

Suplementação de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 reduz marcadores inflamatórios e melhora a ação da insulina em fígado de camundongos

Polyunsaturated fatty acids omega-3 supplementation reduces inflammatory markers and improves insulin action in liver of mice

Gabrielle da LUZ¹
Sabrina da SILVA¹
Schérolin MARQUES¹
Thaís Fernandes LUCIANO¹
Cláudio Teodoro de SOUZA¹

RESUMO

Objetivo

Avaliar os efeitos da suplementação do ácido graxo poli-insaturado ômega-3 (n-3) sobre a sinalização da insulina e via pró-inflamatória no tecido hepático de camundongos.

Métodos

Camundongos *Swiss* foram divididos em seis grupos que receberam, por gavagem esofágica, diferentes doses de óleo de peixe contendo ômega-3 (1mg, 5mg, 10mg e 50mg). O grupo-controle recebeu água. Para determinar os efeitos do ômega-3 dependentes de dose e tempo, a glicemia de jejum foi avaliada nos dias 0 (sem suplementação), 14 e 21 (após suplementação). Como o grupo n-3-21dias (21 dias de suplementação) apresentou menor nível de glicemia, esse intervalo de tempo foi selecionado para as análises moleculares. Após jejum de 8 horas, amostras do tecido hepático foram obtidas do grupo-controle, e n-3-21dias e análises das vias de sinalização da insulina e pró-inflamatória foram realizadas por *western blot*.

Resultados

Os resultados mostraram que a dose de 10mg induziu maior redução na glicemia no 14º e no 21º dias quando comparada às demais doses. Dessa forma, essa foi a dose utilizada nos experimentos de análises moleculares

¹ Universidade do Extremo Sul Catarinense, Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício. Av. Universitária, Bairro Universitário, 88806-000, Criciúma, SC, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: G LUZ. E-mail: <gabrielle.daluz@hotmail.com>.

e foi a que diminuiu de forma significativa a fosforilação da c-Jun N-terminal quinase e quinase e níveis proteicos do fator de transcrição Kappa B. Em paralelo, foi observado aumento na fosforilação do receptor da insulina, substrato do receptor de insulina 1 e proteína quinase B.

Conclusão

O presente estudo sugere que o ômega-3 induza melhora na via de sinalização da insulina no fígado de camundongos, pelo menos em parte, por reduzir inflamação. Esses resultados podem explicar menores níveis de glicose de jejum.

Termos de indexação: Ácidos graxos insaturados. Fígado. Inflamação. Resistência à insulina.

ABSTRACT

Objective

The aim of the present study was to assess the effects of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on insulin signaling and the pro-inflammatory pathway in the liver tissue of mice.

Methods

Swiss mice were divided into six groups given different dosages of fish oil containing omega-3 (1mg, 5mg, 10mg and 50mg) by gavage. The control group was given water. Fasting plasma glucose was measured on days 0 (no supplementation), 14 and 21 (after supplementation) to determine the dosage and time-dependent effects of omega-3. Because the group n-3-21days (21 days of omega-3 supplementation) demonstrated lower blood glucose, this time interval was selected for molecular analysis. After an 8-hour fast, liver tissue samples were taken from the control and n-3-21days groups, and western blot analyses were performed to assess insulin signaling and the pro-inflammatory pathway.

Results

The results showed that the dosage of 10mg leads to greater reduction in blood glucose at 14 and 21 days when compared with other dosages. Thus, this dosage was selected for molecular analysis. This dosage significantly decreased phosphorylation of c-Jun N-terminal protein kinase and I κ B kinase and protein levels of nuclear factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells. In parallel, increased insulin pathway signaling was observed, as confirmed by increases in insulin receptors, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B phosphorylation.

Conclusion

The present study suggests that omega-3 fatty acids improve insulin signaling by reducing inflammation. These results may be one of the explanations for low fasting glucose.

Indexing terms: Fatty acids, unsaturated. Liver. Inflammation. Insulin resistance.

INTRODUÇÃO

A ingestão de Ácidos Graxos Poli-Insaturados (AGPI) da família do ômega-3 é essencial à saúde humana. O ômega-3 é encontrado abundantemente no leite materno e nos peixes de água fria, que contêm os Ácidos Graxos Eicosa-pentaenoico (EPA, 20:5, n-3) e Docosaenoico (DHA, 22:6, n-3). Diversos benefícios do ômega-3 vêm sendo apontados, inclusive a melhora da homeostasia da glicose, que envolve diversos mecanismos moleculares, tais como a estimulação da via de sinalização da insulina^{1,2}. No tecido

hepático de roedores e humanos, observa-se que a ativação do Receptor da Insulina (IR), do Substrato do Receptor de Insulina 1 (IRS1) e Proteína Quinase B (Akt) desempenham importante função na captação de glicose e principalmente na regulação da produção hepática de glicose³⁻⁶. Isso é importante uma vez que elevada produção hepática de glicose pode estar relacionada à hiperglicemia de jejum em pacientes diabéticos^{7,8}. A principal explicação para isso é que, em indivíduos diabéticos, a menor ação hepática da insulina culmina com aumento nos níveis proteicos e na atividade das enzimas gliconeogênicas, tais

como Fosfoenolpiruvato Quinase (PEPCK) e Glicose-6 Fosfatase (G6Pase)^{9,10}.

Entretanto, tem sido claramente descrito na literatura que citocinas inflamatórias interferem na via de sinalização da insulina e atuam negativamente na funcionalidade do IR e do IRS, pois uma vez fosforilados em serina por proteínas inflamatórias, a possibilidade de serem fosforilados em tirosina fica comprometida, contribuindo para a Resistência à Insulina (RI)¹¹⁻¹³. As principais moléculas da via inflamatória são o I kappa B Quinase (IKK), Fator Nuclear Kappa B (NF-κB) e *c-Jun N-terminal Quinase* (JNK)¹⁴. Estudos têm demonstrado os efeitos anti-inflamatórios do ômega-3¹⁵. Apesar de seu mecanismo não estar bem estabelecido, algumas explicações têm sido propostas. O tratamento com ômega-3 mostrou-se eficiente na redução da fosforilação da JNK^{16,17} e no bloqueio da via IKK/NF-κB¹⁸⁻¹⁹. Dessa forma, o bloqueio da via inflamatória por meio do ômega-3 poderia aumentar a transdução do sinal insulínico no tecido hepático.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar se a ação anti-inflamatória do ômega-3 melhoraria a sinalização hepática da insulina e relacionar esse fato à homeostase da glicose de jejum em camundongos.

MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 50 camundongos *Swiss*, machos, com dois meses de idade. Os animais foram obtidos a partir do Centro de Bioterismo da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), alojados em caixas plásticas e mantidos em ambiente com temperatura controlada (24°C), com ciclo claro-escuro de 12 horas. Os camundongos foram alimentados com ração comercial padrão (carboidrato: 70%; proteína: 20%; gordura 10%; no total de 3,8kcal/g) para roedores (Nuvital Nutrientes S.A., Colombo, PR, Brasil), ofe-

recida *ad libitum*. Os animais foram divididos em grupos (n=10) de acordo com a dose de ômega-3 suplementada: 1; 5; 10mg e 50mg de uma mistura encapsulada (1.000mg por cápsula) de ácidos graxos contendo 540mg de EPA, 100mg de DHA e 2mg de vitamina E (Biotik do Brasil Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil). Camundongos que receberam água foram denominados controles. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios e os procedimentos descritos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense (Protocolo nº 91/2009).

Suplementação de ômega-3 e determinação da dose e do tempo

Os animais foram suplementados por gavagem esofágica, por meio de uma cânula específica para esse procedimento. Os grupos de camundongos receberam as doses de ômega-3 ou água por 21 dias. O peso corporal dos animais foi avaliado. A variabilidade do peso corporal não foi significativa entre os grupos durante os 21 dias (dados não mostrados). Como o objetivo era avaliar os efeitos da suplementação de ômega-3 sobre a homeostase da glicose, a glicemia foi avaliada. Após 8 horas de jejum, foi efetuado um pequeno corte na extremidade caudal dos animais e uma gota de sangue foi analisada por meio de um glicosímetro. Os tempos utilizados para análise foram: zero dia (antes da primeira suplementação - não suplementado); 14 dias (suplementação) e 21 dias (suplementação). Os resultados foram expressos em mg/dL. O tempo de 21 dias e a dose de 10mg apresentaram maior redução nos níveis sanguíneos, e por isso foram utilizados para os testes de análises moleculares por *Western blot*. Para isso, dois outros grupos de animais foram utilizados: grupo-controle (gavagem com água) e grupo suplementado com 10mg de ômega-3 por 21 dias (n=3-21 dias). Esses procedimentos foram similares aos descritos acima.

Extração do tecido e *Western blot*

No 21º dia e após 8 horas de jejum, os camundongos foram anestesiados com ketamina (50mg/kg, Ketalar; Parke-Davis, Ann Arbor, MI) e xilazina (20mg/kg, Rompin/Bayer, Leverkusen). Posteriormente, foi aberta a cavidade abdominal e injetada solução fisiológica (grupo negativo (-), 0,1mL) ou insulina regular (grupo positivo (+), 0,1mL, 10⁻⁶) pela veia cava inferior do animal. Após injeção da insulina (Humulin R; Eli Lilly, Indianapolis, USA), foram coletados fragmentos de tecido hepático, colocados imediatamente em tampão de extração específico (1% Triton-X 100, 100mM Tris, pH 7,4, contendo 100mM pirofosfato de sódio, 100mM fluoreto de sódio, 10mM EDTA, 10mM vanadato de sódio, 2mM PMSF e 0,1mg de aprotinina/mL) e homogeneizados em processador *polytron* (*Polytron* MR 2100, Kinematica, Suíça). Ao final da extração, foi adicionado Triton X-100 em todas as amostras, que foram mantidas em gelo. Após quarenta minutos, os materiais extraídos e homogeneizados foram submetidos à centrifugação para remoção do material insolúvel. Utilizou-se a velocidade de 11.000rpm por 40 minutos a 4°C. Uma parte do sobrenadante foi utilizada para determinar a concentração proteica pelo método colorimétrico de biureto²⁰; outra parte foi utilizada para avaliação do extrato total, ou seja, separação das proteínas em *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE), com tampão de Laemmli²¹.

Alíquotas contendo 250µg de proteína por amostra foram aplicadas sobre gel de poliacrilamida SDS-PAGE, de 1,5mm de espessura. A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da Bio Rad (Mini-Protean), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. Na sequência, as proteínas separadas no SDS-PAGE foram transferidas para a membrana de nitrocelulose por duas horas, sob refrigeração contínua por gelo. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora por duas horas, à temperatura ambiente, para diminuir a ligação inespecífica de

proteínas. A seguir, as membranas foram lavadas com solução basal por 3 sessões de 5 minutos e incubadas com anticorpos específicos. Os anticorpos usados foram anti-IR, anti-IRS1, anti-Akt, anti-pIR, anti-pIRS1, anti-pAkt^{ser473}, anti-IKKα/β e anti-JNK, obtidos da Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA), e anti-pIKKα/β, anti-NF-κB, anti-pJNK e anti-α-Tubulina, obtidos da Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA). Após incubação primária, as membranas foram lavadas novamente com solução basal por 3 sessões de 5 minutos e incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase para quimioluminescência (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). A intensidade das bandas foi determinada através da leitura das autorradiografias reveladas por densitometria ótica, por meio de um *scanner* (HP® G2710) e do programa *Scion Image* (*Scion Corporation*®).

Análise estatística

Os dados de *Western blot* foram expressos como média e erro-padrão da média da área da banda e analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) *one-way*, seguidos por teste *pos-hoc* de Bonferroni. Foram considerados significantes valores de $p < 0,05$. Para análise estatística, foi utilizado o *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) (versão 16.0) para Windows

RESULTADOS

Quanto aos dados relativos à curva dose-resposta e tempo-dependente da glicemia de jejum de camundongos-controle e suplementados com diferentes doses de óleo de peixe nos dias 0, 14º e 21º, a análise dos resultados demonstrou uma redução estatisticamente significativa na glicemia de jejum nos grupos 5mg e 10mg a partir do 21º e 14º dia respectivamente (Figura 1). No entanto, o grupo 10mg apresentou redução na glicemia no dia 21º ainda maior em relação ao 14º dia e em relação ao grupo 5mg ($p < 0,05$).

Dessa forma, o tempo 21 dias e a dose 10mg foram usados para as análises moleculares.

As análises moleculares por *immunoblotting* demonstraram que a suplementação com 10mg de ômega-3 reduziu significativamente a fosforilação da IKK α/β (Figura 2A) e a expressão de NF- κ B (Figura 2B) quando comparada à suplementação do grupo-controle no tecido hepático ($p < 0,05$). Além disso, observou-se a diminuição da fosforilação da JNK (Figura 2C) no grupo

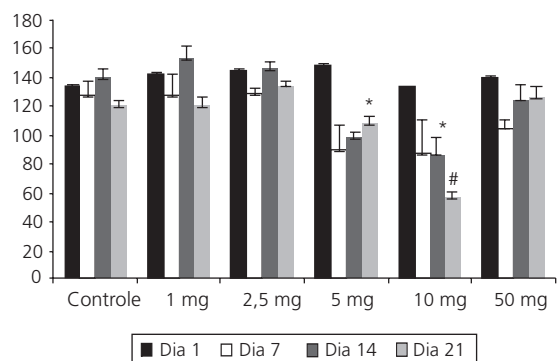


Figura 1. Efeitos da suplementação de óleo de peixe em diferentes doses e diferentes tempos de tratamentos na glicemia de jejum de camundongos.

Nota: * $p < 0,05$, Camundongos suplementados *versus* grupo-controle; # $p < 0,05$, grupo 10mg no 21º dia *versus* grupo 10mg no 14º dia.

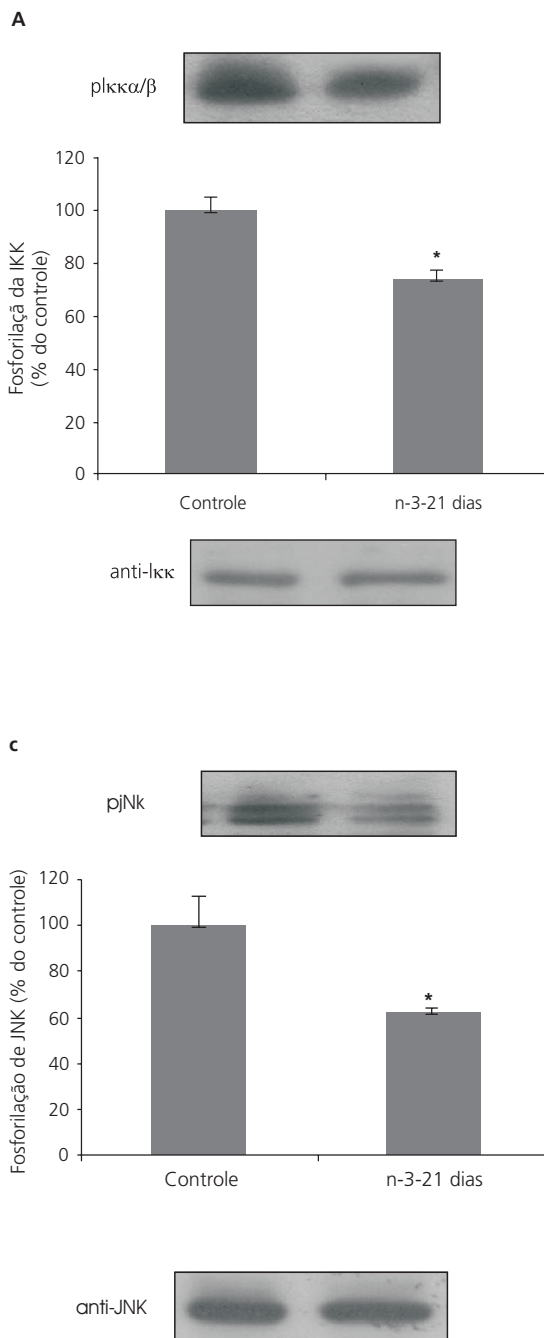
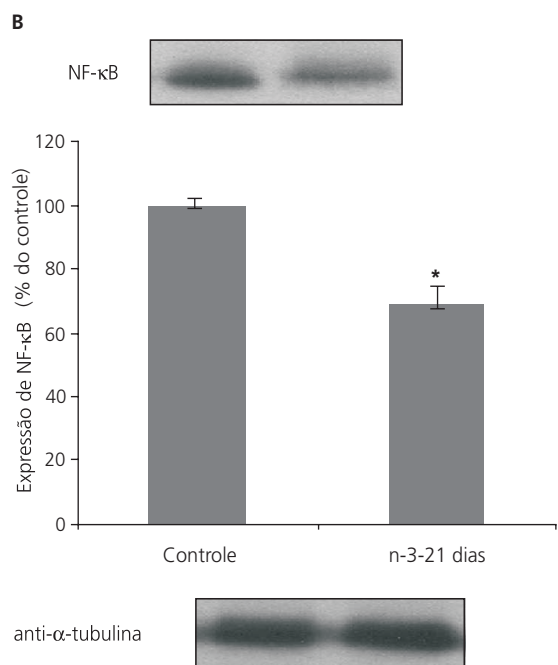


Figura 2. Efeitos da suplementação de 10mg de óleo de peixe na sinalização na fosforilação da IKK e JNK e expressão de NF κ B no hepatócito de camundongos.

Nota: * $p < 0,05$, n-3-21 dias *versus* grupo-controle. IKK: I kappa B Quinase; JNK: *c-Jun N-terminal* Quinase.

n-3-21 dias em comparação ao grupo-controle com $p < 0,05$. As expressões proteicas de JNK e de IKK α/β não foram diferentes (imagens nos painéis inferiores em Figura 2A e Figura 2C, respectivamente).

Por fim, foi avaliada a fosforilação em tirosina de IR (Figura 3A) e IRS1 (Figura 3B) e fosforilação em serina da Akt (Figura 3C) no tecido hepático de camundongos-controle e n-3-21 dias após oito horas de jejum. A estimulação com a

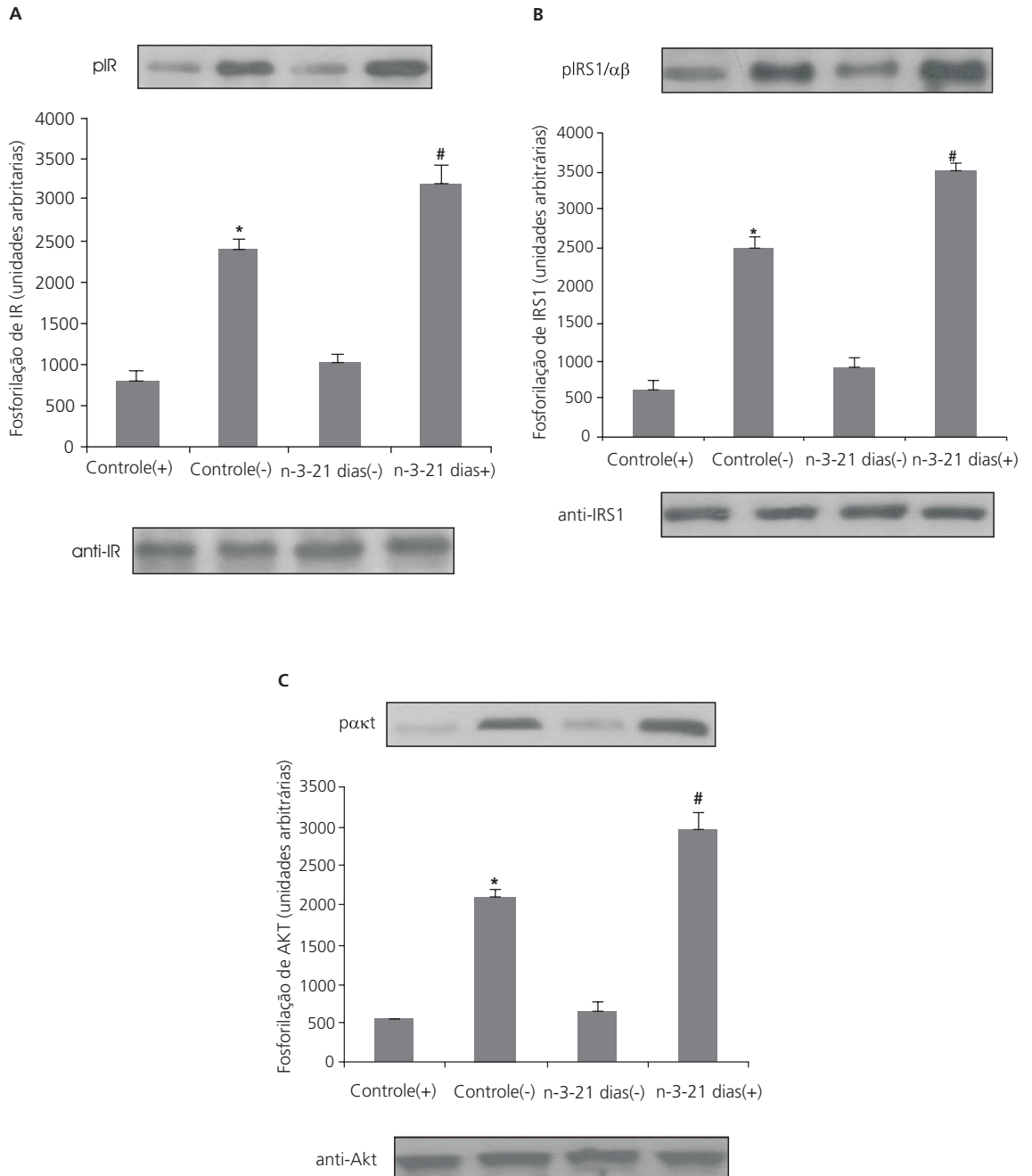


Figura 3. Efeitos da suplementação de óleo de peixe na fosforilação de IR, IRS1 e Akt no tecido hepático de camundongos.

Nota: * $p < 0,05$, n-3-21 dias versus grupo-controle estimulado por insulina (+); IR: Receptor de Insulina; IRS1: Substrato do Receptor de Insulina 1; AKT: Proteína Quinase B.

insulina exógena (+) promoveu o aumento da fosforilação de IR, IRS1 e Akt nos dois grupos, controle e tratado, quando comparada aos respectivos grupos-controle (-), que receberam salina. No entanto, quando analisados ambos os grupos estimulados com insulina (+), observou-se maior fosforilação do IR, IRS1 e Akt no grupo n-3-21 dias quando comparado ao controle (Figuras 3A, 3B e 3C, respectivamente).

DISCUSSÃO

Durante as últimas décadas, pesquisas têm caracterizado mecanismos moleculares de RI. Múltiplos sinais de crescimento e inflamatórios, entre outros, podem ativar enzimas fosfatases e serinas quinases e diminuir a via de transdução do sinal insulínico^{22,23}. A ação da insulina no tecido hepático envolve a via IR/IRS1/Akt. Aumento na sinalização da insulina, por exemplo, no período pós-prandial, diminui a gliconeogênese hepática e a glicemia. Entretanto, defeitos na via IR/IRS1/Akt podem estar relacionados ao aumento na gliconeogênese e glicogenólise: o que pode resultar em aumento na produção hepática de glicose e nos níveis glicêmicos^{2-4,24}.

Diversos mecanismos vêm sendo implicados na RI; dentre eles, a inflamação subclínica tem destaque. Distúrbios na via inflamatória, mais especificamente sua exacerbação, precedem e acompanham a progressão da RI e doenças a ela associadas, como DM-2 e obesidade^{12,23}. Por outro lado, foram identificadas características anti-inflamatórias no ômega-3²⁵, que, por isso, vem sendo foco de estudo no tratamento da RI²⁶. Com a confirmação do papel benéfico do ômega-3 sobre a inflamação e sobre a ação da insulina, é provável que o uso de ácido graxo poli-insaturado ômega-3 EPA e de DHA possa diminuir o *status* inflamatório, aumentar a ação da insulina em fígado de camundongos e, possivelmente, reduzir a glicemia.

No presente estudo, demonstra-se que a suplementação com ômega-3 diminuiu os níveis

glicêmicos de modo dependente da dose e do tempo. Em paralelo, a diminuição da glicemia foi acompanhada do aumento da via de sinalização molecular da insulina e diminuição da via inflamatória. Os resultados demonstram que a ação potencial da suplementação com ômega-3 na diminuição dos níveis glicêmicos é dependente da dose e do tempo de tratamento. Os grupos suplementados com 5mg e 10mg apresentaram alterações glicêmicas importantes, com diminuição significativa da glicemia de jejum a partir do 14º e 21º dia respectivamente. De forma interessante, a menor e a maior dose não demonstraram efeito na glicemia dos animais neste experimento. A partir dos resultados glicêmicos, a dose 10mg/dia durante 21 dias foi selecionada para a análise das moléculas pró-inflamatórias. Análises das amostras do tecido hepático de camundongos mostraram reduzida fosforilação da JNK e do IKK e níveis proteicos do NF-κB nos animais suplementados com ômega-3, o que demonstra claramente que ômega-3 reverteu a fosforilação das moléculas pró-inflamatórias e sugere diminuição do *status* inflamatório no fígado. Esses resultados estão em concordância com estudos prévios^{16,20}.

Conforme descrito acima, mecanismos inflamatórios estão envolvidos na patogênese da RI. Nesse contexto, é possível que a diminuição da glicemia e de moléculas pró-inflamatórias esteja relacionada ao aumento da atividade da via da insulina após a suplementação com ômega-3. confirmação e compreensão das alterações metabólicas ocorridas após suplementação com ômega-3, as importantes proteínas responsáveis pela transdução do sinal insulínico IR, IRS-1 e Akt foram avaliadas. Os resultados mostraram que a sensibilidade ao hormônio estava preservada: estes resultados eram esperados, uma vez que animais alimentados com dieta padrão demonstram esse comportamento na ação desse hormônio^{9,27-28}. De modo interessante, nos animais que receberam ômega-3, foi observado um aumento significativo na fosforilação do IR, IRS1 e Akt, em comparação ao grupo-controle.

Coletivamente, esses dados demonstram que a suplementação com ômega-3 promoveu a diminuição da glicemia de jejum; essa alteração foi acompanhada da diminuição da via inflamatória e do aumento da ação da insulina no fígado e ocorreu na ausência de mudança no peso corporal.

Esses resultados são interessantes uma vez que o fígado é um importante órgão na manutenção da glicemia. Assim, os benefícios da suplementação com ômega-3 sobre o metabolismo pode ser dependente da sua ação sobre o tecido hepático⁹. A sinalização da insulina desempenha um papel importante no controle da expressão gênica de enzimas gliconeogênicas, incluindo a fosfoenolpiruvato Carboxiquinase (PEPCK), que catalisa a etapa limitante da gliconeogênese hepática. Mais especificamente, a ação da insulina no hepatócito diminui a produção hepática de glicose^{28,29}. Enfim, os dados evidenciam que a suplementação com ômega-3 melhora a ação da insulina, e que esse mecanismo envolve a diminuição na inflamação no tecido hepático de camundongos.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a suplementação de óleo de peixe contendo EPA e DHA 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. Em paralelo às alterações da glicemia, o estudo verificou o aumento da fosforilação de IR e IRS1 e Akt, o que significa aumento na transdução no sinal insulínico no fígado. O aumento na sinalização da insulina pode ter ocorrido devido à redução na expressão e fosforilação de moléculas pró-inflamatórias. Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que o ômega-3 induza melhora na via de sinalização da insulina no fígado de camundongos, pelo menos em parte, por reduzir inflamação. Esses resultados podem explicar menores níveis de glicose de jejum.

COLABORADORES

G LUZ participou das análises fisiológicas e moleculares, da interpretação dos resultados e da redação do artigo. S SILVA participou das análises fisiológicas e moleculares. S MARQUES participou das análises moleculares. TF LUCIANO participou das análises moleculares. CT SOUZA participou da concepção da pesquisa, da interpretação dos resultados e da redação do artigo.

REFERÊNCIAS

1. Kiecolt-Glaser JK, Belury MA, Andridge R, Malarkey WB, Glaser R. Omega-3 supplementation lowers inflammation and anxiety in medical students: a randomized controlled trial. *Brain Behav Immun.* 2011; 29(8):1725-34. doi:10.1016/j.bbi.2011.07.29.
2. Wu JH, Micha R, Imamura F, Pan A, Biggs ML, Ajaz O, *et al.* Omega-3 fatty acids and incident type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Br J Nutr.* 2012; 107 (Suppl 2):S214-27. doi: 10.1017/S0007114512001602.
3. Alessi DR, Cohen P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev.* 1998; 8(1):55-62. doi: 10.1016/S0959-437X(98)0062-2.
4. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001; 414:799-806. doi:10.1038/414799a.
5. Younggreen JF. Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64 (7-8):873-91. doi: 10.1007/s00018-007-6359-9.
6. Barthel A, Schmolli D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 285(4):E685-692. doi: 10.1152/ajpendo.00253.
7. Deckelbaum RJ, Torrejon C. The omega-3 fatty acid nutritional landscape: health benefits and sources. *J Nutr.* 2012; 142(3):587S-91S. doi: 10.3945/jn.11.148080.
8. Drewes T, Senkel S, Holewa B, Ryffel GU. Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. *Mol Cell Biol.* 1996; 16(3):925-31.
9. Schmolli D, Walker KS, Alessi DR, Grempler R, Burchell A, Guo S, *et al.* Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase B α and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -

- independent effects of insulin on promoter activity. *J Biol Chem.* 2000; 275:36324-33. doi: 10.1074/jbc.M003616200.
10. Souza CT, Frederico MJ, Luz G, Cintra DE, Ropelle ER, Pauli JR, *et al.* Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo1/Hnf-4alpha pathway in insulin resistant mice. *J Physiol.* 2010; 588(Pt12):2239-53. doi: 10.1113/jphysiol.2009.183996.
 11. Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis, R, White MF. The c-Jun N-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of ser(307). *J Biol Chem.* 2000; 275(12):9047-54. doi: 10.1074/jbc.275.12.9047.
 12. Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, *et al.* Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology.* 2005; 146(3):1576-87. doi: 10.1210/en.2004-0767.
 13. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha - and obesity - induced insulin resistance. *Science.* 1996; 271(5249):665-8. doi: 10.1126/science.271.5249.665.
 14. Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis, R, White MF. The c-Jun N-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of ser(307). *J Biol Chem.* 2000; 275(12):9047-54. doi: 10.1074/jbc.275.12.9047.
 15. Shoelson SE, Lee J. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003; 27(Suppl 3):S49-52. doi:10.1038/sj.ijo.0802501.
 16. Tull SP, Yates CM, Maskrey BH, O'Donnell VB, Madden J, *et al.* Omega-3 fatty acids and inflammation: novel interactions reveal a new step in neutrophil recruitment. *PLoS Biol.* 2009; 7(8):e1000177. doi: 10.1371/journal.pbio.1000177.
 17. Pallarès V, Calay D, Cedó L, Castell-Auví A, Raes M, Pinent M, *et al.* Enhanced anti-inflammatory effect of resveratrol and EPA in treated endotoxin-activated RAW 264.7 macrophages. *Br J Nutr.* 2012; 6:1-12. [Epub ahead of print].
 18. Lu J, Borthwick F, Hassanali Z, Wang Y, Mangat R, Ruth M, *et al.* Chronic dietary n-3 PUFA intervention improves dyslipidaemia and subsequent cardiovascular complications in the JCR:LA - cp rat model of the metabolic syndrome. *Br J Nutr.* 2011; 105(11):1572-82. [Epub ahead of print].
 19. Singer P, Shapiro H, Theilla M, Anbar R, Singer J, Cohen J. Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective. *Intensive Care Med.* 2008; 34(9):1580-92. [Epub 2008].
 20. Spencer L, Mann C, Metcalfe M, Webb M, Pollard C, Spencer D, *et al.* The effect of omega-3 FAs on tumour angiogenesis and their therapeutic potential. *Eur J Cancer.* 2009; 45(12):2077-86. [Epub 2009].
 21. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72(7):248-54.
 22. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680-5. doi:10.1038/227680a0.
 23. Chen R, Kim O, Yang J, Sato K, Eisenmann KM, Mccarthy J, *et al.* Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 2001; 276(34):31854-62. doi: 10.1074/jbc.C100271200.
 24. Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003; 14(3-4):193-209. doi: 10.1016/S1359-6101(03)00021-2.
 25. Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Opin Cell Biol.* 1998; 10(2):262-7. doi: 10.1016/S0955-0674(98)0149-X.
 26. Sureshi Y, Das UN. Long-chain polyunsaturated fatty acids and chemically induced diabetes mellitus: effect of omega-3 fatty acids. *Nutrition.* 2003; 19(2):93-114.
 27. Flachs P, Rühl R, Hensler M, Janovska P, Zouhar P, Kus V, *et al.* 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.* 2011; 54(10):2626-38. doi: 10.1007/s00125-011-2233-2.
 28. Da Luz G, Frederico MSJ, Da Silva S, Vitto MF, Cesconetto PA, Pinho RA, *et al.* Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. *Eur J Appl Physiol.* 2011; 111(9):2015-23. doi: 10.1007/s00421-010-1802-2.
 29. Sutherland C, O'Brien RM, Granner DK. New connections in the regulation of PEPCK gene expression by insulin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1996; 351(1336):191-9. doi: 10.1098/rstb.1996.0016.

Recebido em: 28/9/2011
 Versão final em: 21/6/2012
 Aprovado em: 12/7/2012

