

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:
HEPATOLOGIA**

Michely Lopes Nunes

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ÔMEGA-3 SOBRE O
PROCESSO INFLAMATÓRIO NO FÍGADO DE RATOS
DIABÉTICOS**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre

2013

Michely Lopes Nunes

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ÔMEGA-3 SOBRE O
PROCESSO INFLAMATÓRIO NO FÍGADO DE RATOS
DIABÉTICOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Hepatologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina: Hepatologia.

Orientadora: Prof^a Dra. Marilene Porowski Garrido

Porto Alegre

2013

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela oportunidade, por ter me dado força e iluminando meu caminho, para que eu pudesse concluir mais uma etapa da minha vida;

Minha família, particularmente a minha mãe **Verônica Lopes Nunes** pelo apoio constante e seu amor nas horas mais delicadas que passei.

Manifesto um agradecimento especial: À orientadora **prof. Dra. Marilene Porowski Garrido**, pelo carinho, orientação e que acreditou em mim e apoiou nos momentos em que a dedicação aos estudos foi exclusiva na realização e desenvolvimento desse trabalho.

À **Prof. Dr^a Maria Isabel Morgan-Martins**, pela ajuda com sua experiência e carinho que teve para me ajudar na avaliação dos resultados dos experimentos, meu muito obrigado,

À minha colega de mestrado, **Keli Cristina Simões da Silveira**, por me ajudar em todas as etapas deste trabalho, com paciência e apoio incondicional.

À minha amiga **Grazielle Halmenschlager**, pela ajuda na hora de tabulação dos dados e na estatística, pelos dias, pela convivência e ensinamentos.

Por fim, gostaria de agradecer às colegas do laboratório da ULBRA em Canoas: por formarem uma equipe de verdade e colaboraram para o sucesso deste trabalho: **Elizângela Shimitt, Jozyane Raskopf, Renata Minuzzo Hartmann**, meu eterno agradecimento.

Se amanhã o que sonhei não for bem aquilo,
Eu tiro um arco-íris da cartola.
E refaço colo, pinto e bordo.
Porque a força de dentro é maior.
Maior que todo mal que existe no mundo.
Maior que todos os ventos contrários.
É maior porque é do bem. E nisso sim acredito até o fim.

“Caio Fernando Abreu”

Sumário

Resumo	6
Abstract	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE GRÁFICOS	12
1 INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.2 Ômega-3	13
2.2.1 Histórico	13
2.2.2 Metabolismo dos ácidos graxos ω -3	14
2.3 Consenso Nutricional	18
2.4 Mecanismo inflamatório e anti-inflamatório	18
2.4.1 Interleucina-1	20
2.4.2 Interleucina-6	21
2.4.3 Enzima Ciclooxigenase-2 (COX-2)	22
2.5 Estresse Oxidativo	23
3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	25
4 OBJETIVOS	26
4.1 Geral	26
4.2 Específicos	26
5 MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1 Grupos Experimentais:	27
5.2 Determinações da glicemia, TG e colesterol.	28
5.3 Dosagem de Proteína	28
5.4. Medida das Substâncias que Reagem ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) ..	28
5.5 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase SOD	29
5.6 Atividade da Enzima Glutathione Peroxidase (GPx)	30
5.7 Atividade da Enzima Catalase (CAT)	31
5.8 Detecção Imuno-histoquímica da IL-1, IL-6 e COX-2 no tecido hepático ..	31
5.9 Análise Estatística	32
5.10 Considerações Éticas	32
6. RESULTADOS	33
6.1 Medidas da glicemia e dos níveis plasmáticos de colesterol e trigliceríde..	33
6.2 Avaliação da lipoperoxidação (TBARS)	35
6.3 Atividade das enzimas, SOD, CAT e GPx, no tecido hepático	36
6.4 Localização e quantificação imuno-histoquímica da IL-1, IL-6 e COX-2	39
7. DISCUSSÃO	44
8. CONCLUSÃO	52
9. REFERÊNCIAS	53

Resumo

O diabetes Mellitus (DM) é uma enfermidade endócrino-metabólica frequente, que afeta mais de 246 milhões de pessoas em nível global. A hiperglicemia está associada a complicações, disfunções e insuficiência de vários órgãos. O objetivo foi avaliar os efeitos do ômega-3 no estresse oxidativo e no processo inflamatório no tecido hepático de ratos diabéticos. Foram utilizados 54 ratos Wistar machos, o DM foi induzido através de uma única injeção de estreptozotocina (70 mg/Kg). Os animais foram divididos em 6 grupos e receberam ômega-3 na dose de 4g/Kg durante 15 dias e 30 dias. O tratamento com o ômega-3 reduziu os níveis plasmáticos dos triglicérides nos animais diabéticos, porém não houve modificação significativa na glicemia e colesterol nesses animais. Nos animais diabéticos tratados com ômega-3 houve uma redução na lipoperoxidação, porém não significativa. A atividade da superóxido dismutase apresentou-se significativamente aumentada nos animais diabéticos em relação aos tratados com ômega-3 (ω 3). A atividade da enzima glutathione peroxidase foi significativamente reduzida nos animais diabéticos da mesma forma que nos controles tratados. A atividade da catalase foi significativamente aumentada nos animais diabéticos em relação aos controles e os diabéticos tratados apresentaram uma diminuição significativa. A interleucina-1 e a interleucina-6, avaliadas no tecido hepático por imunohistoquímica, mostraram-se significativamente aumentadas nos animais diabéticos e reduzidas nos animais tratados. Esses resultados parecem indicar que o tratamento com ômega-3 IL-1, IL6 e COX-2, teve uma ação anti-inflamatória, porém mais estudos são necessários para caracterizar uma ação do antioxidante.

Palavras chaves: ômega-3, inflamação, estresse oxidativo, diabetes.

Abstract

Diabetes Mellitus (DM) is an endocrine-metabolic disease frequent, affecting more than 246 million people globally. Hyperglycemia is associated with complications, dysfunction and failure of various organs. The objective was to evaluate the effects of using omega-3 in oxidative stress and inflammation in the liver tissue of diabetic rats. We used 54 male Wistar rats, diabetes (DM) was induced by a single intraperitoneal injection (ip) of streptozotocin - STZ (70 mg/kg body weight). The animals were divided into six groups and given omega-3 (4g/Kg) for 15 days and 30 days. Treatment with omega-3 was able to reduce levels of triglycerides in diabetic animals, but there was no change in mean blood glucose levels and cholesterol in these animals. In diabetic animals treated with omega-3 there was a reduction in lipid peroxidation, however not significant. The activity of superoxide dismutase was significantly increased in diabetic animals in relation to treatments with omega-3. The activity of the enzyme glutathione peroxidase was significantly reduced in diabetic animals. The catalase activity was significantly increased in diabetic animals compared to controls and the treated diabetic showed a significant decrease. The interleukin-1 and interleukin-6, evaluated in liver tissue by immunohistochemistry, were significantly increased in diabetic animals and reduced in the treated animals. These results seem to indicate that the treatment with omega3 during 15 and 30 days not decreased the blood glucose and lipid peroxidation in diabetic animals, but altered the activity of antioxidant enzymes, reduced the levels of triglycerides and marking the liver of interleukins 1 and 6 which may indicate that the omega 3 had an anti-inflammatory action, although more studies are needed to characterize a antioxidant action.

Keywords: omega-3, inflammation, oxidative stress, diabetes.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidônico
AGCL	Ácidos Graxos de Cadeia Longa
AG	Ácido Graxo
AGPI	Ácido Graxo Poli-insaturado
ALA	Ácido α linolênico
AP	Ácido Pantotênico
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética de Uso de Animais
CSF-GM	Colônias de granulócitos e macrófagos
CO	Controle
Cu	Cobre
COX2	Ciclooxigenase-2
DHA	Ácido docosahexaenóico
DM	Diabetes Melittus
EPA	Ácido eicosapentaenóico
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
RL	Radicais Livres
AGCL	Ácidos Graxos de Cadeia Longa
DM	Diabetes Melittus
Fe	Ferro
GPx	Glutationa Peroxidase
GSH	Glutationa
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HDL	Colesterol ligado à Lipoproteína de Alta Densidade

H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzível
IL-1	Interleucina-1
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
i.p.	Intraperitoneal
LDL	Colesterol ligado à Lipoproteína de Baixa Densidade
LOX	Lipoxigenase
LT	Leucotrienos
LX	Lipoxinas
MAPK	Proteína cinase mitógeno reguladora
NaCl	Cloreto de Sódio
NFκB	Fator Nuclear kappa B
O₂	Oxigênio
O₂⁻	Ânion superóxido
PG2	Prostaglandina-2
PGI	Prostaciclina
RDA	<i>Recommend Dietary allowances</i>
RL	Radicais Livres
RSV	Resveratrol
SBAN	Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SOD	Superóxido Dismutase
SPSS	<i>Statistical Package for Social Science</i>
STZ	Estreptozotocina

TBARS	Substâncias que reagem ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TG	Triglicerídeos
TX	Tramboxanos
ω- 3	Ômega-3
ω- 6	Ômega-6

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química dos ácidos Eicosapentaenóico (EPA) e Docosaexaenóico (DHA).....	15
Figura 2 - Metabolismo do ômega-6 (ω -6).....	16
Figura 3 - Metabolismo do ômega-3 (ω -3).....	16
Figura 4 - Fotomicrografia do tecido hepático de rato, localização imuno-histoquímica da citocina IL-1.....	41
Figura 5 - Fotomicrografia do tecido hepático de rato, localização imuno-histoquímica da citocina IL-6.....	42
Figura 6 - Fotomicrografia do tecido hepático de rato, localização imuno-histoquímica da enzima COX-2.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores da glicemia e dos níveis plasmáticos do colesterol e triglicerídeos.....	34
Tabela 2: Atividade das enzimas (SOD), (CAT) e (GPx) no tecido hepático dos animais.	37
Tabela 3: Quantificação da marcação imuno-histoquímica da IL-1, IL-6 e COX-2 no tecido hepático	40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Valores de glicemia.....	34
Gráfico 2 – Valores de colesterol.....	35
Gráfico 3 – Valores de triglicerídeos.....	25
Gráfico 4 – Níveis de malondialdeído no tecido hepático dos animais (TBA-RS).....	36
Gráfico 5 - Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD).....	37
Gráfico 6 - Atividade da Enzima Glutathiona Peroxidase (GPx).....	38
Gráfico 7 - Atividade da Enzima Catalase (CAT).....	38
Gráfico 8 – Quantificação da marcação imuno-histoquímica da IL-1 no tecido hepático.....	40
Gráfico 9 - Quantificação da marcação imuno-histoquímica da IL- 6 no tecido hepático.....	41
Gráfico 10 - Quantificação da marcação imuno-histoquímica da enzima COX-2 no tecido hepático.....	42

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) configura-se hoje como uma epidemia mundial, traduzindo-se em grande desafio para os sistemas de saúde de todo o mundo. O envelhecimento da população, a urbanização crescente e a adoção de estilos de vida pouco saudáveis como sedentarismo, dieta inadequada e obesidade são os grandes responsáveis pelo aumento da incidência e prevalência do diabetes em todo o mundo. ⁽¹⁾

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, o número de portadores da doença em todo o mundo era de 177 milhões em 2000, com expectativa de alcançar 350 milhões de pessoas em 2025. No Brasil são cerca de seis milhões de portadores, a números de hoje, e deve alcançar 10 milhões de pessoas em 2025. ⁽²⁾

Um indicador macroeconômico a ser considerado é que o diabetes cresce mais rapidamente em países pobres e em desenvolvimento e isso impacta de forma muito negativa devido à morbimortalidade precoce que atinge pessoas ainda em plena vida produtiva, onera a previdência social e contribui para a continuidade do ciclo vicioso da pobreza e da exclusão social. ^(1,2)

O DM é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia e associadas a complicações, disfunções e insuficiência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, cérebro, coração e vasos sanguíneos. Pode resultar de defeitos de secreção e/ou ação da insulina envolvendo processos patogênicos específicos, por exemplo, destruição das células beta do pâncreas (produtoras de insulina), resistência à ação da insulina, distúrbios da secreção da insulina, entre outros. ^(2,3)

É uma enfermidade endócrino-metabólica frequente, que afeta mais de 246 milhões de pessoas em nível global. ⁽³⁾ É caracterizada pela poliúria, polidipsia, perda de peso apesar da polifagia, hiperglicemia, glicosúria, cetose, acidose e, em casos mais graves, o coma. Apresenta uma variedade de alterações bioquímicas, mas a fundamental, é a redução da entrada de glicose nos tecidos periféricos e o aumento na liberação de glicose circulante pelo fígado. ^(4,5)

O fígado possui um papel central na manutenção da euglicemia. A glicemia depende da ingestão de carboidratos, da gliconeogênese e da glicogenólise. Em condições normais, o fígado é o principal órgão responsável pela gliconeogênese. Na eventualidade de não haver necessidade de aumentar a glicemia, o tecido hepático e o muscular esquelético captam a glicose e a armazenam como glicogênio e gordura. ^(5,6)

Existem diversas anormalidades no DM, como a diminuição da velocidade de condução nervosa, distúrbio da atividade motora gastrointestinal, diminuição no esvaziamento gástrico, anorexia, vômitos, diarreia e constipação. ⁽⁷⁾

No Brasil, o diabetes junto com a hipertensão arterial, é responsável pela primeira causa de mortalidade e de hospitalizações, de amputações de membros inferiores e representa ainda 62,1% dos diagnósticos primários em pacientes com insuficiência renal crônica submetidos à diálise. É importante observar que já existem informações e evidências científicas suficientes para prevenir e/ou retardar o aparecimento do diabetes e de suas complicações e que pessoas e comunidades progressivamente têm tido acesso a esses cuidados. ⁽⁸⁾

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.2 Ômega-3

2.2.1 Histórico

O interesse dos pesquisadores sobre os benefícios do ácido graxo poli-insaturado (AGPI) ω -3 teve início quando se observou que os esquimós da Groelândia apresentavam baixa incidência de doenças cardiovasculares a despeito de sua elevada ingestão de gorduras. Essa população consumia peixes de águas profundas e geladas abundantes em AGPI ω -3 de cadeia longa. ⁽⁹⁾ Tais observações levaram ao aumento das pesquisas sobre os efeitos benéficos e/ou preventivos desses ácidos graxos em uma série de condições clínicas como doenças cardiovasculares, artrite reumatóide, asma, entre outras. ^(9,10)

Os ácidos graxos poli-insaturados do tipo ω -3 exercem uma grande variedade de efeitos biológicos e são estudados em várias condições clínicas distintas como doença coronariana, hipertensão, hiperlipidemia, câncer, diabetes, doenças renais e em doenças inflamatórias. ⁽¹⁰⁾

Os ácidos graxos ω -3 provenientes da dieta são componentes essenciais para cada célula viva, sendo especialmente importantes para a integridade das estruturas da bicamada lipídica da membrana celular. Eles são também fontes importantes de energia e são precursores para numerosos compostos biologicamente ativos. Humanos podem sintetizar todos os lípidos necessários para uma boa saúde com exceção dos pertencentes às famílias do ω -3 e ω -6. ⁽¹¹⁾

Burr & Burr verificaram em experiências com ratos que os ácidos graxos essenciais eram o linoléico, linolênico e araquidônico. Durante as duas últimas décadas, tem-se percebido que a quantidade de ácido graxos de cadeia longa (AGCL) consumido na dieta pode influenciar profundamente nas respostas biológicas. ^(12,13)

As fontes dos ácidos graxos ω -3 são: ácido linolênico, encontrado em folhas verdes e em sementes oleaginosas, como também na semente de linhaça, mostarda e óleo de soja; ácido docosahexaenóico (DHA) e ácido eicosapentaenóico (EPA) presentes principalmente nos peixes de águas frias (como a cavala, o arenque e o salmão). Os peixes brancos magros (como bacalhau e linguado) contêm apenas quantidades pequenas de EPA e DHA. ^(14,15)

2.2.2 Metabolismo dos ácidos graxos ω -3

O ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) são considerados nutricionalmente essenciais e derivados exclusivamente de peixes, são também chamados de óleo de peixe e podem ser encontrados em formulações preparadas pela indústria alimentícia e farmacêutica e contém uma mistura variável de EPA e DHA numa proporção de 2:1. ⁽¹⁶⁾

O ácido araquidônico (AA) é o mais comum precursor de eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, isoprostanos, etc); EPA é o

precursor mais comum de prostaglandinas da série 3 e de leucotrienos da série 5 e o mais abundante ácido graxo poli-insaturado presente no óleo de peixe. O DHA é o ácido graxo poli-insaturado mais abundante nos tecidos (especialmente no SNC) e pode exercer efeitos parcialmente por conversão a EPA. ⁽¹⁷⁾

Os ácidos graxos ω -3, como o ácido alfa-linolênico, ácido eicosapentaenóico e o ácido docosahexaenóico, são ácidos carboxílicos poli-insaturados, em que a dupla ligação está no terceiro carbono a partir da extremidade oposta à carboxila (figura 1). O mecanismo proposto para o benefício dos AGPI ω -3 parece estar relacionado à incorporação destes ácidos graxos nas membranas celulares. ⁽¹⁷⁾

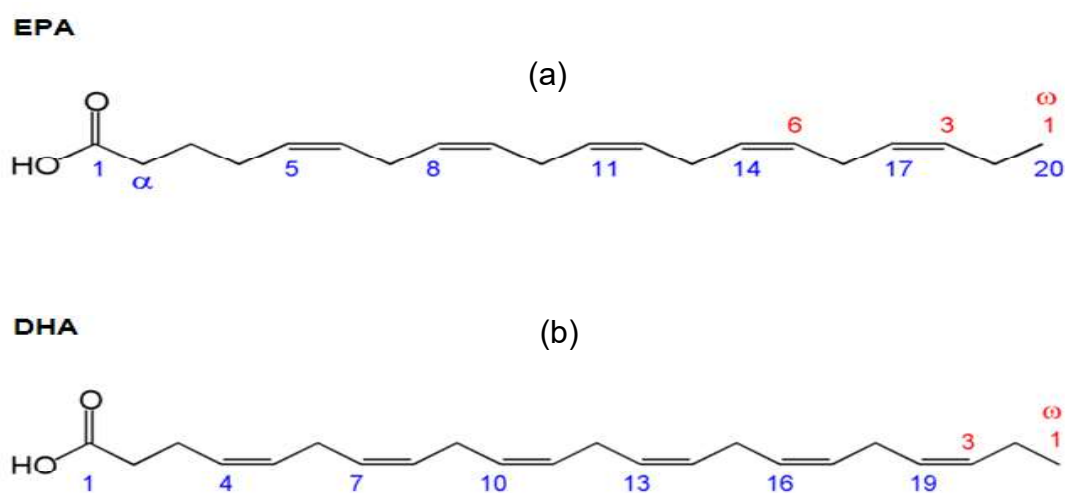


Figura 1 – Estrutura química dos ácidos Eicosapentaenóico (a) e Docosahexaenóico (b).

O aumento da ingestão de ácidos graxos ω -3 na dieta causa a substituição parcial dos ácidos graxos ω -6, especificamente do ácido araquidônico (AA) das membranas fosfolipídicas. Os AGPI ω -3 EPA e DHA podem ser liberados da membrana celular pela ação da enzima fosfolipase A2 e metabolizados pela enzima ciclooxygenase (COX) que levam à formação das prostaglandinas da série 2 (PGH2), tromboxanos (TX) e leucotrienos (LT), mediadores de um amplo espectro de atividades biológicas (figuras 2 e 3). ⁽¹⁸⁾

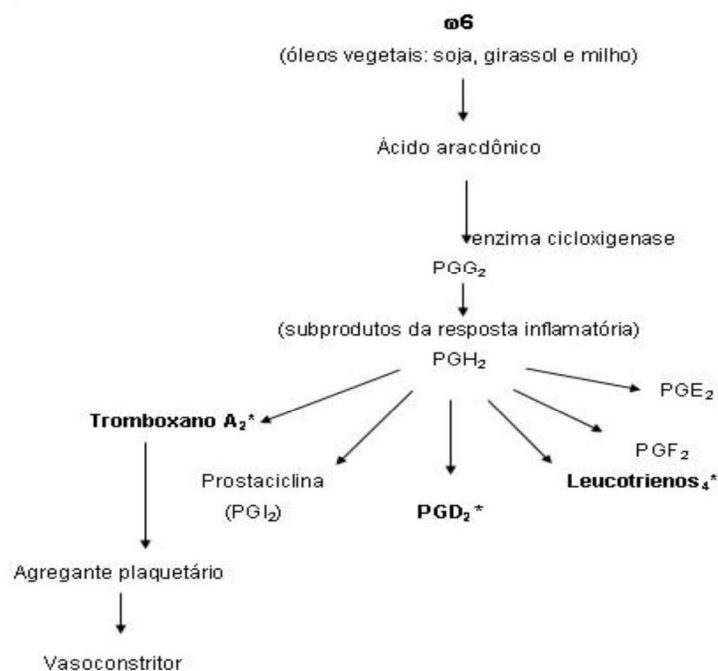


Figura 2 - Metabolismo do Ômega-6 (ω -6), mediadores bioquímicos AA, COX e TX, envolvidos na inflamação, infecção, lesão tecidual, modulação do sistema imune e agregação plaquetária. [Fonte: Hirayama, *et al.*, (2012) Adaptado para o estudo]

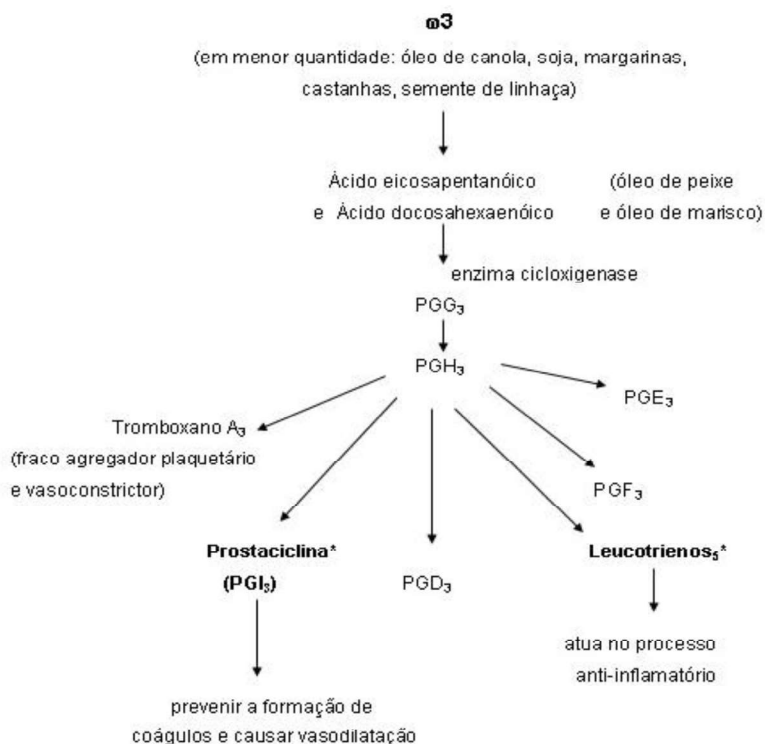


Figura 3 - Metabolismo do ômega-3 (ω -3), mediadores bioquímicos EPA, DHA, COX e PGI₃, que atuam no processo anti-inflamatório e não inibem o sistema imune. [Fonte: Hirayama, *et al.*, (2012) Adaptado para o estudo]

As séries de ácidos graxos ω -3, ω -6 e ω -9 competem entre si, pela enzima Δ 6 dessaturase, que é uma enzima-chave clássica e comum para todas as vias metabólicas ^(19,20,21) e apresentam maior afinidade pelos substratos mais altamente insaturados. Logo, devido a essa natureza competitiva, cada ácido graxo pode interferir no metabolismo do outro, apresentando implicações nutricionais. Um excesso de ω -6 irá reduzir o metabolismo de ω -3, levando possivelmente a uma deficiência nos seus metabólitos, incluindo o ácido eicosapentaenóico. ⁽²²⁾

O DHA e o EPA interferem no sistema imune competindo com o ácido araquidônico (AA) no metabolismo da cicloxigenase na membrana celular. O AA em altas concentrações (1,5g/dia por 50 dias) compromete o sistema imunológico destacando-se o aumento da proliferação linfocitária, produção de citocinas e atividade de célula natural "Killer". ⁽²³⁾

Os ácidos graxos ω -3 também inibem a enzima dessaturase, que diminui a produção de ácido araquidônico e conseqüentemente de tromboxano A₂. Logo, o aumento exagerado de ω -3 reduz a relação desses ácidos graxos (ω -6: ω -3) a níveis baixos de 3:1, esta condição propicia alterações indesejáveis na coagulação sangüínea (como aumento do tempo de hemorragia, diminuição da agregação plaquetária, viscosidade do sangue e fibrinogênese, aumento da deformidade eritrocitária, diminuindo a tendência para formação de trombos) e na própria resposta, inflamatória. ^(24,25)

Porém, quando foram avaliados pacientes submetidos à cirurgia de artéria coronariana e que ingeriram ω -3, não foi identificado aumento nos casos de hemorragia devido à ingestão desses ácidos graxos ⁽²⁶⁾. A proporção de ω -6 e ω -3 pode influenciar na formação de neurotransmissores e prostaglandinas, fatores que são vitais para manter a função cerebral normal. ^(25,26)

2.3 Consenso Nutricional

As RDAs (*Recommend Dietary Allowances*) não estipulam a quantidade de lipídios que devem ser assimilados através da alimentação. Entretanto, a ingestão de gorduras, segundo o Guia Alimentar para Americanos e o *National Cholesterol Education Program*, deve estar dentro de um limite de 30% do valor calórico total, dos quais 10% são provenientes de lipídios saturados, 10% poli-insaturados e 10% monoinsaturados, ou seja, na proporção 1:1:1. A ingestão de colesterol deve manter-se abaixo de 300mg/dia. ⁽²⁷⁾

A Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição (SBAN) recomenda que o limite máximo de gordura na dieta fique em torno dos 30% e o mínimo em 20%, sugerindo também uma proporção aproximadamente igual entre os ácidos graxos saturados, ácidos graxos monoinsaturados e ácidos graxos poli-insaturados. ⁽²⁸⁾

Muitos estudos sugerem que a excessiva quantidade de ácidos graxos ω -6 e a deficiência do ω -3 na dieta, promovendo assim razão desproporcional de ω -6/ ω -3, podem levar ao desenvolvimento das doenças crônicas. Em países onde a alimentação esta associada a um maior consumo de óleo de peixe (ω -3), e a razão entre o consumo de ω -6 e ω -3 atinge 4/1, tem sido observado que há redução de 70% das mortes associadas a doenças como aterosclerose. ^(28,29)

A quantidade de gordura na dieta altera respostas celulares, mas vale salientar que não reagem sozinhas, sendo também influenciadas por outros nutrientes, tais como vitamina C e E, antioxidantes, glutamina e carboidratos. A necessidade de uma relação ω -3/ ω -6, na alimentação é de 1:5, relação esta considerada ideal, tolerando-se 1:10. Nos Estados Unidos, por exemplo, a media de proporção entre ω -3/ ω -6 e de 1:20-30, ou seja, valores altos de ômega 6 em relação ao ω -3. ⁽²⁹⁾

2.4 Mecanismo inflamatório e anti-inflamatório

O processo inflamatório é uma resposta de defesa ao trauma ou a infecções microbianas e é iniciado com a finalidade de extinguir o estímulo que

o desencadeou ou para remover um dano tissular. Muitas doenças como o mal de Alzheimer, diabetes, doenças cardiovasculares, asma, artrite reumatóide, periodontite, câncer e outras são resultantes de processos inflamatórios inapropriados ou excessivos que as iniciam e as acompanham de forma crônica. ^(30,31)

Nas células com respostas inflamatórias há sempre altos níveis de AA e baixos níveis de outros ácidos graxos. Sendo assim, o ácido araquidônico está sempre em maior disponibilidade como precursor para a biossíntese dos eicosanóides que estarão envolvidos na modulação da intensidade e duração das respostas inflamatórias. Os aspectos patofisiológicos de sua ação dependem do tecido alvo, da natureza do estímulo, da produção e quantidade de eicosanóides que são produzidos e da sensibilidade das células alvo à sua ação. ^(32,33,34)

No local da inflamação, neutrófilos produzem espécies reativas de oxigênio, que são de vital importância na atividade microbicida e inflamatória dessas células. A atividade microbicida é dependente da ativação do sistema NADPH oxidase, ou seja, da geração de espécies reativas de oxigênio, (*burst* respiratório) e mobilização de cátions no fagossomo. ⁽³⁶⁾

Os AGPI ω -3 podem auxiliar na proteção de doença vascular aterosclerótica, artrite, pancreatite, alergias, pneumonia e outras doenças inflamatórias. Podem, por exemplo, modular o processo inflamatório dentro da parede do vaso sanguíneo alterando também a composição estrutural e celular da placa aterosclerótica em estado avançado de tal forma que pode reduzir a ruptura ou ulceração da placa, que é um processo que precede o infarto do miocárdio. ^(37, 38,)

Quando administrados em voluntários saudáveis, os ácidos graxos poli-insaturados ω -3 promovem uma diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias interleucina (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF)- α induzidos por polissacarídeos bacterianos. Eles também modulam a ativação do fator nuclear kappa B (NFkB) que está envolvido na transcrição de vários genes envolvidos na inflamação aguda, arterosclerose e resposta imune. ^(39,40)

Alguns estudos têm testado a influência da suplementação com ω -3 em diferentes parâmetros das alterações provocadas pelo diabetes como a disfunção endotelial, resistência à insulina e sensibilidade à insulina. Por outro

lado, existem fortes evidências epidemiológicas para um efeito protetor dos ω -3 no desenvolvimento de risco para diabetes tipo II. ^(41,42)

O AA é precursor de prostanóides de série 2 incluindo prostaciclina (PGI₂), TXA₂ e PGE₂, o qual apresenta diversos efeitos pró-inflamatórios (indução de febre, eritema, aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação), quando o EPA é precursor de prostanóides os quais são biologicamente menos ativos, PG e LT têm menores propriedades inflamatórias e TXA₃ tem mínima atividade vasoconstritora e agregante plaquetário. ^(43,44)

As propriedades anti-inflamatórias dos ácidos graxos ω -3 estão bem estabelecidas e uma possível ação antioxidante tem sido proposta principalmente em relação ao DHA que pode interferir com a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e /ou combatê-las devido às suas múltiplas duplas ligações. ^(44,45)

2.4.1 Interleucina-1

A produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF)- α ocorrem rapidamente após o trauma. Estas medeiam os sintomas associados com o trauma. Embora a resposta mediada por citocinas seja parte essencial para a cicatrização, a sua produção em excesso está associada com a severidade da doença em muitos processos inflamatório-infecciosos. TNF- α e IL-1, por exemplo, são os principais mediadores da resposta inflamatória aguda e importante na ativação de células endoteliais e na expressão de moléculas de adesão, fato que contribui para o recrutamento e acúmulo de mais fagócitos na área inflamada. ^(46,47)

A ação mais importante da IL-1 na inflamação deve-se aos efeitos que produz no endotélio, nos leucócitos e nos fibroblastos, bem como na indução das reações da fase aguda inflamatória. No endotélio, a IL-1 induz várias mudanças, a maioria relacionada ao nível de transcrição de gene para síntese de moléculas de adesão endotelial e mediadores químicos como citocinas, fator de crescimento, óxido nítrico e a produção de enzimas associadas à remodelação de células matrizes e aumento na superfície trombogênica do

endotélio. Associada ao $TNF\alpha$ induz a resposta de fase aguda à infecção ou agressão tecidual. ^(48,49)

Essa atividade específica da IL-1, também desencadeada pelo monócito, liga-se estreitamente à regulação da leucopese durante um processo infeccioso. A IL-1 atua junto aos fibroblastos e às células endoteliais, estimulando a liberação de fatores de crescimento para granulócitos, macrófagos e monócitos. Além disso, libera o fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$) que estimula os linfócitos T a produzirem anticorpos específicos. ^(49, 50,51)

2.4.2 Interleucina-6

A Interleucina (IL-6) é uma citocina com potente atividade antiviral, de grande atuação como resposta imunológica durante a fase aguda de uma infecção. Alguns estudos têm associação positivamente à produção de PGE2 endógena e liberação de IL-6, os macrófagos são importantes receptores para responder ao processo inflamatório das PGE2 durante a inflamação, estudos mostram que os macrófagos respondem a PGE3 exógena ao sintetizar a IL-6, na produção de citocina inflamatória. ^(52,53)

A IL-6 é expressa e secretada por macrófagos e adipócitos e está associada ao desenvolvimento de doenças relacionadas com a obesidade, tais como o diabetes tipo 2 e a resistência à insulina. Até um terço da IL-6 na circulação é proveniente dos adipócitos. ⁽⁵⁴⁾ A produção de IL-6 é estimulada pela PGE2 e pelo NFkB sendo que está via pode ser inibida pelos antioxidantes polifenólicos. ⁽⁵⁵⁾

A IL-6 atua no estímulo da unidade formadora de colônias de granulócitos e macrófagos (CSF-GM) e na célula-tronco. ⁽⁵⁰⁾

A produção de mutantes de IL-6 por células neoplásicas é um fator que contribui para o crescimento de linfócitos B leucêmicos, linfomas das células T, e no Sarcoma de Kaposi. A IL-6 anormal é polimórfica e uma dessas formas variantes ou mutantes de IL-6 está associada com a hipertrigliceridemia. ^(51,52)

2.4.3 Enzima Ciclooxygenase-2 (COX-2)

Apesar de a ciclooxygenase (COX) ter sido identificada há mais de 20 anos, o maior progresso no entendimento de suas funções ocorreu na última década. O termo COX deve-se ao seu mecanismo de ação consistir na formação de peróxidos bicíclicos (endoperóxidos) a partir da oxigenação de ácidos graxos poli-insaturados. ⁽⁵⁶⁾

A ciclooxygenase (COX), também conhecida como prostaglandina sintase, é a enzima chave na síntese de PG a partir de ácido araquidônico (AA). Expressão aberrante da COX-2 tem sido implicada na etiologia de diversos tumores. As funções mitogênicas e pró-inflamatórias da COX-2 estão ligadas principalmente à síntese de PGE2 exagerada. ⁽⁵⁷⁾

Existem duas isoformas homólogas da COX, sendo referidas como COX-1 e COX-2. Em quase todos os tecidos normais foi detectada a presença estrutural da COX-1, e níveis baixos a indetectáveis da COX-2, a qual pode ser expressa em maior quantidade mediante a presença de citocinas, fatores de crescimento e estimulantes tumorais, sugerindo sua relevância no câncer e em processos inflamatórios. ^(56,57) A COX-1 é considerada como fisiologicamente constitutiva, agindo como citoprotetora gástrica e mantenedora da homeostase renal e plaquetária e a COX-2 ou induzível, a qual surge apenas em situação de trauma tissular, inflamação etc. ⁽⁵⁸⁾.

A expressão aumentada de COX-2 também tem sido implicada, na Doença de Alzheimer, além de outras condições neurológicas. Recentemente foi proposta a existência de uma terceira isoforma desta família enzimática, denominada COX-3, a qual, ao contrário da COX-1 e COX-2, não produziria prostanóides pró-inflamatórios, mas sim substâncias anti-inflamatórias. Tal evidência poderia explicar os períodos de remissão vistos em casos de doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatóide. ⁽⁵⁹⁾

Os fenômenos inflamatórios através da via da ciclooxygenase (COX) têm sido implicados no desenvolvimento tumoral. Esta via sintetiza prostaglandinas a partir do ácido araquidônico e as isoformas COX-1 e COX-2 são enzimas fundamentais neste processo. Enquanto a primeira encontra-se expressa numa enorme variedade de tecidos, a COX-2 não se expressa na maioria deles em

condições normais, no entanto, os seus níveis aumentam drasticamente com estímulos que causem irritação ou inflamação. ^(60,61)

2.5 Estresse Oxidativo

Dentre as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) algumas são muito reativas como os radicais livres (RL) que ao reagirem com biomoléculas, causam diferentes danos biológicos que podem levar à morte celular. Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existir independentemente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, sendo espécies paramagnéticas e altamente reativas, capazes de atacar qualquer biomolécula. Tais radicais podem ser formados em situações fisiológicas ou patológicas e são danosos às células e ao organismo quando produzidos em grandes quantidades. ^(61,62)

Os RL reagem através de ligações covalentes ou reações bioquímicas em cadeia. Na primeira situação, uma união covalente ocorre quando dois radicais formam um par, combinando os seus elétrons desemparelhados. As reações bioquímicas em cadeia ocorrem quando reagem com outro não radical, e, ao final dessa reação, produzir-se-á outro radical. Além dessas duas vias, existem outras formas de obtenção de radicais livres, através da fagocitose na resposta inflamatória, em situações de exposição do organismo a radiações ionizantes, nas contaminações, poluição, excesso de exercício, hiperóxia e isquemia. ⁽⁶⁵⁾

A defesa do organismo contra ERO vai desde a prevenção da formação das ERO, da interceptação dos radicais formados e do reparo das células danificadas. Os sistemas que previnem a formação de ERO são considerados biomoléculas ligantes de metais (Fe e Cu), são os quelantes. Assim o quelante, “sequestra”, os íons metálicos, formando quelados que possibilitam sua eliminação pelo organismo ou impede que eles participem de reações químicas, pois previnem às células dos processos oxidativos catalisados por íons metálicos e como consequência a formação de RL. ⁽⁶⁵⁾

As enzimas são capazes de controlar e degradar o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e essas enzimas são encontradas nos peroxissomas. Dentre

as mais comuns encontram-se a catalase (CAT), D-amino oxidase, urato oxidase, β -oxidase de ácidos graxos e glutathione peroxidase (GPx). O H_2O_2 apesar de não ser um radical livre, pode reagir com outro ânion superóxido, ou com metais de transição, formando o radical hidroxila (OH^\bullet).⁽⁶⁴⁾

O radical hidroxila é uma ERO instável, sendo um dos mais potentes oxidantes em sistemas biológicos. É formado a partir da reação do H_2O_2 com um ânion superóxido ou com íons ferro e que não possui enzima que catalise sua remoção. Esse radical livre possui a capacidade de atravessar as membranas e reagir com biomoléculas, como lipídios insaturados e DNA, apesar de seu baixo tempo de meia vida.⁽⁶⁶⁾

Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas às de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato. Os antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos ou não enzimáticos.⁽⁶⁷⁾

Entre as principais defesas antioxidantes enzimáticas estão as enzimas superóxido dismutase (SOD), responsáveis pela dismutação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a catalase (CAT), responsável pela dismutação do (H_2O_2) e a glutathione peroxidase (GPx). A GPx, degrada, além do H_2O_2 , outros peróxidos orgânicos. Assim as enzimas, antioxidantes evitam, impedem ou retardam a formação de RL mais lesivo o radical hidroxil e com isso o dano celular.^(68,69)

Entre as principais defesas antioxidantes não enzimáticas da célula estão as vitaminas C e E, os carotenoides, os flavonoides e a glutathione. A glutathione é considerada o antioxidante não enzimático hidrossolúvel mais importante por participar de inúmeras reações de óxido-redução.⁽⁷⁰⁾

3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Nos últimos 100 anos, mudanças no padrão alimentar ocidental tem resultado em alterações no consumo de ácidos graxos da dieta, levando a um grande aumento na proporção dos ácidos graxos do tipo ω -6 do que do ω -3. Em relação ao consumo elevado na alimentação do ω -6, ocorre seu aumento na circulação e nos tecidos, estimulando a produção de mediadores inflamatórios levando a uma maior incidência de doenças inflamatórias, incluindo asma, alergias, diabetes, doença cardiovascular e artrite.

A Associação Brasileira do Coração (SBC) recomenda a ingestão 1g/kg de ω -3 para a prevenção de doença cardiovascular e para pacientes com hipertrigliceridemia. Estudos demonstram que a combinação de medicação hipoglicemiante e ingestão de ω -3 parecem reduzir os efeitos colaterais do tratamento para diabetes tipo II. Há evidências que a suplementação com ω -3 melhora a sensibilidade à insulina em roedores sendo indicado para tratamento da síndrome metabólica. Embora muitos estudos comprovem o efeito anti-inflamatório da suplementação com ω -3, ainda não há consenso a respeito da dose adequada e mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo de ação dessa substância.⁽⁷¹⁾

Atualmente, pesquisadores investigam em diferentes tecidos de animais diabéticos buscando avaliar o efeito do estresse oxidativo e da inflamação e a possibilidade de utilizar uma substância com propriedades antioxidante e anti-inflamatória a fim de proteger as células contra o dano oxidativo e inflamatório.

O presente trabalho visa avaliar o tecido hepático de animais com diabetes mellitus induzido por administração de estreptozotocina (STZ) e o possível efeito protetor do ômega-3 (ω -3) como adjuvante para o tratamento das complicações do diabetes.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Investigar os efeitos da administração do ômega-3 na dose de 4g/kg sobre o estresse oxidativo e o processo inflamatório no fígado de ratos diabéticos.

4.2 Específicos

4.2.1 Determinar a glicemia e os níveis de colesterol e triglicerídeos no sangue;

4.2.2 Identificar a IL-1, IL-6 e COX-2, no tecido hepático através de imunohistoquímica;

4.2.3 Avaliar o dano oxidativo através da medida das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico TBARS;

4.2.4 Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase no fígado.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo tem caráter de pesquisa experimental quantitativo e qualitativo. Para isso foi induzido o diabetes em ratos associado à administração do ômega-3. Neste estudo foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar, provenientes do biotério da UFCSPA. O peso médio dos animais no início do estudo foi de 180 gramas (g). Os animais foram mantidos no biotério da UFCSPA, em caixas plásticas de 47x34x18cm, forradas com maravalha com 4 animais por caixa, com temperatura média de 22°C, ciclo de 12 horas claro/escuro. Os animais receberam comida e água *ad libitum*. O diabetes mellitus (DM) foi induzido por uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de estreptozotocina - STZ (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) na

dose de 70 mg/Kg de peso corporal. ⁽⁷²⁾ A STZ foi dissolvida em tampão citrato de sódio (0,1 M pH 4,5) e ácido cítrico (0,1M, pH 4,5) e administrada na região abdominal esquerda do animal cerca de 10 minutos após a diluição em solução tampão. Os animais do grupo controle receberam somente NaCl 0,9% i.p. no mesmo volume do tampão utilizado para dissolver a STZ. Foi realizada avaliação da glicemia 72h após a indução para determinação dos animais que apresentavam uma glicemia acima de 250 mg/dl, os quais foram considerados diabéticos. O período do estudo foi de 30 dias.

5.1 Grupos Experimentais:

Os animais foram divididos em 6 grupos com 9 animais por grupo segundo o esquema abaixo.

- I. Grupo Controle (CO):** receberam 1ml de NaCl por gavagem diariamente durante 30 dias;
- II. Grupo Controle+ ω 3 15 dias (CO+Ô15D):** receberam 1ml de ω -3 na dose de 4g/kg de peso por gavagem diariamente durante 15 dias;
- III. Grupo Controle+ ω 3 30 dias (CO+Ô30D):** receberam 1 ml de ω -3 na dose de 4g/kg de peso por gavagem diariamente durante 30 dias;
- IV. Grupo Diabético (DM):** receberam 1ml de NaCl por gavagem diariamente durante 30 dias;
- V. Grupo Diabético+ ω -3 15 dias (DM+Ô15D):** receberam 1 ml de ω -3 na dose de 4g/kg de peso por gavagem diariamente durante 15 dias após a indução da doença;
- VI. Grupo Diabético+ ω -3 30 dias (DM+Ô30D):** receberam 1 ml de ω -3 na dose de 4g/kg de peso por gavagem diariamente durante 30 dias após a indução da doença.

Após o término do tratamento, os animais foram anestesiados com 50 mg/Kg de cloridrato de xilasina (Rompum) e 100 mg/Kg de cloridrato de cetamina (Ketalar) para a retirada do sangue e do tecido hepático para

posteriores análises. Após, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésicos.

5.2 Determinações da glicemia, TG e colesterol.

Para determinação da glicemia foi utilizado o teste enzimático colorimétrico Kit ENZI-COLOR, Bio Diagnóstica. Foram considerados diabéticos aqueles animais que apresentaram a concentração de glicose sanguínea acima de 250 mg/dl. ⁽⁷³⁾ Para determinação dos níveis plasmáticos de TG e colesterol foi utilizado o kit comercial Labtest. A coleta de sangue foi realizada em dois momentos: a) 72h após a indução com estreptozotocina: os animais foram anestesiados com cetamina e xilasina e foram coletados 0,5ml de sangue do plexo retro-orbital; b) no dia do sacrifício: os animais foram anestesiados com cetamina e xilasina e foram retiradas 2 alíquotas de 1ml de sangue do plexo retro-orbital.

5.3 Dosagem de Proteína

A concentração de proteínas no homogeneizado do fígado foi determinada utilizando como padrão uma solução de albumina bovina 1mg/ml (utilizaram-se volumes de 50, 100 e 150 ml). Colocou-se uma alíquota do homogeneizado (20 ml) em 780 μ L de água destilada e 2,0 ml do reativo C que foi preparado com 50 ml de NaHCO₃ 0,5 ml do reativo B1 (CuSO₄.H₂O 1%) e 0,5 ml do reativo B2 (tartarato de sódio e potássio 2%). Após a adição do reativo C, aguardaram-se 10 minutos e colocou-se 0,2 ml de reativo de Folin Ciocalteau diluído na proporção 1:3 em água destilada. Após 30 minutos, realizou-se a medida em espectrofotômetro a 625 nm. ⁽⁷³⁾

5.4. Medida das Substâncias que Reagem ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A lipoperoxidação foi determinada através da medida das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A técnica de TBARS consiste no aquecimento do material homogeneizado na presença de ácido tiobarbitúrico e

consequente formação de um produto de coloração rósea, medido em espectrofotômetro a 535nm. O aparecimento de coloração ocorre devido à presença do malondialdeído e outras substâncias provenientes da peroxidação lipídica no material biológico. Foram colocados em tubo de ensaio, nesta ordem de adição, 0,5 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%, 0,25ml de água destilada, 0,75ml de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 0,25ml do homogeneizado. O TBA reagiu com produtos da lipoperoxidação formando uma base de Schiff, e o TCA teve função de desnaturar as proteínas presentes, além de acidificar o meio de reação. A seguir, agitou-se cada tubo, os quais foram aquecidos à temperatura de 100° C durante 15 minutos. Após, os tubos foram resfriados, e acrescentou-se 1,5 mL de álcool n-butílico, para extrair o pigmento formado. Os tubos foram colocados em agitador (Biomatic) por 45 segundos e centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm (1110 x g). Por último, o produto corado foi retirado e realizado a leitura em espectrofotômetro (CARY 3E-UV-Visible Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 535nm. A concentração de TBA-RS foi expressa em nmoles/mg de proteína. (69,74)

5.5 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase SOD

A SOD tem por principal função atuar na dismutação do ânion superóxido em H_2O_2 e O_2 , sendo que o primeiro é menos reativo que ânion superóxido e pode ser degradado por outras enzimas. A SOD pode ser classificada em três grandes grupos, segundo o metal que se encontra presente no sítio ativo: a Cu-ZnSOD, localizada no citosol; a SOD-manganês, presente na matriz mitocondrial e a FeSOD existente somente nos procariontes e plantas.

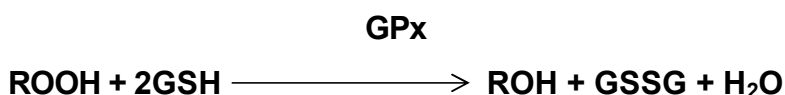
A reação catalisada é a seguinte:



A técnica para determinação da SOD está baseada na inibição da reação do radical superóxido com adrenalina. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe 50% a velocidade de formação de oxidação do detector (adrenalina). A oxidação da adrenalina leva à formação de um produto colorido, o adrenocromo, detectado espectrofotometricamente. A atividade da SOD é determinada medindo a velocidade de formação do adrenocromo, observada a 480 nm, em um meio de reação contendo glicina-NaOH (50 mM, pH 10) e adrenalina (1mM).^(68,75)

5.6 Atividade da Enzima Glutationa Peroxidase (GPx)

A enzima glutaciona peroxidase (GPx) catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutaciona reduzida (GSH) para formar glutaciona oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido, por isso, a sua atividade pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH, na presença de GSH e GR na reação de redução acoplada à reação da GPx.



Atividade da GPx é medida em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm, onde é monitorada a diminuição da absorbância do NADPH, em um meio de reação contendo os seguintes reagentes: a) Solução tampão de fosfatos 143 mM e EDTA 1 mM, com pH 7,5; b) NADPH 0,24 mM; c) Azida 1 mM, utilizada para inibir a atividade da catalase; d) GSH 5 mM; e)

Glutathiona redutase (GR) 0,25 U/ml; f) Hidroperóxido de tert-butila 0,5 mM. Os resultados são expressos em nmoles por minuto por mg de proteína. ⁽⁶⁵⁾

5.7 Atividade da Enzima Catalase (CAT)

A enzima catalase catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, segundo a seguinte reação.



A velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade enzimática e obedece a uma cinética de pseudo-primeira ordem com respeito ao peróxido de hidrogênio. O ensaio consiste em medir a diminuição da absorção a 240 nm (longitude de onda pela qual absorve o peróxido de hidrogênio).

A medida espectrofotométrica consistiu em colocar na cubetas o meio de reação (solução reguladora de fosfato 50 mM) com distintas alíquotas da amostra. Depois, fez-se um gráfico com uma linha de base. Em seguida, adicionaram-se 20µl de H₂O₂ 300 mM. A concentração foi expressa em nmol (µmoles ou picomoles) por mg de proteína. ^(59,65)

5.8 Detecção Imuno-histoquímica da IL-1, IL-6 e COX-2 no tecido hepático

Para avaliação imuno-histoquímica foram utilizados 4 grupos: controle, diabético, diabético tratado com ω-3 durante 15 dias e diabético tratado com ω-3 durante 30 dias. A técnica de imuno-histoquímica foi utilizada para localização e quantificação das interleucinas IL-1, IL-6 e enzima COX-2 no tecido hepático dos animais diabéticos e tratados com ômega3.

Utilizou-se a marcação com o complexo de estreptavidina-biotina peroxidase (StreptABC, DAKO). Foram obtidos cortes de 3µm de espessura usando um micrótomo mecânico. Os cortes foram então deparafinados e

sucessivamente imersos em xilol e álcool etílico e submetidos à recuperação antigênica por calor usando o tampão citrato (10 mM, pH 6.0) por 15 minutos. O bloqueio da peroxidase foi realizado usando uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% seguido de incubação com o anticorpo primário específico para cada citocina. As reações foram marcadas com diaminobenzidina (DAB, Sigma) solução a 60 mg% e contra-corados com hematoxilina de Harris (Merck).⁽⁵⁹⁾ Para cada reação, utilizou-se um controle positivo e dois controles negativos, esse primeiro pela ausência de anticorpo primário e o segundo, removendo o anticorpo secundário durante as etapas de reação.

5.9 Análise Estatística

Os valores obtidos nos experimentos foram expressos com média \pm erro padrão da média (EPM) para cada grupo experimental. Para a análise de múltiplas comparações usou-se o teste ANOVA one-way. Para analisar a significância entre os grupos estudados usou-se o Teste de Tukey como pós-teste. Utilizou-se o software *Statistical Package for Social Science* (SPSS) versão 17.0. Para análise quantitativa das imagens de microestruturas de materiais de imuno-histoquímica, as imagens foram transferidas para o computador através do sistema OLYMPUS *Master* v.1.41 EX e as áreas marcadas foram quantificadas com o auxílio do software IMAGE J®. O nível de significância utilizado foi de 5% ($p < 0,05$).

5.10 Considerações Éticas

O estudo tem caráter de pesquisa experimental, os procedimentos com animais foram de acordo com o preconizado pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Este trabalho foi submetido e aprovado pelo CEUA, tendo o número do parecer: 021/10 e protocolo 011/10.

6. RESULTADOS

A caracterização do estado diabético dos animais em estudo foi realizada através do acompanhamento dos níveis glicêmicos e da evolução do peso corporal de cada animal, além da observação dos quadros de polifagia, polidipsia e poliúria durante o período de 30 dias após a indução e instalação do diabetes.

6.1 Medidas da glicemia e dos níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos

Os animais controle apresentaram glicemia normal ao longo do período do experimento (30 dias). Os animais que receberam estreptozotocina para indução do diabetes apresentaram um aumento significativo ($p < 0,01$) na glicemia como esperado pela característica do modelo utilizado. Os animais controle tratados com ômega-3 durante 15 e 30 dias não apresentaram alterações significativas nos níveis glicêmicos após o período de tratamento. Os animais diabéticos tratados durante 15 e 30 dias com ômega-3 mantiveram os níveis glicêmicos elevados, característico do quadro de diabetes, o tratamento com ômega-3 não reduziu a glicemia (Tabela 1 e gráfico 1).

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de colesterol plasmático nos diferentes grupos estudados. Os animais diabéticos não apresentaram diferença significativa ($p < 0,28$) em relação ao controle e o tratamento com ômega-3, também não provocou mudanças significativas (Tabela 1 e gráfico 2).

Por outro lado, os níveis de triglicerídeos foram significativamente aumentados nos animais diabéticos quando comparados aos animais controle. O tratamento dos animais diabéticos com ômega 3 durante 30 dias foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,02$) os triglicerídeos plasmáticos mantendo-os próximos aos valores dos animais controle, porém nos animais diabéticos tratados com ômega-3 durante 15 dias não foi observado esse efeito. Nos animais controle tratados com ômega não houve alteração nos triglicerídeos plasmáticos (Tabela 1 e gráfico 3).

Tabela 1 – Valores da glicemia e dos níveis plasmáticos do colesterol e triglicerídeos.

Parâmetros	Grupos						p
	CO	CO+Ô15D	CO+Ô30D	DM	DM+Ô15D	DM+Ô30D	
Glicemia							
(mg/dl)	107,06±12,13	63,97±9,22	102,39±12,84	458,28±78,66 ^a	475,44±37,45 ^a	430,92±272,84 ^a	0,01
Colesterol							
(mg/dl)	68,12±3,32	55,10±7,48	51,17±4,44	65,52±11,73	65,52±7,42	72,97±4,56	0,28
TG (mg/dl)	59,02±7,82	57,94±10,35	58,73±10,10	148,54±64,30 ^b	210,11±23,07 ^b	72,97±58,42	0,02

^a diferença significativa dos controles .

^b diferença significativa dos controles e do grupo DM+Ô30D.

Os resultados estão expressos como média±erro padrão da média (EPM), ($p < 0,05$).

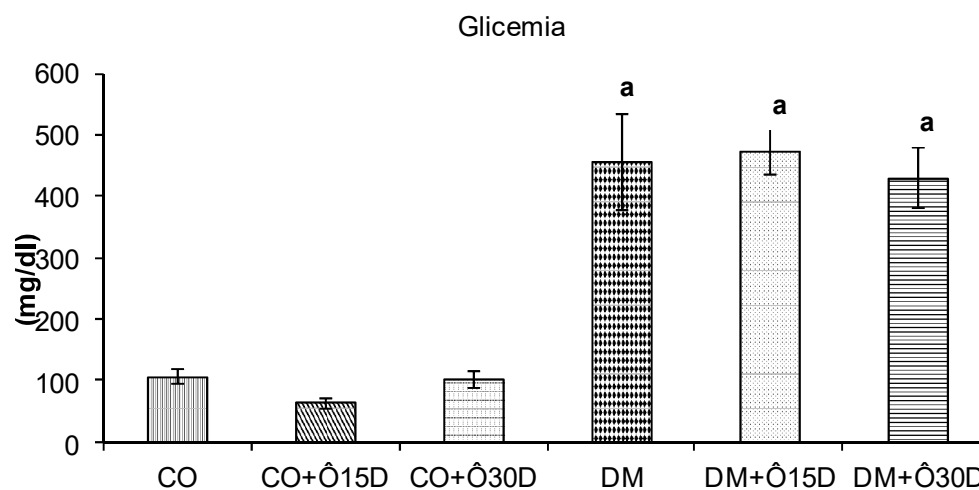


Gráfico 1 – Valores de glicemia

^a Diferença significativa da glicemia entre os grupos CO em relação os grupos DM e DM+Ô15D e DM+Ô30D.

Os resultados acima são expressos como a média±erro padrão média (EPM), ($p < 0,05$).

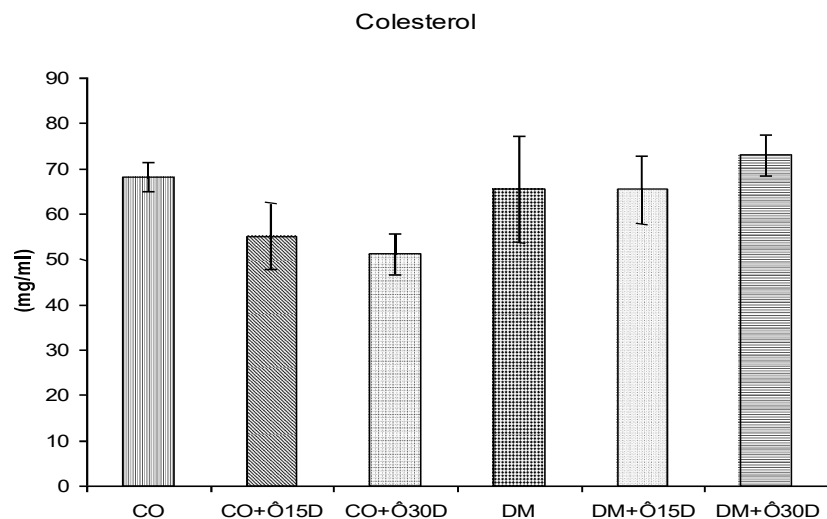


Gráfico 2 – Valores de colesterol

Não houve diferença significativa.

Os resultados são expressos com média \pm erro padrão média (EPM), ($p < 0,05$).

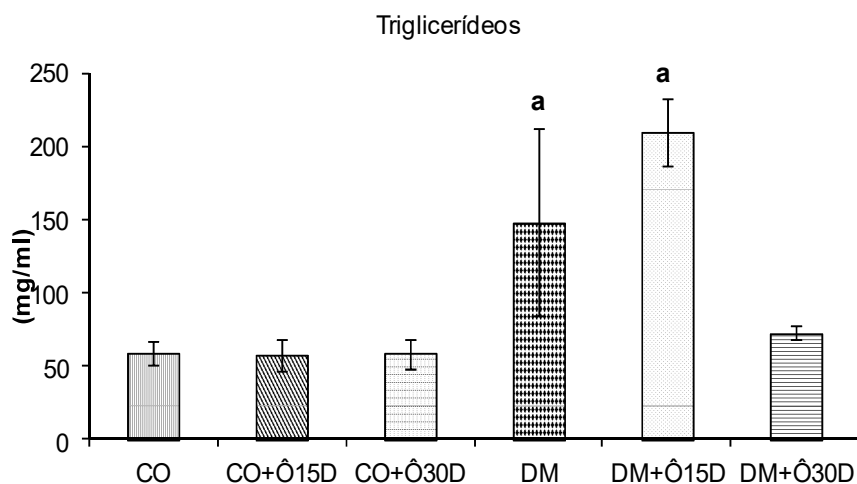


Gráfico 3 – Valores de triglicerídeos

^a Diferença significativa em relação aos grupos controles e do grupo DM+Ô30D.

Os resultados são expressos com média \pm erro padrão média (EPM), ($p < 0,05$).

6.2 Avaliação da lipoperoxidação (TBARS)

Observou-se um aumento significativo na lipoperoxidação medida por TBARS nos animais diabéticos e nos animais controle tratados com ômega-3 durante 15 e 30 dias. Nos animais diabéticos tratados com ômega-3 houve uma redução na lipoperoxidação, porém não foi significativa (Gráfico 4).

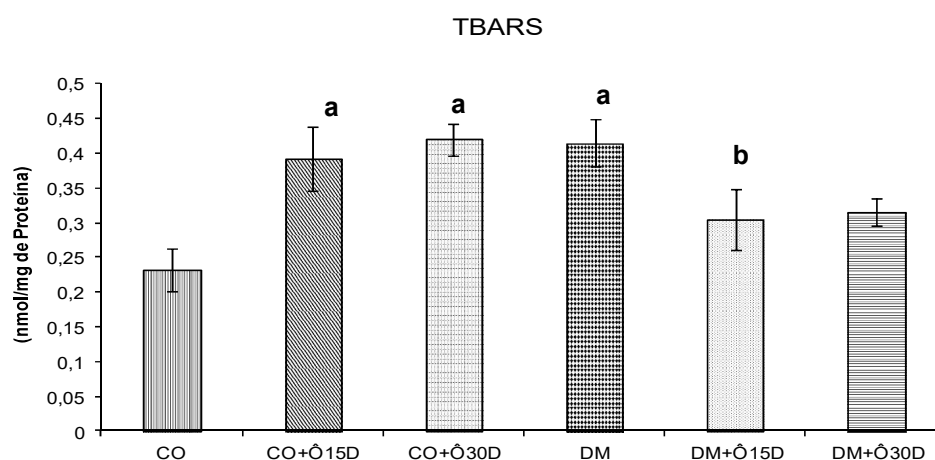


Gráfico 4 - Níveis de malondialdeído no tecido hepático dos animais (TBARS).

^a Diferença significativa do CO.

^b Diferença significativa do DM.

Os resultados são expressos com média \pm erro padrão média (EPM), ($p < 0,05$).

6.3 Atividade das enzimas, SOD, CAT e GPx, no tecido hepático

A atividade da SOD apresentou-se significativamente aumentada nos animais diabéticos em relação aos animais controle tratados com ômega-3. Nos animais diabéticos tratados com ômega-3 houve uma redução na atividade da SOD, porém não significativa (Tabela 2 e gráfico 5).

A atividade da enzima glutathiona peroxidase foi significativamente reduzida nos animais diabéticos da mesma forma que nos animais controle tratados com ômega-3. Os animais diabéticos tratados com ômega-3 durante 30 dias sofreram uma redução significativamente maior que os diabéticos (Tabela 2 e gráfico 6).

A atividade da catalase foi significativamente aumentada nos animais diabéticos em relação aos controles e os animais diabéticos tratados com ômega-3 apresentaram uma diminuição significativa na atividade desta enzima (Tabela 2 e gráfico 7).

Tabela 2 – Atividade das enzimas SOD, GPx e CAT no tecido hepático dos animais controle, diabéticos, diabéticos tratados com ω -3 nos diferentes grupos.

Parâmetros	Grupos						p
	CO	CO+Ô15D	CO+Ô30D	DM	DM+Ô15D	DM+Ô30D	
SOD (U/mg)	22,21±1,50	17,10±0,54	18,01±1,28	23,92±1,24 ^a	19,13±0,82	21,90±1,60	0,01
GPx (U/mg)	372,58±8,27	267,99±8,68 ^b	267,13±6,32 ^b	280,45±10,50 ^b	271,68±9,04 ^b	182,92±33,29 ^{bc}	0,03
CAT (U/mg)	0,41±0,07	-	0,73±0,25	4,87±0,50 ^d	-	1,79±0,60 ^e	0,02

^adiferença significativa do CO+Ô15D e do CO+Ô30D.

^bdiferença significativa do CO.

^cdiferença significativa do DM.

^ddiferença significativa dos CO.

^ediferença significativa do DM.

Os resultados estão expressos média±erro padrão média (EPM), ($p < 0,05$).

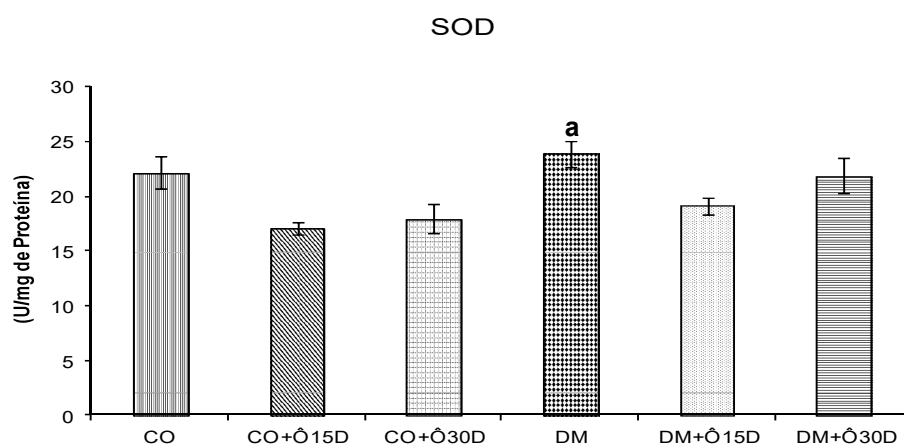


Gráfico 5 – Atividade da enzima peróxido desmutase (SOD)

^aDiferença significativa do grupo CO+Ô15D e CO+Ô30D.

Os resultados são expressos com média ± erro padrão média (EPM), ($p < 0,05$).

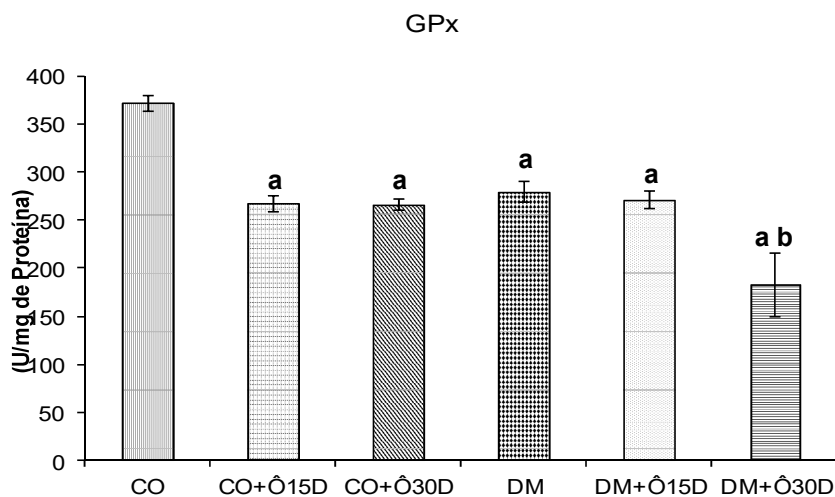


Gráfico 6 – Atividade da enzima glutatona peróxidase (GPx)

^a Diferença significativa do grupo CO.

^b Diferença significativa do grupo DM.

Os resultados são expressos com média \pm erro padrão média (EPM), ($p < 0,05$).

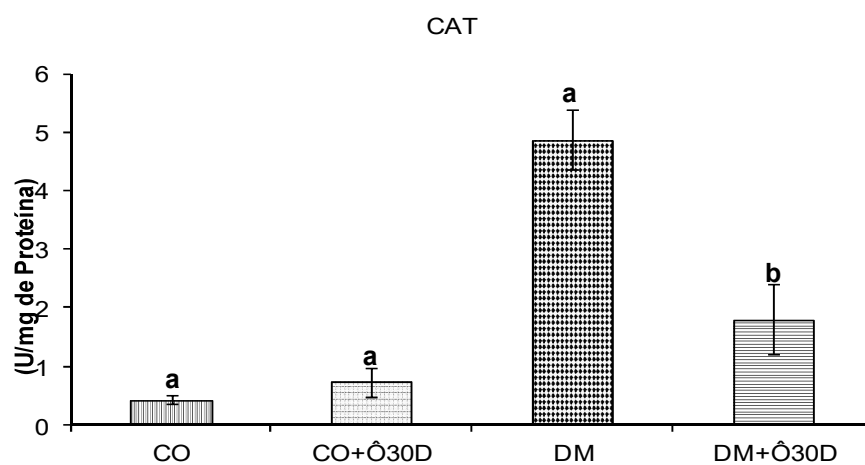


Gráfico 7 – Atividade da enzima catalase (CAT)

^a Diferença significativa dos grupos CO e CO+O30D.

^b Diferença significativa do DM.

Os resultados são expressos com média \pm erro padrão média (EPM), ($p < 0,05$).

6.4 Localização e quantificação imuno-histoquímica da IL-1, IL-6 e COX-2

Na figura 4B observa-se a presença de IL-1 identificada pela coloração marrom no parênquima hepático dos animais diabéticos. Nos animais controle (figura 4A) não foi identificada a presença da IL-1 e nos animais diabéticos tratados com ômega-3 durante 15 e 30 dias (figura 4C e 4D) observa-se uma diminuição na intensidade da marcação imuno-histoquímica para IL-1. A tabela 3 e o gráfico 8, apresenta os resultados da quantificação da intensidade da marcação imuno-histoquímica da IL-1, indicando um aumento significativo da IL-1 nos animais diabéticos em relação ao controle e uma redução significativa nos animais diabéticos tratados com ômega-3 durante 15 e 30 dias .

Na figura 5B observou-se a presença de IL-6 no tecido hepático dos animais diabéticos. Nos animais diabéticos tratados com ômega-3 durante 15 e 30 dias houve uma redução na marcação da imuno-histoquímica para IL-6. A tabela 3 e o gráfico 9 apresentam os resultados da quantificação da intensidade da marcação imuno-histoquímica da IL-6, indicando um aumento significativo da IL-6 nos animais diabéticos em relação ao controle e uma redução significativa nos animais diabéticos tratados com ômega-3 durante 15 e 30 dias.

Na figura 6B observa-se uma intensa marcação imuno-histoquímica para COX-2 no tecido hepático dos animais diabéticos (Tabela 3 e gráfico 10). Os animais controle também apresentaram marcação positiva para COX-2 e os animais diabéticos tratados com ômega-3 durante e 30 dias mostraram uma redução na intensidade da marcação quando comparados aos animais diabéticos e controle, o que não foi observado nos animais tratados com ômega durante 15 dias. Na quantificação da intensidade da coloração, os animais diabéticos e controle apresentaram um aumento da COX-2 e os animais diabéticos tratados durante 30 dias tiveram uma redução significativa em relação aos animais diabéticos.

Tabela –3: Quantificação da marcação imuno-histoquímica da IL-1, IL-6 e COX-2 no tecido hepático.

Parâmetros	Grupos				p
	CO	DM	DM+Ô15D	DM+Ô30D	
IL-1	2,22 ± 0,485	23,66 ± 2,590 ^a	7,44 ± 1,254 ^{a,b}	5,55 ± 0,677 ^{a,b}	0,01
IL-6	3,77 ± 0,399	13,33 ± 3,237 ^c	8,22 ± 0,619 ^{c,d}	5,99 ± 2,257 ^d	0,02
COX-2	18,44 ± 4,239	26,11 ± 5,825	24,66 ± 1,452	10,66 ± 2,038 ^e	0,04

^a diferença significativa do grupo CO.

^b diferença significativa do grupo DM.

^c diferença significativa do CO.

^d diferença significativa do grupo DM.

^e diferença significativa dos demais grupos .

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão média (EPM) p 0,05

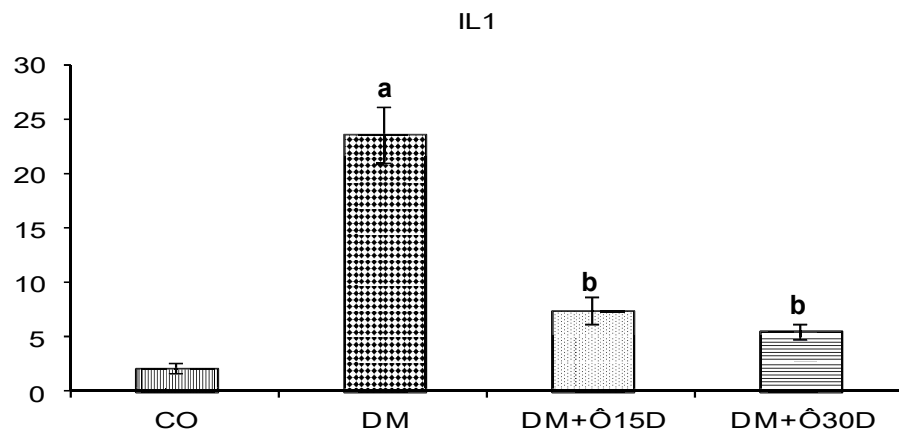


Gráfico 8 – Quantificação da marcação imuno-histoquímica da interleucina-1 (IL-1)

^a Diferença significativa do grupo CO.

^b Diferença significativa do grupo DM.

Os resultados são expressos com média \pm erro padrão média (EPM), ($p < 0,001$).

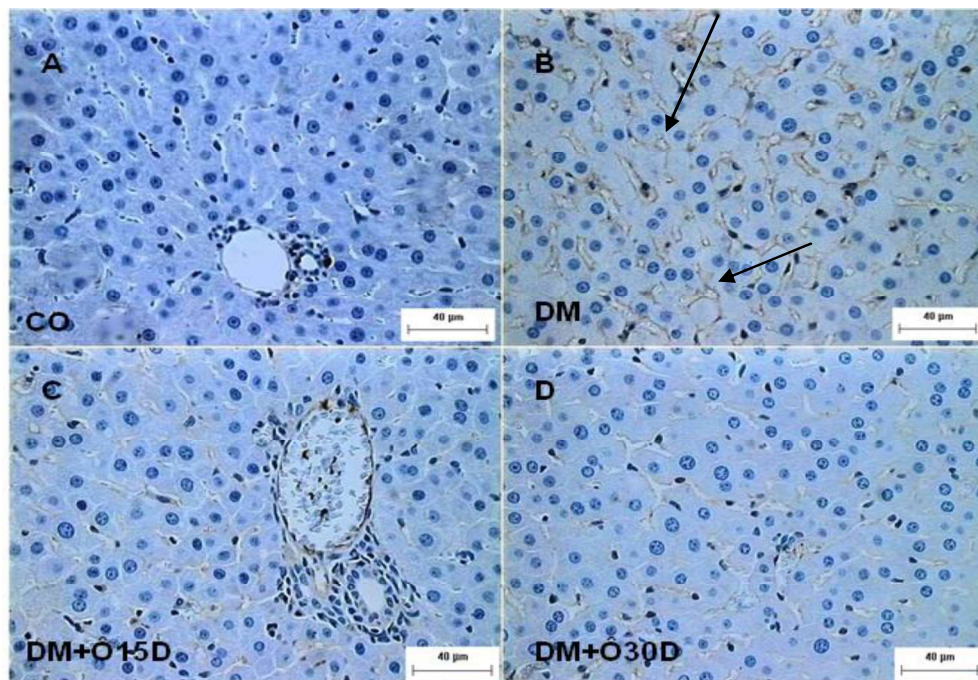


Figura 4 - Fotomicrografia do tecido hepático de animais, marcação imuno-histoquímica da citocina IL-1 vista ao redor das células (Coloração: hematoxilina-eosina, aumento original de (400X)).

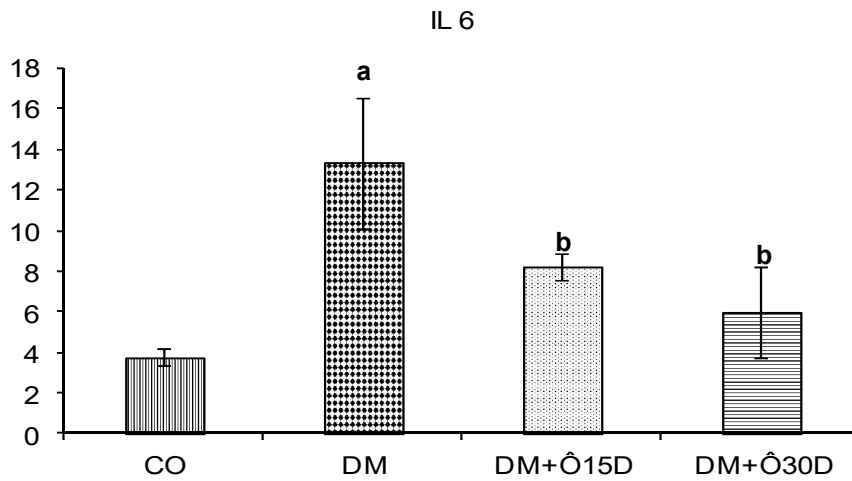


Gráfico 9 – Quantificação da marcação imuno-histoquímica da interleucina-6 (IL-6)

^a Diferença significativa do grupo CO.

^b Diferença significativa do grupo DM.

Os resultados são expressos com média \pm erro padrão média (EPM), ($p < 0,05$).

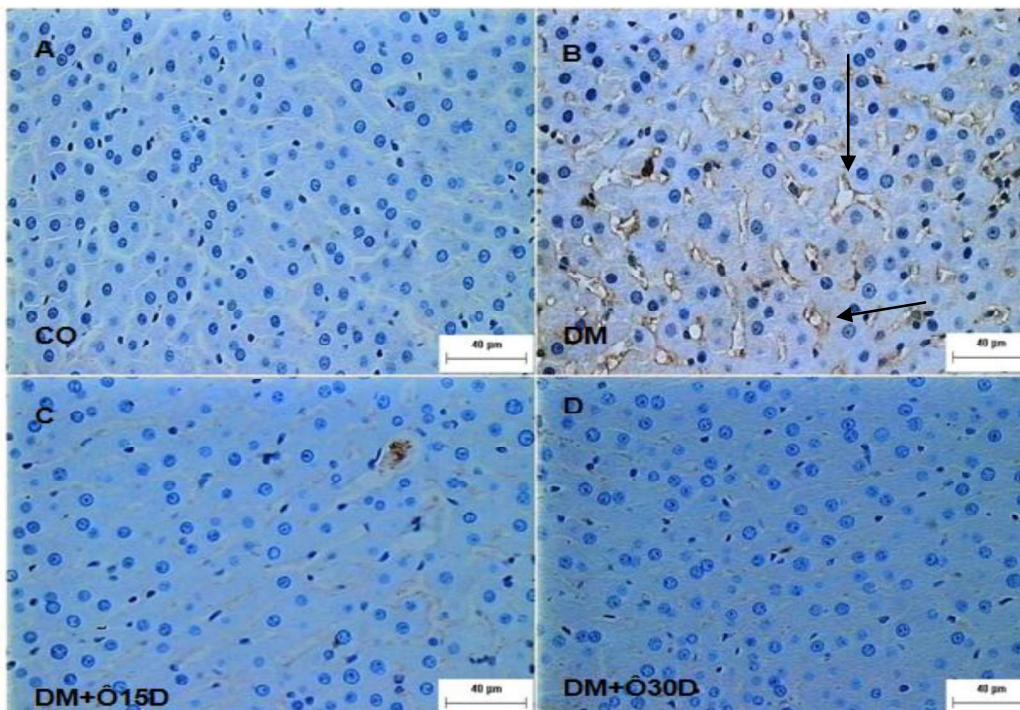


Figura 5 - Fotomicrografia do tecido hepático de animais, marcação imuno-histoquímica da citocina IL-6 vista ao redor das células (Coloração: hematoxilina-eosina, aumento original de (400X)).

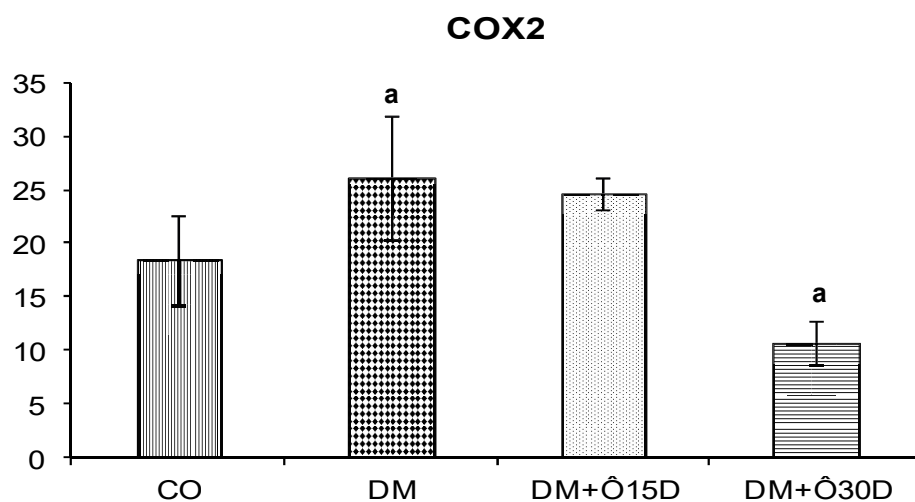


Gráfico 10 – Quantificação da marcação imuno-histoquímica da enzima ciclooxigenase (COX-2)

^a Diferença significativa do grupo DM e DM+Ô30D.

Os resultados são expressos com média \pm erro padrão média (EPM), ($p < 0,05$).

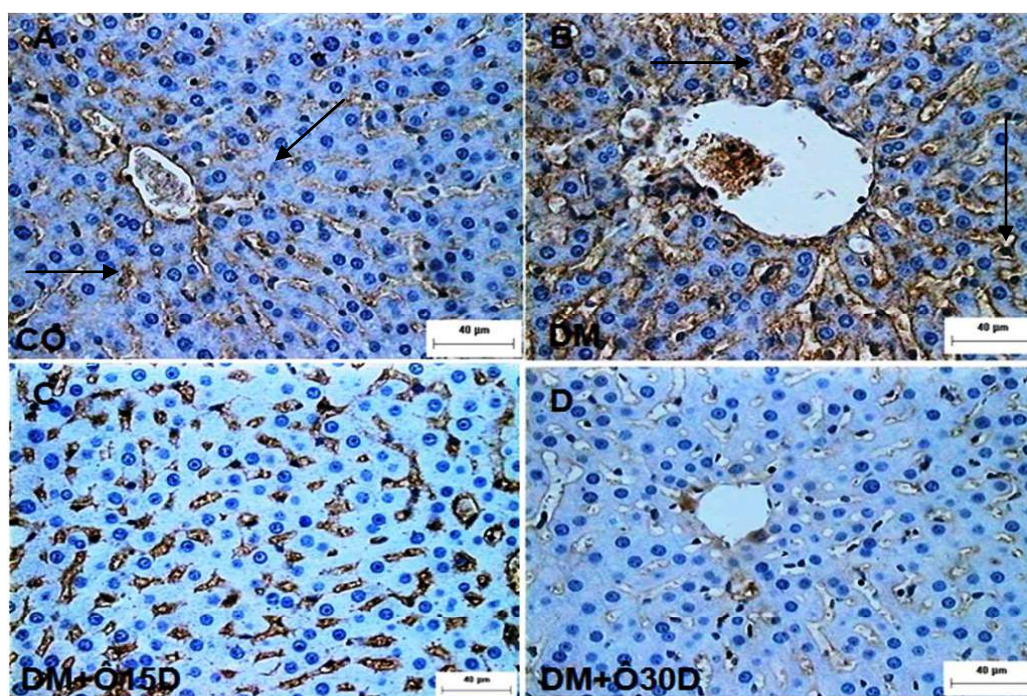


Figura 6 - Fotomicrografia do tecido hepático de animais, marcação imuno-histoquímica da enzima COX-2 vista ao redor das células, aumento original de (400X).

7. DISCUSSÃO

O diabetes mellitus é uma síndrome crônica, caracterizada pela ausência absoluta ou relativa de insulina e/ou pela resistência à insulina. Constitui um problema de importância crescente em saúde pública. Sua incidência e prevalência estão aumentando, alcançando proporções epidêmicas. ⁽⁷⁶⁾

Está associado a complicações que comprometem a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevivência dos indivíduos. Além disso, acarreta altos custos para seu controle metabólico e para o tratamento de suas complicações. ⁽⁷⁷⁾

Os modelos experimentais utilizados para o estudo do DM contribuem para o esclarecimento sobre a doença, suas causas e consequências. A indução química do diabetes em animais experimentais ocorre após a destruição seletiva das células β -pancreáticas. As substâncias diabetogênicas mais usadas são a estreptozotocina (STZ) e o aloxano. ⁽⁷⁸⁾

Neste estudo foi utilizado o modelo experimental de diabetes por STZ. A glicemia foi medida 72 horas após a indução do diabetes e no momento da morte dos animais (30 dias). Os animais mantiveram uma glicemia significativamente maior que os animais controle durante todo o experimento e o tratamento diário com ômega-3 não foi capaz de reduzir os níveis glicêmicos dos animais diabéticos. Outros estudos utilizando substâncias com potencial antioxidante como a quercetina ⁽⁷⁹⁾, aminoguanidina ⁽⁸⁰⁾ e sacaca também não promoveram redução na glicemia quando o tratamento é instituído após a instalação da doença. Porém, alguns autores observaram redução na glicemia quando o tratamento é iniciado antes da indução do diabetes. ^(81,82)

Em estudos utilizando suplementação com ômega-3 em pacientes com diabetes tipo II, também não foi observado alteração no controle glicêmico ou modificações na sensibilidade à insulina. ⁽⁸³⁾

Comparando pessoas saudáveis com pacientes portadores de diabetes tipo II, observou-se que a suplementação com ômega-3 pode ser capaz de

modular a ação da insulina mas não de reverter a resistência insulínica já estabelecida e portanto, não reduz a glicemia em pacientes diabéticos.⁽⁸⁴⁾

Os níveis de colesterol total permaneceram inalterados, tanto nos animais diabéticos quanto naqueles que receberam suplementação com ômega-3. Os animais controles que receberam suplementação com ômega-3 também não apresentaram alterações significativas. Em estudo realizado com animais com 60 dias de diabetes observou-se aumento nos níveis de colesterol total que não foram reduzidos pelo tratamento com sacaca.⁽⁸¹⁾

Por outro lado, os níveis de triglicerídeos foram significativamente aumentados nos animais diabéticos quando comparados aos controles. O tratamento dos animais diabéticos durante 30 dias com o ômega-3 foi capaz de reduzir significativamente os triglicerídeos plasmáticos.

Estudos em pacientes com risco cardiovascular utilizando EPA e DHA, comparados com outros pacientes que utilizavam estatinas, observou-se resultados semelhantes na redução dos TG plasmáticos.⁽⁸⁵⁾

A administração de ômega-3 em dois grupos de pacientes, um com hipertrigliceridemia e outro com risco cardiovascular, observou-se uma redução de 5% nos TG plasmáticos dos pacientes com hipertrigliceridemia e uma redução de 53% nos TG plasmático dos pacientes com risco cardiovascular.^(86,87)

O estresse oxidativo é um processo mediado pela formação de radicais livres diversos que resultam na degradação oxidativa dos lipídeos (lipoperoxidação) e de proteínas presentes nos diversos sistemas de membranas da célula. Esse processo pode ser iniciado por radicais derivados dos xenobióticos gerados em reações catalisadas pelas isoenzimas do citocromo-P450 ou ainda pela produção de radicais livres oriundos do oxigênio. A primeira consequência desse processo é a profunda alteração das propriedades físicas e químicas das membranas, causando perda das suas funções especializadas.⁽⁸⁸⁾

A formação excessiva de radicais livres em muitas reações desempenha um papel crucial na patogênese das complicações crônicas do diabetes mellitus. As Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) são continuamente produzidas durante os eventos fisiológicos normais, sendo removidas por

mecanismo de defesa antioxidante. Em condições patológicas como as provocadas pelo diabetes mellitus, as ERO resultam em peroxidação lipídica e dano oxidativo. ⁽⁶³⁾

O fígado é rico em mitocôndrias e importante para o metabolismo energético e o principal órgão que atua nos processos oxidativos e de detoxificação. Portanto, danos às mitocôndrias hepáticas vão agravar os distúrbios metabólicos no diabetes.

No presente estudo observou-se um aumento significativo na lipoperoxidação medida por TBARS no fígado dos animais diabéticos e nos animais controle tratados com ômega-3 durante 15 e 30 dias. Nos animais diabéticos tratados com ômega-3 houve uma redução na lipoperoxidação, que foi significativa apenas nos animais tratados durante 15 dias. Um aumento na geração de radicais livres pode conduzir à oxidação de lipídios e proteínas que são importantes componentes das biomembranas.

Níveis aumentados de TBARS têm sido encontrados em fígados de ratos diabéticos. Estudos que utilizaram a aminoguanidina, uma substância com potencial antioxidante, demonstraram redução na lipoperoxidação no fígado e no pulmão de animais com DM. ^(80, 89)

Estudos utilizando o flavonoide quercetina, sobre o estresse oxidativo hepático no modelo experimental de diabetes também mostrou redução na lipoperoxidação de membranas. ^(79,90)

O ômega-3 foi capaz de reduzir a lipoperoxidação no fígado, porém apenas com 15 dias de tratamento, essa redução não foi significativa com o tratamento mais prolongado.

O aumento da lipoperoxidação observado nos animais controle que receberam ômega-3 pode estar relacionado com sua capacidade de interagir com os fosfolípídeos de membrana, uma vez que uma ingesta aumentada de ácidos graxos ω -3 causa a substituição parcial dos ácidos graxos ω -6 especificamente do ácido araquidônico (AA) das membranas fosfolipídicas.

A enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), é a primeira linha de defesa contra ataques de radicais livres a qual pode ser distinguida entre: citoplasmática, mitocondrial e extracelular. ^(91,92)

A Superóxido-dismutase catalisa a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em um peróxido (H_2O_2) menos lesivo, que posteriormente é degradado pela catalase ou glutathiona peroxidase. ⁽⁹³⁾

No presente estudo a atividade da SOD apresentou-se significativamente aumentada nos animais diabéticos em relação aos animais controle tratados com ômega-3, 15 e 30 dias. Nos animais diabéticos tratados com ômega-3 houve uma redução na atividade da SOD, porém não significativa. Em um estudo utilizando a suplementação do ômega-3 ocorreu um aumento a expressão de genes de enzimas antioxidantes e genes associados à baixa regulação da produção de espécies reativas de oxigênio. ⁽⁹⁴⁾

Outros estudos com ratos que utilizaram ômega-3 como antioxidante, observaram aumento da atividade da SOD o que pode conduzir a uma importante eliminação de íons de superóxido, a qual pode, então, inibir a formação de radicais hidroxila. ⁽⁹⁵⁾

Em outro estudo com a administração do ômega-3 em ratos, a atividade da SOD mostrou-se aumentada, associada com uma diminuição dos níveis de malondialdeído, um marcador de peroxidação lipídica. ^(96,97)

No presente estudo a atividade da enzima glutathiona peroxidase foi significativamente reduzida nos animais diabéticos da mesma forma que nos animais controle tratados com ômega-3. Os animais diabéticos tratados com ômega-3 durante 30 dias sofreram uma redução significativamente maior que os diabéticos não tratados.

A glutathiona peroxidase é uma enzima que elimina os H_2O_2 e outros peróxidos orgânicos. Em recente estudo foi relatado uma relação linear entre o ácido docosahexaenóico em cultura de fibroblastos humanos e um grande aumento das enzimas antioxidante. ⁽⁹⁸⁾

Há uma mudança sobre as atividades das enzimas antioxidantes de diferentes órgãos em ratos diabéticos. ⁽⁷⁹⁾

A catalase (CAT) é reponsável por decompor o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio (O_2). Assim as enzimas antioxidantes evitam, impedem ou retardam a formação do radical livre (RL) mais lesivo o radical hidroxil e com isso, impede o dano celular. ⁽⁶³⁾

Em nosso estudo a atividade da catalase foi significativamente aumentada nos animais diabéticos em relação aos controles e os animais diabéticos tratados com ômega-3 apresentaram uma diminuição significativa na atividade desta enzima.

Em estudos utilizando o flavonoide quercetina, observou-se um aumento na atividade das enzimas antioxidantes, sugerindo que este flavonoide conserva a atividade das enzimas SOD e CAT, tanto no tecido hepático como em eritrócitos. ⁽¹⁰³⁾

Em estudos utilizando o pó da folha de amoreira, observou-se um aumento significativo na atividade da enzima CAT em animais diabéticos tratados. ⁽¹⁰⁴⁾

Embora alguns estudos mostrem que a atividade das enzimas SOD, catalase e glutathione peroxidase no DM seja reduzida ⁽⁹⁹⁾ outros autores apontam para o aumento da atividade em ratos diabéticos induzidos por STZ. ^(100,101) Essa aparente contradição pode ser devida à especificidade do tecido, variações na severidade ou duração da doença, ou outras condições experimentais. ⁽¹⁰²⁾

Em nosso estudo, observamos que o tratamento com ômega-3 reduziu a atividade das enzimas antioxidantes, tanto nos animais diabéticos quanto nos animais controle.

O processo inflamatório e a injúria tecidual induzem uma cascata complexa de eventos fisiológicos conhecidos como resposta inflamatória que promove proteção aos tecidos, restringindo os danos no local da infecção ou injúria, mas podendo ter efeitos deletérios quando de forma exacerbada. Em estágios iniciais da inflamação o tipo celular predominante é o neutrófilo, em fases mais tardias os monócitos e os linfócitos também migram para o local, amplificando o processo inflamatório. ⁽¹⁰⁵⁾

A reação inflamatória é acompanhada por uma resposta sistêmica conhecida por resposta de fase aguda. Esta resposta é caracterizada por febre, produção de diversos hormônios, leucocitose e produção de proteínas de fase aguda pelo fígado. Citocinas, como IL-1, IL-6, TNF- α , factor inibidor de leucemia (LIF - *leukemia inhibitory factor*) e oncostatina M (OSM) são produzidas no local da inflamação e desempenham papel crucial na resposta

de fase aguda, induzindo a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos. ⁽¹⁰⁵⁾.

Além disso, as ERO desencadeiam uma cascata inflamatória, por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-6, as quais estão envolvidas na patogênese de complicações micro e macrovasculares. Com efeito, a presença dessas citocinas são frequentemente utilizados como marcadores da resposta inflamatória. O TNF- α , a IL-1 e a IL-6, quando em altas concentrações, também ativam hepatócitos aumentando a síntese de proteínas séricas. O conjunto de proteínas séricas induzidas por estas citocinas constituem o que se denomina de resposta de fase aguda. ⁽¹⁰⁶⁾.

No presente estudo observa-se a presença de IL-1 no parênquima hepático dos animais diabéticos indicando um aumento significativo da IL-1 nos animais diabéticos em relação ao controle e uma redução significativa nos animais diabéticos tratados com ômega-3 durante 15 e 30 dias .

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que influencia respostas imune-antígeno-específicas e reações inflamatórias, sendo um dos maiores mediadores da fase aguda da inflamação. Estimula a produção de proteínas da fase aguda da inflamação nos hepatócitos e aumenta a concentração de zinco intracelular nestas células o que, teoricamente, previne a toxicidade causada pelo tetracloreto de metila. Tem ainda ação importante na atração de eosinófilos para o local de inflamação. ⁽¹⁰⁷⁾

Estudo em pacientes diabéticos e indivíduos saudáveis foi detectado um aumento significativo da IL-6 em pacientes diabéticos, mas sem complicações micro ou macrovascular, em comparação com indivíduos saudáveis ^(108,109).

Em outro estudo semelhante, a pesquisa focando a associação entre inflamação e obesidade, dislipidemia, hiperglicemia e em 553 pacientes jovens com DM, e 215 indivíduos saudáveis, encontraram níveis significativamente mais elevados de IL-6 no grupo de diabéticos, independentemente do peso ou concentração de Hemoglobina Glicada (HbA1c). ⁽¹¹⁰⁾

Assim, de acordo com um estudo com 22 crianças portadoras de DM tipo I, Rosa e Flores relataram que a hiperglicemia aguda foi associada com o

aumento dos níveis de IL-6, IL-4, e IL-1, e estes níveis elevados persistiram por pelo menos 2h após o controle da glicose.⁽¹¹¹⁾

Em outro estudo os resultados demonstram que a oxidação e as respostas inflamatórias são aumentadas no início do DM, mas mantêm-se inalteradas durante a progressão da doença.⁽¹¹²⁾

Resultados com a utilização do resveratrol indicaram que a citocina IL-1 teve sua expressão reduzida no tecido hepático, porém houve um aumento da IL-6 no baço de ratos diabéticos.⁽¹¹³⁾

Portanto, nos resultados observados neste estudo houve aumento na marcação imunohistoquímica para IL-1 e IL-6 no tecido hepático dos ratos diabéticos. Nos ratos diabéticos tratados com ômega-3 houve uma redução das citocinas no tecido hepático, isso demonstra que o ômega-3, talvez possa ter um efeito anti-inflamatório.

Durante a resposta inflamatória, mediadores protéicos, como citocinas, e lipídicos, como as prostaglandinas, juntamente com substâncias liberadas localmente, as quais incluem histamina, bradicinina e substância P, são responsáveis pela manutenção e amplificação do processo inflamatório. Dentre os muitos mediadores químicos associados à evolução e à amplificação da resposta inflamatória, as prostaglandinas, indubitavelmente, possuem papel de destaque⁽¹¹⁴⁾. Prostaglandinas, moléculas biologicamente ativas derivadas do ácido araquidônico e outros ácidos graxos poli-insaturados, são liberadas por estímulos químicos ou mecânicos a partir dos fosfolipídios de membrana, sob a ação da fosfolipase A2 (PLA2). A COX-2, é codificada por um gene diferente, é expressa em resposta a estímulos inflamatórios e mitogênicos, sendo, portanto responsável pela formação das prostaglandinas associadas à resposta inflamatória.⁽¹¹⁵⁾

A COX-2 pode ser expressa constitutivamente em muitos tecidos, incluindo endotélio vascular, SNC e rins. Ademais, evidências recentes mostraram que ambas COX-1 e COX-2 estão envolvidas tanto em eventos fisiológicos quanto patológicos. De fato, uma resposta inflamatória plena é sustentada por prostanóides gerados tanto pela COX-1 quanto pela COX-2⁽¹¹⁶⁾. Além do envolvimento em processos inflamatórios, a COX-2 parece também estar implicada em crescimento e formação tumoral⁽¹¹⁷⁾.

No presente estudo observou-se no tecido hepático dos animais controle significativa marcação da COX-2. Os animais diabéticos tratados com ômega-3 durante 15 e 30 dias mostraram uma redução na expressão da COX-2, quando comparados aos animais diabéticos e controle.

Entre os mecanismos que podem explicar os efeitos benéficos do ômega-3 está a competição pelo substrato que previne a conversão de Ácido Araquidônico (AA) a eicosanóides pró-inflamatórios como as prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT) e lipoxinas (LX) pela cicloxigenase (COX) ou lipoxigenase (LOX).⁽¹¹⁸⁾

Estudos mostram que a composição lipídica das células imunes de roedores possui aproximadamente 15 a 20% de AG como do AA e pequenas concentrações de ω -3. Quando a dieta destes animais é modificada em sua concentração de AG, também ocorre modificação na composição destes ácidos na membrana das células imunes.⁽¹¹⁹⁾

Neste estudo outra possibilidade de ação dos AGPI ω -3 está na competição com o estoque de AA levando à inibição da produção de eicosanóides pró-inflamatórios. Podem também servir como substrato alternativo para a ciclooxigenase (COX1 e COX2) resultando na formação de produtos menos potentes que os pró-inflamatórios.⁽¹²⁰⁾

Nossos resultados demonstram que o tratamento com ômega-3 durante 15 e 30 dias tem um efeito benéfico sobre os níveis de IL-1, IL-6 e COX-2 no tecido hepático.

8. CONCLUSÃO

O tratamento de ratos diabéticos com 4g/Kg de ômega-3 durante 15 e 30 não foi capaz de reduzir a glicemia, não provocou mudanças nos níveis de colesterol, mas reduziu de forma significativa o nível dos TG plasmáticos nos animais tratados durante 30 dias, dados esses que apresentam correspondência com a literatura.

Os animais diabéticos apresentaram um aumento na lipoperoxidação que foi reduzido significativamente nos animais tratados durante 15 dias, porém manteve-se elevado nos animais controle que receberam ômega e nos diabéticos tratados durante 30 dias. O tratamento com ômega-3 também reduziu a atividade das enzimas antioxidantes. Esses resultados parecem indicar que a dose e o tempo de tratamento podem promover um efeito pró-oxidante.

Nos animais diabéticos observou-se um aumento significativo na marcação imunohistoquímica das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 e IL-6 e na enzima COX-2 o que caracteriza um aumento da resposta inflamatória no DM. O tratamento com ômega-3, tanto por 15 dias quanto por 30 dias, foi capaz de reduzir esses marcadores inflamatórios no tecido hepático dos animais diabéticos.

Portanto, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, é possível sugerir um aumento do dano oxidativo e inflamatório relacionados ao diabetes, observados através do aumento da lipoperoxidação e das citocinas inflamatórias IL-1, IL-6 e da enzima COX-2 no fígado.

O tratamento com ômega-3 apresentou em efeito importante na redução dos TG plasmáticos e nas citocinas inflamatórias, sugerindo um efeito positivo no controle das complicações do diabetes, porém mais estudos são necessários para caracterizar o possível efeito antioxidante do tratamento com ômega-3.

9. REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Diabetes Mellitus / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica – Ministério da Saúde, 64 p. il. – (Cadernos de Atenção Básica, n. 16) (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Brasília: Brasil. 2006.
2. OMS, www.worlddiabetesday.org. 2007. [acesso em 2012, Abril/ 06]
3. Ganong. William. F. Reproduction and the renin-angiotensin system, V. 19, Ed. 2, p: 241-250.1995.
4. Johnson, Cynthia S; Sadayoshi Ito and Carretero, Oscar A. Modulation of Angiotensin induced Vasoconstriction by Endothelium- derived Relaxing Factor in the Isolated Microperfused Rabbit Afferent Arteriole. J. Clin. Invest. The American Society for Clinical Investigation. Volume 87, May, Inc.0021-9738/91/05/1656/08.1991.
5. Büttow, N. C.; Miranda-Neto, M. H.; Bazzotte, R. B. Morfological and quantitative study of the myenteric plexus of the duodenum of streptozotocin-induced diabetic rats. Arq. Gastroenterol.34(1), 34-42. 1997.
6. Dias, A. S.; Lesuy, S.; Marroni, C. A.; Marroni, N. Alterações gastrointestinais no diabetes mellitus: estresse oxidativo e fluxo sanguíneo da artéria mesentérica – estudo experimental. Arq Gastroenterol. 41(2), 108-113. 2004.
7. Evans, J.L.; Goldfine, I.D.; Maddux, B.A.; Grodsky, G.M. Perspectives in Diabetes. Are oxidative stress – Activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction Diabetes.52: 1- 8, 2003.
8. Bierhaus, A.; Schiekofe, S.; Schwaninger, M.; Andrassy, M.; Humpert, P.M.; et al. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear-kB. Diabetes.50:2792-2808. 2001.
9. Kromhout, D. Bosschieter E. B., de Lezenne Coulander C. The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. N. Engl. J. Med. 312, 1205–1209.1985.

10. Simopoulos, A.P. The importance of the ration of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*, v.56, p. 365-379.2002.

11. Salmeron, M. Próxima geração de ácidos graxos ômega-3 para enriquecer alimentos. *Revista Food Ingredients*, v.9,p. 58-59. 2000.

12. Burr, G. O; Burr, M. M. A. New Deficiency Disease Produced by the Rigid Exclusion of Fat from the Diet. *J. Biol. Chem.* 82, 345–367.1929.

13. Burr, G. O.; Burr, M. M. . On the Nature and Role of the Fatty Acids Essential in Nutrition *J. Biol. Chem.* 86, 587–621.1930.

14. De Caterina, R. And G. Basta, G. n-3 Fatty acids and the inflammatory response -biological background. *European Heart Journal Supplements*. 3 (Supplement D); D42-D49.2001.

15. Dziezak, J. Fats, oils and fat substitutes. *Food technol*, Chicago, v. 43, p.66-74,1989.

16. Gorjão, R.; Azevedo, Martins, A.K.; Rodrigues, H.G.; Abdulkader, F.; Arcisio-Miranda, M.; Procopio, J.; Curi, R. Comparative effects of DHA and EPA on cell function. *Pharmacology & Therapeutics*.122: 56–64.2009.

17. Martin, Clayton Antunes; Almeida, Vanessa Vivian de; Ruiz, Marcos Roberto; Visentainer, Jeane Eliete Laguila; Matshushita, Makoto; Souza, Nilson Evelázio de; Visentainer, Jesuí Vergílio. Ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev. Nutr.* v.19 n.6 Campinas nov./dez. 2006.

18. Riediger, Natalie D.; Othman, Rgia, A.; Mohammed, Miyoung Suh, H. Moghadasian. A Systemic Review of the Roles of n-3 Fatty Acids in Health and Disease. *A Systemic Review of the Roles of n-3 Fatty Acids in Health and Disease*. V. 109, Issue 4 , Pages 668-679; 12.022;2009.

19. Waitzberg, D.L.; Borges, V.C. Gorduras In: *Nutrição oral, Enteral e Parenteralna Prática Clínica*. 3ª edição. São Paulo: Atheneu;.p: 59-64. 2002.

20. Duarte, A.C. Nutrição Imunomoduladora. In: *Semiologia Imunológica Nutricional*. Rio de Janeiro: Axcel Books; p.138-144. 2003.

21. Lopes & Juzwiak. O uso de Fórmulas Infantis após o desmame. *Temas de Pediatria*. Nestlé; (74). p.7-8.2003.
22. Jones, P.J.H.; Kubow S. Lipídios, esteróis e seus metabólitos. In: *Tratado de Nutrição Moderna na saúde e na Doença*. 9ª ed. São Paulo: Manole; 1: 1243-48.2002.
23. Oliveira, F.L.C. Imunomodulação. In: *Temas de Nutrição em Pediatria*. Publicação elaborada pelo departamento de Nutrição da Sociedade Brasileira de Pediatria; (3).p.24-27.2004.
24. Mahan, L.K, Escott-Stump S. Lipídeos. In: *Krause: alimentos, nutrição & dietoterapia*. 9ª ed. São Paulo: Roca;. p. 51-53. 1998.
25. Waitzberg, D.L.; Souza, T.T. Terapia Nutricional para o paciente crítico - Controle do estresse metabólico com intervenção nutricional específica. *Support*; p.11-13. 1999.
26. Simopoulos, A.P. Omega 3 fatty acids in health and disease and is growth and development. *Am J Clin Nutr*, (54): 438-63. 1991.
27. Tirapegui, J. *Nutrição: fundamentos e aspectos atuais*. Sao Paulo: Atheneu, 284 p.2000.
28. Vannucchi, H. et al. Aplicações das recomendações nutricionais adaptadas a população brasileira. *Caderno de Nutrição*, Sao Paulo, v.2, p.63-67.1990.
29. Shepard, R.J.; Shek, P.N. Heavy exercise nutrition and immune function: is there a connection? *Int. J. Sports Med.*, v.16, p. 491-497.1995.
30. Hunter, J.E.; Zhang, J.; Etherton, Kris. P.M. Cardiovascular disease risk of dietary stearic acid compared with trans, other saturated, and unsaturated fatty acids: a systematic review. *Am J Clin Nutr*; 91: 46-63.2010.
31. Calder, P.C. Immunomodulation by omega 3 fatty acids. *Prost Leukotrienes and essential fatty acids*; 77: 327-35;2007.

32. Calder, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie*; 91:791-5.2009.
33. Calder, P.C, Yaqoob P. Understanding omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Postgrad Med*; 121:148-57.2009.
34. Calder, R.P.C, Yaqoob P. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. *Biofactors*; 35:266-72; 2009.
35. Mollinedo, F.; Borregaard, N. & Boxer, L.A. Novel trends in neutrophil structure, function and development. *Immunol Today* 20(12):535-537.1999.
36. Borregaard, N.; Løllike, K.; Kjeldsen, L.; Sengelov, H.; Bastholm, L.; Nielsen, M.H. & Bainton, D.F. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol* 51(4):187-98.1993.
37. Lund, T. Mangsbo, S.M.; Scholz, H.; Gjørstrup, P.; Tøtteman, T.H.; Korsgren, O.; Foss, A.; Resolvin, E. Reduces proinflammatory markers in human pancreatic islets in vitro. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*; 118: 237-44.2010.
38. Ahima, R.S.; Flier, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metabolism*.11(8):327-32. 2000.
39. Karin, M. How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene*.18(49): p. 6867-74. 1999.
40. Dias, A. S.; Porawski, M.; Alonso, M.; Marroni, N.; Collado, P. S.; González-Gallego, J. Quercetin decreases oxidative stress, NF- κ B activation and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr*.135 (10), 2299-304. 2005.
41. Lund, Andersen, Henrik.; Gaede, Parving. Peter.; Hans-Henrik, and Oluf, Pedersen. Effect of a Multifactorial Intervention on Mortality in Type 2 Diabetes. Massachusetts Medical Society. All rights reserved. february 7, 2008. *N Engl J Med*;358:580-91.2008.
42. Steemburgo, Thais; Azevedo, Mirela J.; De Martinez, José Alfredo. Gene-nutrient interaction and its association with obesity and diabetes mellitus *Arq*

Brás Endocrinol Metab vol.53 no.5 São Paulo July. *Print version* ISSN 0004-2730; 2009.

43. Garcia, Mediavilla, V.; Crespo, I.; Collado, P.S.; Esteller, A.; Sanchez-Campos, S., et al., The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur J Pharmacol*,.557(2-3): p. 221-9. 2007.

44. Segui, J.; Goronella, N.; Sans, M.; Granell, S.; Gil, F.; Gimeno, M.; Coronel, P.; Piqué, J. M.; Panés, J. Superoxide dismutase ameliorates TNBS-Induced colitis by reducing oxidative estress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. *J Leuk Biol*.76, 537-544.2004.

45. Ramel, Wiveka ; Goldinkateri, Philippe R. Rae; James J. Gross. The Neural Bases of Emotion Regulation: Reappraisal and Suppression of Negative Emotion. *Biological Psychiatry*; Volume 63, Issue 6, 15 March, Pages 577–586.2008.

46. Romero, Carla Eduarda; Machado, Zanesco, Angelina. O papel dos hormônios Leptina e grelina na gênese da obesidade. *Rev. Nutr., Campinas, jan./fev.19(1): 85-91. 2006.*

47. Naoum, Paulo Cesar. Citocinas e interleucinas.Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto – SP;Nov.2009.

48. Rinke, Stienstra; Fredy, Saudale; Duval, Caroline; Shohreh, Keshtkar; Groener, Johanna, E. M; Nico, van Rooijen; Bart, Staels; Sander, Kersten; and Michael, Muller. Kupffer Cells Promote Hepatic Steatosis Via Interleukin-1_– Dependent Suppression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor _– Activity. *Hepatology*.Vol. 51, No. 2. 2010.

49. Colleen, Smith Marks; Allan, Lieberman Machael. *Bioquímica Médica Básica de Marks*. 1º edição-Porto Alegre: Artmed.2007.

50. Tang, Z.Y. Hepatocellular carcinoma-Cause,treatment and metastasis. *World J. Gastroenterol*..7:445-454.2001.

51. Luo, R.H.; Zhao, Z.X.; Zhou, X.Y.; Gao, Z.L.; Yao, J.L. Risk factors for primary liver carcinoma in Chinese population. *World J Gastroenterol*, 11(28):4431-4434.2005.

52. Williams, J. A. & Shacter, E. J. *Biol. Chem.* 272, 25693–25699.1997.
53. Millet, I.; McCarthy, T. L. & Vignery, A. J. *Bone Miner. Res.* 13,1092–1100.1998.
54. O'Rourke, R.W. Inflammation in obesity-related diseases. *Surgery*, 145:(3), 2009
55. Siriwardhanaa, N.; Kalupahanab, N.S.; Cekanovac, M.; LeMieuxa, M.; Greerd, B.; Moustaid-Moussaa, N. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24: 613–623, 2013.
56. Marnett, L.J.; Rowlinson, W.S.; Goodwin, D.C et al –Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2 - *J Biol Chem.* 274:22903-22906.1999.
57. Cao, Y. & Prescott, S. M. *J. Cell. Physiol.* 190, 279–286.2001.
58. Fitzgerald, G.A.; Patrono, C. – The coxibs, selective inhibitor of cyclooxygenase-2. *N Engl J Méd.* 345:433-442,2001.
59. Harris, R.C.; Breyer, M.D. – Physiological regulation of cyclooxygenase- 2 in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 281:F1-F11.2001.
60. Yaksh, T.L.; Dirig, D.M.; Conway, C.M. et al –The acute antihyperalgesic action of nonsteroidal, anti-inflammatory drugs and release of spinal prostaglandin E2 is mediated by the inhibition of constitutive spinal cyclooxygenase-2 (COX-2) but not COX-1, *J Neurosc.* 21:5847-5853.2001.
61. Perazella, M.A.; Tray, K. – Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: A pattern of nephrotoxicity similar to traditional nosteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med.* 111:64-67.2001.Fitzgerald GA; Patrono C. –The coxibs, selective inhibitor of cyclooxygenase-2. *N Engl J Méd.* 345:433-442,2001.
62. Willoughby, D.A.; Moore, A.R.; Colville-Nash PR. – COX-1, COX-2, and COX-3 and the future of chronic inflammatory disease. *Lancet.*355:646-648.2000.

63. Halliwell, B. "Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?" *Lancet* 344(8924): 721-4.

64. Peres, W.; Tunon, M. J. et al. "The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction." *J Hepatol.*1994; 33(5): 742-50. 2000.

65. Marroni, P. Norma; Martins, M. Maria Isabel; Porowski, Marilene. *Radicais Livres no processo saúde-doença: da bancada à clínica.*1º.ed.Curitiba, PR:CRV. 2012.p.9 -101.

66. Favier, A.E., J. Cadet et al. "Análisis of free radicals in biological systems". Basel, Boston, Berlin, Birkhauser.1995.

67. Halliwell, B. & J.C.M. Gutteridge. "Free Radicals in Biology and Medicine". 3th ed. Oxford University Press. 1999.

68. Droge, W. "Free radicals in the physiological control of cell function." *Physiol Rev* 82(1):: 47-95. 2002.

69. Halliwell, B. "Antioxidants: The Basis What They Are and How to Evaluate Them". In: Sies, H. *Antioxidants in diseases: Mechanisms and Therapy.* (Advances in Pharmacology. vol. 38) California: Academic Press. 1997.

70. Colleen, Smith Marks; Allan, Lieberman Machael. *Bioquímica Médica Básica de Marks*; tradução Ângela de Mattos Dutra, et.al. 2º edição-Porto Alegre: Artemed, 2008.

71. Giannini, Sérgio, D.; Santos, Raul D. Fonseca; Francisco H. ; Moriguchi H., Emílio. *Resumo das III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia.* *Arq Bras Cardiol* Vol. 77, (suplemento III), 2001.

72. Takeuchi, K.; Ueshima, K.; Ohuchi, T.; Okabe, S. Induction of gastric lesions and hypoglycemic response by food deprivation in streptozotocin-diabetic rats. *Dig. Dis. Sci.*39(3), 626-634. 1994.

73. Lowry, O. H.; N. J. Rosebrough, et al. "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem.; 193(1): 265-75.1951.

74. Buege, J.A. & Aust, S.D. Microsomal Lipid Peroxidation. Meth. Enzymol.;52:302-309. 1978.

75. Boveris, A. and B. Chance. "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." Biochem J.; 134(3): 707-16.1973.

76. Abuja, P.M.; Albertini, R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. Clin Chim Acta; 306: 1-17. 2001.

77. Consenso de Diabetes. Diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito tipo 2. Sociedade Brasileira de Diabetes. Rio de Janeiro: Diagraphic; 2003.

78 Sz kudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the Rat pancreas. Physiology Research, v. 50, p. 537-46, 2001.

79.Dias, Alexandre Simões; Porawski, Marilene; Alonso, María; Marroni, Norma; Collado, Pilar S; González-Gallego, Javier. Quercetin Decreases Oxidative Stress, NF- κ B Activation, and iNOS Overexpression in Liver of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. American Society for Nutrition. 0022 3166/05.2005.

80. Di Naso, Fabio Cangeri; Junior, Luiz Alberto Forgiarini; Forgiarini, Luiz Felipe; Porawski, Marilene; Dias, Alexandre Simões; Marroni, Norma Anair Possa. Aminoguanidine reduces oxidative stress and structural lung changes in experimental diabetes mellitus. J Bras Pneumol.36(4):485-489. 2010.

81. Rodrigues, G; Porawski, Marilene; Kretzmann. NA; Marroni, N.Possa. Antioxidant effect and the expression of NF- α B of *Croton Cajucara Benth* aqueous extract in liver of streptozotocin- induced diabetic rats. Arq. Gastroenterol.47(3).2010.

82. Di Naso, Fábio Cangeri; Rodrigues Graziella; Dias Alexandre Simões; Porawski, Marilene; Fillmann, Henrique Marroni, Norma Possa. Hepatic nitrosative stress in experimental diabetes. 1056-8727/ 04.015;2012.

83. Kabir, M.; Skurnik, G.; Naour, N. et al. Treatment for 2mo with n 3 polyunsaturated fatty acids reduces adiposity and someatherogenic factors but

does not improve insulin sensitivity in women with type 2 diabetes: a randomized controlled study. *Am J Clin Nutr* 2007;86:1670–9.

84. Woodman, R.J.; Mori, T.A.; Burke, V.; Puddey, I.B.; Watts, G.F.; Beilin, L.J. Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on glycemic control, blood pressure, and serum lipids in type 2 diabetic patients with treated hypertension. *Am J Clin Nutr* 2002;76:1007–15.

85. Mori, T.A.; Woodman, R.J. The independent effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on cardiovascular risk factors in humans. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9;95–104.2006.

86. Y. Saito, M.; Yokoyama, H.; Origasa, M.; Matsuzaki, Y.; Matsuzawa, Y.; Ishikawa, S.; Oikawa, J.; Sasaki, H.; Hishida, H.; Itakura, T.; Kita, A.; Kitabatake, N.; Nakaya, T.; Sakata, K.; Shimada, K. Shirato. Effects of EPA on coronary artery disease in hypercholesterolemic patients with multiple risk factors: sub-analysis of primary prevention cases from the Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS), *Atherosclerosis*.35–140.2008.

87. McEwen, Brad; Morel-Kopp, Marie-Christine; Tofler, Geoffrey; Ward, Christopher. Effect of Omega-3 Fish Oil on Cardiovascular Risk in Diabetes *The Diabetes Educator* 2010 36: 565 originally published online 9 June 2010.

88. ROSS, D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents Mechanisms of Free-Radical Induced Toxicity and Glutathione-dependent Protection. *Pharmac. Ther.*, Oxford, v.37, p.231-249, 1988.

89. Ren, X. Y.; Li, Y. N.; Qi, J. S., & Niu, T. Peroxynitrite-induced protein nitration contributes to liver mitochondrial damage in diabetic rats. *J Diabetes Complications*,22, 357–364.2008.

90. Garg, MC; Chaudhary, D.P; Bansal, DD. Effect of vitamin E supplementation on diabetes induced oxidative stress in experimental diabetes in rats. *Indian J Exp Biol*. Feb;43(2):177-80;2005.

91. Reis, J.S; Veloso, C.A; Mattos R.T; Purish, S; Nogueira, Machado J.A. [Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 52(7):1096-105.2008.

92. Brzozowski, T.; Konturek, P.C.; Konturek, S.J.; Drozdowicz, D.; kwiecień, S.; Pajdo, R.; Bielanski, W.; Hahn, E.G. Role of gastric acid secretion in progression of acute gastric erosions induced by ischemia-reperfusion into gastric ulcers. *Eur J Pharmacol*; 398: 147-158, 2000.

93. Kwiecień, S.; Brzozowski, T.; Konturek, P.C.H.; Konturek, S.J. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions. *J Physiol Pharmacol. Dec*;53(4 Pt 2):761-73, 2002.

94. Rahman, Adcock I.M.: (2006). Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J* 28:219-242,B

95. Zararsiz, L.; Sonmez, M.F.; Yilmaz, H.R. et al. Effects of omega- 3 essential fatty acids against formaldehyde-induced nephropathy in rats. *Toxicol Ind Health* 22:223-229;2006.

96. Benzi, G.; Moretti, A. Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Rad. Biol. Med.*, Tarrytown, v.19, p.77-101, 1995.

97. Arab, K.; Rossary, A.; Flourie, F. et al. Docosahexaenoic acid enhances the antioxidant response of human fibroblasts by upregulating gammaglutamyl-cysteinyl ligase and glutathione reductase. *Br J Nutr* 95:18-22. 2006.

98. Ozkaya, Y., et al., The effect of exercise on brain antioxidant status of diabetic rats. *Diabetes Metab.* 28: p. 344-84. 2002.

99. Yilmaz, H. et al., Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *Biochem. Mol. Toxol*, 18: p. 234-8. 2004.

100. Aliciguzel, Y. et al., Activities of xantine oxidoreductase and antioxidant enzymes in different tissues of diabetic rats. *J. Lab. Clin. Med.* 142: p. 172-7. 2003.

102. Essani, N. G. McGuire, and A. Manning, Endotoxin-induced activation of the nuclear transcription factor NF-kB in hepatocytes, Kupffer cells and endothelial cells in vivo. *J. Immunol*; 156: p. 2956-63.1996.

103. Peres, W.; Túon, M. J.; Collado, P. S.; Herrmann, S.; Marroni, N. and J. González-Gallego, "The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction," *Journal of Hepatology*, vol. 33, no. 5, pp. 742–750, 2000.
104. Bondada, Andall, AV. Vinay Kumar, and N.Ch Varadacharyulu. Oxidative Stress in Streptozocin Diabetic Rats: Amelioration By Mulberry (*Morus Indica* L.) Leaves. The Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine Press and Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2012.
105. Bilate, Angelina M. B, Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. temas de reumatologia clínica - vol. 8 - nº 2 – jun/ 2007.
106. Davi, G.; Chiarelli, F.; Santilli, F. et al. Enhanced lipid peroxidation and platelet activation in the early phase of type 1 diabetes mellitus: role of interleukin-6 and disease duration. *Circulation*.107:3199-203.
107. Heinrich, Peter C.; Castell, Jose V. and Andust, Tilo. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.* 265, 621-636;1990.
108. Myrup, B. de Maat M.; Rossing, P.; Gram J. et al. Elevated fibrinogen and the relation to acute phase response in diabetic nephropathy. *Thromb Res.*;81:485-90.1996.
109. Targher, G.; Zenari, L.; Bertolini, L. et al. Elevated levels of interleukin- 6 in young adults with type 1 diabetes without clinical evidence of microvascular and macrovascular complications. *Diabetes Care*.23:577-9.2000.
110. Snell-Bergeon, JK.; West, NA.; Mayer-Davis, E.J. et al. Inflammatory markers are increased in youth with type 1 diabetes: the SEARCH case-control study. *J Clin Endocrinol Metab*.95:2868-76. 2010.
111. Rosa, J.S.; Flores, R.L.; Oliver, S.R. et al. Sustained IL-1, IL-4, and IL-6 elevations following correction of hyperglycemia in children with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes*.;9:9-16. 2008.
112. Chang, Chih-Chun; Chang; Chieh-Yu; Huang, Jiung-Pang; Hung, Li-Man. Effect of Resveratrol on Oxidative and Inflammatory Stress in Liver and Spleen of Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetic Rats *Chinese Journal of Physiology* 55(3): 192-201; 2012.

113. Reis, Janice Sepúlveda; Amaral, Clara Araújo Veloso; Volpe, Caroline Maria Oliveira; Fernandes, Jamille Silveira; Borges, Erica Abreu; Isoni, Camila Armond; Anjos, Paula Martins Ferreira dos; Machado, José Augusto Nogueira. Oxidative stress and interleukin-6 secretion during the progression of type 1 diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 56/7.2012.
114. Ferreira, S.R.G. et al., Population-based incidence of IDDM in the state of São Paulo, Brazil. *Diabetes Care*, 16: p. 701-704.2000.
115. Chandranath, S.I.; Bastaki, S.M.A.; Singh, J. A comparative study on the activity of lansoprazole, omeprazole and PD-136450 on acidified ethanol and indomethacin-induced gastric lesions in the rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 29, 173-180, 2002.
116. Reding, T.; Bimmler, D.; Perren A.; Sun, L.K.; Fortunato F.; Storn,F.; Graf i, R., A selective COX-2 inhibitor suppresses chronic pancreatitis in an animal model (WBN/Kob rats): significant reduction of macrophage infiltration and fibrosis, *Gut* 55:1165–1173; 2006.
117. Tjonahen, E.; Oh, S.F., Siegelman J.; Elangovan, S.; Percarpio, K.B.; Hong, S.; Arita,M.; Serhan, C.N., Resolvin E2: identification and anti-inflammatory actions: pivotal role of human 5-lipoxygenase in resolvin E series biosynthesis, *Chem. Biol.* 13:1193–1202.2006.
118. Barbalho, Sandra M; Bechara, Marcelo D.; Quesada, Karina R.; Goulart, Ricardo A. Omega 3 fatty acid and the resolution of inflammatory processes. *Revista, Medicina (Ribeirão Preto)*.1;44(3): 244-50.2011.
119. Calder, P.C. Immunomodulation by omega 3 fatty acids Prost Leukotrienes and essential fatty acids. *77: 327-35.* . 2007.
120. Serhan, C.N.; Yang, R.; Martinod, K.; Kasuga, K.; Pillai, P.S.; Porter, T.F.; Oh, S.F.; Spite M. (2009). Maresins: novel macrophage mediators with potent anti-inflammatory and proresolving actions. *J Exp Med*; 206:15-23.