

## INFLUÊNCIA DO ÔMEGA-3 EM MARCADORES DE SENSIBILIDADE À INSULINA

**VÂNIA PEREIRA OLIVEIRA<sup>1</sup>; CAROLINA B. JACOMETO<sup>2</sup>, EDUARDO SCHMITT<sup>3</sup>, LUIZ F. PFEIFER<sup>4</sup>, MARCIO N. CORRÊA<sup>5</sup>, AUGUSTO SCHNEIDER<sup>6</sup>**

<sup>1</sup> *Universidade Federal de Pelotas – vania\_svp@hotmail.com*

<sup>2</sup> *Universidade Federal de Pelotas- cbjacometo@gmail.com*

<sup>3</sup> *EMBRAPA, Rondônia- schmitt.edu@gmail.com*

<sup>4</sup> *EMBRAPA, Rondônia- luizufpel@gmail.com*

<sup>5</sup> *Universidade Federal de Pelotas- marcio.nunescorrea@gmail.com*

<sup>6</sup> *Universidade Federal de Pelotas – augustoschneider@gmail.com*

### 1. INTRODUÇÃO

Há duas famílias principais de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI): a família ômega-3 e ômega-6, das quais os mais conhecidos componentes são o ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3, n-3, LNA) e ácido linoleico (18:2, n-6, LA) respectivamente, considerados ácidos graxos essenciais, pois só podem ser adquiridos através da dieta. Ambos os ácidos, Ômega-6 e Ômega-3 têm sido associados a efeitos benéficos para a saúde cardiovascular. Entretanto, a importância da relação n-6/n-3 fundamenta-se na competição existente entre eles (SANTOS et. al., 2013). Diversos benefícios do ômega-3 vêm sendo apontados, inclusive a melhora na homeostasia da glicose, que envolve diversos mecanismos moleculares, tais como a estimulação da via de sinalização da insulina (KIECOLT et. al., 2011; WU et. al., 2012). Além disso, foram identificadas características anti-inflamatórias e antioxidantes no AGPI ômega-3, dois fatores importantes na resistência à insulina (SURESH e DAS, 2003).

A insulina é um polipeptídeo secretado pelas células Beta do pâncreas, com importante papel na homeostase da glicose (EHRMANN, 2005). A sinalização intracelular da insulina começa com a sua ligação a um receptor específico de membrana. Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos proteicos em tirosina (PATTI; KAHN, 1998; PESSIN; SALTIEL, 2000). A fosforilação das proteínas IRS cria sítios de ligação para outra proteína citosólica, denominada fosfatidilinositol 3-quinase (PI3q), promovendo sua ativação (BACKER et al., 1992). A ativação da PI3q aumenta a fosforilação em serina da proteína quinase B (Akt) e isso permite o transporte de glicose nos tecidos, através da translocação da proteína GLUT4 para a membrana celular (CZECH, COVERA 1999). A obesidade, especialmente do tipo visceral, leva ao desenvolvimento da resistência à ação da insulina no fígado, sendo esta uma das principais causas do desenvolvimento da intolerância a glicose e subsequente do Diabetes Mellitus (DM) tipo 2 (MADEC et. al., AL 2011).

Frente ao grande número de estudos que indicam a importância do AGPI em diversos processo fisiológicos, o presente estudo pretende avaliar qual o impacto exercido por uma dieta com elevada razão ômega-3/ômega-6 em marcadores de sensibilidade a insulina em animais suplementados na gestação e ao nascimento. Segundo SYMONDS et. al. (2010), o ambiente nutricional e metabólico materno é fundamental para determinar não apenas a sua capacidade reprodutiva, mas também a saúde em longo prazo e viabilidade das crias. Como estudos com humanos, neste sentido são difíceis devido a dificuldade de controlar fatores externos e também pelos aspectos éticos, o presente estudo investiga em modelo experimental, ratos, que assemelham-se em muitas funções fisiológicas a humanos.

## 2. METODOLOGIA

Para este estudo foram usadas 16 amostras de fígados de ratos Wistar, obtidos de outro estudo. A geração fundadora (F0) foi composta por trinta e seis fêmeas, que foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: (1) os ratos alimentados com uma dieta elaborada com óleo de linhaça, com uma elevada razão n-3/n-6 (2,44/1) (grupo O, n=18) e (2) os ratos alimentados com uma dieta controle, elaborada com óleo de soja, com menor razão n-3/n-6 (0,07/1) (grupo C, n=18). Durante o experimento os machos receberam apenas dieta controle. Os animais foram aclimatados ao alojamento e dietas durante 30 dias e depois acasalados. Da prole de F0, as fêmeas ao desmame (21 dias) foram classificadas para compor a geração F1 que se dividiu em 3 grupos: (1) fêmeas do grupo O que continuaram a receber dieta com elevada razão n-3/n-6 (O/O, n=16), (2) fêmeas do grupo O que começaram a receber dieta de controle (O/C, n=16) e (3) fêmeas do grupo C que continuaram a receber dieta de controle com baixa razão n-3/n-6 (C/C, n=16). Foram sacrificadas seis fêmeas da geração F1 para cada grupo no pós-parto (ao desmame, 21 dias após o parto). As fêmeas foram mantidas em jejum durante 12 horas durante a noite, e em seguida, elas foram anestesiadas e sacrificadas de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel.

O RNA total foi isolado a partir de amostras de fígado, utilizando reagente TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total foi purificado utilizando colunas RNeasy e tratamento com DNase (Qiagen, Alemanha), seguindo o protocolo do fabricante. Ausência de degradação do RNA foi verificada em um gel de agarose para verificar a presença das subunidades 28S e 18S intactas, após eletroforese em 80V, durante 1h30. A pureza e a concentração do RNA foi medida com um espectrofotômetro de UV (UV Mini 1240, Shimadzu). A transcrição reversa foi realizada com 1 µg de RNA usando o kit High Capacity cDNA RT com inibidor de RNase (Applied Biosystems, Foster City, EUA), em um volume de 10 µL. A reação foi realizada num termociclador (MyCycle™ termociclador, Bio Rad), utilizando o seguinte programa de temperatura: 25° C durante 10 min, 37° C durante 120 minutos e 85° C durante 5 minutos. O cDNA foi, em seguida, diluído a 5 ng/µL.

Real-Time PCR quantitativo usando corante SYBR Green foi utilizado para avaliar a expressão de IRS1, IRS2 e GLUT4. A β-actina (ACTB), desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato (G3PDH) e subunidade 18S do RNA ribossômico (18S) foram utilizados como controles internos e a média geométrica calculada e utilizada para normalizar os dados. Cada amostra foi executada em duplicata, e uma curva-padrão de 5 pontos foi gerada utilizando diluições em série de cDNA preparados a partir de amostras de fígado para calcular a eficiência de cada par de primers. Cada placa de ensaio incluiu um controle negativo em duplicata. O CV foi inferior a 10% para todos os pares de primers utilizados. As reações foram realizadas num instrumento ABI Prism 7500-Fast (Applied Biosystems, CA). A expressão gênica foi calculada usando o método do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Os resultados são apresentados como médias ± erro padrão da média (SEM). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando SAS (SAS Institute Inc, Cary, NC, EUA).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo não encontramos resultados estatisticamente significativos, apesar de diferenças numéricas, nenhum dos grupos se destacou, a expressão de GLUT4 teve uma discreta diminuição, tanto no grupo que recebeu ômega no pré e pós parto (ômega-ômega), quanto no grupo que somente as mães

receberam (ômega-controle), em relação aqueles que nunca receberam a suplementação (controle-controle). Para IRS1 e IRS2 no grupo ômega-ômega houve pequeno aumento e no grupo ômega-controle houve discreta diminuição da expressão quando comparados aos controles.

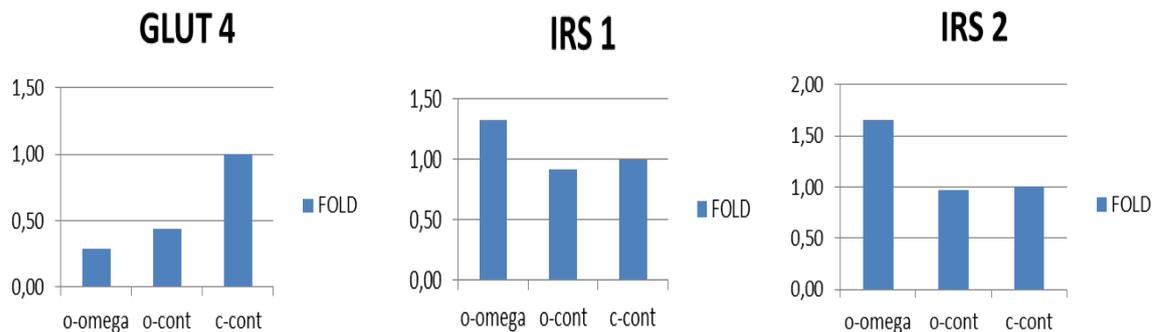


Figura 1- Gráficos representativos da expressão de GLUT 4, IRS 1, IRS 2.

LOMBARDO et. al. (2007) foi o primeiro a mostrar reversão da resistência à insulina em ratos após adição de óleo de peixe (7%) na dieta por 2 meses. No entanto, GILLAM et. al. (2009) não encontraram efeitos benéficos dos ácidos graxos  $\omega$ -3 em relação ao estado de resistência à insulina, função pancreática, em ratos alimentados com dieta contendo 10% de óleo de linhaça ou menhadem após 8,5 semanas. LUZ et. al. (2012) em estudo, para avaliar os efeitos da suplementação do ômega-3 (n-3) sobre a sinalização da insulina e via pró-inflamatória no tecido hepático de camundongos, encontrou diminuição da glicemia dependente do tempo e da dose e aumento da fosforilação do IR, IRS1 e Akt o que significa aumento na transdução do sinal insulínico no fígado e redução da expressão de moléculas pró-inflamatórias, no entanto em seu estudo a suplementação foi com óleo de peixe rico em DHA e EPA e os resultados mais relevantes foram com doses de 10 mg por 21 dias.

Na revisão bibliográfica os estudos encontrados são bem controversos principalmente quando o ômega-3 utilizado para suplementação é proveniente da linhaça rico em ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA), do que quando o óleo é proveniente de peixes rico em ácido docosaenoico (DHA) e ácido eicosapentaenoico (EPA), pois, segundo NETTLETON (1991) os efeitos dos óleos ricos em ALA são mais modestos do que os exercidos pelos óleos ricos em EPA, pois somente pequenas quantidades de ALA são convertidas em EPA para exercer efeitos biológicos.

#### 4. CONCLUSÕES

Frente ao resultado que não demonstrou nenhuma diferença na expressão de IRS1, IRS2 ou GLUT4 entre os animais suplementados e os não suplementados com ômega-3 e a controvérsia de resultados encontrados na revisão, ressalta-se a importância de novos estudos com o objetivo de esclarecer as vias envolvidas no metabolismo dos AGPI ômega-3, identificar dose necessária para que ocorra resposta, razão n-3/n-6, tempo de suplementação assim como efeitos em sucessivas gerações.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACKER, J.M.; MYERS, M.G.; SHOELSON, S.E.; CHIN, D.J.; SUN, X.J.; MIRALPEIX, M. et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **EMBO J.** 11(9):3469-79, 1992.

- CZECH, M.P.; CORVERA, S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. **J Biol Chem.** 274(4):1865-8, 1999.
- EHRMANN, D.A. Polycystic ovary syndrome. **New England Journal of Medicine.** 352.12, 1223-1236. 2005.
- GILLAM, M.; NOTO, A.; ZAHRAKKA, P.; TAYLOR, C.G. Improved n-3 fatty acid status does not modulate insulin resistance in fa/fa Zucker rats. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.** v.81, n.5-6, p.331-9. Nov-Dec, 2009.
- KIECOLT, G.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.** V. 25, N 8, p.1725-1734. Nov, 2011.
- LOMBARDO, Y.B.; HEIN, G.; CHICCO, A.. Metabolic syndrome: effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity. **Lipids,** v.42, n.5, p.427-37. May, 2007.
- LUZ, G.; SILVA, S.; MARQUES, S.; LUCIANO, T.F.; SOUZA, C.T. Suplementação de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 reduz marcadores inflamatórios e melhora a ação da insulina em fígado de camundongos. **Rev. Nutr. [online]**.vol.25, n.5, p. 621-629. , 2012.
- MADEC, S.; CORRETTI, V.; SANTINI, E.; FERRANNINI, E.; SOLINI, A. Effect of a fatty meal on inflammatory markers in healthy volunteers with a family history of type 2 diabetes. **British Journal of Nutrition.** 106, 364–368, 2011.
- NETTLETON, J.A. Omega-3 fatty acids: comparison of plant and seafood sources in human nutrition. **J Am Diet Assoc.** 91(3):331- 7, Mar, 1991.
- PATTI, M.E.; KAHN,C.R. The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology,** v.9, n.2-4, p.89-109, 1998.
- PESSIN, J.E.; SALTIEL, A.R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation,** v.106, n.2, p.165-169, 2000.
- SANTOS R.D.; GAGLIARDI A.C.M.; XAVIER H.T.; MAGNONI C.D.; CASSANI R.; LOTTENBERG A.M. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. **Arq Bras Cardiol.** 100(1Supl.3):1-40, 2013.
- SURESHI, Y.; DAS, U.N. Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids and Chemically Induced Diabetes Mellitus: Effect of  $\omega$ -3 Fatty Acids..**Nutrition.** v.19,p.213-228, 2003.
- SYMONDS, M.E.; SEBERT, S.P.; BUDGE, H. Nutritional regulation of fetal growth and implications for productive life in ruminants. **Animal.** p 1075-1083, 2010.
- WU, J.H.; MICHA, R.; IMAMURA, F.; PAN, A.; BIGGS, M.L.; AJAZ, O. Omega-3 fatty acids and incident type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis.**Br J Nutr.** 107 S2:S214-27. 2012.