

Amanda Marreiro Barbosa

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE
SOBRE ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DA GLICOSE E
DOS LIPÍDIOS INDUZIDAS POR GLICOCORTICOIDE EM
RATOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Mestre em Nutrição, linha de pesquisa Estudo Dietético e Bioquímico relacionado com o estado nutricional, sob a orientação do Professor Drº. Everson Araújo Nunes.

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Barbosa, Amanda Marreiro

Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre alterações no metabolismo da glicose e dos lipídios induzidas por glicocorticoide em ratos / Amanda Marreiro Barbosa ; orientador, Everson Araújo Nunes - Florianópolis, SC, 2014.99 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição.

Inclui referências

1. Nutrição. 2. Dexametasona. 3. Óleo de peixe. 4. Homeostase glicêmica. 5. Metabolismo lipídico. I. Nunes, Everson Araújo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. III. Título.

AGRADECIMENTOS

“Chegou a hora de me tornar gente grande!”, foi isso que pensei em 2012. Aos 22 anos estava terminando a graduação e me tornando uma profissional em Nutrição. Senti que a responsabilidade a cada dia batia mais forte em minha porta e que naquele ano eu tomaria decisões que poderiam mudar muito o caminho. Minhas experiências durante a graduação me fizeram apostar que o fazer, sentir e muitas vezes viver a Pesquisa passariam a fazer parte de mais algumas páginas da minha vida. Escolha feita!!!

Como qualquer decisão a ser tomada, foi difícil. Difícil, exclusivamente por ter que ficar longe daqueles que eu amo incondicionalmente. Mas no meio de tudo isso, foi exatamente esse AMOR que me deu forças e me impulsionou nesta nova etapa. Sentimento este, muito bem representado pela minha família, por isso saibam que esse grande passo que dei foi me apoiando e segurando a mão de vocês.

Sei que a realização de sonho nunca é feita sozinho, ela é compartilhada com aqueles que são importantes para você. De fato, eu sou uma menina de sorte. O meu sonho foi apoiado e vivido pelas duas grandes estrelas da minha vida, por aqueles que antes de depositarem qualquer expectativa sobre mim, me amam como se não houvesse amanhã. Mãe (Gorete) e Pai (Nonato) vocês são os melhores exemplos que eu poderia ter, exemplos de dignidade, respeito, companheirismo. O meu agradecimento a vocês é diário, infinito e verdadeiro. Obrigada por embarcarem nesta viagem junto comigo, por me educarem de maneira sábia e prazerosa. Irmã (Andreia), obrigada por estar sempre ao meu lado, por me incentivar, por ter plantado a sementinha que me traria a Florianópolis, por simplesmente ser minha irmã que amo tanto.

Agradeço a minha Grande Família em nome das minhas duas primas-irmãs (Ceixa-Família Marreiro) e (Jamila-Família Barbosa), tenho certeza que cada um sabe o quão importante foi nesta jornada, muito obrigada pelo apoio. No meio de tudo isso dois grandes exemplos nos deixaram (Luiza Antônia-avó e Jamil Gedeon-tio), a distância me fez sofrer por não estar perto e não poder apoiar com minha presença aqueles que amo, mas a garra que vocês sempre tiveram lutando por mais um dia de vida e pela felicidade intrínseca que carregavam contagiava e acalmava o coração de todos.

Agradeço com muito carinho aos meus amigos, aqui representados pela Turma do Junco (Manu, Gilmar, Heleninha, Isaac, Raquel, Daniel, Olinda, Enoque), amigos-irmãos que estiveram comigo

em todos os embarques e desembarques desta jornada, em todas as comemorações e despedidas, obrigada por fazerem parte de mim. Aos meus queridos amigos Raimundo Junior, Leonardo Torres, Gustavo dos Anjos e Orlando Holanda pelo apoio e palavras amigas nas horas certas.

É com grande prazer que agradeço ao meu querido Erasmo, que me acolheu em Florianópolis como uma filha, que se fez presente nos momentos profissionais e especialmente aos domingos aconchegantes. De uma maneira especial, gostaria de agradecer minha companheira de aventura, Bruna Teles, embarcamos nesta jornada juntas e nos apoiamos sempre que necessário, Bru, obrigada por compartilhar esse momento tão especial. Um agradecimento cheio de carinho ao amiguinho, Macell, obrigada por dividir esta experiência comigo, por temos vividos momentos especiais juntos na República do Piauí (Bruna, Macell).

Agradeço com carinho aos amigos conquistados na Ilha da Magia. À turma de Mestrado em Nutrição, representada pelos queridos amigos e amigas (Dani, Morgs, Camis, Tábata, Martha, Ricardo, Amanda, Rafa, Adri), muito obrigada pelo acolhimento e pelos momentos especiais que compartilhamos.

Aos amigos do laboratório LANDI aqui representados por Marininha, Fran, Dani, Igor, Tatilinha, Carol, Serginho, Josiel, Gaúcho, que compartilharam comigo além de momentos científicos, com troca de conhecimentos, momentos de muitas gargalhadas, que fizeram meus dias mais divertidos, mais prazerosos e claro, pelas horas do cafezinho que relaxavam os nossos dias. Desta turma, gostaria de agradecer em especial ao Murilinho que se tornou um grande amigo, dividindo comigo momentos especiais, bem caracterizados pelos cafezinhos de manhã cedinho.

Com muita admiração e carinho começo a agradecer ao time LIDoC (Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas) pelos dois grandes exemplos que coordenam esse laboratório: Everson Araújo Nunes e Alex Rafacho. Ao meu orientador (Prof^o Everson) agradeço por ter me acolhido e por ter sido este exemplo de profissional, de inteligência, sabedoria, dedicação e de força de vontade, exemplo este que me inspiro e que me impulsiona a seguir e amar cada vez mais o que faço, obrigada sempre pelas horas de ensinamento. Muito obrigada ao meu querido Alex Rafacho que além de compartilhar comigo muito aprendizado, é um exemplo a ser seguido, com uma dedicação que contagia, agradeço com todo carinho os momentos profissionais e de descontração que compartilhamos. Aos meus amigos do LIDoC (Cris, Katia, Luiz, Fran Ferreira, Bry, Du, Pri, Cristina, Fran Battiston, Rapha, Cleiton, Darlan, Marina, Henver, Caroline, Carolina, Luiza) agradeço

pelos momentos que compartilhamos juntos, pela troca de conhecimentos e pelos momentos de descontração e divertidos que fizeram com que estes anos fossem vividos com a magia que esta Ilha nos oferece, pelo apoio emocional sempre que preciso, vocês contribuíram para que eu não deixasse a peteca cair, em especial gostaria de agradecer a minha Tata, irmã de orientação e companheira pra vida toda, que fez os meus dias mais felizes pela sua gargalhada e alegria contagiante, obrigada sempre ao time LIDoC, que de fato é um belo exemplo de que a união faz a força.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição por auxiliar no meu aprendizado e apoiar a realização da minha pesquisa. À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pela disponibilização de suas dependências e pelo suporte financeiro para a participação em congressos científicos. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Aos professores Adair Roberto Soares dos Santos, Anicleto Poli e André Báfica por abrirem as portas de seus laboratórios e possibilitarem a execução de experimentos fundamentais. Aos professores Alex Rafacho, Gleisson Alisson Pereira Brito, Adair Roberto Soares dos Santos e Letícia Carina Ribeiro por aceitarem fazer parte da Banca Examinadora de defesa da Dissertação, contribuindo assim, com este trabalho.

A todos os animais necessários para esta pesquisa, sem eles de fato não seria possível.

Por fim, minha gratidão a cada um que de maneira particular sabe o quanto foi importante para mim nesta etapa.

Obrigada meu Deus, eu sei que Tu me sondas!!!

RESUMO

A dexametasona (Dex) é um glicocorticoide sintético usado como potente anti-inflamatório na prática clínica. Quando administrada em excesso, a Dex pode promover alterações no perfil glicêmico e lipídico. Os ácidos graxos polinsaturados ômega n-3 (AGPIs n-3) presentes no óleo de peixe (OPe) podem ser usados como potentes moduladores do metabolismo da glicose e dos lipídios. Com isso, nós investigamos os efeitos da suplementação com OPe sobre alterações no metabolismo da glicose e dos lipídios ocasionadas por 15 dias de tratamento com Dex. Foram utilizados ratos machos adultos divididos em 4 grupos: CTL, salina 1 ml/kg p.c. e óleo mineral 1 g/kg p.c., DEX, dexametasona 0,5 mg/kg p.c. e óleo mineral 1 g/kg p.c., OP, óleo de peixe 1g/kg p.c. e salina 1 ml/kg p.c e DOP, óleo de peixe 1g/kg p.c. e dexametasona 0,5 mg/kg p.c, tratados por 15 dias. A Dex e salina foram administradas via intraperitoneal e o óleo de peixe e óleo mineral, via gavagem. Foram analisados a massa corpórea, glicose sanguínea, componentes plasmáticos (triacilglicerol-TAG, colesterol total-CT, HDL-c), conteúdo de glicogênio e gordura hepática, tolerância à glicose, à insulina e ao piruvato. Também foi avaliado o conteúdo das proteínas substrato receptor de insulina 1 (IRS-1), proteína cinase B (Akt), receptores ativados por proliferadores de peroxissomos-gama (PPAR γ) e coativador 1 do receptor ativado por proliferadores de peroxissomos-alfa (PGC-1 α) e a incorporação dos ácidos graxos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) no fígado. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguido de *post hoc* de Tukey, com nível de significância de 95%. Os dados mostram que a suplementação com OPe resultou em maior incorporação de EPA (DEX: 0,3 \pm 0,0; DOP: 1,3 \pm 0,1) e DHA (DEX: 5,6 \pm 0,7; DOP: 10,5 \pm 0,8) no fígado e reduziu as concentrações plasmáticas de TAG, CT e fração não HDL-c nos ratos tratados com Dex. Estas modificações ocorreram sem alteração no conteúdo hepático das proteínas IRS-1, Akt, PGC-1 α e PPAR γ . A ingestão de OPe não atenuou a perda de peso, o aumento da glicemia em jejum e a intolerância à glicose (no oitavo dia de tratamento) nos ratos tratados com Dex. No fim do tratamento (16 dias) não foi observada intolerância à glicose nos ratos tratados com Dex, independente da suplementação. Diante disso, o presente estudo mostra que a suplementação com óleo de peixe, na dose e tempo utilizados, atenua as alterações dos lipídios plasmáticos provocadas pelo tratamento com

Dex, mas não exerce nenhum efeito sobre os parâmetros da homeostase glicêmica em ratos.

Palavras-chave: dexametasona, óleo de peixe, perfil glicêmico, metabolismo lipídico.

ABSTRACT

Dexamethasone (Dex) is a synthetic glucocorticoid clinically applied as anti-inflammatory. However, in excess or after prolonged exposition, Dex may also alter the glucose and lipid homeostasis. The omega-3 fatty acids, present in fish oil (FOi), can be used as potential modulators of intermediary glucose and lipids' metabolism. Herein, we evaluate the effects of FOi supplementation on the glucose and lipid' metabolism in rats treated with Dex during 15 days. Adult male Wistar rats were divided in four groups: CTL received saline 1 ml/kg per body weight (b.w) and mineral oil 1 g/kg b.w; DEX received dexamethasone 0.5 mg/kg b.w and mineral oil 1 g/kg b.w; FO received fish oil 1g/kg and saline 1 ml/kg b.w; and DFO received fish oil 1 g.kg b.w and dexamethasone 1 mg/kg b.w for 15 days. Dex and saline were administered intraperitoneally and fish oil and mineral oil by gavage. Were evaluated the body weight, blood glycaemia, plasmatic parameters (triacylglycerol – TAG, total cholesterol –TC and HDL-c), glycogen content, hepatic fat and glucose, insulin and pyruvate tolerance. In addition, were evaluated the expression of the insulin receptor substrate 1 (IRS-1), protein kinase B (PKB), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) and the incorporation of fatty acids eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) in liver. Data were analyzed by ANOVA and post hoc test at a significance level of $p < 0.05$. The results showed that FOi supplementation increased DHA (DEX: 5.6 \pm 0.7; DFO: 10.5 \pm 0.8) and EPA (DEX: 0.3 \pm 0.0; DFO: 1.3 \pm 0.1) hepatic content and attenuate the modifications of the plasmatic concentrations of TAG, TC and non-HDL-c fraction in the DFO rats compared with DEX. These effects occurred without modifications on the hepatic expression of IRS-1, Akt, PGC-1 and PPAR γ proteins. The FOi supplementation does not attenuate the loss of body weight, the increase of fasting glycaemia and the glucose intolerance (on the eighth day of treatment) in the rats treated with Dex. At the end of treatment (16 days), we observed that the DEX groups were not glucose intolerant, independent of the FOi supplementation. Therefore, the present study showed that the FOi supplementation, in the dose and time tested, attenuated the lipid metabolism alterations induced by Dex treatment.

Key-words: dexamethasone, fish oil, glycaemia profile, lipid metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais eventos envolvidos na secreção de insulina estimulada por glicose.....	30
Figura 2 - Via de sinalização da insulina em células musculares e adiposas.....	33
Figura 3 - Mecanismos pelos quais os AGPIs n-3 atuam através dos PPARs na melhora do perfil lipídico sanguíneo e no controle da glicose.....	39
Figura 4 - Informação nutricional das cápsulas de óleo de peixe.....	45
Figura 5- Representação esquemática da distribuição temporal dos procedimentos realizados em cada bloco de experimentos.....	46
Figura 6- Tratamento com Dex reduz o peso corpóreo em ratos Wistar.....	64
Figura 7- Alterações na tolerância à glicose após tratamento com Dex e suplementação com óleo de peixe.....	67
Figura 8-Tolerância ao piruvato, à insulina e índice de sensibilidade TyG em ratos tratados com Dex e suplementados com óleo de peixe após 15 dias de tratamento.....	68
Figura 9- Conteúdo de glicogênio e de triacilglicerol hepático.....	69
Figura 10- Conteúdo total e fosforilado de IRS1 e Akt em fígado de ratos tratados com DEX não estão diminuídos.....	71
Figura 11-Conteúdo total de PGC-1 (A) e de PPAR γ (B) no fígado de ratos tratados com Dex e suplementados com óleo de peixe.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos do tratamento com Dex em ratos normais sobre os parâmetros relacionados à homeostase glicêmica.	27
Tabela 2 - Efeitos da suplementação prévia com OPe sobre as consequências relacionadas ao tratamento com Dex.....	41
Tabela 3- Avaliação da massa corpórea, do consumo de ração e da massa de tecidos e órgão de ratos tratados ou não com Dex durante 15 dias.	53
Tabela 4- Massa de tecidos e órgão (mg/g de p.c.) de ratos CTL e tratados com Dex suplementados ou não com óleo de peixe.	64
Tabela 5- Parâmetros sanguíneos em ratos CTL e tratados com Dex suplementados ou não com óleo de peixe, após jejum de 12 a 14 horas.	65
Tabela 6- Percentual (%) de ácidos graxos no fígado em ratos CTL e tratados com Dex suplementados ou não com óleo de peixe durante 15 dias.	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
AC	Adenilato ciclase
ADP	Difosfato de adenosina
AGs	Ácidos graxos
AGLs	Ácidos graxos livres
AGPI	Ácido graxo poli-insaturado
Akt	Proteína cinase B
ALA	Ácido graxo α -linolênico
AL	Ácido linoleico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
BMMC	4-bromometil-7-metoxi-cumarin
CAP	Proteína associada a Cbl
CT	Colesterol total
CTL	Grupo Controle
DAG	Diacilglicerol
Dex	Dexametasona
DEX	Grupo dexametasona
DHA	Ácido graxo docosaenoico
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DOP	Grupo Dexametasona + Óleo de peixe
EPA	Ácido graxo eicosapentaenoico
ERK	Cinases reguladas por sinais extracelulares
FL	Fosfolipídios
FSP	Fase Superior Pura Suplementada
GC	Glicocorticoide
GLUT	Transportador de glicose
GPR	Receptores acoplados à proteína G
GR	Receptor de glicocorticoide
Grb 2	Proteína 2 ligada à receptores de fatores do crescimento
HK	Hexocinase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IG	Intolerância à glicose
IP3	Inositol 1, 4, 5 – trifosfato
IRS	Substrato do receptor de insulina
IpGTT	Teste de tolerância à glicose intraperitoneal
IpPTT	Teste de tolerância ao piruvato intraperitoneal
IpITT	Teste de tolerância à insulina intraperitoneal

KITT	Constante de decaimento da glicose sanguínea
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
LHS	Lipase hormônio sensível
LLP	Lipase de lipoproteínas
NO	Óxido nítrico
OPe	Óleo de peixe
OP	Grupo óleo de peixe
PDK1	Piruvato desidrogenase cinase 1
PI3K	Fosfatidil inositol 3cinase
PGC-1	Coativador 1 do receptor ativado por proliferadores de peroxissomos
PKA	Proteína cinase A
PKB	Proteína cinase B
PKC	Proteína cinase C
PLA2	Fosfolipase A2
PLC	Fosfolipase C
PPAR	Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos
RE	Retículo endoplasmático
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RI	Resistência à insulina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SI	Sensibilidade à insulina
TAG	Triacilglicerol
TBST	Solução salina tamponada com Tris e Tween
TG	Tolerância à glicose
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
n-3	Ácido graxo poli-insaturado ômega 3
n-6	Ácido graxo poli-insaturado ômega 6
n-9	Ácido graxo poli-insaturado ômega 9

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	25
2.1 GLICOCORTICOIDES.....	25
2.2 METABOLISMO DA GLICOSE.....	28
2.2.1 Captação, absorção tecidual e intolerância à glicose.....	28
2.2.2 Ação, sinalização e resistência à ação da insulina.....	31
2.3 METABOLISMO DOS LIPÍDIOS.....	33
2.4 ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS ÔMEGA-3.....	36
2.4.1 Aspectos bioquímicos e metabólicos.....	36
2.4.2 Ácidos graxos polinsaturados n-3 e seu papel no metabolismo da glicose e dos lipídios.....	37
3 OBJETIVOS.....	43
3.1 OBJETIVO GERAL.....	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 ANIMAIS.....	45
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	45
4.3 SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE E TRATAMENTO COM DEXAMETASONA.....	46
4.4 PARÂMETROS MURINOMÉTRICOS, DE INGESTÃO E METABÓLICOS.....	47
4.4.1 Acompanhamento da massa corporal.....	47
4.4.2 Avaliação do consumo de ração.....	47
4.4.3 Avaliação do consumo de água.....	47
4.4.4 Avaliação da glicose sanguínea de jejum.....	47
4.4.5 Avaliação da concentração de triacilglicerol plasmático no 8º dia de tratamento.....	48
4.4.6 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT).....	48
4.4.7 Teste de tolerância ao piruvato intraperitoneal (ipPTT).....	48

4.4.8	Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT).....	48
4.4.9	Eutanásia dos animais.....	49
4.4.10	Avaliação perfil lipídico plasmático.....	49
4.4.11	Pesagem de órgãos e tecidos.....	49
4.4.12	Mensuração do conteúdo de glicogênio hepático.....	49
4.4.13	Avaliação do conteúdo de triacilglicerol hepático.....	49
4.5	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DAS PROTEÍNAS: IRS-1, Akt E DO PPARγ E DAS FORMAS FOSFORILADAS DO IRS-1 e DA Akt EM EXTRATOS DE TECIDO HEPÁTICO.....	50
4.5.1	Extração proteica e Western Blott.....	50
4.6	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM EXTRATOS DE TECIO HEPÁTICO.....	51
4.6.1	Extração lipídica.....	51
4.6.2	Saponificação dos extratos lipídicos.....	51
4.6.3	Derivatização dos ácidos graxos.....	51
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5	RESULTADOS DE CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL.....	53
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO (INSERIDOS EM MODELO DE ARTIGO).....	55
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
	REFERÊNCIAS.....	85
	ANEXO A- Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC.....	97

1 INTRODUÇÃO

Os hormônios glicocorticoides (GC) (principalmente o cortisol em seres humanos e a corticosterona em roedores) são produzidos pelo córtex adrenal e estão sob o controle do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Em condições fisiológicas, desempenham papel chave na regulação do metabolismo hídrico e de sais, da pressão sanguínea, da função imunológica e do metabolismo de macronutrientes. Em períodos de estresse, esse hormônio torna-se importante pelo seu papel na modulação do metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos que favorecem a disponibilização de substratos para o metabolismo oxidativo (ANDREWS; WALKER, 1999).

Inúmeros compostos com atividade glicocorticoide têm sido sintetizados, como por exemplo, a dexametasona (Dex). Na prática clínica, sua administração é indicada para a supressão da inflamação, para o tratamento das manifestações clínicas da artrite reumatoide (SCHÄCKE et al., 2002; CZOCK et al., 2005) e para a atenuação da êmese associada à quimioterapia (MARANZANO et al., 2005). Quando administrada em excesso, a Dex pode induzir efeitos adversos como a atrofia muscular (PRELOVSEK et al., 2006), hiperfagia (DEBONS et al., 1986), aumento da deposição de gordura central, hipertrigliceridemia, resistência periférica à insulina (RI) e intolerância à glicose (IG) (STOJANOVSKA et al., 1990; BINNERT et al., 2004, KORACH-ANDRÉ et al., 2005; BURÉN et al., 2008; RAFACHO et al., 2008a; RAFACHO et al., 2010). Com base nestes efeitos, a Dex pode ser utilizada para indução de RI e IG experimentalmente em roedores (STOJANOVSKA et al., 1990; SEVERINO et al., 2002; KORACH-ANDRÉ et al., 2005; BURÉN et al., 2008; RAFACHO et al., 2008a; RAFACHO et al., 2010) e transitória em humanos (BINNERT et al., 2004).

Alterações no metabolismo da glicose e dos lipídios, como a IG e a hipertrigliceridemia, em ratos tratados com GC tem sido bastante estudados. Contudo, a reprodutibilidade e o grau de influência sobre essas variáveis parece ser dependente de dose, duração de tratamento ou fatores predisponentes (por exemplo, obesidade, gravidez e envelhecimento) (NOVELLI et al., 1999; HOLNESS; SUGDEN, 2001; RAFACHO et al., 2008a). Um estudo realizado por Rafacho et al. (2008a) com ratos machos adultos tratados com 0,1; 0,5 ou 1 mg/kg de peso corporal de Dex durante 5 dias, mostrou que apenas os animais tratados com 1 mg/kg de peso corporal de Dex tornaram-se intolerantes à glicose e aqueles tratados com 0,5 e 1 mg/kg de peso corporal de Dex

apresentaram aumento significativo nas concentrações de triacilglicerol e de ácidos graxos não esterificados em estado pós-absortivo.

Atenuar efeitos adversos causados pelo tratamento com Dex pode ser importante estratégia para propiciar melhor qualidade de vida dos indivíduos que são expostos a esta situação. Alternativamente, a redução de efeitos colaterais pode potencialmente ser fator que possibilite o aumento do tempo com glicocorticoide sem prejudicar de forma tão drástica outros parâmetros metabólicos. Assim, estratégias adjuvantes podem ser investigadas no sentido da busca de redução dos efeitos colaterais negativos. Nesse sentido, evidências sugerem que os ácidos graxos polinsaturados (AGPIs) ômega-3 (n-3), principalmente os ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA), podem aumentar a tolerância à glicose (TG), a sensibilidade à insulina (SI), e reduzir os fatores de risco para várias doenças tais como: dislipidemias, doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, câncer, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e síndrome metabólica (STORLIEN et al., 2000; KRIS-ETHERTON et al., 2002; SIRTORI; GALLI, 2002; HIRABARA et al., 2012). Aparentemente, estas propriedades se devem aos diversos efeitos fisiológicos dos AGPIs n-3 sobre a modulação da concentração de lipídeos plasmáticos, função imunitária, sinalização da insulina, desenvolvimento neuronal e acuidade visual (JUMP, 2002).

Estudos epidemiológicos demonstram que a ingestão de óleo de peixe (OPE), fonte natural de AGPI n-3, nos primeiros anos da infância retarda o desenvolvimento da IG ao longo da vida. Os mecanismos moleculares apontados estão relacionados à melhora da transdução do sinal insulínico e a seus efeitos anti-inflamatórios (STENE; JONER, 2003).

Além disso, foi demonstrado que AGPIs n-3 possuem capacidade em modular a ação da insulina em seus tecidos-alvo. A alteração na composição da membrana lipídica com conseqüente alteração da função de receptores ou canais de membrana, efeitos na translocação e atividade do transportador de glicose (GLUT-4), interações com diacilglicerol (DAG) – proteína cinase C (PKC), produção de óxido nítrico (NO) e armazenamento de triacilglicerol (TAG) no músculo, assim como um aumento na fosforilação em tirosina do substrato receptor de insulina 1 (IRS-1) e aumento da atividade da fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K) no fígado são algumas das várias hipóteses que vêm sendo sugeridas para explicar os mecanismos por trás dos efeitos dos AGs polinsaturados na redução da RI e na melhora da TG (STORLIEN et al., 1996; ZIERATH et al., 1997; KRSSAK et al., 1999; TAOUIS et al., 2002).

Os efeitos adversos provocados por doses elevadas ou por uso prolongado de Dex têm sido previamente reportados em estudos com animais e seres humanos, assim como o efeito da suplementação de OPe na diminuição da IG, da RI e da hipertrigliceridemia. Contudo, não existem dados que possam suportar a recomendação da indicação da suplementação com óleo de peixe para atenuar efeitos colaterais do tratamento com dexametasona sobre a IG, RI e hipertrigliceridemia.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 GLICOCORTICOIDES

Os GC são hormônios esteroides produzidos no córtex das glândulas adrenais sob o controle do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (ANDREWS; WALKER, 1999). Na prática clínica eles são amplamente utilizados como agentes anti-inflamatórios e imunossupressores (SAKLATVALA, 2002). Em essência, os GC são muito importantes em períodos de estresse, quando eles subsidiam sinais de longo prazo que minimizam muitas das respostas adversas e favorecem a disponibilização de substratos para o metabolismo oxidativo (ANDREWS; WALKER, 1999).

A deficiência de cortisol é caracterizada pela hipotensão postural, perda de peso e hipoglicemia. Contudo, excesso de cortisol é caracterizado por hipertensão, obesidade central e IG (ANDREWS; WALKER, 1999). Em excesso, os GCs endógenos induzem também RI (STOJANOVSKA et al., 1990; KORACH-ANDRE et al., 2005; RAFACHO et al., 2008b) como evidenciado na síndrome de Cushing (SAKLATVALA, 2002). Nesta situação, a RI contribui para o aumento da produção hepática de glicose pela gliconeogênese e diminuição de sua captação pelos tecidos periféricos (DELAUNAY et al., 1997).

Vários compostos com atividade glicocorticoide têm sido sintetizados, eles representam a terapia padrão para a atenuação das respostas inflamatória e imunitária na asma, bem como em inúmeras respostas de hipersensibilidade (ANDREWS; WALKER, 1999). Os GCs sintéticos ainda são amplamente utilizados na clínica e, em alguns casos, são os fármacos mais apropriados para alguns tratamentos dependendo do resultado que se almeja (SAKLATVALA, 2002).

A Dex é um dos GCs sintéticos mais utilizados, e apresenta afinidade 50 vezes maior aos receptores de glicocorticoide (GR), em relação ao próprio cortisol (SCHÄCKE et al., 2002).

Por outro lado, os GC promovem inúmeros efeitos colaterais em diversos órgãos ou sistemas como a pele (adelgamento), sistema músculo-esquelético (osteoporose e miotrofia), sistema nervoso (distúrbios cognitivos), digestório (úlceras), cardiovascular (hipertensão), imunitário (imunossupressão) e, em especial, no sistema endócrino (SCHÄCKE et al., 2002).

De longa data é conhecido que os GCs diminuem o transporte da glicose estimulada por insulina (OLEFSKY, 1975; TANAKA et al., 1992). Além disso, já está bem estabelecido que o excesso de GC promove redução da captação e da oxidação de glicose em músculo

esquelético (DIMITRIADIS et al., 1997). Estas alterações corroboram a IG, RI, dislipidemia e hiperglicemia observadas nessas situações (SCHACKE et al., 2002).

Assim, para doses reduzidas e/ou períodos curtos de administração de GC, a elevação na secreção de insulina é suficiente para impedir qualquer desarranjo na homeostase da glicose. No entanto, para doses elevadas e/ou períodos prolongados de tratamento com GC, o aumento da síntese e secreção de insulina pelas células β -pancreáticas não são suficientes para compensar a exigência metabólica e a IG se manifesta. Também é importante mencionar que ratos idosos tratados com GC (NOVELLI et al., 1999), ratos consumindo dieta com percentual alto de gordura (HOLNESS et al., 2005) ou ratas grávidas tornam-se intolerantes à glicose após um desafio com açúcar. Fato que está associado com índice insulinogênico diminuído (HOLNESS; SUGDEN, 2001)

Estudos desenvolvidos por Burén et al. (2008) analisaram a concentração total e o grau de fosforilação de inúmeras proteínas envolvidas na sinalização insulínica de tecidos periféricos de ratos insulinoresistentes induzidos por tratamento com Dex. Após 11 dias de tratamento com 1,0 mg/kg de peso corpóreo foi observado redução significativa de 40% e 30-70% na captação de glicose estimulada por insulina em tecido adiposo e muscular, respectivamente. As mudanças não se resumem a tecidos periféricos, pois em animais induzidos à IG e a RI com o glicocorticoide sintético Dex (1mg/kg p.c. por 5 dias consecutivos), foram observadas alterações funcionais e morfológicas que ocorrem nas ilhotas pancreáticas como mecanismos compensatórios à RI (RAFACHO et al., 2008a; RAFACHO et al., 2009). Em resumo, alguns estudos relacionados ao efeito da dexametasona sobre parâmetros relacionados à homeostase glicêmica estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Efeitos do tratamento com Dex em ratos normais sobre os parâmetros relacionados à homeostase glicêmica.

GC	Dose	Sensibilidade á insulina (SI) Tolerância à glicose (TG)	Glicemia em jejum	Insulinemia em jejum	Secreção de Insulina	Referência
Dex	0,005 mg 2x/dia em 3 ou 4 dias em SD machos	Diminuição da SI	Aumento moderado	Aumento	Aumento	(Stojanovska et al., 1990)
Dex i.p.	5 mg/kg por 2,4 dias	Diminuição da SI em animais normais	Inalterado	----	Aumento	(Ogawa et al., 1992)
Dex s.c.	0,1 mg/kg de peso por 6 dias em ratas Wistar não grávidas	Modesta Diminuição da TG	Inalterado	Aumento	Aumento	(Holness; Sugden, 2001)
Dex s.c.	0,001 mg 2x/dia por 4 semanas	Diminuição da SI	Inalterado	Aumento	Aumento	(Severino et al, 2002)
Dex oral	0,01 ou 0,1 mg/kg de peso por 8 semanas em SD machos	Diminuição da SI	Inalterado	Aumento por peso	----	(Choi et al., 2006)
Dex i.p.	0,1; 0,5 ou 1 mg/kg de peso por 5 dias em ratos Wistar	Diminuição da SI em todos e Diminuição da TG (0,5 e 1 mg)	Aumento Modesto com dose elevada	Aumento dependente da dose	Aumento dependente da dose	(Rafacho et al, 2008)
Dex i.p.	0,125 mg/kg de peso por 20 dias em SD	Diminuição da SI	Inalterado	Aumento	Aumento	(Novelli et al., 2008)
Dex i.p.	0,2 mg/kg de peso por 2 dias em ratos Wistar machos	----	Modesto aumento	Aumento	Aumento	(Sood; Ismail-Beigi, 2010)
Dex i.p.	1 mg/kg de peso por 1, 3 ou 5 dias em ratos Wistar machos	Diminuição da SI (3 e 5 dias) Diminuição da TG (5 dias)	Tendência nesse sentido em 5 dias	Aumento dependente do tempo	Aumento em todos	(Rafacho et al, 2011)

GC: glicocorticoides, Dex: dexametasona, SD: Sprague-Dawley

Fonte: Adaptado de Rafacho et al., 2012.

Os GC apresentam também importante papel modulador sobre os lipídios circulantes. Eles aumentam as concentrações plasmáticas de triacilglicerol por inibição da atividade da lipoproteína lipase (FRANCO-COLIN et al., 2000) e podem aumentar as concentrações de ácidos graxos livres (AGL) por ativação da lipase hormônio sensível (SLAVIN et al., 1994). No modelo de indução à IG e à RI com dexametasona foi verificado marcante elevação nas concentrações de AGL e triacilglicerol. Esta observação levou à hipótese dos lipídios modularem a compensação das ilhotas resistentes à insulina, também citada em outros trabalhos (PRENTKI et al., 2002; EL-ASSAD et al., 2003; NOVELLI et al., 1999).

2.2 METABOLISMO DA GLICOSE

2.2.1 Captação, absorção tecidual e intolerância à glicose

A secreção de insulina é estimulada por vários fatores, alguns deles exercem efeito direto sobre as células β -pancreáticas, como por exemplo, substratos energéticos, hormônios (catecolaminas e hormônios gastrintestinais) e transmissores colinérgicos (MALAISSE et al., 1979).

A glicose é o agente estimulador mais importante, esta é transportada para o interior da célula β por uma proteína integral de membrana denominada GLUT2, que difere das outras isoformas existentes nos mamíferos, por apresentar K_m alto (entre 15 e 20mmol/L, com baixa afinidade para glicose) e V_{max} muito elevado, permitindo um equilíbrio rápido entre as concentrações externa e interna de glicose, quando esta se eleva no meio extracelular (THORENS et al., 1988). A seguir, a glicose é fosforilada à glicose-6-fosfato por duas enzimas: a hexocinase IV (glicocinase) de baixa afinidade (K_m entre 6 a 11mmol/L) e a hexocinase I (HK) de alta afinidade ($K_m < 0,1$ mmol/L). A enzima de alta afinidade é inibida pela glicose-6-fosfato e, em menor grau, pela glicose-1-6-difosfato, o que transfere para a glicocinase o papel preponderante na fosforilação da glicose pelas células β . Esse mecanismo funciona como “válvula de segurança”, permitindo formação de glicose-6-fosfato apenas em concentrações fisiológicas e suprafisiológicas de glicose no sangue. Confere ainda à glicocinase papel fundamental na regulação do fluxo glicolítico e, portanto, na secreção de insulina, caracterizando, em suma, a glicocinase como o “sensor” da glicose pelas células β (BOSCHERO, 1996).

A RI está associada ao aumento na expressão de HK nas células β . Becker et al. (1994) confirmaram que a superexpressão de HK em

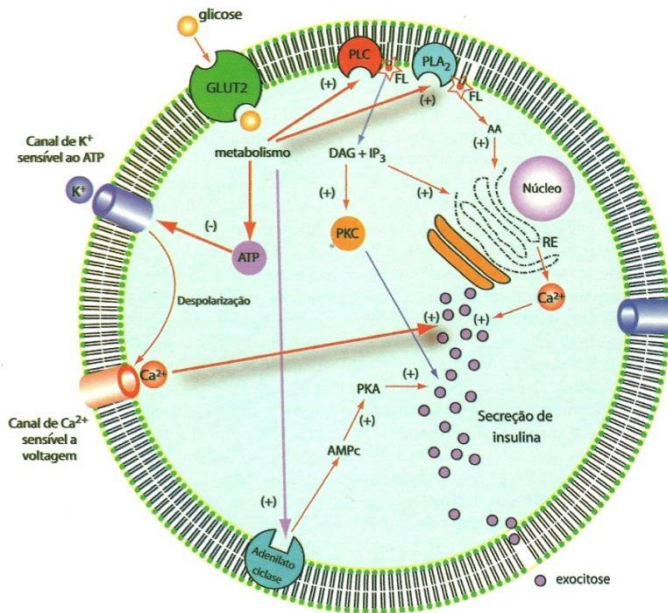
ilhas isoladas induz diminuição da utilização de glicose e a liberação de insulina em concentrações menores de glicose.

O metabolismo da glicose gera ATP e a razão ATP/ADP aumenta no citoplasma. Essa relação ATP/ADP aumentada provoca o fechamento dos canais de potássio e a consequente despolarização da membrana celular que abre canais de cálcio, sensíveis à voltagem. O aumento do influxo de cálcio para a célula β resulta em despolarização suplementar da membrana plasmática e desencadeamento do processo excitatório da insulina (HABER et al., 2001).

A estimulação das células β pela glicose leva à ativação de isoformas da fosfolipase C (PLC), promovendo a hidrólise de fosfolípidos de membrana e gerando inositol 1-4-5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 ativa os canais de cálcio localizados na membrana do retículo endoplasmático com a saída de cálcio da organela e aumento da concentração desse íon no citosol. O DAG, por sua vez, também produz o mesmo efeito na concentração de cálcio intracelular, ao ativar os canais de cálcio sensíveis à voltagem da membrana plasmática, permitindo a passagem do cátion do meio extracelular para o intracelular. O DAG também ativa a proteína cinase C (PKC) que ativa proteínas dos grânulos secretórios de insulina que, juntamente com o Ca^{2+} , promovem a ativação do sistema de microtúbulos e microfilamentos, responsável pela translocação desses grânulos para as proximidades da membrana plasmática e consequente exocitose. Outra função proposta para a PKC é de ativação da adenilato ciclase (que também ocorre por outros mecanismos, durante a glicólise) com o consequente aumento do conteúdo intracelular de AMPc (HABER et al., 2001).

A produção de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) ativa a proteína cinase A (PKA), que parece agir nos processos de síntese proteica da célula. A PKA pode, ainda, estimular a secreção de insulina por duas maneiras distintas: 1) pela fosforilação do canal de Ca^{2+} , sensível à voltagem, permitindo a entrada do íon na célula; 2) pela fosforilação de alguns componentes não tão específicos da maquinaria secretória, mas que garantem a sua eficiência (HABER et al., 2001).

Figura 1 - Principais eventos envolvidos na secreção de insulina estimulada por glicose.



GLUT-2 = transportador de glicose do tipo 2; ATP = adenosina trifosfato; PLC = fosfolipase C; PLA2 = fosfolipase A2; FL = fosfolípidios; AA = ácido araquidônico, RE = retículo endoplasmático, PKA = proteína cinase A; PKC = proteína cinase C; DAG = diacilglicerol; IP3 = inositol trifosfato; AMPc = adenosina monofosfato cíclico; (+) estimula; (-) inibe. Fonte: Curi et al. (2002).

Segundo Melissa et al. (2000), existe relação entre a RI, aumento compensatório na massa de células β e o metabolismo da glicose. Quando o processo de compensação das células β em relação à RI é suficiente, a TG pode ser mantida. Quando não há compensação das células β a concentração de glicose se altera podendo levar ao diabetes mellitus ou IG.

2.2.2 Ação, sinalização e resistência à ação da insulina.

A insulina é o hormônio polipeptídico anabólico mais conhecido e essencial para a manutenção da homeostase da glicose, além de promover crescimento e diferenciação celular (CARVALHEIRA et al., 2002). Esse hormônio é secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento da concentração de glicose circulante, aminoácidos e ácidos graxos (PRENTKI et al., 2002) após as refeições. A distribuição eficiente desses substratos energéticos nos tecidos periféricos (fígado, músculo e tecido adiposo) é coordenada pela ação antagonista da insulina e do glucagon, um hormônio secretado pelas células α das ilhotas pancreáticas (JIANG; ZHANG, 2003).

A insulina aumenta a captação periférica de glicose, reduz a produção hepática da mesma por meio da diminuição da gliconeogênese e glicogenólise, além de estimular a lipogênese e a síntese proteica (CARVALHEIRA et al., 2002). No jejum, a redução no balanço insulina/glucagon disponibiliza os substratos energéticos via glicogenólise, gliconeogênese e lipólise, contudo, sem interferir no metabolismo muscular (JIANG; ZHANG, 2003).

A RI caracteriza-se pela redução da capacidade dos tecidos sensíveis à insulina de regular a homeostase da glicose em concentrações normais do hormônio. As principais características da RI são o aumento da lipólise no tecido adiposo, aumentando o fluxo de AGLs, a secreção hepática da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), causando hipertriacilglicerolemia, reduzindo a concentração plasmática das lipoproteínas de alta densidade (HDL) (AVRAMOGLU et al., 2006) e o aumento da gliconeogênese no fígado e diminuição da captação de glicose pelo músculo. As células β , frente às concentrações crescentes de glicose impostas pela RI, desenvolvem mecanismos compensatórios, dentre os quais estão a hiperinsulinemia, para manter a normalidade da glicemia (CEFALU, 2001). Dependendo do grau de RI, ocorre hipertrofia das ilhotas pancreáticas e aumento da proliferação das células β , fato que também auxilia na homeostase da glicose (RAFACHO et al., 2008a; RAFACHO et al., 2009).

Aschroft; Aschroft (1992) relataram que a RI caracteriza-se por diminuição da capacidade celular em elevar o transporte e/ou utilização de glicose em resposta à ação da insulina. Nessa condição, a menor captação de glicose faz com que sua concentração plasmática tenda a se elevar, promovendo um quadro de IG.

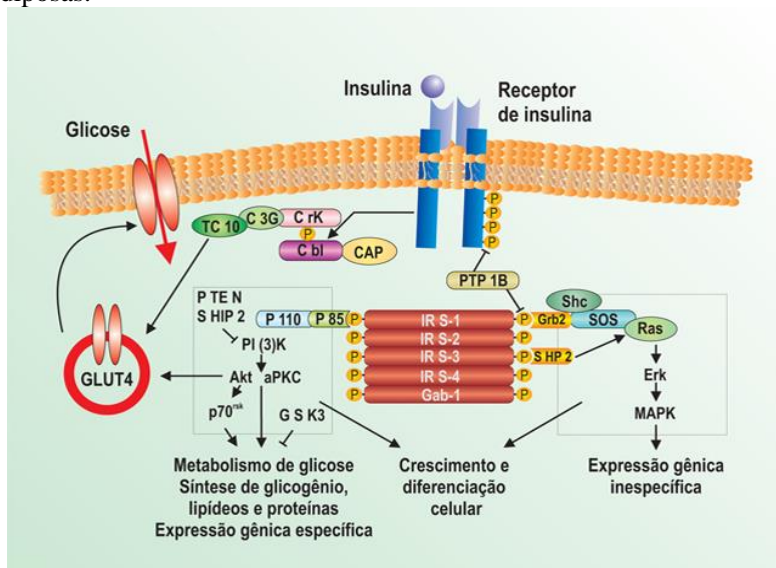
A sinalização intracelular da insulina começa com a sua ligação ao receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica

com atividade cinase, composta por duas subunidades α e duas subunidades β , que atua como uma enzima alostérica na qual a subunidade α inibe a atividade tirosina cinase da subunidade β . A ligação da insulina à subunidade α permite que a subunidade β adquira atividade cinase levando à alteração conformacional e auto fosforilação, que aumenta ainda mais a atividade cinase do receptor (PATTI; KAHN, 1998).

Após ativação do receptor de insulina, este promove a fosforilação, em resíduos tirosina, de proteínas citoplasmáticas ancoradas ao mesmo, como o substrato do receptor de insulina (IRS)-1 (WHITE; KAHN, 1994).

As três principais vias ativadas por proteínas IRS, são as vias da PI3K, da CAP/Cbl/Tc10 e da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK). A PI3K ativada aumenta as concentrações de fosfatidilinositol 3, 4, 5- trifosfato que regulam, por sua vez, a atividade de diferentes proteínas cinases como a proteína cinase B (PKB ou Akt), proteína cinase piruvato desidrogenase-1 (PDK-1) e as proteínas cinases C (PKCs) atípicas. A ativação da via da PI3K encontra-se envolvida com o transporte de glicose (translocação de GLUT4 para a membrana plasmática), síntese de glicogênio e lipogênese. Uma via paralela envolvida com a captação de glicose é a via da CAP/Cbl/Tc10, iniciada pela associação da Cbl com o receptor da insulina através da proteína adaptadora CAP. O complexo CAP-Cbl encontra-se associado aos “rafts” lipídicos (“balsas” lipídicas) e à proteína caveolar flotilina. A via da MAPK também é ativada pela insulina através da associação Shc com o receptor de insulina e da Grb2. As MAPK ou ERKs (cinases reguladas por sinais extracelulares) não possuem papel principal nas respostas metabólicas, embora o aumento na atividade basal de MAPK parece contribuir com o desenvolvimento da RI (PIROLA et al., 2004) (Figura 2).

Figura 2 - Via de sinalização da insulina em células musculares e adiposas.



Fonte: adaptado de SALTIEL; KAHN, 2001.

2.3 METABOLISMO DOS LIPÍDIOS

Os componentes lipídicos, especialmente os ácidos graxos (AGs), estão presentes nas mais diversas formas de vida, desempenhando importantes funções na estrutura das membranas celulares e nos processos metabólicos (CURI, 2002).

Os AGs são ácidos carboxílicos compostos por longa cadeia de hidrocarbonetos com um grupo carboxila numa extremidade e um metila na outra (CALDER, 2005). Estes podem ser saturados ou insaturados. Na ausência de duplas ligações são classificados como saturados e na presença de duplas ligações, insaturados (RUXTON et al, 2004).

Quando o ácido graxo possui uma única dupla ligação, é denominado monoinsaturado, se contém duas ou mais duplas ligações, polinsaturado. As duplas ligações têm grande importância, pois aumentam a flexibilidade da cadeia e conseqüentemente a fluidez das membranas biológicas quando esses ácidos graxos são incorporados. Os AGs são classificados também como AGs de cadeia curta (2 a 4

carbonos), média (6 a 10 carbonos) e longa (acima de doze carbonos) (CURI, 2002).

As lipoproteínas permitem a solubilização e o transporte dos lipídios, que são substâncias geralmente hidrofóbicas, no meio aquoso plasmático. São compostas por lipídios e proteínas denominadas apolipoproteínas (apos). As apos têm diversas funções no metabolismo das lipoproteínas, como a formação intracelular das partículas lipoproteicas, caso das apos B100 e B48, e a atuação como ligantes a receptores de membrana, como as apos B100 e E, ou cofatores enzimáticos, como as apos CII, CIII e AI. Existem quatro grandes classes de lipoproteínas separadas em dois grupos: (1) as ricas em TAG, maiores e menos densas, representadas pelos quilomícrons, de origem intestinal, e pelas lipoproteínas VLDL, de origem hepática; e (2) as ricas em colesterol, incluindo as de densidade baixa ou *low density lipoprotein* (LDL) e as de densidade alta, HDL. Existe ainda uma classe de lipoproteínas de densidade intermediária ou *intermediary density lipoprotein* (IDL) (XAVIER et al., 2013).

Os AGs são adquiridos da dieta, principalmente como triacilgliceróis, e são armazenados para reserva energética, transformados em hormônios, mensageiros celulares e constituintes da membrana celular (ALBERTS et al., 1997).

Após serem absorvidas pelas células intestinais, as diversas moléculas lipídicas, particularmente os AGs, são utilizadas na produção de quilomícrons, que são em seguida secretados pelas células intestinais para o interior do sistema linfático, de onde alcançam a circulação sanguínea via comunicação do ducto torácico com a veia subclávia esquerda (XAVIER et al., 2013).

O metabolismo dos lipídeos é influenciado, em parte, pela ação de duas enzimas: a lipase hormônio sensível (LHS) e a lipase de lipoproteínas (LLP). A LLP, localizada nas células endoteliais, age sobre os quilomícrons e VLDL, hidrolisando triglicerídeos e fosfolipídios em glicerol e ácidos graxos. Quando os ácidos graxos são necessários, a LHS mobiliza os ácidos graxos do tecido adiposo, por hidrólise dos triglicerídeos armazenados, para a corrente sanguínea. Ao entrarem na célula, estes ácidos graxos são transportados para o interior da mitocôndria através de acil-transferases. Estes podem ser reesterificados, convertidos em TAG e armazenados na própria célula, podem ser incorporados nas membranas, seguir na via da β -oxidação ou ainda entrar no núcleo e agir como ativadores ou inibidores da expressão gênica. A LLP do tecido adiposo é mais ativa no período pós-prandial e a LLP do músculo nos períodos de jejum (JÉQUIER; TAPPY, 1999).

Após o processo de lipólise, AGs são capturados por células musculares e também adipócitos, os quilomícrons e AGs remanescentes também são capturados pelo fígado, onde são utilizados na formação de VLDL. O transporte de lipídios de origem hepática ocorre por meio das VLDL, IDL e LDL. As VLDL são lipoproteínas ricas em TG e contêm a apo B100 como sua apolipoproteína principal. As VLDLs são montadas e secretadas pelo fígado e liberadas na circulação periférica. Na circulação, os TGs das VLDL, assim como no caso dos quilomícrons, são então hidrolisados pela lipase lipoproteica, enzima estimulada pela apo CII e inibida pela apo CIII. Os AGs assim liberados são redistribuídos para os tecidos, onde podem ser armazenados, como no tecido adiposo, ou prontamente utilizados, como nos músculos esqueléticos (XAVIER et al., 2013).

A insulina está ligada diretamente ao processo de oxidação dos nutrientes e atua no metabolismo de lipídios, reduzindo a oxidação de gorduras por inibição da LHS, e estimulando o depósito por ativação da LLP. Em indivíduos que apresentam RI, a ação LLP é suprimida o que pode parece explicar as elevadas concentrações de triacilglicerol nesses indivíduos (HOWARD, 1999).

O aumento na disponibilidade de AGs, com diminuição na captação de glicose caracteriza o ciclo de Randle. O aumento no conteúdo de acetil-CoA proveniente de AGs eleva a produção de citrato, que juntamente com a razão ATP/ADP elevada, inibe a atividade da fosfofrutocinase, resultando em redução da atividade da via glicolítica. Como consequência, há aumento no conteúdo de glicose-6-fosfato, que passa a inibir a hexoquinase II, causando acúmulo de glicose intracelular e redução do seu transporte. Com isso, os AGs causam inibição da captação e utilização de glicose, resultando em RI (RANDLE et al., 1963).

A RI impede a utilização adequada da glicose, promovendo um aumento da lipólise com consequente elevação plasmática de AGL. Nesta condição, as alterações mais comuns são hipertrigliceridemia e concentrações reduzidas de HDL-c (JÉQUIER; TAPPY, 1999). Adicionalmente, as concentrações da enzima LLP são diminuídas (PANAROTTO et al., 2002), interferindo na cascata metabólica normal das lipoproteínas e resultando em diminuição no *clearance* de VLDL (HOWARD, 1999; PANAROTTO et al., 2002).

2.4 ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS ÔMEGA-3

2.4.1 Aspectos bioquímicos e metabólicos

Existem duas importantes famílias de AGPIs denominados de: ômega 3 (n-3) e ômega 6 (n-6), sendo que a nomenclatura se refere à posição da primeira dupla ligação a partir do carbono ômega no terminal metila da cadeia de hidrocarboneto (DOMMELS et al., 2002; CALDER, 2005).

O ácido graxo α -linolênico (ALA; 18:3n-3) é precursor do ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3) e do docosahexaenoico (DHA 22:6n-3) e o ácido linoleico (AL; 18:2n-6) é precursor do ácido araquidônico (AA; 20:4n-6). Os ALA e AL possuem efeitos opostos e são considerados essenciais para a dieta humana, pois não podem ser sintetizados pelo organismo humano e nem interconvertidos, devido à ausência das enzimas dessaturases $\Delta 12$ e $\Delta 15$ (TAPIERO et al., 2002; RUXTON et al., 2004).

Na biossíntese dos ácidos graxos n-3 e n-6, estes compartilham a mesma enzima dessaturase (Δ -6-dessaturase) e, portanto competem pela mesma via metabólica. A Δ -6- dessaturase tem preferência pelo ácido α -linolênico, todavia altas concentrações de ácido linoleico podem inibir a conversão do ALA em EPA e DHA, reduzindo a quantidade destes AG (RUXTON et al., 2004).

Os AGs n-6 modulam diversas funções como: capacidade de agregação plaquetária, atividade vasoconstritora e são precursores de agentes quimiotáxicos muito potentes. Os ácidos graxos n-3 tendem a ter propriedades anti-inflamatórias, antiarrítmicas e de redução da concentração de lipídios (ex: triacilgliceróis) no sangue (CALDER, 2001).

O EPA e DHA são produzidos primariamente pelas algas. Logo, peixes e frutos do mar que se alimentam de algas são ricos em EPA e DHA, assim como produtos derivados de sua extração lipídica (ARTEMBURN; HALL; OKEN, 2006). É importante considerar que diferentes tipos de peixes contêm quantidades diferentes destes AGs e podem conter diferentes proporções de EPA e DHA. Isso se deve a inúmeros fatores que incluem as características metabólicas do peixe, a sua alimentação, a temperatura da água em que vivem, e a estação do ano. De forma geral, os peixes gordurosos (salmão, cavala, atum, arenque, sardinha) contêm mais AGPI n-3. Por exemplo, uma porção de salmão ou cavala, pode fornecer de 1,5 a 3,5 g de AGPI n-3. O OPe obtido da carne de peixes gordurosos ou do fígado de peixes magros é

rico em EPA e DHA. Compreendendo até 30% dos AGs presentes neste tipo de produto. Comercialmente, a maioria dos produtos à base de óleo de peixe possui, em média, 0,3 g EPA mais DHA/g de óleo de peixe. No entanto, a variabilidade das proporções relativas de ácidos graxos n-3 de cada tipo de peixe são refletidas também no OPe derivado. Existem ainda, fórmulas disponíveis de EPA e/ou DHA isolados e concentrados (CALDER, 2012).

2.4.2 Ácidos graxos polinsaturados n-3 e seu papel no metabolismo da glicose e dos lipídios

Os AGPIs n-3 têm despertado interesse, principalmente por apresentarem efeitos antiarrítmicos, antitrombogênicos, hipotriacilglicerolemiantes (KRIS-ETHERTON et al., 2002).

O estudo realizado por Belzung et al. (1993) mostrou que a suplementação de óleo de peixe (40% do fornecimento de energia) reduziu a gordura epididimária e retroperitoneal em ratos alimentados com teores elevados de gordura. Mostrou também que esta redução no acúmulo de gordura pela dieta rica em n-3 foi associada com redução na hipertrofia dos adipócitos.

Devido aos efeitos descritos acima, estudos clínicos e em modelos animais investigaram a ação dos AGPIs n-3 como possível tratamento do diabetes mellitus (SIRTORI; GALLI, 2002). Os ácidos graxos n-3 exercem seus efeitos modulando 3 vias principais: 1) estrutura e função da membrana plasmática; 2) síntese de eicosanoides; e 3) expressão gênica (JUMP, 2002). A incorporação dos ácidos graxos polinsaturados AA, EPA e DHA na membrana das células musculares esqueléticas é capaz de aumentar a fluidez de membrana, número de receptores de insulina na membrana plasmática e a ação da insulina (MARTIN et al., 2009).

Os fosfolipídios de membrana são substratos para enzimas que liberam AGPIs livres. Os AGPIs liberados podem atuar como moléculas sinalizadoras, ligantes (ou precursores de ligantes) para fatores de transcrição, como PPARs (receptores ativados por proliferadores peroxissomos), ou precursores para a biossíntese de mediadores lipídicos, que estão envolvidos na regulação de muitas respostas de células e tecidos (CALDER, 2012).

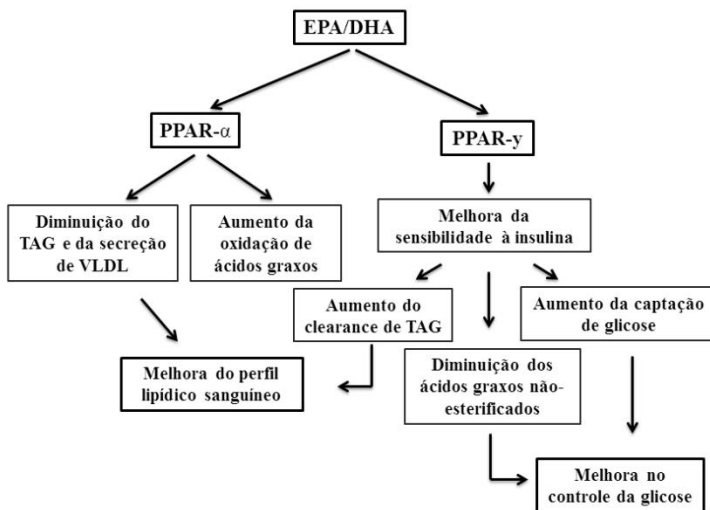
Deste modo, as mudanças na composição de AGs da membrana podem influenciar o funcionamento das células por meio de alterações das propriedades físicas da membrana. Tais como as alterações na estrutura dos “rafts” lipídicos (regiões das membranas com uma composição estrutural distinta, são particularmente ricas em

esfingolipídios e colesterol), como também, nos efeitos nas vias de sinalização celular. Estas conduzem às alterações da atividade de fatores de transcrição, às alterações na expressão de genes, e às alterações no padrão de mediadores lipídicos produzidos com os diferentes mediadores em diferentes atividades biológicas (CALDER, 2012).

Alguns AGs são considerados potentes ativadores de PPARs, que por sua vez, controlam a expressão de genes envolvidos no metabolismo de glicose, lipídio, e adipogênese (SIRTORI; GALLI, 2002; LOMBARDO; CHICCO, 2006). Existem três isoformas de PPAR descritas: α , β e γ . O PPAR α é expresso principalmente em tecido com alta capacidade oxidativa de AG como fígado, coração, músculo esquelético e rins. O PPAR β é expresso na maioria dos tecidos e em quantidades maiores que as demais isoformas. Já o PPAR γ é expresso principalmente no tecido adiposo (SCHOONJANS; STAELS; AUWERX, 1996). Através da ativação dos receptores PPARs, os AGPIs n-3 são capazes de regular o metabolismo de outras células do tecido e suas respostas, incluindo a diferenciação de adipócitos e inflamação. No fígado, a ativação do PPAR α resulta em aumento no transporte e oxidação de AG (MASCARO et al., 1998). No tecido adiposo a ativação do PPAR γ está relacionada com a diferenciação de adipócitos e aumento na captação e armazenamento de AGs (ROSEN E SPIEGELMAN, 2001). Este mecanismo pode explicar algumas ações fisiológicas dos AGPIs n-3, por exemplo, a sua capacidade de diminuir as concentrações de TAG no plasma em jejum, melhorar a sensibilidade à insulina, e reduzir a inflamação (Figura 3).

Já foi demonstrado que dietas ricas em AGPIs modificam a ação da insulina em ratos. Por exemplo, quando os lipídeos provinham do óleo de peixe, houve prevenção da RI induzida por uma dieta rica em lipídios (TAOUI et al., 2002). No estudo realizado por Vessby et al. (2002) a substituição dos ácidos graxos saturados pelos polinsaturados n-3 mudou o padrão característico dos lipídeos séricos encontrados no estado de RI. Estes efeitos dietéticos protetores do ômega 3 podem ocorrer devido à incorporação dos AGs nos fosfolipídios das membranas dos tecidos alvos da insulina e também por seu efeito hipolipidêmico, ou seja, redução do conteúdo de triacilgliceróis (THOMPSON et al., 2000; TAOUI et al., 2002; LOMBARDO; CHICCO, 2006). No entanto, os mecanismos do efeito protetor dos AGPIs n-3 não estão totalmente esclarecidos.

Figura 3 - Mecanismos pelos quais os AGPIs n-3 atuam através dos PPARs na melhora do perfil lipídico sanguíneo e no controle da glicose.



Fonte: Adaptado de CALDER, 2012.

Borkman et al. (1993) mostraram pela primeira vez a associação entre a composição de AG dos fosfolipídeos de membrana das células musculares esqueléticas e a sensibilidade à insulina em seres humanos, ou seja, as proporções de AGPIs nos fosfolipídios de membrana do músculo estavam diretamente relacionado com a sensibilidade à insulina.

A composição dos AGs das membranas também pode influenciar a ação da insulina, alterando as proteínas intracelulares específicas da sinalização da insulina, através da modulação da afinidade do receptor e da translocação dos transportadores de glicose para a membrana (HULBERT et al., 2005).

No músculo de rato, as alterações na composição da membrana causadas pelos AGPIs n-3 afetaram os receptores da insulina, o IRS-1 e a PI3K (LOMBARDO; CHICCO, 2006; TAOUIS et al., 2002). Em modelo animal espontâneo de diabetes, a suplementação com óleo de peixe por aproximadamente 18 semanas preveniu o desenvolvimento da RI, provavelmente pela maior expressão do RNAm para GLUT-4 mediado pela alteração na composição da membrana (LOMBARDO; CHICCO, 2006).

Um dos mecanismos relacionados com os efeitos protetores dos AGPIs n-3 sobre a sinalização insulínica pode ser observado no estudo de Oh et al. (2010) que demonstrou que o DHA promoveu a translocação do transportador de glicose GLUT-4 para a superfície de adipócitos em cultura e que esta foi associada com o aumento da captação de glicose. Eles sugeriram que esses efeitos foram provocados por receptores acoplados à proteína G (GPRs), no caso GPR120. Receptor este que medeia algumas das ações metabólicas do DHA.

Ratos tratados com Dex que induz RI, possuem diminuição da atividade da PI3K estimulada pela insulina ou no estado alimentado tanto no fígado, no músculo e no tecido adiposo. A fosforilação da Akt em serina é reduzida em 50% no músculo em ratos tratados com Dex, o que pode contribuir para a disfunção induzida por Dex na captação de glicose neste tecido (RUZZIN et al., 2005).

No estudo com suplementação de óleo de peixe e tratamento com Dex realizado por Corporeau et al. (2006), foi demonstrado que a substituição de baixa quantidade de OPe, 2,2% da energia metabolizável, por dieta normolipídica contendo 6,6% da energia como óleo de amendoim em ratos não alterou a diminuição do peso corpóreo e do consumo de ração. Assim como, não alterou o aumento da glicemia, da insulinemia e dos ácidos graxos não esterificados provocados pela administração da Dex. Em contrapartida, mostrou diminuição na atividade da PI3K no fígado e músculo, enquanto no tecido adiposo apresentou ativação. O aumento da atividade de PI3K no tecido adiposo poderia ter compensado a sua diminuição no fígado e no músculo, o que poderia explicar a ausência de alteração na tolerância à glicose e na sensibilidade à insulina. Em um estudo seguinte, o mesmo grupo mostrou que a suplementação com OPe na dieta modula a fosforilação da Akt independentemente da atividade da PI3K, uma vez uma diminuição da atividade da PI3K estimulada por insulina no tecido adiposo de ratos normais e resistentes à insulina não acarretou numa diminuição da fosforilação da Akt quando estimulada por insulina (Le FOLL et al., 2007).

O estudo realizado por Delarue et al. (2006) mostrou que a suplementação de óleo de peixe (6g/dia), durante 3 semanas em seres humanos, não modificou os fluxos de glicose plasmática alterados pelo tratamento com Dex (2mg/dia) durante 2 dias, apesar de proporcionar uma redução de 17% da área sob a curva de resposta a insulina no plasma, sugerindo um efeito de sensibilização à insulina.

A tabela 2 apresenta os principais estudos relacionando os efeitos da suplementação de OPe nas consequências relacionadas ao tratamento com Dex.

Tabela 2 - Efeitos da suplementação prévia com OPe sobre as consequências relacionadas ao tratamento com Dex.

Modelo experimental				Resultados	Referência
Dex	Tempo (dias)	Óleo de peixe	Tempo (semanas)		
1mg/kg de p.c. em ratos	5	2,2% da dieta OPe	4	OPe aumentou a fosforilação da PI3K em tecido adiposo, inibindo simultaneamente em fígado e músculo.	CORPOREAU et al., 2006
1mg/kg de p.c. em ratos	5	4,9% da dieta OPe	4	OPe na dieta modula a fosforilação da Akt independentemente e da atividade da PI3K, em ratos normais e resistentes à insulina.	FOLL et al., 2007
2 mg (4 x 0,5 mg/dia) em humanos	2	6 g/ dia (1,1 g de EPA e 0,7 g de DHA)	3	Após a suplementação de óleo de peixe, os fluxos de glicose plasmática foram mantidos, apesar de uma redução de 17% da área sob a curva de resposta a insulina no plasma, sugerindo um efeito de sensibilização à insulina.	DELARUE et al., 2006

OPe: óleo de peixe; PI3k: fosfatidil-inositol-3-fosfato; Akt: proteína cinase B; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico.

Os efeitos adversos, como a IG, a hipertrigliceridemia, provocados por doses elevadas de GC ou por seu uso prolongado, têm sido previamente reportados em estudos com animais e seres humanos. Da mesma forma, existem dados que corroboram o potencial uso da

suplementação de OPe para atenuação da IG, da RI e da hipertrigliceridemia. Porém, a recomendação da ingestão de OPe para indivíduos em tratamento com dexametasona no sentido de atenuar os efeitos negativos da terapia com o GC ainda não possui suporte na literatura científica. Assim, este estudo se propôs a obter dados mais consistentes e conclusivos a esse respeito, uma vez que o conhecimento do potencial efeito benéfico do OPe sobre a homeostase glicêmica e lipídica em modelo animal de quebra da homeostase induzida por Dex pode contribuir para a orientação de tratamentos que envolvam ambas as variáveis em um eventual quadro clínico.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da suplementação com OPe sobre alterações no metabolismo da glicose e dos lipídios induzidas por Dex em ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- caracterizar parâmetros no modelo experimental com a determinação: da massa corporal, do consumo de ração e de água e da massa dos seguintes órgãos e tecidos: fígado, tecido adiposo epididimário, tecido adiposo retroperitoneal e adrenais;
- avaliar a tolerância à glicose, à insulina e ao piruvato;
- avaliar a concentração da glicose sanguínea em jejum;
- determinar concentrações plasmáticas de triacilglicerol, colesterol total, HDL-c em jejum e cálculo da fração não-HDL-c;
- determinar conteúdo total das proteínas: IRS-1, Akt, PPAR γ , PGC-1 e conteúdo das formas fosforiladas do IRS-1, da Akt em extratos de tecido hepático;
- determinar concentração dos ácidos graxos em extratos de tecido hepático.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 120 ratos machos Wistar com 3 meses de idade, provenientes do Biotério Central da UFSC, localizado no Campus Trindade, Florianópolis, SC. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (5 ratos por gaiola) e em ambiente com temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) em ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas), com livre acesso à comida (ração comercial, Puro Trato[®]) e água. Todos os protocolos e procedimentos experimentais relativos ao projeto foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC (Anexo A).

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os grupos experimentais foram divididos em: **Grupo controle (CTL)**: ratos suplementados com óleo mineral (Mariol[®]) e com administração de solução salina, **Grupo DEX (DEX)**: ratos suplementados com óleo mineral (usado como placebo, uma vez que não é absorvido pelo animal) e tratados com dexametasona (Decadron[®], Aché, Campinas, SP, Brasil), **Grupo Óleo de peixe (OP)**: ratos suplementados com óleo de peixe (Phytomare[®], Figura 4 – Informação nutricional) e com administração de solução salina e **Grupo DEX + Óleo de peixe (DOP)**: ratos suplementados com óleo de peixe e tratados com dexametasona.

Figura 4 - Informação nutricional das cápsulas de óleo de peixe.

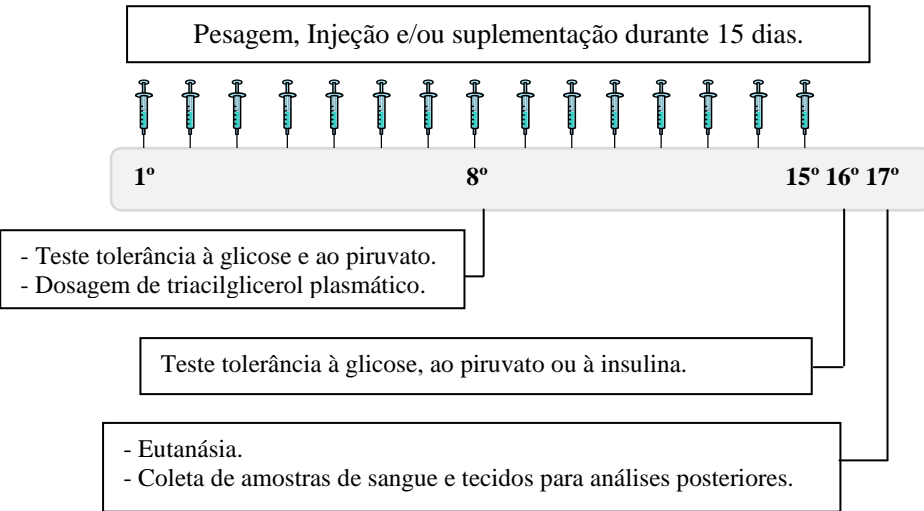
INFORMAÇÃO NUTRICIONAL	
Porção 1,0 g	
Quantidade por porção	
Valor energético	8,5 kcal = 35,5 kJ
Gorduras totais, das quais:	1,0 g
Gorduras saturadas	0,35 g
Gorduras monoinsaturadas	0,25 g
Gorduras polinsaturadas	0,4 g
Ômega 3:	305 mg
EPA (ácido eicosapentaenóico)	183,5 mg
DHA (ácido docosahexaenóico)	121,5 mg
Colesterol	2,0 mg
Sódio	2,0 mg
Não contém quantidade significativa de carboidratos, proteínas, gorduras trans e fibra alimentar.	

Fonte: Adaptado do rótulo do óleo de peixe encapsulado-Phytomare[®]

4.3 SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE E TRATAMENTO COM DEXAMETASONA

A suplementação com OPe foi conduzida de forma concomitante à administração da Dex. A suplementação com OPe: 1 g/kg, p.c. (YAMAZAKI et al., 2011; HIRABARA et al., 2012) foi iniciada em ratos com aproximadamente 90 dias de vida através de administração única, por via orogástrica, em torno das 08:00 h por 15 dias consecutivos. Os animais não suplementados receberam óleo mineral (1 g/kg, p.c.). Coincidindo com o início da suplementação, foi iniciado o tratamento com Dex: 0,5 mg/kg, p.c., diluída em salina (RAFACHO et al., 2008a), via intraperitoneal, durante 15 dias consecutivos, por volta das 08:00 h, enquanto os grupos não tratados com Dex receberam injeção com solução salina. A figura 5 apresenta resumo da distribuição temporal da administração da Dex, óleos, acompanhamento de variáveis e procedimentos em cada bloco de experimentos.

Figura 5- Representação esquemática da distribuição temporal dos procedimentos realizados em cada bloco de experimentos



4.4 PARÂMETROS MURINOMÉTRICOS, DE INGESTÃO E METABÓLICOS.

4.4.1 Acompanhamento da massa corporal: a determinação da massa corporal foi realizada diariamente um dia antecedente ao início da suplementação até o último dia do estudo em balança eletrônica digital (TECNAL, SP, Brasil).

4.4.2 Avaliação do consumo de ração: a ingestão alimentar foi acompanhada pela pesagem da ração remanescente (não ingerida) descontada do total daquela depositada no dia anterior. A diferença representa a quantidade ingerida por gaiola diariamente. A quantidade média de ração ingerida por animal foi obtida através da divisão da massa total de ração ingerida por gaiola pelo número de animais por caixa. Trabalhos anteriores do nosso grupo mostram que este tipo de avaliação produz resultados equivalentes aos de animais que tiveram estas mesmas variáveis mensuradas a partir da contenção em gaiolas metabólicas, após normalização para massa corporal e número de animais por caixa (RAFACHO et al., 2008; NUNES et al., 2013). Outros grupos também já demonstraram dados similares em outras linhagens de ratos (KROHN et al., 2011). Os resultados foram expressos em gramas de ração ingeridos por quilo de peso corpóreo para se obter a normalização deste parâmetro.

4.4.3 Avaliação do consumo de água: a ingestão hídrica foi acompanhada pela medição da água remanescente descontada do total daquela depositada no dia anterior. A diferença representa a quantidade ingerida por gaiola diariamente. A quantidade média de água ingerida por animal foi obtida através da divisão do volume total de água ingerida por gaiola pelo número de animais por caixa. Os resultados foram expressos em mililitros de água ingeridos por quilo de peso corpóreo para se obter a normalização deste parâmetro (KROHN et al., 2011).

4.4.4 Avaliação da glicose sanguínea de jejum: foi quantificada após jejum (12-14 h) através do sistema de fitas (monitor digital) “Accu-Check Performa” (ROCHE, Brasil) a partir da segunda gota de sangue obtida da ponta da cauda, uma vez que primeira foi descartada (RAFACHO et al., 2013, NUNES et al., 2013).

4.4.5 Avaliação da concentração de triacilglicerol plasmático no 8º dia de tratamento: o sangue da cauda foi coletado em eppendorf previamente lavado em solução salina, contendo anticoagulante heparina (Hemofol®). Em seguida, estes foram centrifugados a 400 g por 10 min a 22 °C (eppendorf 5810R) e o plasma foi aliqotado e armazenado a -20 °C para posterior quantificação do TAG de acordo com instruções do fabricante (Biotécnica®) (BUCOLO e DAVID, 1973; BELL et al., 1952; BURSTEIN, SCHOLNICK, MORFIN, 1970).

4.4.6 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT): foi realizado em ratos sob jejum (12-14 h) e acordados. Os animais tiveram a extremidade da cauda seccionada para a coleta de 2 gotas de sangue. A primeira gota foi descartada e a segunda utilizada para determinação da glicemia no tempo 0. Imediatamente, foi administrada solução de glicose 50% (2 g/kg de peso corpóreo) intraperitoneal e coletadas amostras de sangue da cauda dos ratos aos 30, 60 e 120 min para determinação das concentrações de glicose sanguínea como descrito acima. A partir desses valores calculou-se a área sob a curva (ASC) (BERGMAN et al., 1985).

4.4.7 Teste de tolerância ao piruvato intraperitoneal (ipPTT): foi realizado em ratos sob jejum (12-14 h) e acordados. Os animais tiveram a ponta da cauda seccionada para a coleta de 2 gotas de sangue. A primeira gota foi descartada e a segunda utilizada para determinação da glicemia no tempo 0. Imediatamente, foi injetada solução de piruvato 25% a 36°C (1,5g/kg de peso corpóreo) e amostras de sangue foram posteriormente coletadas aos 30, 60 e 120 minutos para determinação das concentrações de glicose sanguínea. A partir desses valores calculou-se a área sob a curva (ASC) (FERREIRA et al., 2012; NAGAJYOTHI et al., 2013).

4.4.8 Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT): foi realizado em grupo separado de ratos alimentados. A glicemia basal (min 0) foi obtida como descrito previamente no ipGTT. Imediatamente, receberam injeção intraperitoneal de insulina humana recombinante (Biohulin®; Contagem, MG, Brasil) equivalente a 1 UI/kg de peso corpóreo. Amostras de sangue foram coletadas para determinação da glicemia nos tempos 5, 10, 15 e 20 min. A constante de decaimento da glicose sanguínea (KITT) foi calculada a partir do “slope” da linha de regressão obtida com valores de glicose log-transformados entre 0 e 20 min (BONORA et al., 1989).

4.4.9 Eutanásia dos animais: após jejum de 12–14 h a morte dos animais se procedeu por exposição à atmosfera rica em CO₂, seguida por decapitação em guilhotina.

4.4.10 Avaliação perfil lipídico plasmático: imediatamente após a morte dos animais (jejum de 12–14 h), o sangue do tronco foi coletado em tubo de ensaio de vidro previamente lavado em solução salina, contendo anticoagulante heparina (Hemofol[®]). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 400 g por 10 min a 22 °C (ependorf 5810R) e o plasma foi aliquoteado e armazenado a -20 °C para posterior quantificação do TAG, colesterol total (CT) e HDL-c de acordo com instruções do fabricante (Biotécnica[®]) (BUCOLO e DAVID, 1973; BELL et al., 1952; BURSTEIN, SCHOLNICK, MORFIN, 1970). A fração não-HDL-c foi obtida por meio do seguinte cálculo: CT – HDL-c. O TyG index foi calculado com base na fórmula: $\log [((\text{triacilgliceridemia de jejum (mg.dL}^{-1}) \times \text{glicemia de jejum (mg.dL}^{-1}))/2)]$, (GUERRERO-ROMERO et al., 2010).

4.4.11 Pesagem de órgãos e tecidos: imediatamente após a morte dos animais (jejum de 12–14 h), os órgãos de interesse foram cuidadosamente removidos e pesados em balança eletrônica analítica digital (TECNAL, SP, Brasil).

4.4.12 Mensuração do conteúdo de glicogênio hepático: para determinação do glicogênio hepático, amostras de fígado (300 a 500mg) foram transferidas para tubos de centrífuga contendo KOH 30% e fervidas por 1 h para completa digestão. Em seguida, foi adicionado Na₂SO₄ e o glicogênio foi precipitado com etanol submetido ao banho maria por aproximadamente 15 seg. As amostras foram centrifugadas a 800 x g por 10 min, o sobrenadante contendo lípidos saponificados, aminoácidos, etc, foi descartado e o ‘pellet’ ressuspenso em água destilada quente. Etanol foi adicionado em seguida, o material foi homogeneizado e levado rapidamente ao banho maria, e as amostras foram conduzidas novamente a centrifugação. Após diluição do precipitado em 25 ml de água destilada quente o conteúdo do glicogênio foi quantificado por espectrofotometria em reação com reagente fenol e H₂SO₄. A absorbância foi determinada a 490 nm (Lo et al., 1970, adaptado por RAFACHO et al., 2008).

4.4.13 Avaliação do conteúdo de triacilglicerol hepático: para determinação da gordura hepática, 100 mg de fígado foram transferidas

para tubos de centrífuga contendo NaCl (1M) e homogeneizados em ultraturrax. Posteriormente foi adicionado clorofórmio/metanol (2:1) e centrifugado a 5000 x g por 5 min. Formou-se 3 fases e a fase inferior (metanólica) foi retirada para posterior secagem em banho-maria fervente. Em seguida, a amostra foi ressuspensa em TritonX100/Metanol (2:1) e agitada. Logo após, foi realizada a dosagem do triacilglicerol por método enzimático colorimétrico de acordo com instruções do fabricante (Biotécnica[®]) (adaptado de Trinh et al, 1998).

4.5 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DAS PROTEÍNAS: IRS-1, Akt E DO PPAR γ E DAS FORMAS FOSFORILADAS DO IRS-1 e DA Akt EM EXTRATOS DE TECIDO HEPÁTICO

4.5.1 Extração proteica e Western Blott

Imediatamente após a morte dos animais, os fragmentos do tecido hepático foram removidos e congelados em nitrogênio líquido para posterior análise. Estes fragmentos foram homogeneizados em solução de lise celular a 4 °C (Cell Signaling, MA, USA) em ultraturrax (IKA[®]) por 3 séries de 15 segundos cada. Posteriormente foram centrifugados a 13.000 x g por 50 min a 4°C (Eppendorf 5804R). A determinação da concentração proteica total do lisado foi realizada pelo método de Bradford (1976), de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Rad, CA, USA). Alíquotas de proteína total (100 μ g) foram fervidas a 100 °C por 4 minutos em 25% do volume em tampão Laemmli (fosfato de sódio 1M pH 7,0, 10% SDS, 10% β -mercaptoetanol, 50% glicerol, 0,1% azul de bromofenol). As amostras foram submetidas à eletroforese (Mini Protean II - Bio-Rad) em gel de poliacrilamida 6,5-15%. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Santa Cruz Biotechnology) na presença de 20% metanol e 1% SDS em voltagem constante de 120 V por 2 h (SHAPIRO et al., 1967). O fragmento lisado por cada animal foi considerado como $n=1$. Depois de 2 horas de bloqueio a temperatura ambiente as membranas contendo lisado dos tecidos foram lavadas em TBST (solução basal) e incubadas por toda noite com anticorpos primários específicos (Akt-goat polyclonal A2611 (1:500), p-Akt- (Ser 437) rabbit polyclonal C0211 (1:200), IRS-1- rabbit polyclonal A0311 (1:200), p-IRS (Tyr 989) rabbit polyclonal C3011 (1:200), PPAR γ - rabbit polyclonal 1984 (1:500), PGC-1- rabbit polyclonal (1:500), α -tubulina- mouse polyclonal (1:300), Santa Cruz Biotechnology - Santa Cruz, CA, USA) e β -actina-mouse polyclonal (1:3000), Abcam a 4 °C. Depois de lavadas em TBST as membranas foram incubadas com anticorpo secundário específico

(Santa Cruz Biotechnology - Santa Cruz, CA, USA) em temperatura ambiente (TOWBIN et al., 1979). O anticorpo ligado foi detectado por quimioluminescência pelo sistema de fotodocumentação Chemidoc MP (BioRad, CA, USA), como descrito pelo fabricante.

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM EXTRATOS DE TECIDO HEPÁTICO

4.6.1 Extração lipídica

Foi utilizada uma adaptação da metodologia descrita por Folch et al. (1957). Inicialmente, foi homogeneizado 100 mg de tecido ou 100 μ L de plasma com 1,33 ml de clorofórmio- metanol (CHCl_3 / MeOH) (2:1) logo após centrifugou-se por 2 minutos, 1500g, 4 °C. Foi transferido a parte líquida para o tubo numerado e adicionado 240 μ l de metanol e centrifugado a 5000g por 10 min a 4 °C. Foi transferido o sobrenadante para um novo tubo de 5 ml e foi desprezado o infranadante. Foi realizado novamente uma lavagem com a adição de 480 μ l de CHCl_3 (clorofórmio) e 410 μ l de água destilada. A amostra foi agitada e depois descansou por 10 minutos. Após a reconstituição espontânea do sistema bifásico, o sobrenadante (aquoso) foi removido e descartado. Lavou-se 3 vezes com alíquotas de 1 ml da FSP (Solução de Folch – Fase Superior Pura Suplmentada). Cada amostra foi agitada e centrifugada e, após o descarte da fase superior (hidrometanólica), a fase orgânica foi evaporada em nitrogênio gasoso.

4.6.2 Saponificação dos extratos lipídicos

Os extratos lipídicos obtidos do tecido foram ressuspensos em 100 μ L de metanol e saponificados com 2,0 mL de uma solução alcalina em metanol (hidróxido de sódio 1M em metanol a 90%), a 37 °C por 2 horas, em banho-maria com agitação (HAMILTON et al., 1992; NISHIYAMA-NARUKE et al., 1998). A solução alcalina foi então acidificada até aproximadamente pH 3,0, com ácido clorídrico 1 M. Os ácidos graxos em solução foram extraídos 3 vezes com 2,0 mL de hexano. O solvente foi evaporado em nitrogênio gasoso e as amostras então foram guardadas protegidas da luz, a -20°C, até a derivatização com BMMC (Bromo metil metoxi coumirin).

4.6.3 Derivatização dos ácidos graxos

A reação de derivatização foi baseada no método descrito por Abushufa, Reed e Weinkove (1994). O reagente 1 foi preparado adicionando-se 10 mg de BMMC em 10 mL de acetonitrila. O reagente

2 foi preparado adicionando-se 26,5 mg de 18-crown-6 e 100 mg de carbonato de potássio em 5 mL de acetonitrila. O reagente 2 foi sonificado por 30 minutos e outros 5 mL de acetonitrila foram adicionados. O sobrenadante foi separado do precipitado e a solução foi estocada a 4-8 °C. As amostras contendo ácidos graxos a serem derivatizados foram reconstituídas em 100 µL de acetonitrila e homogeneizadas em vórtex. Após 30 segundos, foram adicionados 100 µL do reagente 1, e 100 µL do reagente 2. Depois se adicionou 100µl de acetonitrila, homogeneizou-se durante 30 segundos e aqueceu-se por 15 minutos a 60° C. Pequenas alíquotas desta solução derivatizada foram injetadas em um sistema HPLC – Varian modelo LC-10A e detector de fluorescência (325 nm de excitação e 395 nm de emissão). Foi utilizada curva padrão contendo os ácidos graxos: Láurico, EPA, alfa-linolênico, DHA, Mirístico, AA, Palmitoleico, Linoleico, Palmítico, Oleico e Esteárico.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram organizados e registrados em banco de dados no programa Microsoft Office Excel 2007[®] com dupla entrada. A análise estatística dos dados foi realizada no programa estatístico graphpad prism v.5.01 (Graphpad Inc.; La Jolla, USA). As variáveis quantitativas foram descritas e apresentadas em média e erro padrão da média (EPM) quando a distribuição foi simétrica ou em mediana e intervalo interquartil quando foi assimétrica. Para avaliação da distribuição dos dados foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Foi realizado a análise de variância de uma via (one way - ANOVA) seguido de *post hoc* de Tukey para comparação múltipla de valores com distribuição paramétrica, ou Kruskal-wallis seguido de *post hoc* de Dunns quando as variáveis com distribuição assimétrica. Para todos os testes, foi adotado o nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS DE CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

Assim como mostrado em estudos anteriores (RAFACHO et al, 2008; NUNES et al, 2013), os animais tratados com Dex apresentaram redução significativa da massa corporal, do consumo de ração relativo, da massa do tecido adiposo retroperitoneal, adrenais e aumento significativo da massa relativa do fígado e do tecido adiposo epididimário. As concentrações de glicose sanguínea (CTL: $96,2 \pm 2,7$ e DEX: $132,3 \pm 8,2$ mg/dL) e triacilglicerol plasmático (CTL: $77,8 \pm 5,5$ e DEX: $162,5 \pm 22,0$ mg/dL) em jejum aumentaram significativamente nos ratos tratados com Dex, após 15 dias de tratamento, em relação ao grupo CTL ($p < 0,05$, $n = 10$). Os dados respectivos a esses achados estão na Tabela 3. Diante disto, observamos que o modelo experimental proposto possui similaridades quanto às modificações metabólicas presentes em estudos utilizando doses e tempos diferentes aos aplicados aqui (ex: 1mg/kg/dia por 5 dias) (RAFACHO et al, 2008; NUNES et al, 2013).

No entanto, o modelo experimental utilizado no presente estudo tem particularidades, uma vez que este é caracterizado por um período (15 dias) e dose (0,5 mg/kg de p.c.), combinação esta distinta às outras encontradas na literatura.

Tabela 3- Avaliação da massa corpórea, do consumo de ração e da massa de tecidos e órgão de ratos tratados ou não com Dex durante 15 dias.

	CTL	DEX
Varição da massa corporal (g)	17,0 \pm 1,6	-71,0 \pm 6,4 [#]
Varição do consumo de ração final (g/kg de p.c.)[¥]	-1,9 (-2,9 - 0,9)	-4,9 (-5,7 -3,8) [#]
Tecido adiposo epididimário (mg/g de p.c.)	10,8 \pm 0,5	15,0 \pm 0,9 [#]
Tecido adiposo retroperitoneal (mg/g de p.c.)	13,5 \pm 1,2	7,4 \pm 0,9 [#]
Fígado (mg/g de p.c.)	32,7 \pm 0,7	39,0 \pm 1,8 [#]
Adrenal (mg/g de p.c.)	0,16 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01 [#]

Dados apresentados como média \pm EPM. ¥ indica valores apresentados como mediana e intervalo interquartil e utilizado o teste de Mann-Whitney. # indica diferença significante entre grupo CTL e grupo DEX. Foi utilizado o teste t-student, $p < 0,05$, $n = 10$.

Em seguida, os Resultados e Discussão desta Dissertação serão apresentados em formato de artigo, obedecendo ao formato de Dissertação proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição - UFSC. Por este motivo, o resumo, alguns trechos da introdução e a metodologia serão repetidos. O artigo proposto será enviado para a Revista *The Journal of Nutritional Biochemistry*, fator de impacto 4,552.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO (INSERIDOS EM MODELO DE ARTIGO)

TÍTULO:

Suplementação com óleo de peixe atenua as alterações no perfil lipídico plasmático provocadas pelo tratamento com dexametasona em ratos

Fish oil supplementation attenuates the changes in the plasma lipids caused by dexamethasone treatment in rats

Título curto: Suplementação com óleo de peixe em ratos tratados com dexametasona

RESUMO

A dexametasona (Dex) é um glicocorticoide sintético usado como potente anti-inflamatório na prática clínica. Quando administrada em excesso, a Dex pode promover alterações no perfil glicêmico e lipídico. Os ácidos graxos polinsaturados ômega n-3 (AGPIs n-3) presentes no óleo de peixe (OPe) podem ser usados como potentes moduladores do metabolismo da glicose e dos lipídios. Com isso, nós investigamos os efeitos da suplementação com OPe sobre alterações no metabolismo da glicose e dos lipídios ocasionadas por 15 dias de tratamento com Dex. Foram utilizados ratos machos adultos divididos em 4 grupos: CTL, salina 1 ml/kg p.c. e óleo mineral 1 g/kg p.c., DEX, dexametasona 0,5 mg/kg p.c. e óleo mineral 1 g/kg p.c., OP, óleo de peixe 1g/kg p.c. e salina 1 ml/kg p.c e DOP, óleo de peixe 1g/kg p.c. e dexametasona 0,5 mg/kg p.c, tratados por 15 dias. A Dex e salina foram administradas via intraperitoneal e o óleo de peixe e óleo mineral, via gavagem. Foram analisados a massa corpórea, glicose sanguínea, componentes plasmáticos (triacilglicerol-TAG, colesterol total-CT, HDL-c), conteúdo de glicogênio e gordura hepática, tolerância à glicose, à insulina e ao piruvato. Também foi avaliado o conteúdo das proteínas substrato receptor de insulina 1 (IRS-1), proteína cinase B (Akt), receptores ativados por proliferadores de peroxissomos-gama (PPAR γ) e coativador 1 do receptor ativado por proliferadores de peroxissomos-alfa (PGC-1 α) e a incorporação dos ácidos graxos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) no fígado. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguido de *post hoc* de Tukey, com nível de significância de 95%. Os dados mostram que a suplementação com OPe resultou em maior incorporação de EPA (DEX: 0,3 \pm 0,0; DOP: 1,3 \pm 0,1) e DHA (DEX: 5,6 \pm 0,7; DOP: 10,5 \pm 0,8) no fígado e

reduziu as concentrações plasmáticas de TAG, CT e fração não HDL-c nos ratos tratados com Dex. Estas modificações ocorreram sem alteração no conteúdo hepático das proteínas IRS-1, Akt, PGC-1 α e PPAR γ . A ingestão de OPe não atenuou a perda de peso, o aumento da glicemia em jejum e a intolerância à glicose (no oitavo dia de tratamento) nos ratos tratados com Dex. No fim do tratamento (16 dias) não foi observada intolerância à glicose nos ratos tratados com Dex, independente da suplementação. Diante disso, o presente estudo mostra que a suplementação com óleo de peixe, na dose e tempo utilizados, atenua as alterações dos lipídios plasmáticos provocadas pelo tratamento com Dex, mas não exerce nenhum efeito sobre os parâmetros da homeostase glicêmica em ratos.

Palavras-chave: dexametasona, óleo de peixe, perfil glicêmico, metabolismo lipídico.

ABSTRACT

Dexamethasone (Dex) is a synthetic glucocorticoid clinically applied as anti-inflammatory. However, in excess or after prolonged exposition, Dex may also alter the glucose and lipid homeostasis. The omega-3 fatty acids, present in fish oil (FOi), can be used as potential modulators of intermediary glucose and lipids' metabolism. Herein, we evaluate the effects of FOi supplementation on the glucose and lipid' metabolism in rats treated with Dex during 15 days. Adult male Wistar rats were divided in four groups: CTL received saline 1 ml/kg per body weight (b.w) and mineral oil 1 g/kg b.w; DEX received dexamethasone 0.5 mg/kg b.w and mineral oil 1 g/kg b.w; FO received fish oil 1g/kg and saline 1 ml/kg b.w; and DFO received fish oil 1 g.kg b.w and dexamethasone 1 mg/kg b.w for 15 days. Dex and saline were administered intraperitoneally and fish oil and mineral oil by gavage. Were evaluated the body weight, blood glycaemia, plasmatic parameters (triacylglycerol – TAG, total cholesterol –TC and HDL-c), glycogen content, hepatic fat and glucose, insulin and pyruvate tolerance. In addition, were evaluated the expression of the insulin receptor substrate 1 (IRS-1), protein kinase B (PKB), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) and the incorporation of fatty acids eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) in liver. Data were analyzed by ANOVA and post hoc test at a significance level of $p < 0.05$. The results showed that FOi supplementation increased DHA

(DEX: 5.6 ± 0.7 ; DFO: 10.5 ± 0.8) and EPA (DEX: 0.3 ± 0.0 ; DFO: 1.3 ± 0.1) hepatic content and attenuate the modifications of the plasmatic concentrations of TAG, TC and non-HDL-c fraction in the DFO rats compared with DEX. These effects occurred without modifications on the hepatic expression of IRS-1, Akt, PGC-1 and PPAR γ proteins. The FOi supplementation does not attenuate the loss of body weight, the increase of fasting glycaemia and the glucose intolerance (on the eighth day of treatment) in the rats treated with Dex. At the end of treatment (16 days), we observed that the DEX groups were not glucose intolerant, independent of the FOi supplementation. Therefore, the present study showed that the FOi supplementation, in the dose and time tested, attenuated the lipid metabolism alterations induced by Dex treatment.

Key-words: dexamethasone, fish oil, glycaemia profile, lipid metabolism.

INTRODUÇÃO

A dexametasona (Dex) é um glicocorticoide amplamente utilizado na prática clínica. Sua administração é indicada para a supressão da inflamação, para o tratamento das manifestações clínicas da artrite reumatoide (SCHÄCKE et al., 2002; CZOCK et al., 2005) e para a atenuação da êmese associada à quimioterapia (MARANZANO et al., 2005). Quando administrada em excesso, a Dex pode induzir efeitos adversos como hiperfagia (DEBONS et al., 1986), aumento da deposição de gordura central, hipertrigliceridemia, resistência periférica à insulina (RI) e intolerância à glicose (IG) (STOJANOVSKA et al., 1990; BINNERT et al., 2004; KORACH-ANDRÉ et al., 2005; BURÉN et al., 2008; RAFACHO et al., 2008; RAFACHO et al., 2010). Com base nestes efeitos, a Dex pode ser utilizada para indução de RI e IG experimentalmente em roedores (STOJANOVSKA et al., 1990; SEVERINO et al., 2002; KORACH-ANDRÉ et al., 2005; BURÉN et al., 2008; RAFACHO et al., 2008; RAFACHO et al., 2010) e RI transitória em humanos (BINNERT et al., 2004).

Alterações no metabolismo da glicose e dos lipídios, como a IG e a hipertrigliceridemia, respectivamente, em ratos tratados com GC tem sido bastante estudados. Contudo, a reprodutibilidade e o grau de influência sobre essas variáveis parece ser dependente de dose, duração de tratamento ou fatores predisponentes (por exemplo, obesidade, gravidez e envelhecimento) (NOVELLI et al., 1999; HOLNESS; SUGDEN, 2001; RAFACHO et al., 2008).

Alterações metabólicas provocadas pelo tratamento com Dex podem ser fator limitante para a prolongação de seu uso. Assim, estratégias adjuvantes podem ser investigadas no sentido da busca de redução dos efeitos colaterais da Dex. Neste sentido, há evidências de que os ácidos graxos polinsaturados (AGPIs) ômega-3 (n-3), principalmente os ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA), presentes no óleo de peixe (OPe), estão associados ao aumento da tolerância à glicose (TG), da sensibilidade à insulina (SI), e a diminuição dos fatores de risco para várias doenças tais como: dislipidemias, doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, câncer, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e síndrome metabólica (STORLIEN et al., 2000; KRIS-ETHERTON et al., 2002; SIRTORI; GALLI, 2002; HIRABARA et al., 2012).

Parte dos efeitos citados acima possui seu fundamento na capacidade dos AGPIs n-3 em modular a ação da insulina em seus tecidos-alvo. A alteração na composição da membrana lipídica com consequente alteração da função de receptores ou canais de membrana, aumento na fosforilação em tirosina do substrato receptor de insulina 1 (IRS-1) e aumento da atividade da fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K) no fígado são algumas das várias hipóteses que vêm sendo sugeridas para explicar os mecanismos por trás dos efeitos dos AGPIs na redução da RI e na melhora da TG (STORLIEN et al., 1996; ZIERATH et al., 1997; KRSSAK et al., 1999; TAOUIS et al., 2002).

Outro mecanismo relacionado com a modulação dos AGPIs n-3 sobre a sinalização insulínica foi mostrado no estudo realizado por Oh et al. (2010). Neste estudo, foi demonstrado que o DHA aumentou a translocação do transportador de glicose GLUT-4 para a superfície de adipócitos em cultura com consequente captação de glicose. Estas ações foram dependentes de receptores acoplados à proteína G (GPRs), no caso GPR120, receptor este que medeia algumas das ações metabólicas do DHA e outros ácidos graxos de cadeia longa.

Estudos epidemiológicos demonstram que a ingestão de óleo de peixe (OPe) nos primeiros anos da infância retarda o desenvolvimento da IG ao longo da vida (STENE; JONER, 2003). Adicionalmente, foi demonstrado que a suplementação com OPe previne o aparecimento de RI e dislipidemia em ratos alimentados com um elevado teor de gordura ou dieta rica em sacarose (LOMBARDO; CHICCO, 2006).

Considerando os efeitos biológicos do consumo de OPe, ou de seus ácidos graxos isolados, sobre o metabolismo da glicose e lipídeos em outros modelos, é possível especular sobre potencial efeito terapêutico da suplementação de OPe sobre alguns efeitos metabólicos

do uso de Dex. Neste estudo, foram investigados os efeitos da suplementação com OPe (1g/kg/dia) sobre alterações no metabolismo da glicose e dos lipídios ocasionadas por 15 dias de tratamento com Dex (0,5 mg/kg/dia). A hipótese testada foi de que a ingestão do OPe atenuaria as alterações metabólicas causadas pela Dex.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aprovação ética

Todos os protocolos e procedimentos experimentais relativos ao projeto foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob número de protocolo PP00782.

Animais

Os experimentos foram realizados utilizando ratos machos Wistar com 3 meses de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, mantidos em ambiente com temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) em ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas), com livre acesso à comida (ração comercial, Puro Trato[®]) e água.

Desenho Experimental

Os ratos receberam diariamente injeções intraperitoneal de Dex (0,5 mg/kg, p.c.) ou salina (0,9%) (1 mL/kg, p.c.) e óleo de peixe (1 g/kg, p.c.) ou óleo mineral (1 g/kg, p.c.) via gavagem, entre 08:00 e 09:00 horas por 15 dias consecutivos. A salina foi usada como controle para a dexametasona e o óleo mineral usado como placebo, uma vez que não é absorvido pelo animal. Os ratos foram divididos em quatro grupos: **Grupo controle (CTL)**: tratados com óleo mineral e solução salina, **Grupo DEX (DEX)**: tratados com óleo mineral e dexametasona, **Grupo Óleo de peixe (OP)**: tratados com óleo de peixe e solução salina e **Grupo DEX + Óleo de peixe (DOP)**: tratados com óleo de peixe e dexametasona.

No oitavo dia de tratamento foi realizado o teste de tolerância à glicose e dosagem de triacilglicerol plasmático, a partir de sangue retirado da cauda do animal. No décimo sexto dia foram realizados os testes de teste tolerância à glicose, ao piruvato e à insulina e no dia seguinte (17º dia) foi realizada a eutanásia dos animais para coleta de amostras de sangue e tecidos para análises posteriores.

Mensuração da Ingestão de ração, água e parâmetros metabólicos

A massa corporal, o consumo de ração e de água foram acompanhados diariamente desde um dia antecedente ao início da suplementação até o dia da eutanásia. Após jejum de 12-14 h foi verificado as concentrações de glicose sanguínea com glicosímetro (Accu-Check Performa, ROCHE, Brasil) a partir da segunda gota de sangue obtida da ponta da cauda do animal (RAFACHO et al., 2013, NUNES et al., 2013). Imediatamente após os ratos foram mortos (exposição ao CO₂ seguido de decapitação), o sangue do tronco foi coletado em tubo de ensaio de vidro previamente lavado em solução salina, contendo anticoagulante heparina (Hemofol[®]). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 400g por 10 min a 22 °C (eppendorf 5810R) e o plasma foi alíquotado e armazenado a -20 °C para posterior quantificação do TAG, colesterol total (CT) e HDL-c de acordo com instruções do fabricante (Biotécnica[®]) usando um espectrofotômetro (BUCOLO e DAVID, 1973; ABELL et al., 1952; BURSTEIN, SCHOLNICK, MORFIN, 1970). A fração não-HDL-c foi obtida por meio do seguinte cálculo: CT – HDL-c. Órgãos e tecidos foram cuidadosamente retirados e pesados. O índice TyG foi calculado com base na fórmula: $\log [((\text{triacilgliceridemia de jejum (mg.dL}^{-1}) \times \text{glicemia de jejum (mg.dL}^{-1})))/2]$, (GUERRERO-ROMERO et al., 2010).

Avaliação da tolerância à glicose

Foi realizado em ratos sob jejum (12-14 h) e acordados. Os animais tiveram a extremidade da cauda seccionada para a coleta de 2 gotas de sangue. A primeira gota foi descartada e a segunda utilizada para determinação da glicemia no tempo 0. Imediatamente após, foi administrada solução de glicose 50% (2 g/kg de peso corpóreo) intraperitoneal e coletadas amostras de sangue da cauda dos ratos aos 30, 60 e 120 min para determinação das concentrações de glicose sanguínea como descrito acima. A partir desses valores, calculou-se a área sob a curva (ASC) (BERGMAN et al., 1985).

Avaliação da tolerância ao piruvato

Foi realizado em ratos sob jejum (12-14 h) e acordados. Os animais tiveram a ponta da cauda seccionada para a coleta de 2 gotas de sangue. A primeira gota foi descartada e a segunda utilizada para determinação da glicemia no tempo 0. Imediatamente após, foi injetada solução de piruvato 25% a 36°C (1,5g/kg de peso corpóreo) por via intraperitoneal e amostras de sangue foram posteriormente coletadas aos 30, 60 e 120 minutos para determinação das concentrações de glicose

sanguínea. A partir desses valores, calculou-se a área sob a curva (ASC) (FERREIRA et al., 2012; NAGAJYOTHI et al., 2013).

Avaliação da tolerância à insulina

Foi realizado em grupo separado de ratos alimentados. A glicemia basal (min 0) foi obtida como descrito previamente no ipGTT. Imediatamente, receberam injeção intraperitoneal de insulina humana recombinante (Humulin[®], Indianapolis, Indiana, USA) equivalente a 1 UI/kg de peso corpóreo. Amostras de sangue foram coletadas para determinação da glicemia nos tempos 5, 10, 15 e 20 min. A constante de decaimento da glicose sanguínea (KITT) foi calculada a partir do “slope” da linha de regressão obtida com valores de glicose log-transformados entre 0 e 20 min (BONORA et al., 1989).

Avaliação do conteúdo de glicogênio e gordura hepática

Após a eutanásia, amostras de fígado (300 a 500mg) foram transferidas para tubos de centrífuga contendo KOH 30% e fervidas por 1 h para completa digestão. Em seguida, foi adicionado Na₂SO₄ e o glicogênio foi precipitado com etanol submetido ao banho maria por aproximadamente 15 seg. As amostras foram centrifugadas a 800 x g por 10 min, o sobrenadante contendo lípides saponificados, aminoácidos, etc, foi descartado e o ‘pellet’ ressuspenso em água destilada quente. Etanol foi adicionado em seguida, o material foi homogeneizado e levado rapidamente ao banho maria, e as amostras foram conduzidas novamente a centrifugação. Após diluição do precipitado em 25 ml de água destilada quente o conteúdo do glicogênio foi quantificado por espectrofotometria em reação com reagente fenol e H₂SO₄. A absorbância foi determinada a 490 nm (Lo et al., 1970, adaptado por RAFACHO et al., 2008). Para determinação de gordura hepática, 100 mg de fígado foram transferidas para tubos de centrífuga contendo NaCl (1M) e homogeneizados em ultraturrax. Posteriormente foi adicionado clorofórmio/metanol (2:1) e centrifugado a 5000 x g por 5 min. Formou-se 3 fases e a fase inferior (metanólica) foi retirada para posterior secagem em banho-maria fervente. Em seguida, a amostra foi ressuspenso em TritonX100/Metanol (2:1) e agitada. Logo após, foi realizada a dosagem do triacilglicerol de acordo com instruções do fabricante (Biotécnica[®]) (adaptado de TRINH et al, 1998).

Análise do conteúdo de proteínas por western blotting em fígado.

Imediatamente após a eutanásia, os fragmentos do tecido hepático foram removidos e congelados em nitrogênio líquido para posterior análise. Estes fragmentos foram homogeneizados em solução de lise celular a 4 °C (Cell Signaling, MA, USA) em ultraturrax (IKA®), posteriormente foram centrifugados a 13.000 x g por 50 min a 4°C (Eppendorf 5804R). A determinação da concentração proteica total do lisado foi realizada pelo método de Bradford, de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Rad, CA, USA). Alíquotas de proteína total (100 µg) foram fervidas a 100 °C por 4 minutos em 25% do volume em tampão Laemmli (fosfato de sódio 1M pH 7,0, 10% SDS, 10% β-mercaptoetanol, 50% glicerol, 0,1% azul de bromofenol). As amostras foram submetidas à eletroforese (Mini Protean II - Bio-Rad) em gel de poliacrilamida 6,5-15%. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Santa Cruz Biotechnology) na presença de 20% metanol e 1% SDS em voltagem constante de 120 V por 2 h (SHAPIRO et al., 1967). Depois de 2 horas de bloqueio a temperatura ambiente as membranas contendo lisado dos tecidos foram lavadas em TBST (solução basal) e incubadas por toda noite com anticorpos primários específicos (Akt- goat polyclonal A2611 (1:500), p-Akt- (Ser 437) rabbit polyclonal C0211 (1:200), IRS-1- rabbit polyclonal A0311 (1:200), p-IRS (Tyr 989) rabbit polyclonal C3011 (1:200), PPARγ- rabbit polyclonal 1984 (1:500), PGC-1- rabbit polyclonal (1:500), α-tubulina- mouse polyclonal (1:300), Santa Cruz Biotechnology - Santa Cruz, CA, USA) e β-actina- mouse polyclonal (1:3000), Abcam a 4 °C. Depois de lavadas em TBST as membranas foram incubadas com anticorpo secundário específico (Santa Cruz Biotechnology - Santa Cruz, CA, USA) (TOWBIN et al., 1979). O anticorpo ligado foi detectado por quimioluminescência pelo sistema de fotodocumentação Chemidoc MP (BioRad, CA, USA), como descrito pelo fabricante.

Análise do perfil de ácido graxos hepáticos por HPLC.

Os lipídios dos tecidos e do plasma foram extraídos usando clorofórmio/metanol, uma metodologia adaptada da descrita por Folch et al. (1957). Os extratos lipídicos obtidos do tecido e do plasma foram ressuspensos em 100 µL de metanol e saponificados com 2,0 mL de uma solução alcalina em metanol (hidróxido de sódio 1M em metanol a 90%) (HAMILTON et al., 1992; NISHIYAMA-NARUKE et al., 1998). A solução alcalina foi acidificada até aproximadamente pH 3,0, com ácido clorídrico 1 M. Os ácidos graxos em solução foram extraídos 3 vezes

com 2,0 mL de hexano. O solvente foi evaporado em nitrogênio. Os ácidos graxos foram derivatizados pelo método descrito por Abushufa, Reed e Weinkove (1994) com BMMC (Bromo metil metoxi coumirin) e acetonitrila. Pequenas alíquotas desta solução derivatizada foram injetadas em um sistema HPLC – Varian modelo LC-10A e detector de fluorescência (325 nm de excitação e 395 nm de emissão). Foi utilizada curva padrão contendo os ácidos graxos: Láurico, EPA, alfa-linolênico, DHA, Mirístico, AA, Palmitoleico, Linoleico, Palmítico, Oleico e Esteárico.

Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada no programa estatístico graphpad prism v.5.01 (Graphpad Inc.; La Jolla, USA). As variáveis quantitativas foram descritas e apresentadas em média e erro padrão da média (EPM) quando a distribuição foi simétrica ou em mediana e intervalo interquartil quando foi assimétrica. Para avaliação da distribuição dos dados foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Foi realizado a análise de variância de uma via (one way - ANOVA) seguido de *post hoc* de Tukey para comparação múltipla de valores com distribuição paramétrica, ou Kruskal-wallis seguido de *post hoc* de Dunns quando as variáveis com distribuição assimétrica. Para todos os testes, foi adotado o nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

5.1 Tratamento com dexametasona promove redução da massa corporal, do consumo de ração e alteração da massa de tecidos e órgãos.

A massa corporal inicial dos ratos foi similar em todos os grupos. Após o segundo dia de tratamento, observou-se redução progressiva do peso dos animais tratados com Dex, a qual persistiu com a continuidade do tratamento (Figura 6) em comparação aos ratos controles. O peso do 8º dia de tratamento não foi apresentado por ser influenciado pelo jejum necessário para os testes *in vivo*.

O consumo de ração relativo ($22,2 \pm 0,3$; $20,0 \pm 0,6$; $19,9 \pm 0,6$; $18,4 \pm 0,5$, respectivamente aos grupos CTL, OP, DEX e DOP, $p < 0,05$, $n=10$) e de água ($42,0 \pm 2,1$; $32,2 \pm 1,1$; $31,4 \pm 4,3$; $27,5 \pm 0,8$, respectivamente grupos CTL, OP, DEX e DOP, $p < 0,05$, $n=10$) mostraram redução estatisticamente significativa apenas entre os grupos DEX e CTL. Os dados foram apresentados como consumo de ração (g) ou de água(mL) por kg de p.c. por dia.

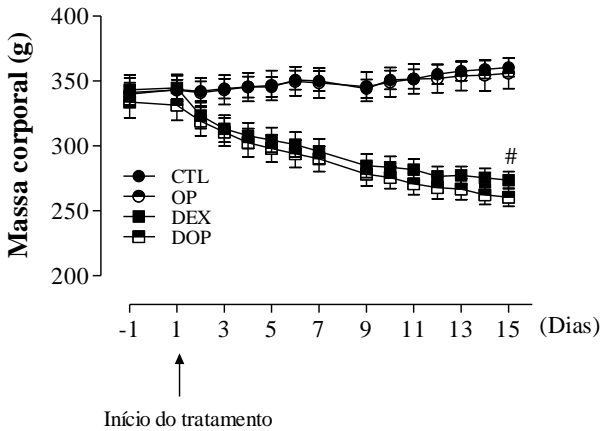


Figura 6- Tratamento com Dex reduz o peso corpóreo em ratos Wistar. Dados apresentados como média \pm EPM. # indica diferença significativa dos ratos tratados com Dex em relação ao seu respectivo controle a partir do 3º dia de tratamento. Foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$, $n = 10$.

A massa relativa do tecido adiposo epididimário e fígado foram significativamente maiores nos ratos tratados com Dex em comparação com o seu respectivo controle. Quanto ao tecido adiposo retroperitoneal e as adrenais foram significativamente reduzidos pelo uso da Dex (Tabela 4). A suplementação com óleo de peixe não influenciou qualquer destes parâmetros.

Tabela 4- Massa de tecidos e órgão (mg/g de p.c.) de ratos CTL e tratados com Dex suplementados ou não com óleo de peixe.

	CTL	OP	DEX	DOP
Tecido adiposo epididimário	10,8 \pm 0,5	10,3 \pm 0,9	15,0 \pm 0,9 [#]	14,6 \pm 1,4 [#]
Tecido adiposo retroperitoneal	13,5 \pm 1,2	14,1 \pm 1,3	7,4 \pm 0,9 [#]	8,5 \pm 1,3 [#]
Fígado	32,7 \pm 0,7	33,6 \pm 1,0	39,0 \pm 1,8 [#]	40,4 \pm 2,4 [#]
Adrenal	0,16 \pm 0,01	0,16 \pm 0,00	0,11 \pm 0,01 [#]	0,11 \pm 0,01 [#]

Valores apresentados em média e erro padrão da média. [#]Diferença estatística significativa entre DEX, DOP e seu respectivo controle. Teste one-way ANOVA seguido de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$, $n = 10$.

5.2 Tratamento com Dex promove aumento na glicemia de jejum e das concentrações de lipídios plasmáticos

Como pode ser observado na tabela 5, o tratamento com Dex promove algumas alterações na homeostase glicêmica e lipídica. As concentrações de glicose sanguínea em jejum aumentaram significativamente nos ratos tratados com Dex em relação ao seu respectivo controle, na metade (8 dias) e no fim do tratamento (17 dias). Os ratos tratados com Dex também apresentaram aumento das concentrações plasmáticas de triacilglicerol na metade do tratamento, porém no fim do tratamento observou-se redução nas concentrações plasmáticas de triacilglicerol no grupo DOP, mostrando efeito da suplementação com óleo de peixe. Ainda em relação ao perfil lipídico, os ratos tratados com Dex apresentaram aumento nas concentrações de CT e fração não HDL-c quando comparados com seus respectivos grupos controles. Contudo, a suplementação com óleo de peixe se mostrou eficaz em reduzir esse parâmetro uma vez que houve uma redução significativa entre o grupo DEX e DOP.

Tabela 5- Parâmetros sanguíneos em ratos CTL e tratados com Dex suplementados ou não com óleo de peixe, após jejum de 12 a 14 horas.

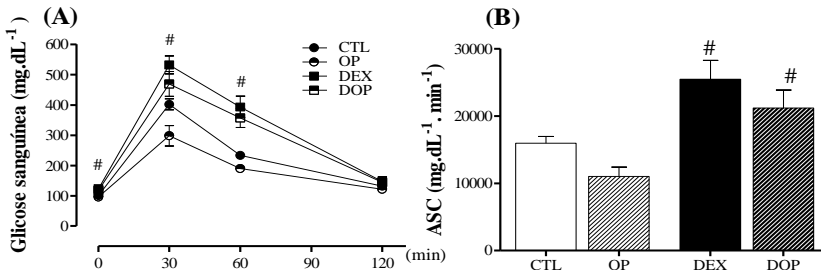
	CTL	OP	DEX	DOP
Glicemia (8° dia)	98,1±2,5	95,2±2,1	115,1±3,7 [#]	113,8±5,5 [#]
Glicemia (16° dia)	96,2±2,7	100,1±1,8	132,3±8,2 [#]	123,4±3,5 [#]
TG (8° dia)	77,1±4,8	96,6±7,5	197,0±11,9 [#]	182,6±10,4 [#]
TG (17° dia)	77,8±5,5	85,2±8,9	162,5±22,0 [#]	108,2±6,4 [*]
CT	130,7±9,4	112,4±6,4	197,0±18,8 [#]	128,1±9,5 [*]
HDL-c	44,3±3,9	40,9±3,2	47,1±7,3	48,4±10,3
Fração não HDL-c	98,6±5,4	80,0±4,1	134,0±14,6 [#]	77,3±6,3 [*]

Valores apresentados em média e erro padrão da média (mg/dL). [#]Diferença estatística significativa entre DEX, DOP e seu respectivo controle, ^{*}Diferença estatística significativa entre DEX e DOP. Teste one-way ANOVA seguido de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$, $n=10$. TG: triacilglicerol, CT: colesterol total, HDL-c: *high density lipoprotein*.

5.3 Alterações na tolerância à glicose, ao piruvato, à insulina e Índice TyG após tratamento com Dex e suplementação com óleo de peixe

O teste de tolerância à glicose no oitavo dia de tratamento revelou incremento nos valores de glicose sanguínea após sobrecarga de glicose intraperitoneal nos minutos 30 e 60 nos grupos DEX e DOP em relação aos grupos CTL e OP (Figura 7A; $p < 0,05$, exceto DEX, $n=8$ e DOP, $n=7$). Os valores da área sob a curva (ASC) da glicose durante o ipGTT foram significativamente maiores nos grupos DEX e DOP em relação aos grupos CTL e OP (Figura 7B; $p < 0,05$, exceto DEX, $n=8$ e DOP, $n=7$). Contudo, no fim do tratamento, o teste de tolerância à glicose não mostrou qualquer diferença significativa entre os grupos (Figura 7C; $p < 0,05$, exceto DOP, $n=6$), o mesmo foi confirmado pela ASC (Figura 7D, CTL $n=10$, DEX $n=9$, OP $n=7$ e DOP, $n=6$), sugerindo assim uma adaptação aos efeitos provocados pela dexametasona em relação à tolerância à glicose.

8º dia



16º dia

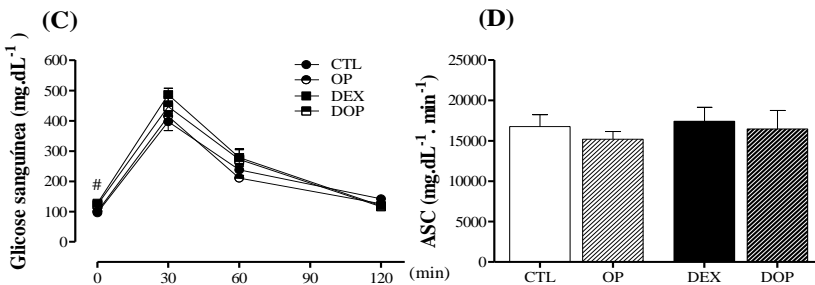


Figura 7- Alterações na tolerância à glicose após tratamento com Dex e suplementação com óleo de peixe.

No oitavo dia de tratamento os ratos tratados com Dex apresentaram redução da tolerância à glicose (A). Os valores obtidos pela ASC confirmam a intolerância à glicose nos ratos tratados com Dex, n=10, exceto DEX, n=8 e DOP, n=7 (B). No fim do tratamento (16º dia), não houve diferença significativa da tolerância à glicose entre os grupos (C). Os valores obtidos pela ASC confirmam que não houve diferença significativa entre os grupos no ipGTT no fim do tratamento (D), CTL n=10, DEX n=9, OP n=7 e DOP, n=6. Dados apresentados como média \pm EPM. # indica diferença significante dos ratos tratados com Dex em relação ao seu respectivo controle. Foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$.

No fim do tratamento (16 dias), o teste de tolerância ao piruvato, que pode está relacionado com a glicogenólise, neoglicogênese, secreção e sensibilidade ao glucagon, secreção de insulina, sensibilidade hepática e periférica a insulina, não apresentou diferença significativa entre os grupos. Porém, os dados sugerem aumento nas concentrações de glicose no grupo DEX após a administração de piruvato em comparação com os outros grupos (Figura 8A e 8B, n=6).

O teste de tolerância à insulina não mostrou diferença significativa da sensibilidade à insulina entre os grupos, como mostrado pela constante de decaimento da glicose (Figura 8C e 8D, n=6). Apesar do teste de tolerância a insulina não discriminar diferenças entre os grupos, o cálculo do índice TyG, que relaciona as concentrações de glicose sanguínea e triacilglicerol plasmático, sugere redução da sensibilidade periférica à insulina nos grupos tratados com Dex tanto do 8º quanto ao final do tratamento (Figura 8E e 8F, n=10).

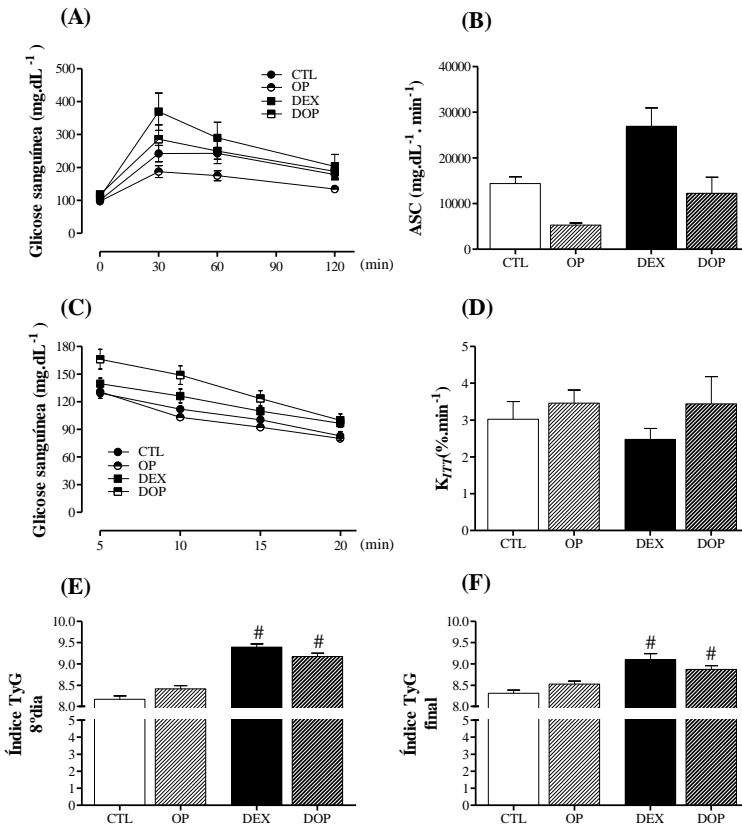


Figura 8-Tolerância ao piruvato, à insulina e índice de sensibilidade TyG em ratos tratados com Dex e suplementados com óleo de peixe após 15 dias de tratamento.

Os ratos tratados com Dex não apresentam aumento significativo nas concentrações de glicose após a administração i.p. de piruvato (A), n=6. Os valores obtidos pela ASC confirmam que não houve o aumento significativo da produção endógena de glicose nos ratos tratados com Dex, houve apenas uma tendência no grupo DEX (B), n=6. O teste de tolerância à insulina mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos (C), n=6. Os valores obtidos pelo K_{ITT} confirmam que não houve diferença significativa entre os grupos em relação à tolerância à insulina (D), n=6. O cálculo do TyG sugere uma redução da sensibilidade periférica à insulina nos grupos tratados com Dex tanto na metade do tratamento (8 dias) (E) como no fim do mesmo (17 dias) (F), n=10. Dados apresentados como média ± EPM. # indica diferença significante em

relação ao seu respectivo controle. Foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$.

5.4 Tratamento com Dex promove alterações no conteúdo de glicogênio e de triacilglicerol hepático

Ao fim do tratamento, o grupo DEX apresentou conteúdo de glicogênio hepático significativamente inferior ao grupo CTL (Figura 9A, $p < 0,05$, $n = 10$). Em relação à concentração de triacilglicerol no fígado, o grupo DEX também mostrou valores significativamente maiores aos do grupo CTL (Figura 9B, $p < 0,05$, $n = 10$).

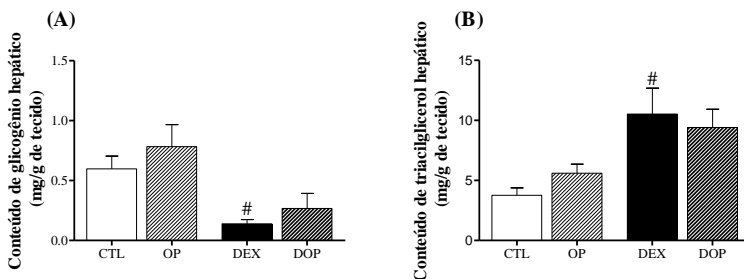


Figura 9- Conteúdo de glicogênio e de triacilglicerol hepático.

Os ratos do grupo DEX apresentaram redução significativa do conteúdo de glicogênio hepático (A) e um aumento nas concentrações de triacilglicerol hepático em comparação com o grupo CTL (B). Dados apresentados como média \pm EPM. # indica diferença significativa em relação ao seu respectivo controle (DEX vs. CTL). Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido de *post hoc* de Dunn, $p < 0,05$, $n = 10$.

5.5 Suplementação com óleo de peixe promove incorporação de EPA e DHA no fígado.

Para avaliar a capacidade de mudança do perfil de ácidos graxos tecidual após 15 dias de suplementação com óleo de peixe, verificamos a incorporação dos ácidos graxos no tecido hepático, e se mostrou elevada nos grupos suplementados com óleo de peixe, assim como mostrado na tabela 6. Esses dados mostram que no fígado além de um aumento de EPA e DHA houve também redução do conjunto AA + ácido palmitoleico.

Tabela 6- Percentual (%) de ácidos graxos no fígado em ratos CTL e tratados com Dex suplementados ou não com óleo de peixe durante 15 dias.

	CTL	OP	DEX	DOP
Mirístico^o	0,0(0,0-0,1)	0,1(0,0-0,2)	0,1(0,0-0,2)	0,1(0,0-0,2)
Láurico	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0
Alfa-linolênico^o	0,1(0,1-0,1)	0,1(0,1-0,2)	0,1(0,0-0,1)	0,2(0,2-0,4) *
EPA	0,3±0,0	1,2±0,2 [‡]	0,3±0,0	1,3±0,1*
DHA	5,2±0,2	7,6±0,5 [‡]	5,6±0,7	10,5±0,8 [#] *
Oleico	5,3±0,4	6,4±0,7	8,8±1,0	9,5±1,4
Esteárico	16,0±1,4	14,9±1,9	13,7±1,4	11,3±1,2
Linoleico	18,9±0,9	21,6±1,0	21,4±1,7	23,2±1,6
Palmítico	20,5±0,9	21,8±1,3	25,0±0,8	27,1±1,9
AA+Palmitoleico	33,4±1,4	26,0±1,1	25,0±1,9 [#]	16,6±2,6 [#] *

Dados apresentados como média ± EPM. Foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$, $n = 7$. ^oFoi utilizado teste Kruskal-Wallis e os dados apresentados como mediana e intervalo interquartil. [#]Diferença estatística significante com o respectivo controle, *Diferença estatística significante entre DEX e DOP, [‡]Diferença estatística significante entre OP e CTL. AA: ácido araquidônico, EPA: ácido eicosapentaenoico, DHA: ácido docosahexaenoico.

5.6 Conteúdo e ativação basal de proteínas envolvidas na sinalização insulínica e conteúdo total de PPAR γ e PGC-1 α

Com base nos dados apresentados até o momento, verificam-se algumas alterações metabólicas provocadas pelo tratamento com DEX, como por exemplo, o aumento nas concentrações plasmáticas de TAG e CT, que por sua vez foi atenuada pela suplementação com óleo de peixe e uma intolerância à glicose na metade do tratamento (8^o dia) com uma possível adaptação do organismo a esse parâmetro uma vez que essa intolerância não é verificada no fim do tratamento (16^o dia). Para buscar explicações mecanísticas envolvidas nos achados acima, investigou-se primeiramente o conteúdo total e fosforilação basal de duas proteínas da via de sinalização insulínica, IRS-1 e Akt. O conteúdo total e relativo da forma fosforilada do IRS-1 fosforilado não apresentou modificação significativa entre os grupos (Figura 10A e B). O resultado obtido com Akt foi semelhante ao IRS1, uma vez que o seu conteúdo total da Akt e a razão p-Akt e Akt não foram significativamente diferentes entre os grupos (Figura 10C e D).

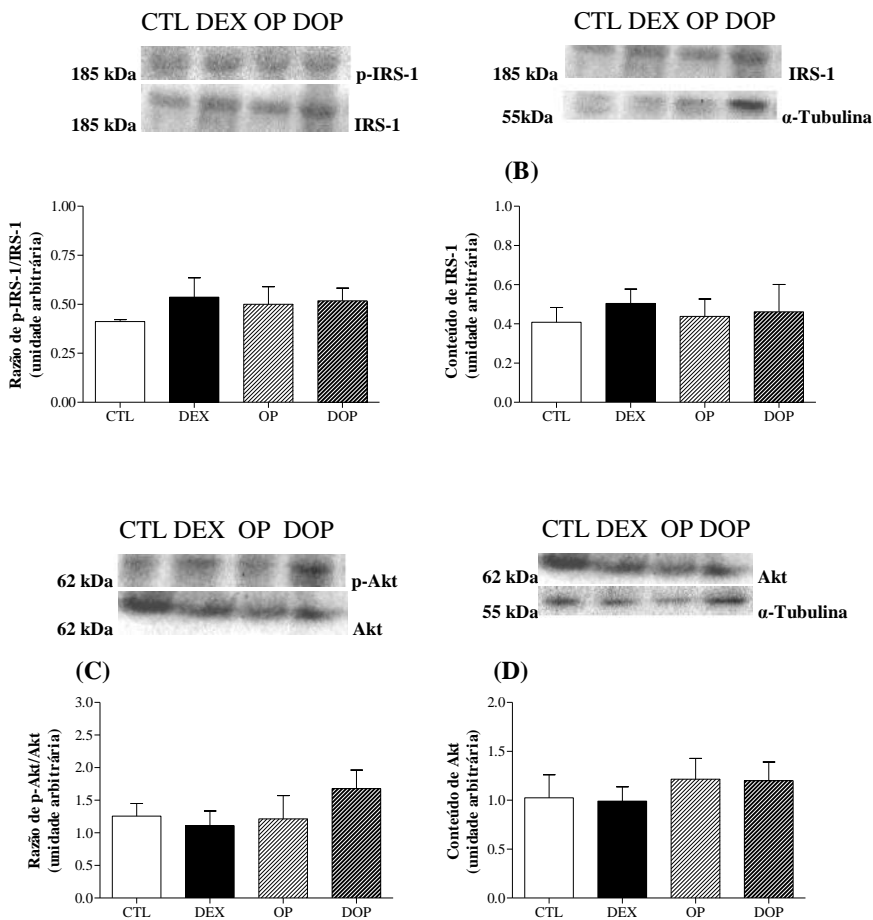


Figura 10- Conteúdo total e fosforilado de IRS1 e Akt em fígado de ratos tratados com DEX não estão diminuídos.

Razão entre IRS-1 fosforilado para o seu conteúdo total (A). Conteúdo total de IRS-1 normalizada pelo controle α -Tubulina (B). Razão Akt fosforilada para seu conteúdo total (C). Conteúdo total de Akt normalizada pelo controle α -Tubulina. Dados apresentados como média \pm EPM. Foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$, $n = 6$.

Para investigar outros potenciais mecanismos relacionados às modificações nos parâmetros da homeostase glicêmica e lipídica observadas, foram avaliadas às expressões de PPAR γ e PGC-1 α em tecido hepático. O conteúdo total de PPAR γ não apresentou diferença significativa entre os grupos. Não houve diferença entre os grupos no conteúdo total de PGC-1 α (Figura 11A e B).

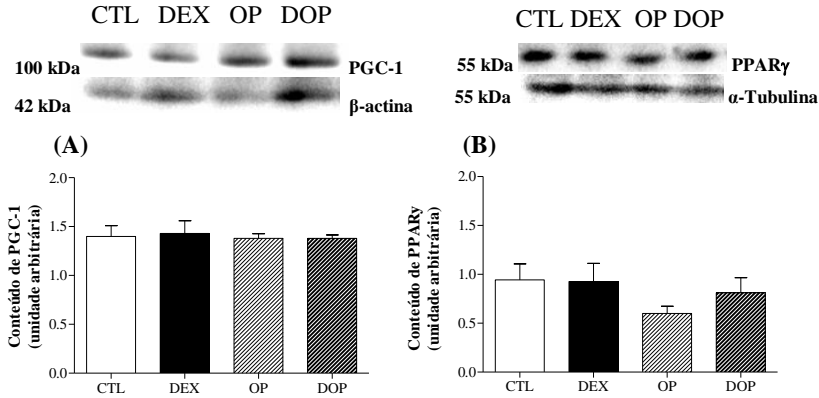


Figura 11-Conteúdo total de PGC-1 (A) e de PPAR γ (B) no fígado de ratos tratados com Dex e suplementados com óleo de peixe. Conteúdo total de PGC-1 normalizada pelo controle β -actina (A). Conteúdo total de PPAR γ normalizada pelo controle α -Tubulina (B). Dados apresentados como média \pm EPM. Foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$, $n = 6$.

DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos que a administração de dexametasona em ratos adultos durante 15 dias promoveu redução no peso corpóreo, atrofia das glândulas suprarrenais, hipofagia, redução do consumo de água, aumento das concentrações de glicose sanguínea, hipertriacilglicerolemia e aumento do conteúdo de triacilglicerol hepático. Esses resultados se assemelham aos dados do nosso grupo e de outros grupos de pesquisa que demonstram essas mesmas alterações em trabalhos anteriores. (SAAD et al., 1993; NOVELLI et al., 1999; BURÉN et al., 2008; RAFACHO et al., 2008; RAFACHO et al., 2011; NUNES et al., 2013; CHIMIN et al., 2014).

Uma das principais alterações apresentadas pelo modelo experimental com injeção de Dex é redução do peso corpóreo ao longo do tratamento. Este parâmetro parece ser resultado de diversas modificações em diferentes eixos endócrinos que regulam ingestão e excreção hídrica (THUNHORST et al., 2007, LIU et al. 2010). Assim como a desidratação, que é um dos principais causadores da redução de massa corporal no modelo, o aumento das concentrações plasmáticas de leptina e de insulina também podem auxiliar nesta perda de massa, uma vez que estes hormônios tem um importante efeito hipofágico (CHIMIN et al., 2014).

Estudos anteriores mostram que o tratamento com Dex promove também intolerância à glicose (SAAD et al., 1993; BURÉN et al., 2008; RAFACHO et al., 2008; CHIMIN et al., 2014), porém no presente estudo mostramos que esta intolerância é transitória uma vez que ela está presente no oitavo dia de tratamento e ausente ao final de 15 dias de aplicação da Dex. Esta acomodação ao tratamento, porém, não foi verificada em parâmetros como a massa corpórea que seguiu diminuindo ao longo do tratamento, assim como na glicemia de jejum e nas concentrações de TAG.

A suplementação oral com óleo de peixe por 15 dias não atenuou as alterações na massa corporal e de tecidos e nos parâmetros glicêmicos provocados pelo tratamento com Dex. O estudo realizado em ratos por Corporeau et al. (2006), com suplementação de óleo de peixe (2,2% da dieta OPe, durante 4 semanas) e tratamento com Dex (1mg/kg de p.c., durante 5 dias) também não demonstrou modificar o aumento da glicemia, provocado pela administração da Dex, se assemelhando assim, com os dados do presente estudo.

O aumento das concentrações sanguíneas de glicose em jejum também é um dos efeitos provocados pelo tratamento com Dex. Esta pode estar associada com o aumento da neoglicogênese, e/ou aumento da glicogenólise hepática sugeridas pela diminuição do conteúdo de glicogênio hepático e pelo teste de tolerância ao piruvato, assim como pelo aumento das concentrações basais de glucagon (BEAUDRY et al., 2013; CUMMINGS et al., 2013; RAFACHO et al., 2014). No estudo realizado por Rizza et al., (1982), utilizando voluntários saudáveis, foi observado que após a infusão de cortisol houve um aumento da produção de glicose em jejum, e mais insulina foi necessária para reduzir essa produção de glicose. Em animais, foi demonstrado que os glicocorticoides induzem expressão de enzimas-chave da gliconeogênese, como a fosfoenolpiruvato carboxilase (JIN et al., 2004),

fato que pode contribuir para aumento da produção endógena de glicose elevando potencialmente a glicemia de jejum.

Os resultados do presente estudo mostraram aumento nas concentrações de triacilglicerol, colesterol total e fração não HDL-c nos ratos que receberam dexametasona. Estes achados também foram vistos em estudos com pacientes tratados com glicocorticoides para asma, doenças cardíacas, transplantes renais e artrite reumatoide (STROHMAYER e KRAKOFF, 2011). Em nosso estudo, esses incrementos foram atenuados pela suplementação com óleo de peixe. Esta atenuação pode ser devida a alterações moleculares promovidas pelos ácidos graxos n-3. Para investigar a potencial participação de proteínas chave na transdução de sinal do hormônio insulina, foi avaliado o conteúdo das proteínas IRS1 e Akt, e a razão de suas formas fosforiladas para o seu conteúdo total no fígado. Contudo, neste modelo não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais. Le Foll et al. (2007) também mostraram que o conteúdo total da proteína Akt não foi alterado após tratamento com Dex (1mg/kg p.c. durante 5 dias). No entanto, quando existe resistência à insulina, estudos mostram redução do conteúdo total e fosforilado de IRS-1 e Akt em tecido adiposo com tratamento de Dex (CAPERUTO et al., 2006) e redução do conteúdo total e fosforilado em serina/treonina da Akt estimulado por insulina em músculo esquelético (BURÉN et al., 2008).

Alguns fármacos utilizados no tratamento do diabetes tipo 2, como as tiazolidinedionas, agem promovendo a ativação do PPAR γ , que por sua vez proporciona redução da produção hepática de glicose, maior sensibilidade à insulina em músculo esquelético, além de inibir a lipólise periférica em adipócitos, reduz a concentração de AGLs no plasma e a adiposidade visceral, resultando em melhora de parâmetros glicêmicos e metabólicos nesses pacientes (Kahn et al., 2006). Em modelos animais, já está também demonstrado que a regulação da homeostase glicêmica e lipídica depende de vias de transdução de sinal envolvendo PPAR γ , após modulação farmacológica das mesmas (Memon et al., 2000; Way et al. 2011). Nosso estudo mostrou que a suplementação com óleo de peixe durante 15 dias promoveu um aumento na incorporação de EPA e DHA no fígado. Estes dados corroboram os do estudo realizado por Le Foll et al. (2007) com ratos suplementados com 4,9% de óleo de peixe na dieta durante 4 semanas e tratados com Dex que mostrou uma maior incorporação de AGPI n-3 em músculo, tecido adiposo e fígado. A incorporação de AGPI pode acarretar em potencial aumento da atividade dos PPAR, que por sua vez, controlam a expressão de genes envolvidos

no metabolismo de glicose, lipídios, e adipogênese (SIRTORI; GALLI, 2002; LOMBARDO; CHICCO, 2006).

Na tentativa de investigar se os efeitos metabólicos proporcionados pela suplementação com OPe nos parâmetros dos ratos que receberam Dex envolvem modificação do conteúdo total de PPAR γ , esta variável foi avaliada em tecido hepático dos animais. Entretanto, no presente estudo, foi observado que o conteúdo de PPAR γ no fígado não foi diferente entre os grupos, independente da aplicação de Dex ou suplementação com OPe. Contudo, é importante ressaltar que mesmo que conteúdo tecidual de PPAR γ seja similar, sua atividade pode estar modificada nos diferentes grupos. Assim, sugere-se que a atividade do PPAR γ seja investigada em trabalhos posteriores.

Outra proteína envolvida na manutenção da homeostase glicêmica e lipídica é a PGC-1 α , pois é considerada uma potente reguladora da atividade do PPAR γ (MEDINA-GOMEZ et al., 2007). Diante disto, avaliamos a proteína PGC-1 α , a fim de relacionarmos sua expressão com a atenuação das concentrações de TAG, CT e fração não HDL-c nos ratos tratados com DEX, porém esta também não se apresentou alterada na comparação entre os grupos. Com base nos dados do presente estudo, pode-se sugerir que os efeitos positivos relacionados com o metabolismo lipídico no modelo utilizado (ex: menores concentrações plasmáticas de TAG e CT em jejum) promovidos pelo OPe podem depender de modulação da atividade dos PPAR γ e da PGC-1 α e não do seu conteúdo.

Para elucidação mais precisa dos mecanismos envolvidos nos efeitos positivos provocados pela suplementação com óleo de peixe, futuros estudos devem focar também na investigação do conteúdo e da ativação das proteínas IRS-1 e Akt em tecidos periféricos (ex: músculo esquelético e tecido adiposo). Sugere-se também que outras proteínas envolvidas no metabolismo lipídico (lipase hormônio sensível e lipase lipoprotéica) e glicêmico (fosfoenolpiruvato carboxilase e glicogênio sintetase) e o fator de transcrição PPAR α sejam investigadas, uma vez que a regulação do metabolismo da glicose e lipídeos é dinâmica e está associada a diversas vias de transdução de sinal.

Em conjunto, o presente estudo demonstrou que o incremento de concentrações de lipídeos plasmáticos em jejum (triacilglicerol e colesterol total), provocada por injeções de Dex por 15 dias, foi atenuado pela suplementação concomitante com óleo de peixe (1 g/kg de p.c.). O mesmo não ocorreu com o aumento da glicemia de jejum promovida pela Dex. Foi possível também concluir que modificações

esperadas para este modelo (ex: intolerância à glicose) são transitórias e reversíveis mesmo com os animais ainda em tratamento farmacológico independente da suplementação com OPe. Sendo assim, o presente estudo sugere que a indicação da suplementação com óleo de peixe pode auxiliar no controle das alterações na homeostase lipídica durante o tratamento com Dex, mas não as sobre a homeostase da glicose.

REFERÊNCIAS

Abell LL, Levy BB, Brodie BB, Kendall FE. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J. Biol. Chem.* 1952; 195: 357-366.

Abushufa R, Reed P, Weinkove C. Fatty acids in erythrocytes measured by isocratic HPLC. *Clin Chemistry.* 1994; 40(9):1707-1712.

Beaudry JL, D'souza AM, Teich T, Tsushima R, Riddell MC. Exogenous glucocorticoids and a high-fat diet cause severe hyperglycemia and hyperinsulinemia and limit glucose responsiveness in young male Sprague-Dawley rats. *Endocrinology.* 2013; 154(9): 3197-3208.

Bergman R, Finegood D, Ader M: Assessment of insulin sensitivity in vivo. *Endocrinol Rev.* 1985; 6: 45–86.

Binnert C, Ruchat S, Nicod N, Tappy L. Dexamethasone induced insulin resistance shows no gender difference in healthy humans. *Diabetes Metab.* 2004; 30(4): 321-326.

Bonora E, et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989; 68(2): 374-8.

Bucolo, G.; David, H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes *Clin. Chem.* 1973; 19: 476-482.

Burén J, Lai YC, Lundgren M, Eriksson JW, Jensen J. Insulin action and signalling in fat and muscle from dexamethasone-treated rats. *Arch Biochem Biophys.* 2008; 474(1): 91-101.

Burstein M, Scholnick HR, Morfin R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J. Lipid Res.* 1970; 11: 583-595.

Calder PC. Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acid. *J. Nutr.* 2012; 142(3): 592S-599S.

Chimin P, Farias TSM, Torres-Leal FL, Bolsoni-Lopes A, Campaña AB, Andreotti S, Lima FB. Chronic glucocorticoid treatment enhances lipogenic activity in visceral adipocytes of male Wistar rats. *Acta Physiol.* 2014; 211(2): 409-420.

Corporeau C, Foll CL, Taouis M, Gouygou JP, Bergé JP, Delarue J. Adipose tissue compensates for defect of phosphatidylinositol 3'-kinase induced in liver and muscle by dietary fish oil in fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006; 290(1): E78-E86.

Cummings BP, Bremer AA, Kieffer TJ, D'Alessio D, Havel PJ. Investigation of the mechanisms contributing to the compensatory increase in insulin secretion during dexamethasone-induced insulin resistance in rhesus macaques. *J Endocrinol.* 2013; 216(2): 207-215.

Czock D, Keller F, Rasche FM, Häussler U. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin. Pharmacokinet.* 2005; 44(1): 61-98.

Debons AF, Zurek LD, Tse CS, Abrahamsen S. Central nervous system control of hyperphagia in hypothalamic obesity: dependence on adrenal glucocorticoids. *Endocrinology.* 1986; 118(4): 1678-1681.

Ferreira DS, Amaral FG, Mesquita CC, Barbosa AP, Lellis-Santos C, Turati AO, et al. Maternal melatonin programs the daily pattern of energy metabolism in adult offspring. *PLoS One.* 2012; 7:e38795.

Folch J, Lees M, Stanley GHS. Simple method for the isolation and purification total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957; 226(1): 497-509.

Le Foll C, Corporeau C, Le Guen V, Gouygou JP, Bergé JP, Delarue J. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids dissociate phosphorylation of Akt from phosphatidylinositol 3-kinase activity in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 292(4): E1223-E1230.

Liu C, et al. Inhibition of Dehydration-Induced Water Intake by Glucocorticoids Is Associated with Activation of Hypothalamic Natriuretic Peptide Receptor-A in Rat. *PloS one.* 2010; 5(12): e15607.

Lo S, Russel JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol.* 1970; 28: 234–236.

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

Hamilton RJ, Hamilton S. Lipid analysis – a practical approach, Chapter 2. IRL Press at Oxford University Press. 1992; 54.

Hirabara SM, Folador A, Fiamoncini J, Lambertucci RH, Rodrigues CF Jr, Rocha MS, et al. Fish oil supplementation for two generations increases insulin sensitivity in rats. *J Nutr Biochem.* 2012; 24(6): 1136-45.

Holness MJ, Sugden MC. Dexamethasone during late gestation exacerbates peripheral insulin resistance and selectively targets glucose-sensitive functions in beta cell and liver. *Endocrinology.* 2001; 142(9): 3742-3748.

Jin JY, DuBois DC, Almon RR, Jusko WJ. Receptor/gene-mediated pharmacodynamics effects of methylprednisolone on phosphoenolpyruvate carboxykinase regulation in rat liver. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309(1):328–39.

Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, Herman WH, Holman RR, Jones NP, et al. Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *N Engl J Med.* 2006; 355(23): 2427-43.

Korach-André M, Gao J, Gounarides JS, Deacon R, Islam A, Laurent D. Relationship between visceral adiposity and intramyocellular lipid content in two rat models of insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005; 288(1): E106–E116.

Krssak M, Falk Petersen K, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, et al. Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. *Diabetologia.* 1999; 42(1): 113-6.

Kris-etherton PM, Harris WS, Appel LJ. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation.* 2002; 106(21): 2747-57.

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

Maranzano E, Feyer PCh, Molassiotis A, Rossi R, Clark-Snow RA, Olver I, et al. Evidence based recommendations for the use of antiemetics in radiotherapy. *Radiother Oncol.* 2005; 76(3): 227-233.

Medina-Gomez G, Gray S, Vidal-Puig A. Adipogenesis and lipotoxicity: role of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and PPAR γ coactivator-1 (PGC1). *Public Health Nutrition.* 2007, 10(10A), 1132–1137.

Nagajyothi F, Kuliawat R, Kusminski CM, Machado FS, Desruisseaux MS, Zhao D, et al. Alterations in glucose homeostasis in a murine model of Chagas disease. *Am J Pathol.* 2013; 182: 886-894.

Nishiyama-Narukea A, Souza JA, Canelósa M, Curi R. HPLC determination of underivatized fatty acids saponified at 37°C analysis of fatty acids in oils and tissues. *Analytical Letters.* 1998; 31(14): 2565-2576.

Novelli M, De Tata V, Bombara M, Lorenzini A, Masini M, Pollera M, et al. Insufficient adaptive capability of pancreatic endocrine function in dexamethasone-treated ageing rats. *J. Endocrinol.* 1999; 162(3): 425-432.

Nunes EA, Gonçalves-Neto LM, Ferreira FBD, Santos C, Fernandes LC, Boschero AC, Calder PC, Rafacho A. Glucose intolerance induced by glucocorticoid excess is further impaired by co-administration with β -hydroxy- β -methylbutyrate in rats. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2013; 38(11): 1137-1146.

Oh DY, et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*. 2010; 142:687-98.

Rafacho A, Giozzet VA, Boschero AC, Bosqueiro JR. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. *Pancreas*. 2008; 36(3): 284–293.

Rafacho A, Cestari TM, Taboga SR, Boschero AC, Bosqueiro JR. High doses of dexamethasone induce increased beta-cell proliferation in pancreatic rat islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009; 296(4): E681–E689.

Rafacho A, Quallio S, Ribeiro DL, Taboga SR, Paula FM, Boschero AC, Bosqueiro JR. The adaptive compensations in endocrine pancreas from glucocorticoid-treated rats are reversible after interruption of treatment. *Acta Physiol*. 2010; 200(3): 3543-3554.

Rafacho A, Abrantes JL, Ribeiro DL, Paula FM, Pinto ME, Boschero AC, Bosqueiro JR. Morphofunctional Alterations in Endocrine Pancreas of Short- and Long-term Dexamethasone-treated Rats. *Horm Metab Res*. 2011; 43(4): 275- 281.

Rafacho A, Gonçalves-Neto LM, Ferreira FBD, Protzek AOP, Boschero AC, Nunes EA, Zoccal DB. Glucose homeostasis in rats exposed to acute intermittent hypoxia. *Acta Physiol* 2013; 209: 77–89.

Rafacho A, Gonçalves-Neto LM, Santos-Silva JC, Alonso-Magdalena P, Merino B, et al. Pancreatic Alpha-Cell Dysfunction Contributes to the Disruption of Glucose Homeostasis and Compensatory Insulin Hypersecretion in Glucocorticoid-Treated Rats. *PLoS ONE*. 2014; 9(4): e93531.

Rizza RA, Mandarino LJ, Gerich JE. Cortisol-induced insulin resistance in man: impaired suppression of glucose-production and stimulation of glucose utilization due to a postreceptor defect of insulin action. *J Clin Endocrinol Metab.* 1982; 54(1):131–8.

Saad MJ, Folli F, Kahn JA, Kahn CR. Modulation of Insulin Receptor, Insulin Receptor Substrate-1, and Phosphatidylinositol 3-Kinase in Liver and Muscle of Dexamethasone-treated Rats. *Clin Invest.* 1993; 92(4): 2065-2072.

Schacke H, Docke WD, Asadullah, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther.* 2002; 96(1): 23-43.

Shapiro AL, Vinuela E, Maizel Jr JV. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 1967;28: 815-20.

Severino C, Brizzi P, Solinas A, Secchi G, Maioli M, Tonolo G. Low-dose dexamethasone in the rat: a model to study insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 283(2): E367-73.

Sirtori CR, Galli C. N-3 fatty acids and diabetes. *Biomed Pharmacother.* 2002; 56(8): 397-406.

Stojanovska L, Rosella G, Proietto J. Evolution of dexamethasone-induced insulin resistance in rats. *Am J Physiol.* 1990; 258: E748–E756.

Storlien LH, Kriketos AD, Jenkins AB, Baur LA, Pan DA, Tapsell LC, Calvert GD. Dietary fats and insulin action. *Diabetologia.* 1996; 39(6):621-31.

Storlien LH, Higgins JA, Thomas TC, Brown MA, Wang HQ, Huang XF, Else PL. Diet composition and insulin action in animal models. *Br J Nutr.* 2000; 83(Suppl 1): S85-90.

Strohmayr E, Krakoff L. Glucocorticoids and cardiovascular risk factors. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2011; 40:409–17.

Taouis M, Dagou C, Ster C, Durand G, Pinault M, Delarue J. N-3 Polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 282(3): E664-E671.

Thunhorst RL, Beltz TG, Johnson AK. Glucocorticoids increase salt appetite by promoting water and sodium excretion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 293(3):1444-1451.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979; 76(9): 4350-4.

Trinh KY, O'Doherty RM, Anderson P, Lange AJ, Newgard CB. Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats. *J Biol Chem.* 1998; 273(47):31615-20.

Zierath JR, Houseknecht KL, Gnudi L, Kahn BB. High-fat feeding impairs insulin-stimulated GLUT4 recruitment via an early insulin-signaling defect. *Diabetes.* 1997; 46(2):215-23.

Way JM, Harrington WW, Brown KK, Gottschalk WK, Sundseth SS, Mansfield TA, Ramachandran RK, Willson TM, Kliewer SA. Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinology.* 2001; 142 :1269–1277.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Alterações metabólicas como, redução do peso corpóreo, da ingestão alimentar, do conteúdo de glicogênio, aumento das concentrações de glicose sanguínea e aumento da gordura hepática após 15 dias de tratamento com Dex não foram atenuadas pela suplementação com óleo de peixe. No entanto, o aumento nas concentrações plasmáticas de triacilglicerol, colesterol total e fração não HDL-c nos ratos tratados com Dex foi menor pela suplementação com óleo de peixe, sugerindo um efeito protetor, potencialmente dos ácidos graxos n-3, sobre alterações no metabolismo lipídico provocadas pelo tratamento com Dex. Este efeito pode estar relacionado com o aumento na incorporação de EPA e DHA no fígado após a suplementação com óleo de peixe.
- As modificações nas concentrações de lipídios plasmáticos promovidas pelo OP nos animais tratados com Dex parecem não depender do conteúdo hepático das proteínas IRS-1, Akt, PPAR γ e PGC-1 α uma vez que estas não estavam alteradas após 15 dias de tratamento com Dex.
- A suplementação com OPe não preveniu ou atenuou de forma significativa as modificações em parâmetros relacionados à homeostase glicêmica em qualquer dos momentos investigados nesta proposta (8^o e após 15 dias de injeções de Dex). É importante ressaltar que a intolerância à glicose nos ratos tratados com Dex observada no 8^o dia, deixou de estar presente após 15 dias de injeções. Sugerindo assim que algumas das modificações causadas pela Dex são transitórias. Esta é informação relevante para trabalhos futuros que se baseiem neste modelo.
- Diante disso, nossos dados sugerem que a suplementação com óleo de peixe pode ser relevante, uma vez que esta pode auxiliar principalmente no controle das alterações na homeostase lipídica durante o tratamento com Dex.

REFERÊNCIAS

ABELL, L.L.; LEVY, B.B.; BRODIE, B.B.; KENDALL, F.E. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. **J. Biol. Chem.** v.195, p.357-366, 1952.

ABUSHUFA, R.; REED, P.; WEINKOVE, C. Fatty acids in erythrocytes measured by isocratic HPLC. **Clin. Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1707-1712, 1994.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**, 3ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

ANDREWS, R.C.; WALKER, B.R. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. **Clin. Science**, v.96, p.513-523, 1999.

ARTEMBURN, L.M.; HALL, E.B.; OKEN, H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 83, p. 1467S-1476S, 2006.

ASCHROFT, F.M.; ASCHROFT, S.J.H. **Mechanisms of insulin secretion**. In: Insulin. Oxford: Oxford University Press. p. 97-150, 1992.

AVRAMOGLU, K.R.; BASCIANO, H.; ADELI, K. Lipid and a lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. **Clin. Chimica Acta**, v. 368, p.1-19, 2006.

BECKER, T.C. et al. Overexpression of hexokinase I in isolated islets of Langerhans via recombinant adenovirus. Enhancement of glucose metabolism and insulin secretion at basal but not stimulatory glucose levels. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 21234-21238, 1994.

BELZUNG, F.; RACLOT, T.; GROSCOLAS, R. Fish oil n-3 fatty acids selectively limit the hypertrophy of abdominal fat depots in growing rats fed high-fat diets. **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. R1111-R1118, 1993.

BERGMAN R, FINEGOOD D, ADER M. Assessment of insulin sensitivity in vivo. **Endocrinol Rev.** v. 6, p. 45–86, 1985.

BINNERT, C. et al. Dexamethasone induced insulin resistance shows no gender difference in healthy humans. **Diabetes Metab.**, v.30, p.321-326, 2004.

BONORA, E. et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J Clin Endocrinol Metab**, v.68, n.2, Feb, p.374-8. 1989.

BORKMAN, M. et al. The relationship between insulin sensitivity and fatty acid composition of skeletal-muscle phospholipids. **New Engl. J. Med.**, v.328, p.238-244, 1993.

BOSCHERO, A.C. Acoplamento da estimulação-secreção de insulina pelas células β pancreáticas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 40, n. 3, 1996.

BUCOLO, G.; DAVID, H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes Clin. Chem. v.19, p.476-482, 1973.

BURÉN, J. et al. Dexamethasone impairs insulin signalling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 146, n. 3, p. 419-429, 2002.

BURÉN, J. et al. Insulin action and signalling in fat and muscle from dexamethasone-treated rats. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 474, n. 1, p. 91-101, 2008.

BURSTEIN, M.; SCHOLNICK, H. R.; MORFIN, R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. **J. Lipid Res.** v.11, p.583-595, 1970.

CALDER, P.C. N-3 polynsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fish tale? **Nutr. Research**, v. 21, p. 309-341, 2001.

- CALDER, P.C. . Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **Biochem. Society Transactions**, v.33, n. 2, p. 424-427, 2005.
- CALDER, P.C. Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acid. **J. Nutr.**, v. 142, n. 3, p. 592S-599S, 2012.
- CARVALHEIRA, J.B.C; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de sinalização da insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.46, p.419-25, 2002.
- CEFALU, W.T. Insulin resistance: cellular and clinical concepts. **Exp. Biol.**, v.226, p.13-26. 2001.
- CORPOREAU, C. et al. Adipose tissue compensates for defect of phosphatidylinositol 3'-kinase induced in liver and muscle by dietary fish oil in fed rats. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 290, p. E78–E86, 2006.
- CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a gordura**. Barueri - SP: Manole. 2002
- CZOCK, D. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. **Clin. Pharmacokinet**, v. 44, p.61-98, 2005.
- DEBONS, A.F. et al. Central nervous system control of hyperphagia in hypothalamic obesity: dependence on adrenal glucocorticoids. **Endocrinology**, v.118, p.1678–1681, 1986.
- DELAUNAY, et al. Pancreatic b-cells are important targets for the diabetogenic effects of glucocorticoids. **J. Clin. Invest.**, v.8, p.2094-2098, 1997.
- DELARUE, et al. Interaction of fish oil and a glucocorticoid on metabolic responses to an oral glucose load in healthy human subjects. **British Journal of Nutrition.**, v.95, p.267-272, 2006.
- DIMITRIADIS, G. et al. Effect of glucocorticoids excess on the sensitivity of glucose transport and metabolism to insulin in rat skeletal muscle. **Biochem. J. Portland.**, v. 321, p. 707-712, 1997.

DOMMELS, Y.E.M. et al. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and colorectal carcinogenesis: results from cultured colon cells, animal models and human studies. **Env. Tox. Pharma.**, v. 12, p. 233-244, 2002.

EL-ASSAD, W. et al. Saturated Fatty Acids Synergize with Elevated Glucose to Cause Pancreatic β -Cell Death. **Endocrinology**, v.144, p.4154-4163, 2003.

FERREIRA DS, et al. Maternal melatonin programs the daily pattern of energy metabolism in adult offspring. **PLoS One**. v. 7, p. e38795, 2012.

FRANCO-COLIN, M. et al. Effects of long-term high-sucrose and dexamethasone on fat depots, liver fat, and lipid fuel fluxes through the retroperitoneal adipose tissue splanchnic area in rats. **Metabolism**, v.49, p.1289-1294, 2000.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. Simple method for the isolation and purification total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 226, p. 497-509, 1957.

HABER, E. P. et al. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.45, n.3, p. 219-227, 2001.

HAMILTON, S. et al. **Lipid analysis – a practical approach**, Chapter 2. IRL Press at Oxford University Press, p.54, 1992.

HIRABARA, S.M. et al. Fish oil supplementation for two generations increases insulin sensitivity in rats. **J. Nutr. Biochem.**, 2012.

HOLNESS, M.J.; SUGDEN, M.C. Dexamethasone during late gestation exacerbates peripheral insulin resistance and selectively targets glucose-sensitive functions in beta cell and liver. **Endocrinology**. v. 142, n. 9, p. 3742-3748, 2001.

HOLNESS, M.J. et al. Interactive influences of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation and glucocorticoids on pancreatic

beta cell compensation in insulin resistance induced by dietary saturated fat in the rat. **Diabetologia**. v. 48, n. 10, p. 2062-2068, 2005.

HOWARD, B. V. Insulin resistance and lipid metabolism. **Am. J. Cardiol.**, v. 84, n. 1A, p. 28-32, 1999.

HULBERT, A.J. et al. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. **Biol. Reviews**, v.80, p.155-169, 2005.

KAHN, S.E. et al. Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. **N Engl J Med**. v. 355, n. 23, p. 2427-43, 2006.

KORACH-ANDRE, M. et al. Relationship between visceral adiposity and intramyocellular lipid content in two rat models of insulin resistance. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.288, p.E106–E116, 2005.

KRSSAK, M.; et al. Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. **Diabetologia**, v.42, n.1, p.113-6. 1999.

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

KROHN, T.C.; FARLOV, H.; HANSEN, A.K. The Effects of Housing on Food and Water Consumption in Da-Rats. **Scand. J. Lab. Anim. Sci.** v. 38, n. 1, 2011.

JÉQUIER, E.; TAPPY, L. Regulation of body weight in humans. **Phys. Rev.**, v. 79, n. 2, p. 451-480, 1999.

JIANG, G.; ZHANG, B. B. Glucagon and regulation of glucagon metabolism. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.284, p.E671-E678, 2003.

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

Le FOLL, et al. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids dissociate phosphorylation of Akt from phosphatidylinositol 3-kinase activity in

rats. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.292, p.E1223–E1230, 2007.

LO, S.; RUSSEL, J.C.; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. **J Appl Physiol**, v. 28, p. 234–236, 1970.

LOMBARDO, Y.B.; CHICCO, A.G. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. **J. Nutr. Biochem.**, v.17, n.1, p.1-13, 2006.

MALAISSSE, W.J. et al. Insulin release: the fuel hypothesis. **Metabolism**. V. 28, p.373-86, 1979.

MARANZANO, E. et al. Evidencebased recommendations for the use of antiemetics in radiotherapy. **Radiother Oncol.**, v.76, p.227-233, 2005.

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

MASCARO, C.; et al. Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase i gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 15, p. 8560-8563, 1998.

MEDINA-GOMEZ, G.; GRAY, S.; VIDAL-PUIG A. Adipogenesis and lipotoxicity: role of peroxisome proliferatoractivated receptor g (PPARg) and PPARgcoactivator-1 (PGC1). **Public Health Nutrition.**, v. 10, n. 10A, p. 1132–1137. 2007.

MELISSA, K.C.; EHRMANN, D.A.; POLONSKY, KS. Interactions between insulin resistance and insulin secretion in the development of glucose intolerance. **The Journal of Clinical Investigation.**, v. 106, n. 3, p. 329-33, 2000.

NAGAJYOTHI F, et al. Alterations in glucose homeostasis in a murine model of Chagas disease. **Am J Pathol.** v. 182, p. 886-894, 2013.

NISHIYAMA-NARUKE, A. et al. HPLC determination of underivatized fatty acids saponified at 37°C analysis of fatty acids in oils and tissues. **Analytical Letters**, v. 31, n. 14, p. 2565-2576, 1998.

NOVELLI, M. et al. Insufficient adaptive capability of pancreatic endocrine function in dexamethasone-treated ageing rats. **J. Endocrinol.**, v. 162, n. 3, p. 425-432, 1999.

NUNES, E.A. et al. Glucose intolerance induced by glucocorticoid excess is further impaired by co-administration with β -hydroxy- β -methylbutyrate in rats. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.**, v.38, p.1137-1146, 2013.

OH, D.Y. et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. **Cell.** v. 142, p. 687-98, 2010.

OLEFSKY, J.M. et al. The effects of acute and chronic dexamethasone administration on insulin binding to isolated rat hepatocytes and adipocytes. **Metabolism.** v. 24, n. 4, p. 517-527, 1975.

PATTI, M.E.; KAHN, C.R. The insulin receptor: a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.**, v.9, p.89-109, 1998

PANAROTTO, D. et al. Insulin resistance affects the regulation of lipoprotein lipase in the postprandial period and in an adipose tissue specific manner. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 32, n. 2, p. 84-92, 2002.

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

PRENTKI, M. et al. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. **Diabetes**, v.51, p.S405–S413, 2002.

PRELOVSEK, O. et al. High dexamethasone concentration prevents stimulatory effects of TNF-alpha and LPS on IL-6 secretion from the precursors of human muscle regeneration. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 291, p.R1651–R1656, 2006.

RAFACHO, A. et al. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. **Pancreas**, v.36, p.284–293, 2008a.

RAFACHO, A. et al. Increased pancreatic islet mass is accompanied by activation of the insulin receptor substrate-2/serine-threonine kinase pathway and augmented cyclin D2 protein levels in insulin-resistant rats. **Int. J. Exp. Path.**, v.89, p.264-275, 2008b.

RAFACHO, A. et al. High doses of dexamethasone induce increased beta-cell proliferation in pancreatic rat islets. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 296, p.E681–E689, 2009.

RAFACHO, A. et al. The adaptive compensations in endocrine pancreas from glucocorticoid-treated rats are reversible after interruption of treatment. **Acta Physiol.**, v. 200, p.3543-3554, 2010.

RAFACHO, A.; BOSCHERO, A.C. e ORTSÄTER, H. Functional and molecular aspects of glucocorticoids in the endocrine pancreas and glucose homeostasis. In: Dr. Sameh Magdeldin. (Org.). State of the Art of Therapeutic Endocrinology. -ed.Rijeka: InTech, p. 121-152, 2012.

RAFACHO A, et al. Glucose homoeostasis in rats exposed to acute intermittent hypoxia. **Acta Physiol.**, v. 209, p.77–89, 2013.

RANDLE, P. J.; GARLAND, P. B.; HALES, C. N.; NEWSHOLME, E. A. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, v.1, p. 785-789, 1963.

ROSEN, E.; SPIEGELMAN, B. M. Ppargamma: A nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 41, p. 37731-37734, 2001.

RUXTON, S.H.C. et al. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. **J. Hum. Nutr. Diet.**, v.17, p 449-459, 2004

RUZZIN, J.; WAGMAN, A.S.; JENSEN, J. Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signalling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor. **Diabetologia**, v. 48, p.2119–2130, 2005.

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

SAKLATVALA, J. Glucocorticoids: do we know how they work? **Arthritis Res.**, v.4, p.146-150, 2002.

SCHACKE, H.; DOCKE, W.D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacol. Ther.**, v. 96, n. 1, p. 23-43, 2002.

SHAPIRO, A.L.; VINUELA, E.; MAIZEL, Jr. J.V. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.28, p. 815-20, 1967.

SHOONJANS, K.; STAELS, B.; AUWERX, J. The peroxisome proliferator activated receptors (ppars) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1302, n. 2, p. 93-109, 1996.

SEVERINO, C. et al. Low-dose dexamethasone in the rat: a model to study insulin resistance. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.283, n.2, p. E367-73, 2002.

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

SLAVIN, B.G; ONG, J.M.; KERN, P.A. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. **J. Lipid. Res.**, Bethesda, v.35, p.1535-1541, 1994.

STOJANOVSKA, L., ROSELLA, G.; PROIETTO, J. Evolution of dexamethasone-induced insulin resistance in rats. **Am. J. Physiol.**, v.258, p.E748-E756, 1990.

STENE, L.C.; JONER, G. Norwegian Childhood Diabetes Study Group. Use of cod liver oil during the first year of life is associated with lower risk of childhood-onset type 1 diabetes: a large, population-based, case-control study. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.78, p.1128-1134, 2003.

STORLIEN, L.H. et al. Dietary fats and insulin action. **Diabetologia**, v.39, n.6, p.621-31. 1996.

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

TAOUI, M. et al. N-3 Polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 282, p.E664-E671, 2002.

TAPIERO, H. et al. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biom. Pharmacol.**, v.56, p. 215-222, 2002.

TANAKA, H. et al. Glucocorticoid receptor and inhibition of 3-O-methyl-D-glucose uptake by glucocorticoids in peripheral blood leukocytes from normal humans: correlation between receptor level and hormone effect in vitro. **Acta Endocrinol. Bucharest**, v. 126, p. 29-36, 1992.

THOMPSON, et al. Effects of individual fatty acids on glucose uptake and glycogen synthesis in soleus muscle in vitro. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.279, p.E577-E584, 2000.

THORENS, B. et al. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and β -pancreatic islet cells. **Cell.**, v.55, p. 281-90, 1988.

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

TRINH, K.Y. et al. Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats. **J Biol Chem.**, v.273, n.47, p. 31615-20, 1998.

YAMAZAKI, R.K. et al. Low fish oil intake improves insulin sensitivity, lipid profile and muscle metabolism on insulin resistant MSG-obese rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 66, 2011.

VESSBY, B. Dietary fat and insulin action in humans. **Br. J. Nutr.**, v.83, supl.1, p.S91-S96, 2000.

XAVIER, H. T. et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq. Bras. Cardiol.** [online]. 2013, vol.101, n.4, supl.1, pp. 1-20.

ZIERATH, J.R. et al. High-fat feeding impairs insulin-stimulated GLUT4 recruitment via an early insulin-signaling defect. **Diabetes**, v.46, n.2, p.215-23, 1997.

WHITE, M.F.; KAHN, C.R. Insulin signaling system. **J Biol Chem**, v. 269, p.1-4, 1994.

ANEXO A- Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC

<http://notes.ufsc.br/aplic/ceua.nsf/48fc5b9fe9931c868325702e0075533>

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00782

Título

METODOLOGIAS UTILIZADAS NO LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÃO DE DOENÇAS CRÔNICAS – LIDoC / ABORDAGENS ENDÓCRINAS E

METABÓLICAS

Data de Entrada

07/05/2012

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

01/06/2012

Considerações

Ofício nº 47/CEUA/PRPE/2011

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(ã): Prof(a) Dr(a) Alex Rafacho, Departamento de Ciências Fisiológicas - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

Os procedimentos elencados no parecer final estão credenciados para uso no seu laboratório pelo período de quatro anos. Qualquer alteração destes, ou inclusão de novos, deverão ser apreciados pela CEUA-UFSC novamente.

Este credenciamento é válido para a utilização das espécies animais: quinhentos camundongos (*Mus musculus*) e quinhentos ratos (*Rattus Norvegicus*).

Procedência do animal: Biotério Central da UFSC.

Por ocasião do término deste período de credenciamento, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais com estes procedimentos aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 05/09/2016

Data 05/06/2012

Parecer(es):

**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE**