep.**, v. 6 n.6, p. 485-91, 2004.

DE LA LASTRA, C. A.; BARRANCO, M. D.; MOTILVA, V.; HERRERÍAS, J. M. Mediterranean Diet and Health: Biological Importance of Olive Oil. **Curr Pharmaceut Des**, v. 7, p. 933-950, 2001.

DE LORGERIL, M.; RENAUD, S. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. **Lancet**, v. 3433, Issue 891, p. 1454, 1994.

DENG, Y.; SCHERER, P. E. Adipokines as novel biomarkers and regulators of metabolic syndrome. **Ann N Y Acad Sci**. ISS 0077-8923, 2010.

DE SOUZA, C. T.; ARAÚJO, E. P.; BORDIN, S.; ASHIMINE, R.; ZOLLNER, R. L.; BOSCHERO, A. C.; SAAD, M. L. A.; VELLOSO, L. A. Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice. **Diabetologia**, v.48, p. 1860-1871, 2005.

DINARELLO, C. A.; DONATH, M. Y.; MANDRUP-POULSEN, T. Role of IL-1 β in type 2 diabetes. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v.17, n.4, p.314-21, 2010.

DONATO JR., J.; FRAZÃO, R.; ELIAS, C. F. The PI3K signaling pathway mediates the biological effects of leptin. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 54(7), p 591-602. 2010

EMANUELLI, B.; PERALDI, P.; FILLOUX, C.; CHAVEY, C.; FREIDINGER, K.; HILTON, D. J.; HOTAMISLIGIL, G. S.; OBBERGHEN, E. V. SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor- α in the adipose tissue of obese mice. **J Biol Chem**, v. 276, n. 51, p. 47944-9, 2001.

FANTIN, V. R.; WANG, Q.; LIENHARD, G. E.; KELLER, S. R. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 278, n. 1, p. E127-33, 2000.

FELLER, S. M. Crk family adaptors - signalling complex formation and biological roles. **Oncogene**, v.20, p. 6348-6371, 2001.

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, I. C.; LIMA, F. B. Tecido adiposo como órgão endócrino: da teoria à prática. **J Pediatr** v. 83, n. 5, p. S192-S203, 2007.

FRITSCHKE, K. Fatty acids as modulators of the immune response. **Annu Rev Nutr**, v. 26, p. 45-73, 2006.

FRÜHBECK, G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. **Biochem J**, v. 393, p. 7-20, 2006.

FUJIMOTO, W. Y. The importance of insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Am J Med**, v. 108, Suppl , p. 9S-14S, 2000.

FURTADO, M. L.; POON, V.; KLIP, A. GLUT4 activation: thoughts on possible mechanisms. **Acta Physiol Scand**, v. 178, n. 4, p. 287-96, 2003.

GERALDO, J. M.; ALFENAS, R. C. G. Papel da Dieta na Prevenção e no Controle da Inflamação Crônica – Evidências Atuais. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, n.6, p.951-967, 2008.

GRAZIOLA, F., SOLIS, V.S., CURI, R., Estrutura Química e Classificação dos ácidos graxos. *In*: CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCÓPIO, J. **Entendendo a gordura**. São Paulo: Ed. Manole, 2002. p. 7-23.

GERICH, J. E. Is insulin resistance the principal cause of type 2 diabetes? **Diabetes Obes Metab**, v. 1, n. 5, p. 257-63, 1999.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, GÖKHAN S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 415-45, 2011.

GUERRE MILLO, M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. **Diabetes Metab**, 30, p.13-9, 2004.

HABER, E. P.; CURI, R.; CARVALHO, C. R. O.; CARPINELLI, A. R. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 45, n. 3, p.219-227, 2001.

HART, C. M., GUPTA, M. P., VAN EVANOFF, V. Oleic acid reduces oxidant stress in cultured pulmonary artery endothelial cells. **Exp Lung Res.**, v.23, n.5, p. 405-25, 1997.

HOTAMISLIGIL, G. S.; ARNER, P.; CARO, J.F.; ATKINSON, R. L.; SPIEGELMAN, B. M. Increased Adipose Tissue Expression of tumor Necrosis Factor- α in Human Obesity and Insulin Resistance. **J Clin Invest**, v.95, p. 2409-2415, 1995.

HOTAMISLIGIL, G. S. The role of TNF α and TNF receptors in obesity and insulin resistance. **Journal of internal medicine**, v. 245, n. 6, p. 621-5, 1999.

_____. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 24, Suppl 4, p. S23-7, 2000.

HOTAMISLIGIL, G. S; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, 1993.

HOTAMISLIGIL, G. S.; MURRAY, D. L.; CHOY, L. N.; SPIEGELMAN, B. M. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. **Diabetes**, v. 43, n. 11, p. 1271-8, 1994.

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

INTERACT CONSORTIUM. Design and cohort description of Inter Act Project: an examination of the interaction of genetic and lifestyle factors on the incidence of type 2 diabetes in the EPIC Study. **Diabetologia**, v. 54, p. 2272-2282, 2011.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **The Global Burden**. Disponível em: <<http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/the-global-burden>>. Acesso em: 26 maio 2012.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Diabetes Atlas**. Disponível em: <<http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/diabetes-and-the-millennium-development-goals>>. Acesso em: 6 jun. 2012.

JAMES, J. J.; GIBSON, R. A.; CLELAND, L. G. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. **Am J Clin Nutr**, v. 71 (suppl), p. 343S-8S, 2000.

JIANG, Z. Y.; ZHOU, Q. L.; COLEMAN, K. A.; CHOUINARD, M.; BOESE, Q.; CZECH, M. P. Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. **Proc Natl Acad Sci. USA**, v. 100, n. 13, p. 7569-74, 2003.

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

KAHN, S. E. The Importance of β -Cell Failure in the Development and Progression of Type 2 Diabetes. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 86, n. 9, p. 4047-4058, 2001.

KALUPAHANA, N. S.; CLAYCOMBE, K.; NEWMAN, S. J.; STUART, T.; SIRIWARDHANA, N.; MATTHAN, N.; LICHTENSTEIN, A. H.; MOUSTAID-MOUSSA, N. Eicosapentaenoic Acid Prevents and Reverses Insulin Resistance in High-Fat - Induced Obese Mice via Modulation of Adipose Tissue Inflammation. **J Nutr**, v. 140, p. 1915-1922, 2010.

KANDA, H.; TATEYA, S. TAMORI, Y.; KOTANI, K.; HIASA, K.; KITAZAWA, R.; KITAZAWA, S.; MIYACHI, H.; MAEDAS, S.; EGASHIRA, K.; KASUGA, M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **J Clin Invest**, v. 116 n. 6, p.1494-1505, 2006.

KANG, J. X.; WEYLANDT K. H. Modulation of inflammatory cytokines by omega-3 fatty acids. **Subcell Biochem.** v. 49, p.133-43, 2008.

KARLSSON, H. K. R.; ZIERATH, J. R.; KANE, S.; KROOK, A.; LIENHARD, G. E.; WALLBERG-HENRIKSSON, H. Insulin-stimulated phosphorylation of the Akt substrate AS160 is impaired in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1692-7, 2005.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **J Clin Endocrinol Metab** v. 89, n. 6, p. 2548-56, 2004.

- KIDO, Y.; BURKS, D. J.; WITHERS, D.; BRUNING, J. C.; KAHN, C. R.; WHITEIM, F.; ACCILI, D. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. **J Clin Invest**, v. 105, n. 2, p. 199-205, 2000.
- KITAMURA, T.; KITAMURA, Y.; KURODA, S.; HINO, Y.; ANDO, M.; KOTANI, K.; KONISHI, H.; MATSUZAKI, H.; KIKKAWA, U.; OGAWA, W.; KASUGA, M. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 9, p. 6286-96, 1999.
- KITAMURA, T.; OGAWA, W.; SAKAUE, H.; HINO, Y.; KURODA, S.; TAKATA, M.; MATSUMOTO, M.; MAEDA, T.; KONISHI, H.; KIKKAWA, U.; KASUGA, M. Requirement for activation of the serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport. **Mol Cell Biol**, v. 18, n. 7, p. 3708-17, 1998.
- KNOBELSPIES, H.; ZEIDLER, J.; HEKERMAN, P.; BAMBERG-LEMPER, S.; BECKER W. Mechanism of attenuation of leptin signaling under chronic ligand stimulation. **BMC Biochemistry**,. p. 11-:2, 2010.
- KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635-43, 6, 2000.
- KOTANI, K.; OGAWA, W.; MATSUMOTO, M.; KITAMURA, T.; SAKAUE, H.; HINO, Y.; MIYAKE, K.; SANO, W.; AKIMOTO, K.; OHNO, S.; KASUGA, M. Requirement of atypical protein kinase clambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. **Mol Cell Biol**, v. 18, n. 12, p. 6971-82, 1998.
- KUBAR, J.; ROCHET, N. Basal autophosphorylation of insulin receptor occurs preferentially on the receptor conformation exhibiting high affinity for insulin and stabilizes this conformation. **Cell Signal**, v. 2, n. 6, p. 587-594, 1990.
- LI, Y.; JIANG, C.; GUOHENG, X.; WANG, N.; ZHU, Y.; TANG, C.; WANG, X. Homocysteine Upregulates Resistin Production From Adipocytes In Vivo and In Vitro. **Diabetes**, v.57, p.817–827, 2008.
- LIANGYOU, R.; YUAN, M.; FRANTZ, D.; SHOELSON, S. WHITE, M. F. SOCS-1 and SOCS-3 Block Insulin Signaling by Ubiquitin-mediated degradation of IRS1 e IRS2. **J Biol Chem**, v. 277, n. 44 Issue 1, p. 42394-42398, 2002
- LIU, S. C.; WANG, Q.; LIENHARD, G. E.; KELLER, S. R. Insulin receptor substrate 3 is not essential for growth or glucose homeostasis. **J Biol Chem**, v. 274, n. 25, p. 18093-9, 1999.
- LOMBARDO, Y. B.; CHICCO, A. G. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. **J Nutr Biochem**, v. 17, p. 1 –13, 2006.
- LYON, C. J.; LAW, R. E.; HSUEH, W. A. Adiposity, Inflammation, and Atherogenesis. **Endocrinology**, v.144 , n.6, p. 2195-2200, 2003.

MASHSRANI, U.; GERMAN, M S. Pancreatic Hormones & Diabetes Mellitus. *In: GARDNER, D. G.; SHOBACK, D. Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology*. 8. ed. [S. L.], 2007. p. 661-747.

MASSARO, M.; HABIB, A.; LUBRANO, L.; DEL TURCO, S.; LAZZERINI, G.; BOURCICER, T.; WEKSLER, B. B.; DE CATERINA, R. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate attenuates endothelial cyclooxygenase-2 induction through both NADP(H) oxidase and KC£ inhibition. **Proc Natl Acad Sci**, v. 103, n. 41, p. 15184-15189, 2006.

MARTIN, C. A.; ALMEIDA, M. R.; VISENTAINER, E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Rev Nutr.**, Campinas, v.19, n.6, p. 761-770, 2006.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Rev Immunol**, v. 1, n. 2, p. 135-45, 2001.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Innate immunity. **N Engl J Med**, v. 343, n. 5, p. 338-44, 3, 2000.

MILASNKI, M.; DEGASPERI, G.; COOPE, A.; MORARI, J.; DENIS, R.; CINTRA, D. E.; TSUKUMO, D. M.; ANHE, G.; AMARAL, M. E.; TAKAHASHI, H. K.; CURI, R.; OLIVEIRA, H. C.; CAVALHEIRA, J. B.; BORDIN, S.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A. Saturated Fatty acids produces an Inflammatory Response Predominantly through the Activation of TLR4 Signaling in Hypothalamus: Implication for the Pathogenesis of Obesity. **J Neurosc.** v. 29, n.2, p. 359-370, 2009.

MOONEY, R. A.; SENN, J.; CAMERON, S.; INAMDAR, N.; BOIVIN, L. M.; SHANG, Y.; FURLANETTO, R. W. Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. **J Biol Chem**, v. 276, n. 28, p. 25889-93, 2001.

MORANI, J.; TORSONI, A. S.; ANHÊ, G. F.; ROMAN, E. A.; CINTRA, D. E.; WARD, L. S.; BORDIN, S.; VELLOSO, L. A. The role of proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α in the fatty-acid-dependent transcriptional control of interleukin-10 in hepatic cells of rodents. **Metabolism**, v. 59, p 215-223, 2010.

MUOIO, D. M.; NEWGARD, C. B. 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, p. 193-205, 2008.

NEELS, J. G.; PANDEY, M.; HOTAMISLIGIL, G. S.; SAMAD, F. Autoamplification of tumor necrosis factor-alpha: a potential mechanism for the maintenance of elevated tumor necrosis factor-alpha in male but not female obese mice. **Am J Pathol**, v. 168, n. 2, p. 435-44, 2006.

NESSCHEN, S.; NESSCHEN, S.; MORINO, K.; ROSSBACHER, J. C.; PONGRATZ, R. L.; CLINE, G. W.; SONO, S.; GILLUM, M.; SHULMAN, G. L. Fish Oil Regulates

Adiponectin Secretion by a Peroxime Proliferator-Activated Receptor γ -Dependent Mechanism in mice. **Diabetes**, v.55, p. 924-928, 2006.

PAIVA, F. P.; MAFFILLI, V. V.; SANTOS, A. C. S. **Curso de Manipulação de Animais de Laboratório**. Salvador: Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, 2005. Disponível em: < http://www.bioteriocentral.Fiocruz_manipulação.pdf >. Acesso em: 16 jul. 2011.

PAN, D.A.; LILLIOJA, S.; KRIKITOS, A. D.; MILNER, M. R.; BAUR, L. A. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. **Diabetes**, v. 46, n.6, p. 983-988, 1997.

PALANÍVEL, R.; MAIDA, A.; LIU, Y.; SWEENEY, G. Regulation of insulin signaling, glucose uptake and metabolism in rat skeletal muscle cells upon prolonged exposure to resistin. **Diabetologia**, v. 40, p. 183-190, 2006.

PEREIRA, L. O; DE FRANCISCHI, R. P; LANCHETA JR., A. H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 47, n. 2, p. 111-127, 2003.

PERINI J. A. L.; STEVANATO, F. B.; SARGI, S. C.; VISENTAINER, J. E. L.; DALALIO, M. M. O; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Rev Nutr**, v.23, n.6, p. 1075-1086, 2010.

PERROT, V.; RECHLER, M. M. The coactivator p300 directly acetylates the forkhead transcription factor Foxo1 and stimulates Foxo1-induced transcription. **Mol Endocrinol**, v. 19, n. 9, p. 2283-98, 2005.

PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J Clin Invest.**, v. 106, n. 2, p. 165-9, 2000.

PICKUP, J. C. Inflammation and Activated Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. 3, p. 813-823, 2004.

PILKIS, S. J.; GRANNER, D. K. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Annu Rev Physiol**, v. 54, p. 885-909, 1992.

PINHEIRO, P. M. A. **Pré-condicionamento com mistura de óleos ômega-3, 6 e 9 na isquemia e reperfusão cerebral em ratos**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2011.

PITOMBO, C.; ARAÚJO, E. P.; SOUZA, C. T. DE; PAREJA, J. C.; GELONEZE, B. Amelioration of diet-induced diabetes mellitus by removal of visceral fat. **J Endocrinol**, v.191, p.699-706, 2006.

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

RANDLE, P. J.; GARLAN, P. B.; HALES, C. N.; NEWSHOLME, M. A. The glucose fatty-acid cycle its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, v. 281, n. 7285, p. 785-789, 1963.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY Jr., G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, 1993.

RIBON, V.; SALTIEL, A. R. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. **Biochem J**, v. 324, p. 839-45, 1997.

RODRIGUES, L. E .A. F. **Papel dos lisossomos nos processos inflamatórios: efeitos do ion zinco sobre os componentes do compartimento lisossômico.** 1986. Tese (doutorado) .-- Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, 1986.

RUAN, H.; LODISH, H. F. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 14, n. 5, p. 447-55, 2003.

RUXTON, C. H. S.; REED, S. C.; SIMPSON, M. J. A.; MILLINGTON, K. J. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. **J Hum Nutr Dietet**, 17, p. 449-459, 2004.

SAAD, M. J.; CARVALHO, C. R.O.; THIRONE, A. C. P.; VELLOSO, L. A. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. **J Biol Chem**, v. 271, n. 36, p. 22100-4, 1996.

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

SAMAD, F. Tumor necrosis factor alpha is a key component in the obesity-linked elevation of plasminogen activator inhibitor 1. **Proc Natl Acad Sci**, v. 96, n. 12, p. 6902-6907, 1999.

SANDERS, L. J. From Thebes to Toronto and the 21st Century: An Incredible Journey. **Diabetes Spectrum**, v.15, n. 1, p 56, 2002.

SANO, H.; KANE, S.; SANO, E.; MIINEA, C. P.; ASARA, J. M.; LANE, W. S.; GARNER, C. W.; LIENHARD, G. E. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. **J Biol Chem**, v. 278, n. 17, p. 14599-602, 2003.

SCHWAB, J. M.; CHIANG, N.; ARITA, M.; SERHAN, C. N. Resolvin E1 and Protectin D1 Activate Inflammation-Resolution Programs. **Nature**, v. 447, n.7146, p. 869-874, 2007.

SCHIMDT, M. I. Diabesidade- uma doença inflamatória e metabólica. **Rev Med UCPel**, Pelotas, v.2, n.2, p. 11-12, 2004.

SENN, J. J. Interleukin-6 Induces Cellular Insulin Resistance in Hepatocytes. **Diabetes**, v. 51, 2002.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 116, n. 7, p. 1793-801, 2006.

SHOJIMA, N.; SAKODA, H.; OGIHARA, T.; FUJISHIRO, M.; KATAGIRI, H.; ANAI, M.; ONISHI, Y.; ONO, H.; INUKAI, K.; ABE, M.; FUKUSHIMA, Y.; KIKUCHI, M.; OKA, Y.; ASANO, T. Humoral regulation of resistin expression in 3T3-L1 and mouse adipose cells. **Diabetes**, v. 51, n. 6, p. 1737-44, 2002.

SHULMAN, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 106, n. 2, p. 171-6, 2000.

SIMOPOULOS, A. P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **Am J Clin Nutr**, v. 70 (suppl), p. 560S-9S, 1999.

_____. Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases. **J of Am Coll Nutr**, v. 21, n. 6, p.495–505, 2002.

_____. The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular. **Exp Biol Med**, v. 233, p. 674-688, 2008.

SPIEGELMAN, B. M.; FLIER, J S. Obesity and the regulation of energy balance. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 531-43, 2001.

STEPAN, C. M.; WANG, J.; WHITEMAN, E. L.; BIRNBAUM, M. J.; LAZAR, M. A. Activation of SOCS-3 by resistin. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 4, p. 1569-75, 2005.

TAPIERO, H.; BA, G. N.; COUVREUR, P.; TEW, K. D. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomed Pharmacother**, v. 56, p. 215–222, 2002.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Rev Immunol**, v. 6, n. 10, p. 772-83, 2006.

TODORIC, J.; LÖFFLER M.; HUBER, J; BILBAN, M.; REIMERS, M.; KADL, A.; ZEYDA, M.; WALDHÄUSL, W.; STULNIG, T. M. Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by *n*-3 polyunsaturated fatty acids. **Diabetologia**, v. 49, p. 2109–2119, 2006.

TSUKUMO, D. M. L.; CARVALHO-FILHO, M. A.; CARVALHEIRA, J. B. C.; PRADA, P. O.; HIRABARA, S. M.; SCHENKA, A. A.; ARAÚJO, E. P.; VASSALLO, J.; CURI, R.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J. A. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 8, p. 1986-98, 2007.

UEKI, K.; KONDO, T.; KAHN, C. R. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of

insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 12, p. 5434-46, 2004.

UYSAL, K. T.; WIESBROCK, S. M.; HOTAMISLIGIL, G S. Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF-alpha-mediated insulin resistance in genetic obesity. **Endocrinology**, v. 139, n. 12, p. 4832-8, 1998.

VALENZUELA, A. B., NIETO, S. M. Ácido docosahexaenoico (DHA) en el desarrollo fetal y en la nutrición materno-infantil. **Rev Méd Chile**, Santiago, v. 129, n. 10, 2001.

VALENZUELA, R. B.; BASCUÑAN, K. G.; VALENZUELA, A. B. Ácido docosahexaenoico (DHA): una perspectiva nutricional para prevención de la enfermedad de alzheimer. **Rev Chil Nutri**, v.35, s. 1, p. 250-261, 2008.

VELLOSO, L. A. O controle hipotalâmico da fome e da termogênese: implicações no desenvolvimento da obesidade. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n. 2, p. 165-176, 2006.

VERLENIA, R.; DE LIMA, T. M. Síntese dos Ácidos Graxos. *In*: CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C. K. **Entendendo as gorduras**. São Paulo: Editora Manole Ltda, 2002. p.121-133.

VOLKER, D. H.; FRITZGERALD, P. E.; GARG, M. L. The eicosapentaenoic to docosahexaenoic acid. ratio of diets affects the pathogenesis of arthritis in Lew/SSN rats. **J. Nutr.**,v.130, p. 559-565, 2000.

WEIR, G. C.; BONNER-WEIR, S. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. **Diabetes**, v. 53 ,Suppl 3, p. S16-21, 2004.

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

_____. Inflammation, stress, and diabetes. **J Clin Invest**, v. 115, n. 5, p. 1111-9, 2005.

WEN, H.; GRIS, D.; LEI, Y.; JHA, S.; ZHANG, L.; HUANGIM, T.; BRICKEY, W. J.; THING, J. P. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. **Nat Immunol**, v.12, n. 5, p. 408-415, 2011.

WEST, M. Dead adipocytes and metabolic dysfunction: recent progress. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 16, n. 2, p. 178-82, 2009.

WEYER, C.; BOGARDUS, C.; MOTT, D. M.; PRATLEY, R. E. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **J Clin Invest**, v. 104, n. 6, p. 787-94, 1999.

WHITE, M. F. The insulin signalling system and the IRS proteins. **Diabetologia**, v. 40, Suppl 2, p. S2-17, 1997.

WITHERS, D. J.; GUTIERREZ, J. S.; TOWERY, H. BURKS, D. J.; REN, J.; PREVIS, S.; ZHANG, Y.; BERNAL, D.; PONS, S.; SHULMAN, G. I.; BONNER-WEIR, S.; WHITE, M. F. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. **Nature**, v. 391, n. 6670, p. 900-4, 1998.

YAMAGUCHI N, N.; ARGUETA, J. G. M.; MASUHIRO, Y.; KAGISHITA, M.; NONAKA, K.; SAITO, T.; HANAZAWA, S.; YAMASHITA, Y. Adiponectin inhibits Toll-like receptor family-induced signaling. **FEBS Lett**, v.579, p.6821–6826, 2005.

YANO, Y.; SUMIDA, Y.; BENZING, C. F.; ROBINSON, F. W.; KONO, T. Primary sites of actions of staurosporine and H-7 in the cascade of insulin action to glucose transport in rat adipocytes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1176, n. 3, p. 327-32, 1993.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 782-7, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE A – PESO GA e GB

GA		Peso em gramas dos CSW									
data	dieta / data	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
08.06.11	AIN93G Inicial	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	14,0	11,0	13,0	12,0	14,0
02.07.11	AIN93G Final / AIN93HA Inicial	29,0	28,5	30,0	29,5	28,0	35,0	29,5	33,0	27,5	29,0
23.07.11	AIN93HA 3 (S)	36,5	38,0	42,5	42,0	41,0	47,0	37,5	46,5	35,0	40,5
13.08.11	AIN93HA 6 (S)	39,0	42,5	48,0	48,5	44,5	53,0	42,0	52,5	39,0	46,0
03.09.11	AIN93HA 9 (S)	42,5	51,0	52,5	54,0	51,5	57,0	47,0	57,0	42,0	52,0
18.09.11	AIN93HA Final	45,0	57,0	58,0	57,0	57,0	59,0	51,0	60,0	45,5	57,0
20.09.11	AIN93HA +H2O		56,5	57,0		57,0	59,0		59,5	45,5	
23.09.11	AIN93HA +H2O		55,5	55,0		56,5	59,5		59,0	44,5	
26.09.11	AIN93HA +H2O		57,0	54,0		56,5	60,0		60,0	46,0	
27.09.11	AIN93HA +H2O		56,0	54,5		57,0	59,0		58,5	45,5	

S: semana

 NDM

 Excluído por critério

 Morte

GB		Peso em gramas dos CSW									
data	dieta / data	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
08.06.11	AIN93G Inicial	11,5	12,0	11,5	12,0	10,5	11,0	13,0	11,5	10,5	13,0
02.07.11	AIN93G Final / AIN93HA Inicial	26,0	33,0	30,0	31,0	30,5	30,0	35,0	30,0	29,0	27,5
23.07.11	AIN93HA 3 (S)	32,0	41,5	39,0	40,0	41,0	41,0	43,0	38,0	40,0	36,0
13.08.11	AIN93HA 6 (S)	34,0	49,0	42,5	45,5	48,0	48,0	48,0	44,0	45,5	39,0
03.09.11	AIN93HA 9 (S)	37,0	53,0	47,0	51,5	52,5	54,0	52,0	47,0	50,0	45,0
18.09.11	AIN93HA Final	37,5	58,0	50,0	54,5	54,0	58,0	57,5	50,5	54,5	48,5
20.09.11	AIN93HA + MXO 1	37,5	57,0		54,0		58,0	58,0		55,0	
23.09.11	AIN93HA + MXO 1	36,5	55,5		53,0		58,5	56,0		53,5	
26.09.11	AIN93HA + MXO 1	36,5	55,5		54,0		59,0	52,0		52,0	
27.09.11	AIN93HA + MXO 1	35	53,5		54,0		57,0	51,5		51,0	

S: semana

 NDM

 Excluído por critério

 Morte

APÊNDICE B - PESO GC e GD

GC		Peso em gramas dos CSW									
data	dieta / data	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
08.06.11	AIN93G Inicial	12,5	11,0	11,5	10,0	11,5	12,5	11,0	11,0	12,0	11,0
02.07.11	AIN93G Final / AIN93HA Inicial	31,5	28,0	32,5	29,5	30,0	34,5	32,0	30,0	35,0	30,0
23.07.11	AIN93HA 3 (S)	40,5	36,5	42,5	40,0	41,0	42,0	42,0	38,0	47,5	40,5
13.08.11	AIN93HA 6 (S)	46,5	43,0	48,5	46,5	47,0	45,5	45,0	41,5	53,0	44,5
03.09.11	AIN93HA 9 (S)	48,5	49,0	53,0	52,0	50,0	51,0	50,5	44,0	57,0	47,5
18.09.11	AIN93HA Final	53,0	57,0	57,5	55,0	54,0	55,0	54,5	46,0	59,0	51,0
20.09.11	AIN93HA + MXO 2			57,0	55,0	54,5	55,5		46,5		50,5
23.09.11	AIN93HA + MXO 2			57,5	54,0	55,0	54,0		46,0		51,0
26.09.11	AIN93HA + MXO 2			57,5	55,0	54,0	54,0		46,0		51,0
27.09.11	AIN93HA + MXO 2			57,0	55,0	55,5	54,5		46,5		51,5

S: semana

 NDM

 Excluído por critério

 Morte

GD		Peso em gramas dos CSW									
data	dieta / data	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
08.06.11	AIN93G Inicial	11,0	10,5	11,0	12,0	12,0	12,0	12,0	11,5	10,0	10,0
02.07.11	AIN93G Final / AIN93HA Inicial	27,0	28,0	29,5	32,5	31,0	31,0	30,5	32,5	28,0	31,0
23.07.11	AIN93HA 3 (S)	37,5	38,5	40,0	39,0	42,0	38,5	39,0	46,0	38,0	40,0
13.08.11	AIN93HA 6 (S)	42,0	42,0	44,0	42,5	50,0	41,0	47,0	52,0	42,5	45,0
03.09.11	AIN93HA 9 (S)	43,0	49,0	49,0	45,5	53,0	43,5	55,0	56,0	47,5	49,0
18.09.11	AIN93HA Final	47,5	53,0	53,0	48,0	54,0	45,5	58,0	59,0	50,0	51,0
20.09.11	AIN93HA + MXO 3	48,0	53,0		47,5				58,0	49,5	51,0
23.09.11	AIN93HA + MXO 3	46,0	52,0		48,0				57,0	49,0	51,0
26.09.11	AIN93HA + MXO 3	44,0	52,5		48,0				57,5	48,5	51,0
27.09.11	AIN93HA + MXO 3	44,0	53,0		48,0				57,0	49,0	51,0

S: semana

 NDM

 Excluído por critério

 Morte

APÊNDICE C – PESO GE

GE		Peso em gramas dos CSW									
data	dieta / data	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
08.06.11	AIN93G Inicial	13,0	11,0	10,0	10,0	12,0	10,0	13,0	11,0	11,0	12,0
02.07.11	AIN93G Final / AIN93HA Inicial	28,5	31,5	27,5	28,0	27,5	26,5	29,5	30,0	28,5	31,0
23.07.11	AIN93HA 3 (S)	40,0	42,0	37,0	37,5	35,0	31,0	37,0	38,5	35,5	39,0
13.08.11	AIN93HA 6 (S)	49,0	49,5	44,0	40,5	39,0	37,5	42,5	43,5	38,5	43,0
03.09.11	AIN93HA 9 (S)	55,0	50,5	49,0	43,5	43,0	41,5	47,0	47,0	39,5	46,0
18.09.11	AIN93HA Final	57,5	52,0	51,5	46,5	46,0	44,0	51,5	50,0	44,0	48,0
20.09.11	AIN93HA + MXO 4		52,5	51,5	46,5	46,5	44,0				47,0
23.09.11	AIN93HA + MXO 4		53,0	51,5	47,0	46,0	42,0				47,0
26.09.11	AIN93HA + MXO 4		54,0	51,5	45,0	46,0	42,0				45,0
27.09.11	AIN93HA + MXO 4		55,0	52,5	45,0	47,0	41,5				44,5

S: semana



NDM



Excluído por critério



Morte

APÊNDICE D – GLICEMIA DADOS BRUTOS GA

GA		CSW	A1		A2		A3		A4		A5		A6		A7		A8		A9		A10	
DATA	momento	Jejum	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h
02.07.11	1o dia AIN-93HA	12h	88		113		93		108		111		111		101		121		99		95	
04.08.11	2d	4h		97		91		103		94		117		120		118		92		87		103
27.08.11	8s	12h	121		96		99		91		118		106		100		125		149		98	
30.08.11	8s 3d	4h		120		137		187		143		161		206		176		199		139		145
06.09.11	9s 3d	4h		135		160		184		206		168		191		186		202		173		188
13.09.11	10s 3d	4h		122		164		221		222		165		249		169		277		152		170
15.09.11	10s 5d	4h		146		163		290		275		167		392		159		382		163		153
17.09.11	11s	12h	158		127		180		161		164		153		204		159		130		163	
19.09.11	11s 2d	4h		147		155		236		256		186		246		186		169		174		141
27.09.11	12s	12h			146		98				174		248				159		119			



G>150



Includido por critério



NDM



Excludido por critério



Morte

APÊNDICE E – GLICEMIA DADOS BRUTOS GB

GB		CSW	B1		B2		B3		B4		B5		B6		B7		B8		B9		B10	
DATA		Jejum	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h
02.07.11	1o dia AIN-93HA	12h	64		79		79		69		90		62		77		75		58		93	
04.08.11	2d	4h		101		113		112		105		111		113		138		120		111		107
27.08.11	8s	12h	72		125		112		105		113		113		138		120		113		104	
30.08.11	8s 3d	4h		127		139		165		181		170		159		208		139		152		122
06.09.11	9s 3d	4h		120		166		172		180		170		191		156		155		199		136
13.09.11	10s 3d	4h		154		146		183		193		156		160		189		172		156		138
15.09.11	10s 5d	4h		124		158		170		244		223		145		161		143		167		150
17.09.11	11s	12h	94		114		181		150		125		112		147		136		127		111	
19.09.11	11s 2d	4h		154		195		156		175		256		155		278		159		142		129
27.09.11	12s	12h	156		153				176				149		103				170			



G>150



Includido por critério



NDM



Excludido por critério



Morte

APÊNDICE F – GLICEMIA DADOS BRUTOS GC

GC		CSW	C1		C2		C3		C4		C5		C6		C7		C8		C9		C10		
DATA		Jejum	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	
02.07.11	Antes 1o dia (AIN-93HA)	12h	66		79		110		95		80		101		98		100		68		92		
04.08.11	2d	4h		100		119		111		126		110		122		90		117		115		95	
27.08.11	8s	12h	122		114		117		134		112		98		97		103		118		124		
30.08.11	8s 3d	4h		118		146		192		191		138		159		141		139		275		155	
06.09.11	9s 3d	4h		114		170		200		224		155		165		153		142		255		149	
13.09.11	10s 3d	4h		122		147		286		229		136		155		183		134		250		147	
15.09.11	10s 5d	4h		141		232		311		251		136		155		160		167		364		182	
17.09.11	11s	12h	155		188		136		160		158		116		171		149		199		172		
19.09.11	11s 2d	4h		137		190		231		210		178		144		157		155		264		142	
27.09.11	12s	12h					177		294		128		183				138				146		



G>150



Includido por critério



NDM



Excludido por critério



Morte

APÊNDICE G – GLICEMIA DADOS BRUTOS GD

GD		CSW	D1		D2		D3		D4		D5		D6		D7		D8		D9		D10		
DATA		Jejum	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	
02.07.11	Antes 1o dia (AIN-93HA)	12h	108		89		100		92		90		81		94		101		70		102		
04.08.11	2d	4h		114		88		109		112		120		98		92		127		107		113	
27.08.11	8s	12h	135		88		109		112		125		98		90		143		107		113		
30.08.11	8s 3d	4h		139		153		150		140		176		134		128		145		160		188	
06.09.11	9s 3d	4h		150		135		160		152		198		125		198		149		176		198	
13.09.11	10s 3d	4h		160		155		184		148		191		135		226		164		155		238	
15.09.11	10s 5d	4h		167		152		183		179		256		137		256		202		202		275	
17.09.11	11s	12h	123		119		130		156		163		136		116		123		117		145		
19.09.11	11s 2d	4h		142		136		201		150		200		137		197		167		232		219	
27.09.11	12s	12h	114		153				165								139		153		194		



G>150



Includido por critério



NDM



Excludido por critério



Morte

APÊNDICE H – GLICEMIA DADOS BRUTOS GE

GE		CSW	E1		E2		E3		E4		E5		E6		E7		E8		E9		E10	
DATA		Jejum	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h	4h	12h		12h	4h
02.07.11	Antes 1o dia (AIN-93HA)	12h	71		101		103		70		83		72		81		90		81		83	
04.08.11	2d	4h		111		123		126		92		108		95		97		110		98		128
27.08.11	8s	12h	121		130		161		100		127		95		102		119		148		79	
30.08.11	8s 3d	4h		259		178		171		123		169		124		116		159		120		154
06.09.11	9s 3d	4h		309		266		231		124		159		139		137		139		131		129
13.09.11	10s 3d	4h		365		255		317		136		161		148		155		153		141		117
15.09.11	10s 5d	4h		413		295		373		154		162		156		187		158		111		161
17.09.11	11s	12h	152		148		126		141		134		128		144		143		168		134	
19.09.11	11s 2d	4h		304		245		258		155		223		152		139		154		143		135
27.09.11	12s	12h			219		188		147		204		97								100	



G>150



Includido por critério



NDM



Excludido por critério



Morte

APÊNDICE I - BANCO DE DADOS PESO e GLICEMIA _A e _D

Grupos	Peso_A	Peso_D	Glicemia 12h_A	Glicemia 12h_D	Glicemia 4h_A
GA	56,5	56,0	127	146	155
GA	57,0	54,5	161	98	256
GA	57,0	57,0	164	174	186
GA	59,0	59,0	153	248	246
GA	59,5	58,5	159	159	169
GA	45,5	45,5	130	119	174
GB	37,5	35,0	94	156	154
GB	55,0	51,0	127	170	142
GB	54,0	54,0	150	176	175
GB	57,0	53,3	114	153	195
GB	58,0	51,5	147	103	278
GB	58,0	57,0	112	149	155
GC	55,0	55,0	160	294	210
GC	54,5	55,5	158	128	178
GC	57,0	57,0	136	177	231
GC	55,5	54,5	116	183	144
GC	50,5	51,5	172	146	142
GC	46,5	46,5	149	138	155
GD	47,5	48,0	156	165	150
GD	48,0	44,0	123	114	142
GD	51,0	51,0	145	194	219
GD	58,0	57,0	123	139	167
GD	49,5	49,0	119	153	232
GD	53,0	53,0	119	153	136
GE	51,5	52,5	126	188	258
GE	46,5	45,0	141	147	155
GE	46,5	47,0	134	204	233
GE	44,0	41,5	128	97	152
GE	52,5	55,0	148	219	245
GE	47,0	44,5	134	100	135

APÊNDICE J - BANCO DE DADOS ADIPOCINAS E INSULINA

VARIÁVEIS (pg/ml)									
Grupos	IL-β	IL_6	Insulina	Leptina	MCP-1	PAI-1	Resistina	TNF- α	Adiponectina
GA	24,59	5,62	1.463,52	48.199,69	46,49	2.146,97	1.627,97	13,22	4.939.433,50
GA	38,49	429,34	3.263,59	75.525,00	184,27	18.586,62	2.542,32	12,56	4.728.314,50
GA	13,37	3,70	444,40	41.305,62	46,49	1.256,94	1.177,16	12,84	4.827.157,00
GA	42,10	3,70	204,47	5.753,06	40,26	593,64	333,25	22,21	1.393.790,00
GA	1,16	5,62	3.026,42	48.150,41	2,15	4.294,79	2.604,09	2,84	5.862.531,00
GA	24,59	3,70	235,60	12.917,22	29,58	623,93	601,92	15,99	2.893.868,25
GB	17,74	6,62	430,64	1.098,74	29,58	2.929,34	485,70	4,83	4.271.669,00
GB	11,84	6,12	931,76	14.398,13	16,44	12.387,48	1.840,83	6,71	9.354.358,00
GB	19,15	18,62	227,92	32.588,66	40,26	405,65	567,41	16,68	2.657.439,25
GB	25,90	3,25	499,01	11.204,63	27,40	3.413,07	760,36	6,07	7.110.720,50
GB	60,46	161,04	1.976,48	21.249,68	31,74	18.529,82	1.727,11	8,93	3.254.141,75
GB	10,28	2,39	642,54	57.112,89	8,93	8.035,49	1.304,83	0,00	6.327.858,00
GC	11,84	1,25	1.412,38	15.323,30	4,00	3.959,26	900,81	0,00	5.550.069,50
GC	10,28	1,08	1.984,09	31.413,35	27,40	2.813,89	578,24	0,86	4.430.930,00
GC	5,23	7,14	1.892,91	49.833,33	26,31	9.831,89	1.301,60	0,69	6.257.462,00
GC	62,67	3,70	324,60	11.327,00	17,54	1.558,94	687,65	2,66	3.501.683,00
GC	7,00	4,64	608,06	32.202,79	12,85	2.944,08	850,04	0,47	5.480.024,00
GC	1,16	1,98	680,18	13.293,82	2,15	4.396,65	960,85	0,00	4.266.908,00
GD	1,16	1,60	2.100,59	13.878,44	4,00	12.020,16	890,51	0,00	5.714.239,50
GD	.	2,39	180,35	4.978,68	15,37	8.257,45	1.938,40	4,01	7.103.649,00
GD	7,00	2,39	3.052,70	33.082,34	44,43	3.071,61	1.119,53	0,55	3.986.053,25
GD	20,53	81,52	1.642,77	32.202,79	64,33	6.785,31	1.504,16	8,79	2.979.258,50
GD	.	1,98	1.560,51	33.082,34	5,85	4.068,06	1.083,46	0,55	4.502.937,50
GD	8,67	1,60	98,73	44.902,55	14,26	4.952,19	1.605,45	2,62	4.354.355,00
GE	50,29	7,66	1.106,29	7.652,12	115,66	647,90	270,07	20,55	1.149.119,50
GE	33,58	171,70	702,03	14.612,49	5,85	8.281,16	1.392,37	8,79	3.770.572,25
GE	8,67	2,39	1.421,80	18.069,49	11,04	3.140,24	887,61	4,71	6.115.507,00
GE	.	815,08	260,67	1.054,45	52,58	9.399,45	241,62	54,95	519.308,94
GE	16,31	3,70	404,43	2.681,93	36,03	96,04	196,44	23,32	881.680,75
GE	7,00	426,99	1.304,66	9.196,99	52,58	7.149,45	1.411,19	24,56	1.211.983,62

ANEXO



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n°106/09, sobre o projeto intitulado: "EFEITOS DE SUPLEMENTAÇÃO COM MISTURA DE ÓLEOS COM ELEVADA RELAÇÃO ÔMEGA 9, ÔMEGA 6 E BAIXA RELAÇÃO ÔMEGA 6, ÔMEGA 3, SOBRE AS ADIPOCINAS SÉRICAS EM CAMUNDONGOS COM *DIABÊTES MELLITUS* INDUZIDO POR DIETA RICA EM GORDURA SATURADA", de responsabilidade de ROSANA QUEZADO, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 07 de abril de 2010.

Fortaleza, 26 de setembro de 2012.


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA