

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO ESPECIALIZAÇÃO EM NUTRIÇÃO CLÍNICA**

**GABRIELLE DA LUZ**

**SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE MELHORA**  
**SENSIBILIDADE À INSULINA E INFLAMAÇÃO NO TECIDO**  
**HEPÁTICO DE CAMUNDONGOS**

**CRICIÚMA, AGOSTO, 2011**

**GABRIELLE DA LUZ**

**SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE MELHORA  
SENSIBILIDADE À INSULINA E INFLAMAÇÃO NO TECIDO  
HEPÁTICO DE CAMUNDONGOS**

Monografia apresentada à Diretoria de Pós-graduação, nível *lato sensu*, da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, para a obtenção do título de especialista em Nutrição Clínica.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Teodoro de Souza

**CRICIÚMA, AGOSTO, 2011**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente a Deus por suas importantes manifestações em minha vida.

Ao meu orientador, Professor Cláudio Teodoro de Souza, pelo entusiasmo com que ensina a pesquisa e por sua orientação competente.

Aos professores do curso de Especialização em Nutrição Clínica da UNESC.

À Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, que com sua excelência, proporcionou a construção de mais uma etapa de minha formação.

Aos meus pais, irmãs, cunhados e sobrinhos pelo apoio incondicional.

Ao querido Thiago, por estar ao meu lado na realização deste sonho.

## RESUMO

O aumento da prevalência de doenças crônicas, como obesidade e diabetes mellitus tipo 2 (DM-2) representa um grave problema de saúde pública em diversos países, inclusive no Brasil. O elo entre tais doenças é a resistência à insulina (RI). TEM SIDO proposto que a obesidade leva a uma quadro de inflamação subclínica que resulta em RI. Apesar dos avanços das pesquisas nessa área, o conhecimento permanece limitado. Neste sentido, diversos estudos vêm investigando possíveis formas de tratamento e/ou prevenção. O consumo de óleo de peixe (fonte natural de ômega 3) tem sido apontado por muitos autores um importante fator para o tratamento das doenças associadas a RI. DESSA FORMA, O objetivo DO PRESENTE estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de óleo de peixe sobre a ação da insulina e inflamação no tecido hepático de camundongos. Para isso, os camundongos foram suplementados com diferentes doses de óleo de peixe (1mg, 5mg, 10mg e 50 mg) ao dia, por 21 dias. Foi avaliada a glicemia de jejum no dia 0, 14 e 21º Estes resultados mostraram que a dose de 10mg ocasionou redução mais significativos na glicemia, no 14º e 21º dias.. Como a dose de 10mg mostrou ter melhores efeitos, essa dose foi utilizado nos demais experimentos. A partir de amostras de tecido hepático observamos que 10 mg de óleo de peixe, diminui a fosforilação de moléculas inflamatórias JNK e IKK e da expressão de NF- $\kappa$ B no tecido hepático. Esta diminuição foi acompanhada do aumento da atividade de moléculas da via da insulina IR, IRS e Akt. Assim, os resultados sugerem que a suplementação com óleo de peixe pode reduzir inflamação, melhorando a resistência à insulina no tecido hepático.

**Palavras-chave:** Óleo de peixe. Ômega 3. Via molecular da insulina. Inflamação. Tecido hepático.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 – Via molecular da insulina .....	16
Ilustração 2 – Mecanismos moleculares de RI .....	19

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AGPI – Ácidos graxos poliinsaturados
- Akt – Proteína quinase B
- ALA – Alfa-linolênico
- AP-1 - Ativador da proteína 1
- AA – Ácido araquidônico
- DCNT - Doenças Crônicas Não Transmissíveis
- DCV – Doenças cardiovasculares
- DHA - Docoexaenóico
- DM-2 – Diabetes mellitus tipo 2
- EPA – Eicosapentaenóico
- FoxO - Fator de transcrição da família *forkhead*
- HAS – Hipertensão artéria sistêmica
- GLUT – Transportador de glicose
- GSK-3 - Glicogênio sintase quinase-3
- IκB - Inibidor de quinase kappa beta
- IKK - IkappaB quinase
- IR – Receptor de insulina
- IRS 1/2 – Substrato do receptor de insulina ½
- JNK - c-jun N-terminal quinase
- NHANHES - National Health and Nutrition Examination
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- NFκB – Fator de transcrição kappa B
- PEPCK - Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PGC-1 $\alpha$  - Coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma  $\alpha$

PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase

PKA – Proteína quinase A

RI - Resistência à insulina

SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes

SH2 - Domínio protéico com homologia a Src 2

SM – Síndrome Metabólica

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral  $\alpha$

TNFR1 – Receptor de TNF

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	8
2.OBJETIVO.....	11
2.1 Objetivo Geral .....	11
2.2 Objetivo Específico.....	11
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	12
3.1 Resistência à insulina: epidemiologia, etiologia e consequências.....	12
3.2 Via molecular da insulina.....	15
3.3 Via inflamatória e RI .....	17
3.4 Óleo de peixe e a RI.....	20
4 METODOLOGIA.....	24
4.1 Animais.....	24
4.2 Protocolo de suplementação de óleo de peixe.....	24
4.2.2 Parâmetros metabólicos e fisiológicos .....	24
4.3 Extração dos tecidos .....	24
4.4 Análises de proteínas por <i>imunoblotting</i> .....	25
4.5 Anticorpos e reagentes.....	25
4.5 Análises estatísticas .....	26
5 APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS .....	27
6 CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	35



## 1 INTRODUÇÃO

A homeostase da glicose é regulada por complexos mecanismos que envolvem ingestão alimentar, exercício físico e ação hormonal (SALTIEL, KAHN, 2001). A insulina é um hormônio anabólico que regula a homeostase de glicose em diversos níveis, inibindo a gliconeogênese e glicólise no tecido hepático e estimulando a captação periférica de glicose principalmente nos tecidos muscular e adiposo (DE SOUZA et al, 2010; PAULI et al, 2008). Desequilíbrios nesses complexos mecanismos de regulação nos tecidos alvos da insulina levam à RI (AGUIRRE et al, 2000; PRADA et al, 2005).

A RI apresenta um componente genético que ainda não foi completamente elucidado, aumentando as chances do desenvolvimento dessa anormalidade em indivíduos da mesma família. Porém, a obesidade e consumo de dieta rica em gordura saturada tem sido apontada com um importante fator para o desenvolvimento da RI em indivíduos predispostos geneticamente (SCHENK; OLEFSKY, 2008; SHOELSON; LEE, 2003). A RI frequentemente pode ser detectada muitos anos antes do aparecimento de doenças como hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes mellitus tipo 2 (DM-2), doenças cardiovasculares (DCV) entre outras (REAVEN, 1993; REAVEN, 2011).

A insulina é um hormônio anabólico com efeitos metabólicos potentes. Ela é secretada pelas células  $\beta$  do pâncreas em resposta ao aumento da glicemia. As etapas que ocorrem após a ligação da insulina ao seu receptor de membrana são complexas e altamente reguladas. Estudos conseguiram definir muitos eventos específicos que regulam a transdução do sinal insulínico, entretanto mecanismos ainda necessitam ser elucidados. A insulina utiliza fosforilação e interações proteína-proteína como ferramentas fundamentais para transmitir seu sinal. O receptor de insulina pertence a uma família de receptores de fatores de crescimento que têm atividade tirosina quinase intrínseca (YOUNGREEN, 2007). Após a ligação da insulina ao receptor, este sofre autofosforilação em múltiplos resíduos de tirosina, ativando diversas moléculas até a transmissão do sinal em direção ao efeito celular final, como ativação da síntese de glicogênio e inibição da gliconeogênese nos hepatócitos. Desajustes nestes complexos mecanismos levam a RI (SCHENK; OLEFSKY, 2008).

Modular a via de sinalização celular desse hormônio é um desafio para os pesquisadores e representa chances significativas de buscar novas formas de prevenção e tratamento da RI e patologias a ela associadas. Fármacos, exercício físico e nutrientes (DAVIDSON et al, 2007; ROPELLE et al, 2006) têm sido alvo de estudos e demonstraram grandes benefícios em aumentar a atividade da via molecular da insulina, diminuindo a RI. Dentre tais nutrientes, destaca-se os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) da família do ômega 3. Os principais alimentos fontes de ômega 3 são o leite materno e os peixes de água fria, que contém os ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) e docoexaenóico (DHA, 22:6n-3). Do ponto de vista fisiológico, a ação do ômega três está relacionada à diminuição nos níveis de triglicérides e LDL séricos, prevenção de DCV, perda de peso e diminuição da glicemia (LEE et al, 2011). Diversos benefícios do ômega 3 vêm sendo apontados e possivelmente as suas funções mais importante no organismo se devem a capacidade antiinflamatória (FLACHS et al, 2011; KIECOLT-GLASER et al, 2011).

Embora as pesquisas demonstrem os benefícios do consumo ômega 3, a ingestão pela maior parte da população ocidental é baixa em virtude do consumo diminuído de peixes em geral e o difícil acesso aos peixes de regiões de águas frias. Por isso, a suplementação com o óleo de peixe vem sendo considerada uma forma eficaz e de baixo custo para aumentar a ingestão desse nutriente. Outra dificuldade é a falta de informações indicando doses seguras para a suplementação (FEDACKO et al, 2007).

Diante disso, o objetivo desse estudo foi estabelecer dose e tempo que resultassem aumento da via de sinalização da insulina e diminuição da inflamação no tecido hepático de camundongos. Nosso estudo baseia-se na hipótese de que a administração de uma dose específica de óleo de peixe administrada por tempo específico levará a diminuição da inflamação, resultando no aumento da atividade da via da insulina no tecido hepático que é um importante regulador da homeostase da glicose.

Pesquisas científicas envolvendo seres humanos possuem limitações metodológicas e éticas. Dessa forma, as pesquisas com animais apresentam-se como uma alternativa fundamental. Tais pesquisas permitem o controle de diversas variáveis, já que os animais podem ser mantidos sob condições ambientais rígidas (LEE, COX, 2011). O conhecimento decorrente de suas experimentações poderá ser

extrapolado para a melhoria da saúde humana, pois os mecanismos a serem analisados nos animais correspondem, até certo ponto, aos dos seres humanos. Inclusive o uso de nutrientes ou compostos bioativos que favoreçam a ação da insulina.

## **2.OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos da suplementação de óleo de peixe sobre a ação da insulina e inflamação no tecido hepático de camundongos.

### **2.2 Objetivo Específico**

- a) Avaliar os efeitos da curva dose-resposta e tempo-dependente na glicemia de camundongos;
- b) Avaliar os efeitos da suplementação de óleo de peixe na fosforilação de moléculas da via da insulina IR, IRS1 e Akt no tecido hepático de camundongos;
- c) Avaliar os efeitos da suplementação de óleo de peixe na expressão de NFκB e fosforilação de IKK e JNK no tecido hepático de camundongos.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Resistência à insulina: epidemiologia, etiologia e consequências

A RI é um fenômeno biológico complexo definido como um estado de menor resposta metabólica aos níveis circulantes desse hormônio. Neste quadro clínico, observa-se concentração anormalmente elevada de insulina (hiperinsulinemia) em detrimento da quantidade necessária para a estimulação das células (STERN et al, 2005). A ação da insulina torna-se significativamente diminuída, resultando em alterações nos diferentes sistemas orgânicos. Já foi descrito RI nos tecidos hipotalâmico, adiposo, muscular, cardíaco, vascular e hepático (DA LUZ et al, 2010; DE SOUZA et al, 2010; EL-BASSOSSY et al, 2011; MEDEIROS et al, 2010; ROPELLE et al, 2010). A RI é um quadro complexo que compromete o organismo do ponto de vista fisiológico, bioquímico e molecular. Pesquisas sobre a RI vêm despertando o interesse de pesquisadores de todo mundo, sendo intensamente estudada em seus diversos aspectos.

A Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2007) recomenda que o estudo realizado por Stern et al (2005) sejam difundidos como critérios para se definir resistência à insulina em estudos clínicos ou na prática clínica. Tal pesquisa utilizou a maior coletânea de resultados de *clamp* euglicêmico associando dados de diferentes populações. Foram desenvolvidos critérios clinicamente viáveis e rotineiros, tendo como base a definição de resistência à insulina no método padrão-ouro (*clamp* euglicêmico). Foram avaliados 2.321 resultados de *clamp*, sendo 2.138 em indivíduos não-diabéticos. Os resultados práticos resumidos desse estudo definem resistência à insulina na prática clínica por meio de três modelos, que utilizam o Índice de Massa Corporal, critérios clínicos e determinações de lípidos.

Para classificação dos níveis de glicose sanguínea, a SBD (2007) baseia-se nos níveis de glicemia de jejum de no mínimo 8 horas, de acordo com a seguinte classificação: normal, <100; tolerância à glicose diminuída >100 a <126; e DM, ≥126. Para o diagnóstico de DM outros sinais clínicos e bioquímicos também devem ser levados em consideração.

Poucos estudos demonstram a prevalência da RI em diferentes populações. São mais comuns estudos epidemiológicos sobre doenças já

instaladas. Dados epidemiológicos do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) III (1988-1994) e NHANES 1999-2002 demonstram a prevalência de RI de 25% e 34,8%, respectivamente, na população não diabética acima de 20 anos dos Estados Unidos da América. Foi constatado que em paralelo com a epidemia de obesidade, a hiperinsulinemia aumentou significativamente na população não diabética, o que aponta aumento da RI. O aumento da prevalência foi de 35,1%, quando comparados NHANES III e NHANES 1999-2002 (LI et al, 2006).

A etiologia da RI é complexa e vem sendo associada a diversos fatores, como: predisposição genética, obesidade, consumo excessivo de gordura saturada, sedentarismo, envelhecimento, estresse e inflamação. Estes fatores podem ocasionar defeitos na via molecular da insulina, ocasionando a RI (REAVEN, 2005). Embora, as bases genéticas transmissíveis da RI sejam inquestionáveis, isoladamente são insuficientes para explicar o alarmante aumento da incidência em todo mundo em curto espaço de tempo; tal aumento é mais bem explicado pelas mudanças comportamentais ocorridas nas últimas décadas (HAMILTON et al, 2007).

As tendências genéticas à RI e doenças associadas vêm apresentando maior expressão diante das transformações no padrão alimentar associado aos baixos níveis de atividade física observados na sociedade atual, em consequência do processo de modernização (MORTON et al., 2006; STEIN; COLDITZ, 2004). Dentre os fatores alimentares, é evidente que há um consumo excessivo de energia, principalmente de fontes lipídicas. A transição nutricional, a ocidentalização dos padrões alimentares, o aumento excessivo do consumo de alimentos industrializados e ricos em gorduras, especialmente as de origem animal tornaram a população predispostas a instalação do quadro de obesidade e doenças crônicas, precedida ou acompanhada, pelo quadro de resistência à insulina (KOPELMAN, 2000).

O risco de desenvolvimento de RI está diretamente associada com o grau de obesidade em indivíduos geneticamente predispostos, especialmente a obesidade abdominal (SALAZAR et al, 2011). Inúmeros fatores associados à obesidade podem regular negativamente à ação da insulina. As pesquisas vêm demonstrando que muitos desses fatores, inclusive citocinas inflamatórias, são produzidos pelos adipócitos em proporção a quantidade de gordura corporal no organismo. Entretanto, as bases moleculares envolvidas nestas anormalidades

ainda não foram completamente elucidadas (GREGOR, HOTAMISLIGIL, 2011; HORN, HOTAMISLIGIL, 2011).

A preocupação com a RI se remete ao fato de ela estar associada à etiologia de diversas doenças crônicas, tais como: DM-2, DCV, esteatose hepática não alcoólica, HAS, síndrome dos ovários policísticos, dislipidemias, obesidade e outras. Em 1988, Reaven propôs originalmente o conceito “síndrome metabólica” (SM), esta síndrome é composta pela associação de diversos fatores de risco, ligados por um elo, a RI. Entretanto, somente em 1998 houve uma definição da SM com reconhecimento internacional proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Diversas definições surgiram de órgãos internacionais e todas incluem alterações de tolerância à glicose e/ou resistência à insulina como critério de diagnóstico (ALBERTI, ZIMMET, 1998; SBD, 2007). A literatura não demonstrou se a RI é a responsável direta por todas essas doenças. Entretanto, a relação entre RI e essas alterações metabólicas é aceita universalmente. Estudos vêm descrevendo a associação entre RI, inflamação e obesidade como um importante fator para o desenvolvimento das alterações metabólicas e patologias que compõe a síndrome (REAVEN, 2011b).

No quadro de RI, observa-se a diminuição da capacidade de resposta à insulina em diferentes tecidos. A RI no hipotálamo, resulta em diminuição da termogênese e aumento da ingestão alimentar (DE SOUZA et al, 2005; ROPELLE et al, 2009). No tecido muscular periférico, a diminuição da ação da insulina está associada à prejudicada captação de glicose (PAULI et al, 2008). No tecido adiposo, além da diminuída captação de glicose, observa-se o estímulo da lipólise (DA LUZ et al, 2010). Já no tecido hepático, a RI está associada ao aumento da glicólise e gliconeogênese (DE SOUZA et al, 2010) triglicérides e lipoproteínas de baixa densidade (VLDL), associando-se redução do colesterol contido na lipoproteína de alta densidade (HDL-c) e aumento da densidade das lipoproteínas de baixa densidade (LDL). O comprometimento da ação da insulina ocasiona defeitos na regulação do metabolismo glicídico e lipídico, que são comuns nas diversas doenças mencionada acima (BODEN, 2011; SALTIEL, KAHN, 2001)

Estudos demonstram que a deterioração do metabolismo de carboidratos precede o DM-2. Além disso, essa doença progride em paralelo à piora da ação da insulina. Inicialmente, as células  $\beta$  pancreáticas compensam o quadro de resistência à insulina aumentando significativamente a secreção desse hormônio,

caracterizando a hiperinsulinemia. Entretanto, com a progressão da RI desenvolve-se o DM-2, quadro caracterizado por hiperglicemia (ALBERTI, ZIMMET, 1998) .

Compreender os mecanismos envolvidos na resistência à insulina é fundamental para o desenvolvimento de novas formas de prevenção e tratamento da RI e doenças associadas.

### **3.2 Via molecular da insulina**

Para compreensão dos mecanismos moleculares atualmente relacionados à resistência à insulina, faz-se necessário a caracterização da via molecular desse hormônio até seus efeitos fisiológicos.

A insulina é um hormônio peptídico composto por duas cadeias de aminoácidos, que através de complexos mecanismos é secretada no sangue pelas células  $\beta$  das Ilhotas de Langherans do pâncreas. A liberação do hormônio, que tem meia vida de seis minutos, é estimulada em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose, ácidos graxos e aminoácidos. Após 10 a 15 minutos é depurada da circulação (YOUNGREN, 2007).

A sinalização intracelular da insulina inicia-se após a sua ligação ao receptor específico de membrana, denominado receptor de insulina (IR) (Figura 1). Trata-se de uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades alfa ( $\alpha$ ) e duas subunidades beta ( $\beta$ ) (SALTIEL, KAHN, 2001). As subunidades  $\alpha$  encontram-se extracelularmente, enquanto as subunidades  $\beta$  são proteínas transmembranas. A insulina liga-se a porção  $\alpha$  do seu receptor, estimulando a autofosforilação cruzada das porções  $\beta$ , que apresentam atividade tirosina quinase intrínseca. A partir deste evento, o IR torna-se apto a levar adiante a transdução do sinal de insulina. A ativação do IR estimula a fosforilação em tirosina de diversos substratos, entre eles, o substrato do receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1/2) (HOTAMISLIGIL et al, 1996). A fosforilação das proteínas IRSs leva a criação de sítios de ligação para outras proteínas como a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), promovendo sua ativação. A PI3K é fundamental na regulação da mitogênese, diferenciação celular e efeitos metabólicos estimulados pela insulina. É um dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). A fosforilação dos sítios de tirosina das proteínas IRSs ao domínio protéico com



homologia a Src 2 (SH2), da subunidade p85 da PI3K ativa o sítio catalítico associado (BACKER et al, 1992). A enzima catalisa a fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol produzindo fosfatidilinositol-3 fosfato, fosfatidilinositol-3,4 difosfato e fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato. A ativação da PI3K aumenta a fosforilação em serina da proteína serina/treonina quinase B (Akt) (ALESSI, COHEN, 1998; DOWNWARD, 1998; CHEN et al, 2001).

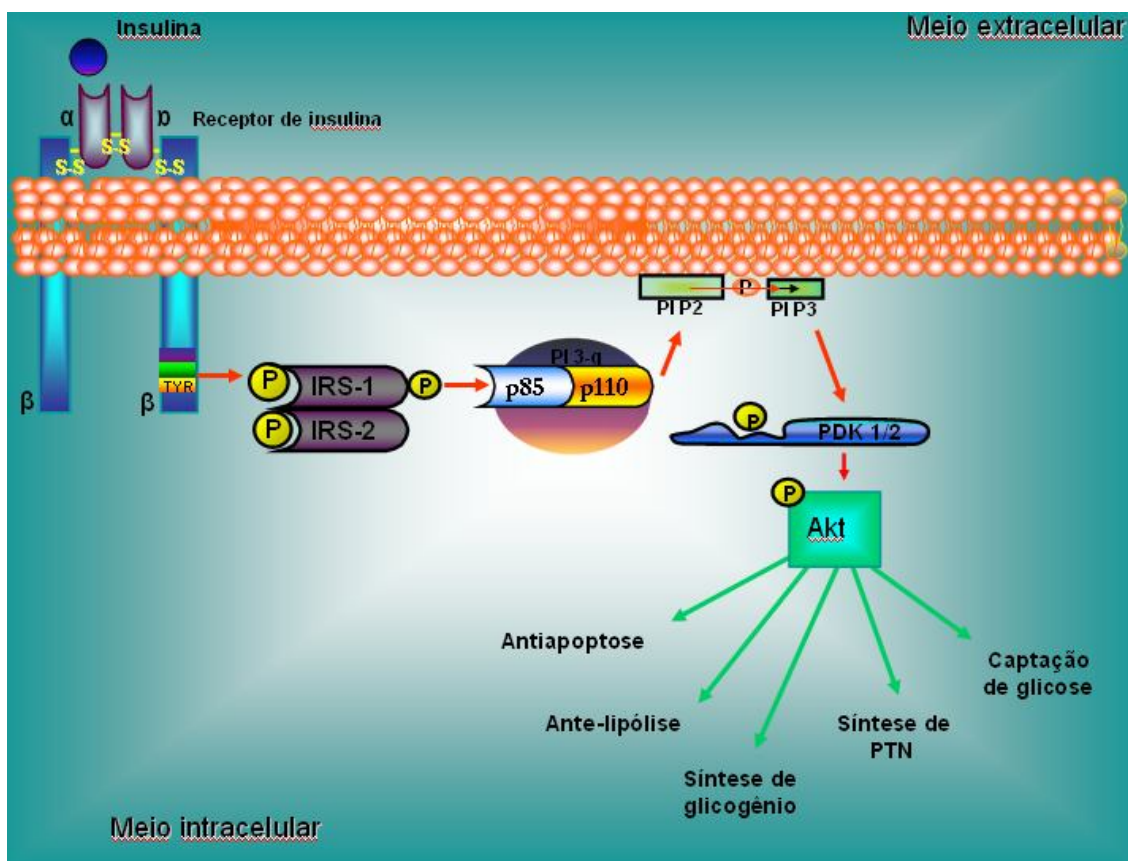


Figura 1 - Via molecular da insulina

A Akt atua aumentando a captação periférica de glicose principalmente no tecido muscular e adiposo por aumentar a translocação dos transportadores de glicose (GLUTs), do citoplasma para a membrana plasmática, o que resulta em captação celular de glicose por difusão facilitada após a ingestão alimentar (ABEL et al, 2001). No tecido adiposo, a Akt apresenta função antilipolítica, por meio do qual inibe a liberação de ácidos graxos dos adipócitos. A insulina inibe a proteína quinase A (PKA), ativando a fosfodiesterase AMP cíclico específica (PDE38), que reduz os níveis de AMP cíclico nos adipócitos, resultando na inibição da enzima lipase hormônio sensível (SUTHERLAND et al, 1996; THIRONE et al, 2004).

Já no tecido hepático o hormônio atua na manutenção do equilíbrio de glicose plasmática, sendo estimulado de acordo com o estoque de nutrientes disponíveis no organismo (ALESSI, COHEN, 1998; CARTEE, DEAN, 1994). A insulina inibe a produção hepática de glicose por inibir a gliconeogênese e glicogenólise. O hormônio inibe a gliconeogênese por meio de vias de sinalização que envolvem fatores de transcrição da família *forkhead* (FoxO) e o coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC-1 $\alpha$ ). Com isso, observa-se a inibição da transcrição de genes que codificam a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), frutose-1,6-bifosfatase e glicose-6-fosfatase. Por outro lado, aumenta a transcrição de genes de enzimas glicolíticas como glicoquinase e piruvato quinase (SAKAKURA et al, 2001).

Ainda, a insulina estimula a glicogênese em músculo e fígado. Este evento é resultado da desfosforilação da enzima glicogênio-sintetase. Quando ativada, a Akt fosforila e inativa a glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3), diminuindo a fosforilação da glicogênio-sintase e aumentando sua atividade. A insulina também é capaz de desfosforilar a glicogênio sintase diretamente, ativando a proteína fosfatase 1, via PI3K (CAMPBELL et al, 1988; CROSS et al, 1995).

### 3.3 Via inflamatória e RI

Já que os efeitos da insulina são mediados por alterações na fosforilação e expressão de moléculas, a redução na atividade quinase do IR e IRSs é um importante fator para a manifestação da RI (TANIGUCHI et al, 2006; THIRONE et al, 2006). Defeitos nos mecanismos moleculares de sinalização da insulina, como serão descrito a seguir, levam à resistência a este hormônio (GUAL et al, 2005).

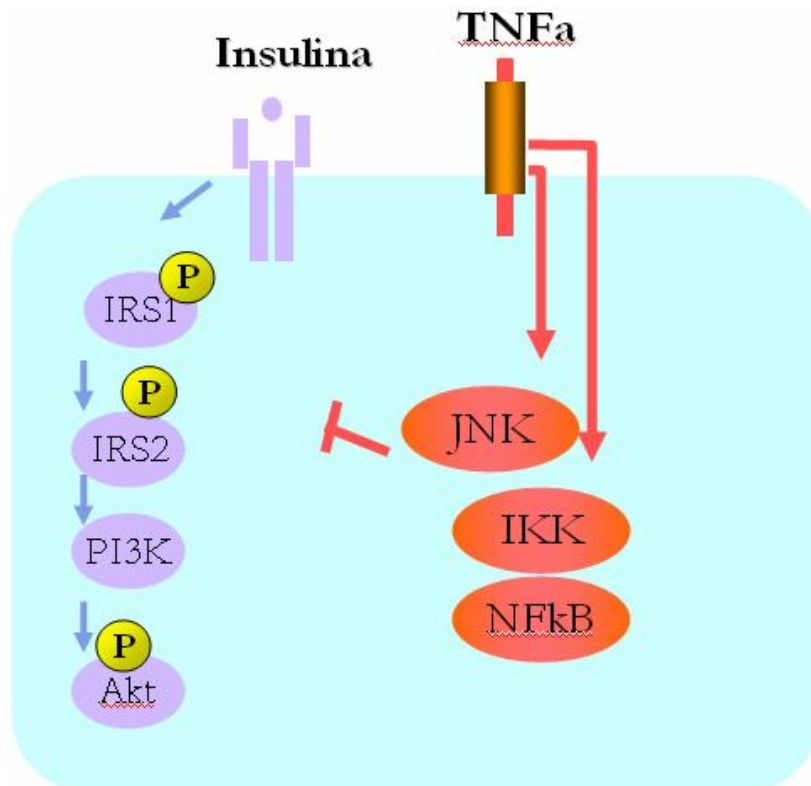
A partir da descoberta da insulina, em 1922, doenças relacionadas à deficiência de ação deste hormônio foram atribuídas à reduzida secreção insulínica. Porém, uma década depois, Himsworth (1936) estudando pacientes diabéticos, propôs que a fisiopatologia da doença estaria relacionada à prejudicada sensibilidade à insulina e não a deficiência de secreção do hormônio. Posteriormente, consolidou-se a relação entre DM-2, resistência insulínica e outras doenças crônicas (BASTARD et al, 2006). Após a caracterização da atividade tirosina quinase do IR e da sua capacidade de transdução do sinal da insulina,

identificou-se, em quadros clínicos de RI, a redução da fosforilação de proteínas da via de transdução desse hormônio, tais como IR, IRS-1 e IRS-2 (ASANTE-APPIAH, KENNEDY, 2003). Mecanismos moleculares associados a uma redução da fosforilação em tirosina de proteínas envolvidas na sinalização da insulina passaram a ser o foco da investigação da fisiopatologia envolvida na gênese da obesidade e doenças relacionadas. Neste contexto, identificou-se que tais proteínas com atividade tirosina quinase podem ser fosforiladas em resíduos serina, e tal fenômeno pode levar a uma atenuação do sinal molecular gerado pela ligação da insulina ao seu receptor (HOTAMISLIGIL et al, 1996; ALESSI, COHEN, 1998), caracterizando o principal mecanismo de resistência à insulina descrito na literatura.

A obesidade vem sendo estritamente associada à inflamação subclínica crônica caracterizada por produção anormalmente elevada de citocinas, aumento de proteínas de fase aguda e ativação de complexas vias de sinalização na maioria dos indivíduos. Estudos sugerem que a liberação de citocinas pró-inflamatórias são importantes mediadores das alterações na sinalização intracelular de insulina (PRADA et al, 2005). A obesidade e a ingestão de dieta hiperlipídica à base gordura saturada são fatores de risco no desenvolvimento de resistência à insulina e DM-2, causando aumento dos níveis plasmáticos de ácidos graxos livres e acúmulo excessivo de gordura corporal. Estudos apontam a relação da resistência à insulina a diversos fatores, como: hormônios derivados dos adipócitos, estresse de retículo endoplasmático e a via inflamatória (BODEN et al., 1994; RON e WALTER, 2007). Contudo, a relação entre lipídeos e resistência à insulina é complexa e o preciso mecanismo ainda não foi completamente elucidado.

Estudos têm revelado a ligação entre vias pró-inflamatórias e vias que regulam o metabolismo, em especial, aquelas ativadas em resposta à insulina. As citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e a Interleucina 1 beta parecem desempenhar um papel central nestas conexões. O TNF- $\alpha$  liga-se ao seu receptor (TNFR1), resultando na ativação de substratos intracelulares envolvidos no controle da transcrição de genes de reposta inflamatória, regula proteínas relacionadas ao controle de apoptose e modula respostas de crescimento e diferenciação celular em diversos tecidos (AMARAL et al, 2006; GUPTA, 2002; HOTAMISLIGIL et al, 1996). Uma das principais moléculas intermediárias da via de sinalização do TNF- $\alpha$  é a serina quinase JNK (c-jun N-terminal quinase). Quando ativada, a JNK tem a função primária de promover a

associação dos produtos dos genes de resposta imediata c-Jun e c-Fos, resultando na formação do fator de transcrição dimérico ativador da proteína 1 (AP-1) (DEMPSEY et al, 2003; MACEWAN, 2002). Porém, a atividade serina quinase da JNK pode também atuar sobre outros substratos, inclusive as moléculas da via da insulina, como IRS-1 e IRS-2 (AGUIRRE et al, 2000; SHOELSON; LEE, 2003). Quando fosforiladas em serina pela JNK, a possibilidade de fosforilação em tirosina pelo receptor de insulina é prejudicada, o que contribui para resistência à transdução do sinal da insulina através da cascata (HIROSUMI et al, 2002; TUNCMAN et al, 2006).



**Figura 2- Mecanismos moleculares de RI**

Os substratos do receptor de insulina também podem sofrer fosforilação em serina por ação de outra via pró-inflamatória, a via IKK (IkappaB quinase) /I $\kappa$ B (inibidor de quinase kappa beta) /NF- $\kappa$ B (fator de transcrição kappa B). Esta via pode ser ativada pelo TNF- $\alpha$ , assim como por outras citocinas pró-inflamatórias. A ativação da IKK induz a dissociação do complexo I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B, porém também pode

promover a fosforilação em serina dos IRSs, ação que compromete a transdução do sinal da insulina através desta via (ARKAN et al, 2005). Diversos estudos têm defendido que nutrientes também podem modular as proteínas pró-inflamatórias (SCHENK, SABERI, OLEFSKY, 2008).

### **3.4 Óleo de peixe e a RI**

A RI é determinada pela associação de inúmeros fatores, e esta multicausalidade dificulta sua prevenção e tratamento. Diante disso, o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas terapêuticas vêm despertando os interesses de pesquisadores de todo mundo (BASTARD et al, 2006). Por estar relacionada ao desenvolvimento de muitas doenças crônicas exige um tratamento longo e meticuloso (REAVEN et al, 2005). Atualmente, a prevenção e tratamento da RI e doenças crônicas associadas baseiam-se na terapia farmacológica e nutricional, cirurgia e prática de exercícios físicos (DAVIDSON et al, 2007; ROPELLE et al, 2006).

Está claramente estabelecida na literatura a relação entre a alimentação adequada e qualidade de vida. Por outro lado, a alimentação excessiva (principalmente hiperlipídica) é um fator que contribui para o desenvolvimento ou aumento da resistência à insulina (SCHENK, SABERI, OLEFSKY, 2008). Já, o consumo de ômega 3 vem sendo recomendado com o objetivo de recuperar a saúde e o bem estar físico, garantindo ao indivíduo a melhora da qualidade de vida por meio da perda gradativa de peso ponderal e reversão das alterações metabólicas e hormonais (BALK et al, 2006).

A SBD (2007) recomenda que o consumo de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) atinja até 10% do valor calórico total. Entretanto, não foram estabelecidas recomendações relacionadas às doses seguras para suplementação. O consumo de ômega 3 contribui favoravelmente para diminuição nos níveis de triglicérides e LDL séricos, prevenção de DCV, perda de peso e diminuição da glicemia (LEE et al, 2011), reduzindo os fatores deletérios ao organismo. Além disso, vem se demonstrando o efeito anti-inflamatório do ômega 3 (ESLICK et al, 2009). Entretanto, não estão estabelecidas na literatura as necessidades diárias de ômega 3 ou doses seguras para a suplementação.

Os benefícios do ômega-3 vêm sendo foco de estudo desde a década de 70, quando Bang e Dyerberg apontaram baixas taxas de morte por DCV em esquimós da Groelândia (BANG, DYERBERG, 1972). E esta proteção contra DC estaria relacionado ao alto consumo de ácidos graxos ômega 3 (5 a 10g/dia, 13% do total de lipídeos ingeridos) decorrente da dieta à base de peixes marinhos, focas e baleias (BANG, DYERBERG, HJOORNE, 1976). Dessa forma, nas últimas décadas, inúmeros estudos indicaram os benefícios do ômega 3 no crescimento, desenvolvimento, prevenção de doenças cardiovasculares, hipertensão, câncer, doenças inflamatórias, DM e outros (HARRIS, 2004).

Os ácidos graxos da família ômega-3 eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) e docosaexaenóico (DHA, 22:6n-3), derivados do alfa-linolênico (ALA, 18:3n-3) são ácidos graxos semi-essenciais classificados como poliinsaturados por apresentarem mais de uma insaturação na cadeia carbônica. As principais fontes alimentares de EPA e DHA são o leite materno e peixes marinhos de água fria (salmão, atum, bacalhau, cavalinhas e cavalas) (VERGÍLIO et al, 2000). Já, o ALA é encontrado em óleos vegetais, como canola e linhaça.

Os lipídeos possuem funções diversificadas no organismo. Participam da regulação de atividades metabólicas, funcionam como depósito energético, são componentes estruturais de todas as membranas plasmáticas e participam funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Os ácidos graxos são classificados como nutrientes por serem essenciais ao organismo humano, entretanto, alguns deles vêm sendo foco de inúmeros estudos por exercerem funções como compostos bioativos de alimentos (BENATTI et al, 2004).

Com a confirmação do papel benéfico do ômega 3 na ação metabólica da insulina, inúmeros estudos buscaram elucidar quais são os mecanismos moleculares pelo qual este ácido graxo como estimulador fisiologicamente relevante da homeostase de glicose em diferentes tecidos. Diversos mecanismos vêm sendo propostos para ação do EPA e DHA na modulação da via insulina. Foram identificadas características antiinflamatórias e antioxidantes no ácido graxo poliinsaturado, ômega 3, dois fatores importantes na resistência à insulina (SURESH e DAS, 2003). Devido a inúmeras ações moleculares, o ômega 3 vêm sendo considerada uma substância antiinflamatória e por isso vêm sendo foco de estudo no tratamento da RI, alteração fisiológica e estritamente relacionada à inflamação (FLACHS et al, 2011).

Estudos de intervenção em seres humanos são limitados e tem apresentado resultados variáveis. Estudos epidemiológicos com humanos indicam que ômega 3 é capaz de reduzir o desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes. Por outro lado pesquisas de intervenção em modelos animais mostraram que a dieta hiperlipídica (principalmente saturadas e ácidos graxos trans) e hiperglicídica (principalmente sacarose) induz resistência à insulina (DE SOUZA et al, 2005).

Numa revisão de diversos trabalhos realizados com animais e seres humanos, observou-se que a suplementação com ômega 3 tem significativa relevância clínica na prevenção da resistência à insulina. Os benefícios da suplementação ocorrem quando associados ao estilo de vida saudável que incluem perda de peso, exercícios físicos, redução do consumo de açúcar refinado, ácidos graxos ômega 6, saturados e trans (MISRA et al, 2010).

Estudos epidemiológicos demonstram que a ingestão de óleo de peixe, fonte natural de ômega 3, nos primeiros anos da infância retarda o desenvolvimento da intolerância à glicose ao longo da vida (STENE, JONER, 2003). Os mecanismos moleculares apontados estão relacionados à capacidade de melhorar a transdução do sinal insulínico e a seus efeitos antiinflamatórios.

Diversos mecanismos foram descritos a fim de explicar os benefícios do ômega 3. O consumo de ômega 3 na dieta favorece a incorporação de EPA nos fosfolipídeos de membrana, substituindo o ácido araquidônico (AA, 20:3n-6) que é utilizado na síntese de eicosanóides com ação pró-inflamatória (prostaglandinas e leucotrienos), por meio da ação das enzimas ciclooxigenase e lipooxigenase. É importante salientar que as prostaglandinas produzidas a partir do EPA contribuem menos para o processo inflamatório do que aqueles derivados do AA (TULL et al, 2009).

Outra possível explicação é que necessita mais estudos é a função dos ácidos graxos ômega 3 na modulação da ação de moléculas da via inflamatória, tais como: TNF- $\alpha$ , JNK, NF $\kappa$ B, IKK, I $\kappa$ B e outras (SURESHI; DAS, 2003). O papel anti-inflamatório do ômega 3 nas Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) tem sido amplamente relatado. Melhora na via de sinalização da insulina pela ação antiinflamatória do ômega 3 pode ser uma possível explicação para os benefícios do consumo deste nutriente.

Como citado anteriormente, a relação entre a via da insulina e o controle

da homeostasia da glicose pelo tecido hepático tem seu elo na proteína Akt, no fator de transcrição Foxo e na proteína GSK-3. É possível, mas ainda não foi comprovado que a capacidade do ômega 3 de modular a via inflamatória no tecido hepático seja capaz de aumentar a sensibilidade à insulina, entre outros motivos, levando ao aumento da atividade da síntese de glicogênio e diminuindo a via gliconeogênica por ativar a via de ação da insulina (IRS/PI3K/Akt).

Sendo assim, estudos que avaliem se a suplementação com diferentes doses de óleo de peixe podem melhorar as vias de inflamação e exercer modulação positiva sobre a via de sinalização da insulina no tecido adiposo, o que poderia resultar em efeitos sobre a glicemia necessitam ser realizados a fim de descobrir novas formas de prevenção do DM-2 e patologias associadas.

Dessa forma, é consenso que citocinas inflamatórias atuam sobre a via de sinalização de insulina, levando à resistência a esse hormônio. Por outro lado, o consumo de nutrientes com ação antiinflamatória pode melhorar a sensibilidade à insulina por meio de efeitos entre outros tecidos, no fígado por reduzir o *status* inflamatório. Entretanto não é conhecido se a melhora da sensibilidade à insulina pela suplementação de óleo de peixe está relacionado aos efeitos de melhorar a sensibilidade à insulina e a diminuição do *status* inflamatório no tecido hepático.

Esses resultados mostrariam mecanismos moleculares associados à resistência à insulina e via inflamatória, acrescentando maior conhecimento acerca dos benefícios do estilo de vida saudável para portadores de patologias, como obesidade e diabetes tipo 2. Estudos com este objetivo representam um grande avanço no conhecimento acerca dos benefícios do estilo de vida saudável, refletindo na melhora da qualidade de vida da população, prevenção de mortes evitáveis, assim como em menor gastos com tratamento e reabilitação.



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Animais

Foram utilizados 50 ratos camundongos *Swiss*, machos, pesando 35-40g, e com dois meses idade. Eles foram obtidos a partir do Centro de Bioterismo da UNESC e alojados em uma sala com temperatura controlada (24 ° C), com ciclo 12 h claro-escuro. Os animais tiveram livre acesso a água e alimento.. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios e procedimentos descritos pelas *National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals* e foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram separados aleatoriamente em cinco grupos e receberam o tratamento por 21 dias:

- controle (cont) (n=10): recebeu água por gavagem;
- 1mg (n=10): recebeu 1 mg de óleo de peixe por gavagem;
- 5mg (n=10): recebeu 5 mg de óleo de peixe por gavagem;
- 10mg (n=10): recebeu 10 mg de óleo de peixe por gavagem;
- 50mg (n=10): recebeu 50 mg de óleo de peixe por gavagem.

### 4.2.2 Parâmetros metabólicos e fisiológicos

Os níveis sanguíneos de glicose foram determinados utilizando glicosímetro nos dias: 0, 7, 14 e 21 para a realização da curva dose-resposta e tempo-dependente.

### 4.3 Extração dos tecidos

Os camundongos foram anestesiados com tiopental sódico (4mg/100g de peso corporal) e para controle de anestesia foram observados os reflexos pedal e de córnea antes de qualquer procedimento experimental. As amostras do tecido hepático foram extraídas e homogeneizadas em tampão de imunoprecipitação contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de

sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de ortovanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C. O homogeneizado de cada amostra foi então centrifugado a 11.000 rpm por 30 minutos. No sobrenadante foi determinada a concentração de proteína utilizando o método de Bradford (BRADFORD , 1976). Em seguida, as proteínas foram desnaturadas pela fervura em Laemmli (LAEMMLI, 1970) e armazenadas a -80°C para análises por *Western blot*.

#### **4.4 Análises de proteínas por *immunoblotting***

Amostras do tecido hepático dos grupos avaliados foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDSPAGE). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIORAD. A membrana de nitrocelulose foi incubada durante 12 horas com anticorpos específicos de nosso interesse. A ligação de anticorpo a proteínas não específicas foi minimizada pela pré-incubação da membrana de nitrocelulose com tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado; 10mmol/L de Tris; 150mmol/L de NaCl; 0,02% de *Tween* 20) por 2 horas. A membrana original foi estripada e reblotada com  $\beta$ -actina. As membranas foram expostas ao anticorpo secundário conjugado com peroxidase para a detecção por quimioluminescente. A visualização de proteínas das bandas foi realizada por exposição de membranas ao RX (Kodak). As bandas identificadas na autorradiografia foram quantificadas por meio de densitometria óptica através do programa *Scion Image*.

#### **4.5 Anticorpos e reagentes**

Os anticorpos de IR fosforilado, IRS1 fosforilado, Akt fosforilada, anti-*IKK*, antifosfoNF $\kappa$ B e anti-JNK foram obtidos da *Cell Signaling Technology* (Beverly, MA). O anticorpo anti- $\alpha$ -Tubulina foi obtido da *Santa Cruz Technology* (Santa Cruz, CA). Os reagentes de rotina utilizados foram da *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO). Foi utilizado um óleo de peixe vendido comercialmente, de fácil acesso para a população em geral.

#### **4.5 Análises estatísticas**

Para análise estatística, utilizamos o *software SPSS (versão 3.0)*. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) two-way para comparação entre os grupos. O teste de Bonferroni foi empregado para análise de múltipla comparação *post-hoc*, quando necessário. Os resultados foram expressos como média erro padrão da media, empregando o nível de significância estatística de  $p < 0,05$ .

## 5 APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS

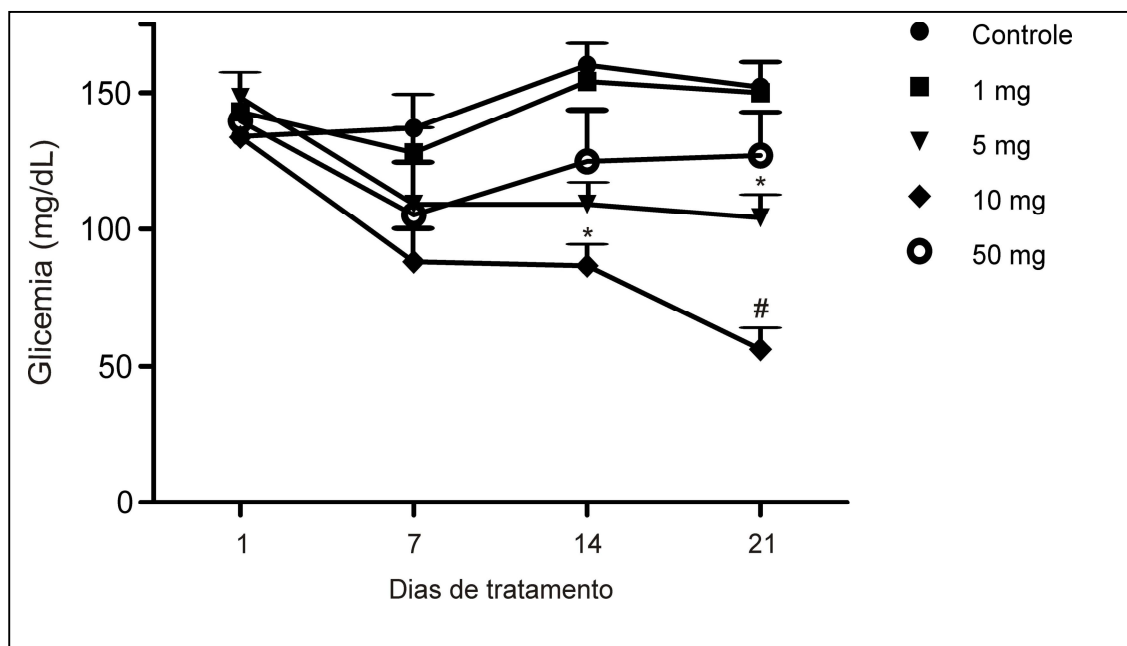
O aumento da prevalência de DCNT, tais como DCV, obesidade e DM-2 representa um grave problema de saúde pública em diversos países, inclusive no Brasil. O elo entre as diversas doenças crônicas é a RI (REAVEN, 2011b). O controle da RI é fundamental para a prevenção ou tratamento de diversas doenças (BASTARD et al, 2006).

As moléculas pró inflamatórias são importantes para o perfeita resposta do sistema imune inato, no entanto a exacerbação dessa via pode interferir na correta ação de varias substancias, inclusive da insulina. Isso pode acarretar em instalação do quadro conhecido com resistência a insulina. Distúrbios na via inflamatória, mais especificamente a exacerbação dela, precedem e acompanham a progressão da RI e doenças a ela associadas, como DM-2 e obesidade (REAVEN, 1988). O círculo vicioso tem início com a ingestão elevada de gordura saturada e/ou o tecido adiposo armazenado em excesso no organismo, seguidos pelo processo inflamatório, que traz prejuízos a via de sinalização da insulina, levando a um quadro caracterizado por RI, hiperinsulinemia e, ainda, favorecimento ao depósito de gordura no organismo e o desenvolvimento de doenças. Dessa forma, o acúmulo de gordura corporal pode reiniciar o ciclo (HOTAMISLIGIL et al, 1996).

O comprometimento dos mecanismos que regulam a homeostase da glicose associa fisiopatologia da obesidade a RI e DM-2. Apesar dos avanços das pesquisas nessa área, o conhecimento permanece limitado. Por isso, diversos estudos vêm buscando novas formas de tratamento e prevenção dessas alterações. O consumo de ômega 3 tem sido apontado por muitos autores um importante fator para o tratamento das DCNT, contribuindo favoravelmente para a diminuição do peso, triglicerídeos, LDL-c (DAVIDSON, et al, 2006), glicemia, hiperinsulinemia, entre outros (SURESHI, DAS, 2003). Fatores bioquímicos e metabólicos podem contribuir para melhora da homeostasia da glicose após a suplementação com óleo de peixe (HARRIS, 2004). Esses benefícios fazem com que a quantidade de ingeridos ácidos graxos poliinsaturados seja um importante fator a ser levado em consideração na prevenção e tratamento de doenças, como DM-2 e DCV.

Com base nisso e com o objetivo de avaliar os mecanismos moleculares envolvendo a ação da suplementação com óleo de peixe na inflamação e resistência à insulina, no primeiro momento do presente trabalho foram realizadas uma curva

dose-resposta e curva tempo-dependente. Para tanto, os animais foram suplementados com diferentes doses de óleo de peixe durante 21 dias e a glicemia de jejum fora avaliada. Para isso, a amostra do sangue foi obtida através de um corte na extremidade da cauda, segundo o protocolo.



**Figura 1 – Curva dose-resposta e tempo-dependente. Efeitos da suplementação de óleo de peixe em diferentes doses e diferentes tempos de tratamentos na glicemia de jejum de camundongos. \* $p < 0.05$ , ratos suplementados versus grupo controle; # $p < 0.05$ , grupo 50mg no 21º dia versus grupo 50mg no 14º dia**

A figura 1 mostra os dados relativos à curva dose-resposta e tempo-dependente na glicemia de jejum de camundongos controle e suplementados com diferentes doses de óleo de peixe do dia 0 ao 21º. Os animais suplementados com 5 mg/kg e 10 mg/kg apresentaram níveis de glicemia de jejum significativamente menores quando comparados ao grupo controle a partir do 14º (80mg/dL) e 21º dia (105 mg/dL), respectivamente. Em adição, o grupo 10 mg apresentou redução significativa da glicemia no 21º dia em relação ao 14º dia (51 mg/dL).

Os grupos suplementados com 5 e 10 mg apresentaram alterações glicêmicas importantes, com a diminuição significativa da glicemia de jejum. Coletivamente, estes achados demonstraram que a ação potencial do óleo de peixe em melhorar a ação da insulina é dependente da dose e do tempo de tratamento. De forma interessante, a menor e a maior dose não demonstraram efeito na glicemia dos animais, neste experimento. Além disso, foi possível constatar os efeitos da

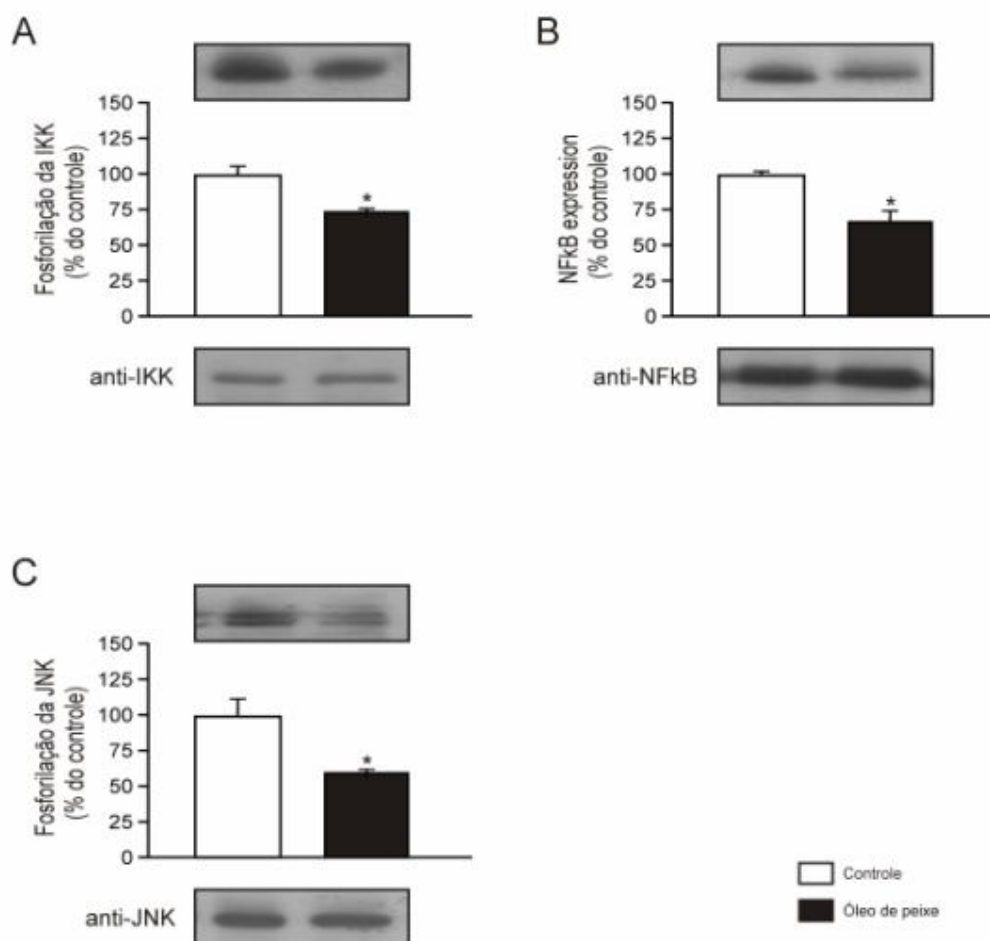
suplementação com o óleo de peixe apenas após o 14º dia no grupo 10mg e no 21º no grupo 5mg.

Diante dos resultados, para a próxima etapa do estudo, a dose 10 mg/kg/dia durante 21 dias foi selecionada. Então, amostras do tecido hepático foram removidas para análises moleculares de moléculas inflamatórias e se essas correlacionam-se com a melhora da glicemia e via da insulina. A nutrição na prevenção e tratamento de doenças relacionadas a RI vem sendo intensamente estudadas, porém os mecanismos moleculares que associam a ingestão de ômega 3, via inflamatória e via da insulina no hepatócito ainda não havia sido investigadas.

A figura 2 demonstra a fosforilação de IKK e JNK e expressão de NFκB no tecido hepático de camundongos submetidos à suplementação de 10 mg/kg de óleo de peixe. Amostras do fígado foram removidas dos grupos estudados após 12 horas de jejum. Os extratos dos músculos obtidos foram incubados com anticorpos de pJNK, pIKK e NFκB. As figuras 2A e 2B demonstrou que a suplementação com óleo de peixe reduziu significativamente a atividade da via de sinalização IKK/NFκB no tecido hepático de camundongos, reduzindo a fosforilação da IKK em 30% e a expressão da NFκB em 35%, quando comparado ao grupo controle. Além disso, nos animais 10 mg, observamos a diminuição da fosforilação da JNK de 40%, quando comparado ao grupo controle.

Nutrientes e hormônios parecem ser importantes participantes do complexo e integrado sistema de controle da homeostasia da glicose, entretanto, não há uma causa específica para a etiologia da resistência à insulina em todos os indivíduos obesos; é provável que os mecanismos exatos diferem entre indivíduos e entre populações (SCHENK, SABERI, OLEFSKY, 2008). Diante disso, pesquisadores de todo o mundo vêm sendo atraídos pela busca de fatores que modulam a sensibilidade insulínica.

Diversos mecanismos inflamatórios podem estar envolvidos na patogênese da resistência à insulina nos tecidos periféricos. É consenso que alguns dos mecanismos moleculares envolvem alterações na ação de moléculas chaves da via inflamatória JNK e NF-κB (ARKAN et al, 2005; LEE et al, 2003).



**Figura 2 – Efeitos da suplementação de 10mg de óleo de peixe na sinalização na fosforilação da IKK e JNK e expressão de NFkB no hepatócito de camundongos. \* $p < 0.05$ , ratos suplementados versus grupo controle.**

Possíveis intervenções terapêuticas não farmacológicas vêm sendo apontadas para a prevenção e tratamento de DCV. Além do inquestionável valor energético e distribuição de macro e micronutrientes da dieta, outros fatores vêm emergindo como importantes determinantes do sucesso da terapia. Exercício físico, alimentos, nutrientes e compostos bioativos têm demonstrado eficiência terapêutica, inclusive do ponto de vista molecular (SCHENK; SABERI; OLEFSKY, 2008).

A ingestão de alimentos funcionais com propriedades que vão além de sua qualidade de fonte de nutrientes tem demonstrado contribuir para a prevenção da resistência à insulina e DM-2. No entanto, os efeitos destes nutrientes do ponto de vista molecular ainda não foram completamente estabelecidos, sendo importantes mais estudos. Os mecanismos moleculares apontados estão relacionados à capacidade de melhorar a transdução do sinal insulínico e a seus

efeitos antiinflamatórios.

Consistente com as características antiinflamatórias demonstradas em estudos anteriores (FLACHS et al, 2011; TULL et al, 2009), no tecido hepático de animais que receberam o 10 mg/kg de óleo de peixe observou-se uma diminuição significativa do *status* inflamatório em comparação ao grupo controle, evidenciado pela diminuição significativa da atividade da JNK e IKK e expressão NF-kB no tecido hepático.

Para a confirmação e compreensão das alterações metabólicas ocorridas após suplementação com o óleo de peixe, as importantes proteínas responsáveis pela transdução do sinal insulínico IR, IRS-1 e Akt foram avaliadas. Para isso, foi injetado insulina ( $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) na veia porta de camundongos controle.. A figura 3 demonstra a fosforilação de IR, IRS-1 e Akt no tecido hepático de camundongos suplementados com 10mg de óleo de peixe. O tecido hepático foi removido dos grupos estudados após doze horas de jejum. Nos animais controle após a administração de insulina, observamos aumento da fosforilação do IR, do IRS-1 e da Akt, quando comparados com os animais controle que receberam salina. Após 21 dias de suplementação com 10 mg de óleo de peixe, a atividade da via de sinalização da insulina foi aumentada no tecido hepático dos camundongos, aumentando a fosforilação do IR em 33%, do IRS-1 em 34% e da Akt em 42% comparados com o grupo controle que recebeu salina.

Os resultados deste estudo foram semelhantes aos anteriores (DA LUZ, et al, 2010; DE SOUZA et al, 2010), já que em animais controle, após a injeção de insulina, observou-se o aumento da fosforilação das proteínas da via da insulina IR, IRS-2, e Akt, demonstrando a preservação da sensibilidade das células hepáticas ao hormônio. Já, nos animais que receberam o suplemento, foi observado um aumento significativo da atividade destas mesmas moléculas, em comparação ao grupo controle, demonstrando aumento da ação da insulina. Neste contexto, é possível que a diminuição da glicemia e aumento da atividade da via da insulina após a suplementação com óleo de peixe descrita neste estudo seja atribuída em parte a diminuição das moléculas da via inflamatória. Várias evidências clínicas, epidemiológicas e experimentais foram realizadas na última década e têm conectado moléculas inflamatórias às doenças metabólicas, particularmente obesidade.

O tecido hepático deve considerado um órgão ativo na manutenção da glicemia e sua atividade pode estar relacionada a alguns dos efeitos benéficos da



suplementação de óleo de peixe sobre a sensibilidade à insulina e o metabolismo. A sinalização da insulina desempenha um papel importante no controle da expressão gênica de enzimas gliconeogênicas, incluindo a PEPCK, que catalisa a etapa limitante da gliconeogênese hepática (SUTHERLAND et al, 1996). Mais especificamente, a sinalização da insulina no hepatócito diminui a produção de glicose pelo fígado. Coletivamente, os dados evidenciam que a suplementação com o óleo de peixe melhora a sinalização da insulina e este mecanismo envolve a diminuição na inflamação no tecido hepático de camundongos.

O presente estudo apresenta limitações na metodologia. Embora a literatura demonstre que uma redução da inflamação resulta na melhora da ação da insulina, não conseguimos confirmar isso neste estudo. É provável que os dois eventos ocorreram em paralelo. No entanto, já que este é um estudo descritivo, a descoberta de que o tratamento crônico com o óleo de peixe na dose de 10mg/kg reduz os marcadores inflamatórios é uma possível explicação, dentre várias, de como o ômega 3 atua benéficamente melhora da ação da insulina. Estes resultados confirmam a hipótese e demonstram que a via inflamatória nos hepatócitos pode ser reduzidos pela suplementação com o óleo de e que isso leva a melhora na ação da insulina e pode ser uma ótima estratégia não farmacológica para reversão da resistência à insulina. Entretanto, mais estudos necessitam ser realizados a fim de estabelecer doses seguras de suplementação do óleo de peixe rico em ômega 3 para humanos. Além disso, estudos com o objetivo de avaliar possíveis efeitos colaterais pelo uso prolongado necessitam ser realizados.

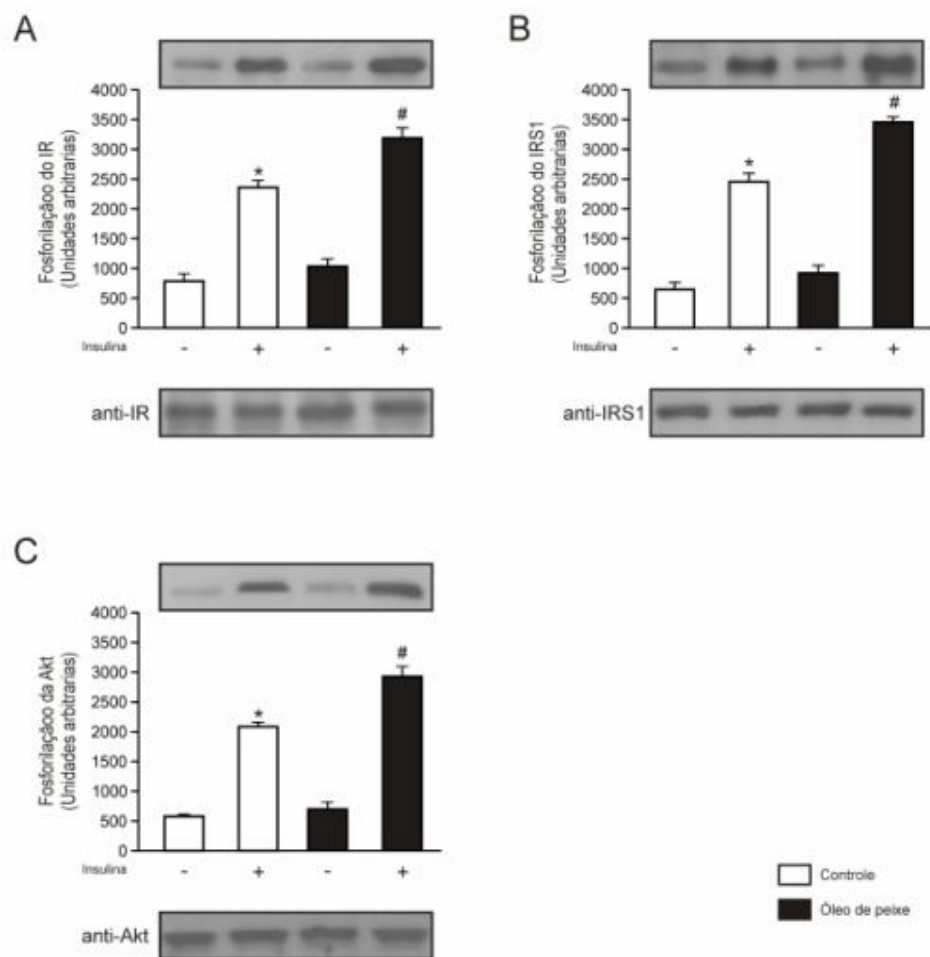


Figura 3 –Efeitos da suplementação de óleo de peixe na fosforilação de IR, IRS1 e Akt no tecido hepático de camundongos. \* $p < 0.05$ , ratos suplementados versus grupo controle.

## **6 CONCLUSÃO**

O presente estudo demonstrou que a suplementação de óleo de peixe diminuiu a glicemia de camundongos de forma dependente do tempo e da dose. Os efeitos mais relevantes foram observados com a dose de 10mg e suplementação por 21 dias além disso, este estudo demonstrou que a suplementação com o óleo de peixe reduz a expressão e atividade de moléculas pró-inflamatórias (JNK, NFkB e IκB) no fígado de camundongos. O estudo demonstrou também que estas alterações foram acompanhadas com o aumento da atividade de IR e IRS1 e Akt, o que significa aumento na transdução no sinal insulínico. Assim, estes dados sugerem que o óleo de peixe aumenta a sinalização intracelular da insulina e isso está relacionado à redução da via inflamatória no tecido hepático.

## REFERÊNCIAS

AGUIRRE, V.; UCHIDA, T.; YENUSH, L.; DAVIS, R.; WHITE, MF. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). **Journal of Biology Chemistry**, v.12, p.9047-9054. 2000.

ALBERTI, K.; ZIMMET, P.; Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabetic Medicine**, v.15, p.539-53, 1998.

ALESSI, D.R.; COHEN, P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. **Current Opinion in Genetics e Development**, v.8, n.1, p. 55-62, 1998.

AMARAL, M.E.; BARBUIO, R.; MILANSKI, M.; ROMANATTO, T.; BARBOSA, H.C.; NADRUZ, W.; BERTOLO, M.B.; BOSCHERO, A.C.; SAAD, M.J.; FRANCHINI, K.G.; VELLOSO, L.A. Tumor necrosis factor-alpha activates signal transduction in hypothalamus and modulates the expression of pro-inflammatory proteins and orexigenic/anorexigenic neurotransmitters. **Journal of Neurochemistry**, v. 98, p. 203-212, 2006.

ARKAN, M.C.; HEVENER, A.L.; GRETEN, F.R.; MAEDA, S.; LI, Z.W.; LONG, J.M.; WYNshaw-BORIS, A.; POLI, G.; OLEFSKY, J.; KARIN, M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. **Nature Medicines**, v.11,p.191-198, 2005.

ASANTE-APPIAH, E.; KENNEDY, B. P. Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action. *American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism*, v. 284, n.4, p.663-670, 2003.

BACKER, J.M.; MYERS, M.G.; SHOELSON, S.E.; CHIN, D.J.; SUN, X.J.; MIRALPEIX, M.; HU, P.; MARGOLIS, B.; SKOLNIK, E.Y.; SCHLESSINGER, J. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **EMBO Journal**, v.11, p. 3469-3479, 1992.

BALK, E.M.; LICHTENSTEIN, A.H.; CHUNGA, M.; KUPELNICK, B.; CHEWA, P.; LAUA, J. Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: A systematic review. **Atherosclerosis**, v.189, p.19 30, 2006.

BANG H.O.; DYERBERG, J. Plasma lipids and lipoproteins in Greenlandic west coast Eskimos. **Acta Medica Scandinavica**, v.192, p.85-94, 1972

BANG, H.O.; DYERBERG, J.; HJOORNE, N. The composition of food consumed by Greenland Eskimos. **Acta Medica Scandinavica**, v.200, p.69-73, 1976

BARBEAU, P.; LITAKER, M.S.; WOODS, K.F.; LEMMON, C.R.; HUMPHRIES, M.C.; OWENS, S.; GUTIN, B. Hemostatic and inflammatory markers in obese youths: effects of exercise and adiposity. **Journal of Pediatrician**, v.141, p 415-20, 2002.

BASTARD, J.P.; MAACHI, M.; LAGATHU, C.; KIM, M.J.; CARON, M.; VIDAL, H.; CAPEAU, J.; FEVE, B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **European Cytokine Network**, v.17, p. 4-12, 2006.

BENATTI, P.; PELUSO, G.; NICOLAI, R.; CALVANI, M. Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 4, p. 281-302, 2004

BODEN, G.; CHEN, X.; RUIZ, J.; WHITE, J.V.; ROSSETTI, L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. **Journal Clinical Investigation**, v. 93, p. 2438–2446, 1994.

BODEN, G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v.2, n. 18, p.139-143, 2011.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248–254, 1976.

CAMPBELL, P.J.; MANDARINO, L.J.; GERICH, J.E. Quantification of the relative impairment in actions of insulin on hepatic glucose production and peripheral glucose uptake in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Metabolism**, v.37,p.15-21, 1988.

CARTEE, G.D.; DEAN, D.J. Glucose transport with brief dietary restriction: heterogenous responses in muscles. **American Journal Physiology**, v. 266, n. p.946–952, 1994.

CHEN, R.; KIM, O.; YANG, J.; SATO, K.; EISENMANN, K.M.; MCCARTHY, J.; CHEN, H.; QIU, Y. Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p.31858–31862, 2001.

CROSS, D.A.; ALESSI, D.R.; COHEN, P.; ANDJELKOVICH, M.; HEMMING, B.A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v.378, p.785-789, 1995.

DAVIDSON, M. H. Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine  $\omega$ -3 fatty acids. **American Journal of Cardiology**, v. 98, n. 4A, p. 27i-33i, 2006.

DAVIDSON, M.H.; STEIN, E.A.; BAYS, H.E.; MAKI, K.C.; DOYLE, R.T.; SHALWITZ, R.A.; BALLANTYNE, C.M.; GINSBERG, H.N. for the Combination of prescription Omega-3 with Simvastatin (COMBOS) Investigators. Efficacy and tolerability of adding prescription omega-3 fatty acids 4 g/d to simvastatin 40 mg/d in hypertriglyceridemic patients: an 8-week, randomized, double-blind, placebocontrolled study. **Clinical Therapeutics**, v.29, n.7, p.1354-1367, 2007

DA LUZ, G.; FREDERICO, M.S.J.; DA SILVA, S.; VITTO, M.F.; CESCO NETTO, P.A.; PINHO, R.A.; PAULI, J.R.; SILVA, A.S.R.; CINTRA, D.E.; ROPELLE, E.R.; DE SOUZA, C.T. Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. **European Journal of Applied Physiology**, [Epub ahead of print], 2010.

DEMPSEY, P.W.; DOYLE, S.E.; CHENG, G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. **Cytokine Growth Factor Revist**, v. 14, p.193-209, 2003.

DE SOUZA C.T.; ARAUJO, E.P.; BORDIN, S.; ASHIMINE, R.; ZOLLNER, R. L.; BOSCHERO, A.C.; SAAD, M.J.; VELLOSO, L.A. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 146, p.4192–4199, 2005.

DE SOUZA, C.T.; FREDERICO, M.J.; DA LUZ, G.; CINTRA, D.E.; ROPELLE, E.R.; PAULI, JR; VELLOSO, LA. Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo1/HNF-4alpha pathway in insulin resistant mice. **Journal of Physiology**, v.588, p.2239-53, 2010.

DOWNWARD, J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 10, 262–267, 1998.

EL-BASSOSSY, H.M.; EL-MOSELHY, M.A.; MAHMOUD, M.F. Pentoxifylline alleviates vascular impairment in insulin resistance via TNF- $\alpha$  inhibition. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology**. [Epub ahead of print] 2011

ESLICK, G. D.; HOWE, P. R.; SMITH, C.; PRIEST, R.; BENSOUSSAN, A. Benefits of fish oil supplementation in hyperlipidemia: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Cardiology**, v. 136, n. 1, p. 4-16, 2009.

FALLON, K. E.; FALLON, S. K.; BOSTON, T. The acute phase response and exercise: court and field sports. **British Journal of Sports Medicine**, Loughborough, v. 35, p.170- 173, 2001.

FEDACKO, J.; PELLA, D.; MECHÍROVÁ, V.; HORVATH; P.; RYBÁR, R.; VARJASSYOVÁ, P.; VARGOVÁ, V. n-3 PUFAs From dietary supplements to medicines. **Pathophysiology**, v.14, p. 127-132, 2007.

FLACHS, P.; RÜHL, R.; HENSLER, M.; JANOVSKA, P.; ZOUHAR, P.; KUS; V.; MACEK JILKOVA, Z.; PAPP, E.; KUDA, O.; SVOBODOVA, M.; ROSSMEISL, M.; TSENOV, G.; MOHAMED-ALI, V.; KOPECKY, J. Synergistic induction of lipid catabolism and anti-inflammatory lipids in white fat of dietary obese mice in response to calorie restriction and n-3 fatty acids. **Diabetologia**, [Epub ahead of print] 2011.

GREGOR, M.F.; HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annual Review of Immunology**, v.29, p.415-45, 2011.

GRIFFIN, M.E.; MARCUCCI, M.J.; CKINE, G.W. BELL, K.; BARUCCI, N.; LEE, D.; GOODYEAR, L.J.; KRAEGEN, E.W.; WHITE, M.F.; SHULMAN, G.I. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activity of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. **Diabetes**, v. 48, p. 1270–1274, 1999.

GUAL, P.L.E; MARCHAND-BRUSTEL, Y.; TANTI, J.F. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. **Biochimie**, v.87, p.99-109, 2005.

GUPTA, S. Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in T cells from aged humans: a role of TNFR-I and downstream signaling molecules. **N Gerontology**, v.37, p.293-299, 2002.

HAMILTON, M.T.; HAMILTON, D.G.; ZDERIC, T.W. The role of low energy expenditure and sitting on obesity, metabolic syndrome, Type 2 diabetes, and cardiovascular disease. **Diabetes**, v.56, p.2655-2667, 2007.

HARPER, C.R.; JACOBSON, T.A. Useful of omega-3 fatty acids and the prevention of coronary hearty disease. **American Journal o Cardiology**, v.11, n.96, p.1521-1529, 2005.

HARRIS, W.S. Fish oil supplementation: evidence for health benefits. **Cleveland Clinic Journal of Medicine** v.71, n.3, p.208-210, 212, 215-218, 2004.

HAYASHI, T.; WOJTASZEWSKI, J.F.; GOODYEAR, L.J. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, v.273, p.1039-1051, 1997.

HIMSWORTH, H.P. Diabetes mellitus: its differentiation into insulin-sensitive and insulin insensitive types. **Lancet**, v.1, p.117–121, 1936.

HIROSUMI, J.; TUNCMAN, G.; CHANG, L.; GORGUN, C.Z.; UYSAL, K.T.; MAEDA, K.; KARIN, M.; HOTAMISLIGIL, G.S. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v. 420, p.333-336, 2002.

HORNG, T.; HOTAMISLIGIL, G.S. Linking the inflammasome to obesity-related disease. **Nature Medicine**, v.2, n.17, p.164-165, 2011.

HOTAMISLIGIL, G.S.; PERALDI, P.; BUDAVARI, A.; ELLIS, R.; WHITE, M.F.; SPIEGELMAN, B.M. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. **Science**.v. 271, p.665–668, 1996.

KARACABEY, K. Effect of regular exercise on health and disease. **Neuroendocrinology Letters**, v.26, p.617-623, 2005.

KIECOLT-GLASER, J.K.; BELURY, M.A.; ANDRIDGE, R.;MALARKEY, W.B.; GLASER, R. Omega-3 supplementation lowers inflammation and anxiety in medical

students: A randomized controlled trial. **Brain, Behavior, and Immunity**. [Epub ahead of print] 2011.

KOPELMAN, Peter G. Obesity as a medical problem, **Nature**, v. 404, 2000.

LEE, A.W.; COX, R.D. Use of mouse models in studying type 2 diabetes mellitus. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 6, n. 13, 2011.

LEE, J.H.; JARREAU, T.; PRASAD, A.; LAVIE, C.; O'KEEFE, J.; VENTURA, H. Nutritional assessment in heart failure patients. **Congestive Heart Failure**, v.17, n. 4, p. 199-203, 2011.

LI, C.; FORD, E.S. M.C. GUIRE, L.C. MOKDAD, A.H.; LITTLE, R.R.; REAVEN, G.M. Trends in Hyperinsulinemia Among Nondiabetic Adults in the U.S. **Diabetes Care**, v. 29, p.2396–2402, 2006.

MACEWAN, D.J. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. **Cell Signaling**, v.14, p. 477-492, 2002.

MEDEIROS, C.; FREDERICO, M.J.; DA LUZ, G. PAULI, J.R.; SILVA, A.S.R.; PINHO, R.A.; VELLOSO, L.A.; ROPELLE, E.E.; DE SOUZA, C.T. Exercise Training Reduces Insulin Resistance and Upregulates the mTOR/p70S6k Pathway in Cardiac Muscle of Diet-Induced Obesity Rats. **Journal of Cellular Physiology**, v.3, n.,226 p. 666-674, 2010.

MISRA, A.; SINGHAL, N.; KHURANA, L. Obesity, the metabolic syndrome, and type 2 diabetes in developing countries: role of dietary fats and oils. **Journal of American College of Nutrition**, v. 3, n. 29, p.289S-301S, 2010.

MORTON, G.J.; CUMMINGS, D.E.; BASKIN, D.G.; BARSH, G.S.; SCHWARTZ, M.W. Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature**, v.443, p. 289–295, 2006.

PAULI, J.R.; ROPELLE, E.R.; CINTRA, D.E.; CARVALHO-FILHO, M.A.; MORAES, J.C.; DE SOUZA, C.T.; VELLOSO, L.A.; CARVALHEIRA, J.B.; SAAD, M.J. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. **Journal of Physiology**, v.586, p.659–671, 2008.

PRADA, P.O.; ZECCHIN, H.G.; GASPARETTI, A.L.; TORSONI, M.A.; UENO, M.; HIRATA, A.E.; COREZOLA, D.O.; AMARAL, M.E.; HOER, N.F.; BOSCHERO, A.C.; SAAD, M.J. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. **Endocrinology**, v.146, p.1576–1587, 2005.

Reaven, G.M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v.21, p.296-309, 1988.

REAVEN, G.M. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. **Annual Reviews Medicine**, v. 44, p. 121–131, 1993.



Reaven, G.M. The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment. **Annual Reviews of Nutrition**. 25:391-406, 2005.

REAVEN, G.M. Insulin resistance: from bit player to centre stage. **Canadian Medical Association Journal**, v.44, p.121–131, 2011a.

REAVEN, G.M. Relationships among insulin resistance, type 2 diabetes, essential hypertension, and cardiovascular disease: similarities and differences. **Journal of Clinical Hypertension** (Greenwich, Conn). v.4, n.13, p.238-243, 2011b.

RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.8, p. 519–529, 2007.

ROPELLE, E.R.; PAULI, J.R.; PRADA, P.; DE SOUZA, C.T.; PICARDI, P.K.; FARIA, M.C.; CINTRA, D.E.; FERNANDES, M.F.; FLORES, M.B.; VELLOSO, L.A.; SAAD, M.J.; CARVALHEIRA, J.B. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. **Journal of Physiology**, v. 577, p.997–1007. 2006.

ROPELLE, E.R.; PAULI, J.R.; PRADA, P.; ; CINTRA, D.E.; ROCHA, G.; MORAES, J.; FREDERICO, M.J.S.; DA LUZ, G.; PINHO, R.A.; CARVALHEIRA, J.B.; VELLOSO, L.A.; SAAD, M.J.; DE SOUZA, C.T. Inhibition of hypothalamic Foxo1 expression reduced food intake in diet-induced obesity rats, **Journal of Physiology**, v. 587, p.2341–2341, 2009.

SAKAKURA, Y; SHIMANO, H; SONE, H; TAKAHASHI, A; INOUE, N; TOYOSHIMA, H; SUZUKI, S; YAMADA, N; SAKAKURA, Y; SHIMANO, H; SONE H. Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.286, p.176-183, 2001.

SALAZAR, M.R.; CARBAJAL, H.A.; ESPECHE, W.G.; DULBECCO, C.A.; AIZPURÚA, M.; MARILLET, A.G.; ECHEVERRÍA, R.F.; REAVEN, G.M. Relationships among insulin resistance, obesity, diagnosis of the metabolic syndrome and cardio-metabolic risk. **Diabetes e Vascular Diseases Research**, v.2,n. 8, p.109-116, 2011.

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

SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. Tratamento e acompanhamento do Diabetes Mellitus**, 2007.

SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v.118, p. 2992-3002. 2008.

SHOELSON, S.E. ; LEE, J. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. **International Journal of Obesity**, v. 27, n.3, p.49-52, 2003.

STEIN, C.J; COLDITZ, G.A. The epidemic of obesity. **Journal Clinical of Endocrinology and Metabolism**, v. 89, p.2522–2525, 2004.

STONE, 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. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.78, p.1128-1134, 2003.

SURESHI, Y.; DAS, U.N. Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids and Chemically Induced Diabetes Mellitus:Effect of  $\omega$ -3 Fatty Acids, **Applied Nutritional** , v.19, p.213-228, 2003.

SUTHERLAND, C.; O'BRIEN, R.M.; GRANNER, D.K. New connections in the regulation of PEPCK gene expression by insulin. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.1336, p.191–199, 1996.

STERN, S.E.; WILLIAMS, K.; FERRANNINI, E.; DEFRONZO, R.A.; BOGARDUS, C.; STERN, M.P. Identification of individuals with insulin resistance using routine clinical measurements. **Diabetes**, v.54; p.333-9; 2005.

TANIGUCHI, C.M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C.R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.7, p.85-96, 2006.

THIRONE, A.C.; HUANG; C.; KLIP, A. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. **Trends in Endocrinology and Metabolism** v.17, p.72-78, 2006.

THIRONE, A.C; CARVALHEIRA, J.B.; HIRATA, A.E.; VELLOSO, L.A.; SAAD; M.J. Regulation of Cbl-associated protein/Cbl pathway in muscle and adipose tissues of two animal models of insulin resistance. **Endocrinology**, v.145, p.281-93, 2004.

TUNCMAN, G.; HIROSUMI, J.; SOLINAS, G.; CHANG, L.; KARIN, M.; HOTAMISLIGIL, G.S. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. **Proceedings of National Academy of Science of United State of América**, v.103, p.10741– 10746, 2006.

TULL, S.P.; YATES, C.M.; MASKREY, B.H.; O'DONNELL, V.B.; MADDEN, J.; GRIMBLE, R.F.; CALDER, P.C.; NASH, G.B.; RAINGER, G.E. Omega-3 Fatty acids and inflammation: novel interactions reveal a new step in neutrophil recruitment. **PLoS Biology**, v.8, n. 7, 2009.

VERGILIO; J.; VISENTAINER; P.; CARVALHO; M.; IKEGAKI; Y. Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes

marinhos da costa brasileira. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. v. 20 n.1  
Campinas, 2000.

YOUNGREN, J.F. Regulation of insulin receptor function. **Cellular Molecular. Life Science**, v. 64, p. 873 – 891, 2007