

UFRGS-UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Efeitos de ácidos graxos poliinsaturados sobre parâmetros do metabolismo intermediário de ratos Wistar

Lisiane Guadagnin Londero

Orientador: Prof. Dr. Marcos Luiz Santos Perry

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas-Bioquímica

Porto Alegre, RS

2008

Lisiane Guadagnin Londero

Efeitos de ácidos graxos poliinsaturados sobre parâmetros do metabolismo intermediário de ratos Wistar

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Luiz Santos Perry

Porto Alegre, RS

2008

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é fruto de dois anos de dedicação à pesquisa e à busca de conhecimento. Sua realização só se tornou possível graças ao apoio e colaboração que recebi de pessoas que me acompanharam e instituições que me acolheram ao longo dessa jornada.

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e ao Departamento de Bioquímica da UFRGS por me proporcionarem um bom ambiente de aprendizado e estudo, além do inestimável contato com pessoas e meios que possibilitaram a realização deste trabalho de mestrado;

Ao meu orientador, Dr. Marcos Luiz Santos Perry, por me receber em seu laboratório e me conduzir ao longo de minha jornada de aprendizado, sendo um exemplo de dedicação e comprometimento com a pesquisa;

À professora Ingrid, por ser um exemplo de profissionalismo, correção e bondade;

Aos colegas de laboratório Betina, Adriano, Daniel, Cíntia, Fernandes, Suzeli, Júlia e Débora por todo o auxílio com os experimentos e pelo companheirismo no laboratório, e em especial à colega Simone, pelas palavras de apoio e auxílio nos últimos ensaios científicos;

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica;

À professora Ana Feoli pela contribuição com material; ao professor Luis Cláudio e ao doutorando Marcos; ao Laboratório de Fisiologia Comparada, em especial aos professores Roselis e Luis Carlos e ao mestrando Tiago, pela acolhida e auxílio com parte dos experimentos deste trabalho; à professora Liane e ao professor Francisco, pelo auxílio com as análises plasmáticas; e às doutorandas Carolina e Júlia pelo grande auxílio com os primeiros experimentos;

Às colegas do Hospital Nossa Senhora da Conceição, em especial Jane, Izabela, Maria Glacy, Carla e Lisiane pela amizade, coleguismo e apoio;

À colega Cristina, que, embora longe, será sempre uma grande amiga e um admirável exemplo de dedicação e conhecimento;

Aos meus pais, Lirio e Joanilda, pela educação, compreensão, amor, carinho, apoio e incentivo; às minhas irmãs Ludmille e Lenara por todo suporte, força e auxílio, e por me ouvirem e acompanharem ao longo dessa jornada, e ao meu irmão Gustavo, por me incentivar sempre, mesmo à distância – sem o apoio de minha família esse trabalho não teria se tornado real.

E por fim, a Deus, pela vida e todos os desafios, conquistas e aprendizados que ela tem me proporcionado.

ÍNDICE

Resumo.....	4
Abstract	5
Lista de Abreviaturas	6
Lista de Figuras	8
Lista de Tabelas	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Resistência à insulina e diabetes mellitus	11
1.1.1 Homeostase da glicose e ações da insulina em condições normais	13
1.1.2 Patogenia da resistência à insulina e da DM2	13
1.1.2.1 Secreção de insulina	14
1.1.2.2 Resistência hepática e muscular à ação da insulina	14
1.1.2.2.1 Supressão da produção hepática de glicose	15
1.1.2.2.2 Captação periférica de glicose (músculo esquelético)	16
1.1.2.3 O papel da hiperglicemia e da glicotoxicidade na DM2	16
1.1.2.4 O papel do adipócito na patogenia da DM2 e a lipotoxicidade	17
1.1.2.5 Teoria glicocêntrica x teoria lipocêntrica na patogenia da RI	19
1.1.2.6 O papel da gliceroneogênese na DM2	20
1.2 Ácidos graxos poliinsaturados	24
1.2.1 As classes de AGPI e a descoberta de sua essencialidade	24
1.2.2 As famílias de ácidos graxos $\omega 3$ e $\omega 6$ e seus respectivos metabólitos	25
1.2.3 Fontes alimentares de AGPI	26
1.2.4 A ingestão de AGPI ao longo da evolução do homem, a ingestão atualmente recomendada e a razão ácidos graxos $\omega 6:\omega 3$ ideal	27
1.2.5 Deficiência de AGPI	30
1.2.6 Efeitos biológicos dos AGPI	30
1.2.6.1 Ações de AGPI nas membranas celulares	32
1.2.6.2 Eicosanóides	32
1.2.6.3 Expressão gênica	32
1.3. AGPI X RI	35
1.3.1 Efeitos dos AGPI no metabolismo de carboidratos	37

1.3.2 Efeitos de AGPI no metabolismo de lipídios	38
2. OBJETIVO	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Material	43
3.1.1 Reagentes	43
3.1.2 Animais experimentais	44
3.2 Métodos	44
3.2.1 Modelos dietéticos de indução de resistência à insulina	44
3.2.2 Teste de tolerância à glicose (TTG)	49
3.2.3 Obtenção dos tecidos e do soro plasmático	50
3.2.4 Análises séricas	50
3.2.5 Solução tampão Krebs Ringer Bicarbonato (KRb)	51
3.2.6 Oxidação de [U- ¹⁴ C]-Glicose e [1- ¹⁴ C]-Piruvato a CO ₂	51
3.2.7 Síntese de lipídios totais a partir de [U- ¹⁴ C]-Glicose e [U- ¹⁴ C]-Glicerol	53
3.2.8 Síntese global de glicogênio a partir de [U- ¹⁴ C]-Glicose e [U- ¹⁴ C]-Glicerol e determinação de sua concentração	55
3.2.9 Determinação da atividade da PEPCK	56
3.2.10 Determinação da concentração hepática de triglicerídeos	58
3.3 Análise estatística	58
4. RESULTADOS	59
4.1 Peso e adiposidade corporal	59
4.2 Dosagens séricas	60
4.3 Teste de tolerância à glicose	62
4.4 Efeitos de AGPI no fígado	64
4.4.1 Oxidação hepática de Piruvato [1-C ¹⁴]	64
4.4.2 Oxidação hepática de glicose	65
4.4.3 Síntese hepática de lipídios a partir de glicose	66
4.4.4 Síntese hepática global de glicogênio a partir de glicose e glicerol	68
4.5 Efeitos de AGPI em tecido adiposo	70
4.5.1 Síntese de lipídios a partir de glicose	70
4.5.2 Oxidação de Glicose a CO ₂ em tecido adiposo	72
4.5.2 Atividade da PEPCK em tecido adiposo	72
4.5.3 Síntese de lipídios a partir de glicerol em tecido adiposo	73
5. DISCUSSÃO	75

5.1 Efeitos de ácidos graxos poliinsaturados no peso corporal e nas concentrações plasmáticas de TG, AGL, glicose, insulina e HDL-col	75
5.2 Efeitos dos ácidos graxos poliinsaturados no metabolismo hepático.....	78
5.3. Efeitos de ácidos graxos polinsaturados no metabolismo do tecido adiposo.....	96
6. CONCLUSÕES FINAIS	120
7. PERSPECTIVAS	122
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

RESUMO

Dietas ricas em sacarose, lipídios ou hiperpalatáveis podem induzir hipertrigliceridemia e resistência à insulina (RI) em humanos e em animais. **Objetivo:** elucidar o efeito da suplementação de ácidos graxos de cadeia muito longa $\omega 3$ (ácidos graxos docosahexaenóico e eicosapentaenóico – DHA e EPA) em alterações do metabolismo da glicose e de lipídios geradas por estas dietas. **Métodos:** animais foram alimentados com uma dieta hiperlipídica durante quatro meses a partir do período gestacional, ou uma dieta rica em sacarose por três meses a partir de um mês de idade, ou uma dieta hiperpalatável por oito meses a partir do período gestacional, contendo ou não óleo de peixe como fonte de EPA e DHA. Teste de tolerância à glicose, verificação dos níveis séricos de triglicerídeos (TG), glicose e ácidos graxos livres (AGL), oxidação e incorporação de glicose a lipídios em fígado foram avaliados em todos os animais. A atividade do complexo piruvato desidrogenase hepático (PDH) foi verificada em animais alimentados com dieta hiperlipídica e a síntese hepática de glicogênio a partir de glicerol e glicose foi analisada em animais alimentados com dieta hiperpalatável. Em tecido adiposo (TA), a atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) e a incorporação de glicerol a TG foram avaliadas nos animais alimentados com dieta rica em sacarose e a incorporação de glicose a TG foi estudada em todos os animais. **Resultados:** ao receber EPA e DHA, os animais apresentaram menores níveis séricos de TG e AGL e menor incorporação de glicose a TG em fígado e tecido adiposo em relação aos seus controles. Animais que receberam dieta hiperlipídica rica em EPA e DHA apresentaram maior atividade da PDH, porém sem diferença na oxidação de glicose em relação aos demais animais. A dieta rica em sacarose suplementada com estes AG ocasionou aumento da atividade da PEPCK e da incorporação de glicerol a lipídios em tecido adiposo em relação àqueles com dieta semelhante, porém pobre em AG $\omega 3$. Tanto animais alimentados com dieta hiperpalatável suplementada com AG $\omega 3$ de cadeia longa, como os alimentados com EPA e DHA apresentaram síntese de glicogênio a partir de glicerol e glicose diminuídas em relação ao grupo controle, alimentado com dieta comercial padrão. **Conclusão:** EPA e DHA melhoram a tolerância à glicose e a ação da insulina. O aumento da atividade da PEPCK e da incorporação de glicerol a TG em TA podem contribuir para a diminuição dos níveis séricos de TG e AGL. A menor síntese de lipídios a partir de glicose em fígado e tecido adiposo também podem contribuir para os efeitos hipolipidêmicos destes AG. Mais estudos são necessários para compreensão de seus efeitos na síntese hepática de glicogênio e na atividade da PDH. O presente estudo estende o conhecimento sobre suas ações no metabolismo intermediário.

ABSTRACT

Feeding rats highly palatable, high-sucrose or high-fat diets may induce hypertriglyceridemia and insulin resistance (IR) in humans and animals. **Objective:** The aim of this study was to elucidate ω 3 very long chain polyunsaturated fatty acids (docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids – DHA and EPA) supplementation effects on glucose and lipid metabolism alterations induced by feeding these diets. **Methods:** The present study was conducted on rats fed a high-fat diet during 4 months from gestational period, or a high-sucrose diet during 3 months beginning with 1 month old animals, or a highly palatable diet for 8 months from gestational period, containing fish oil as EPA and DHA source or not. Glucose tolerance test, serum insulin, glucose, triglycerides (TG) and free fatty acids levels (FFA), glucose oxidation and incorporation into triglycerides in liver were evaluated in all animals. Pyruvate dehydrogenase complex activity (PDH) was analyzed in high-fat fed animals and glycogen synthesis from glucose, and glycerol were studied in highly palatable diet fed animals. In adipose tissue, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) activity and glycerol incorporation into TG were verified in high-sucrose fed animals and glucose incorporation into TG was evaluated for all diets. **Results:** Animals fed all diets, when supplemented with EPA and DHA, showed lower serum FFA and TG levels and lower glucose incorporation into TG in liver and adipose tissue compared to others. Animals fed a high-fat diet rich in these fatty acids had higher hepatic PDH activity, but showed no difference in glucose oxidation compared to other animals fed high-fat diet. Animals fed a highly palatable diet had lower glycogen synthesis from glucose and glycerol in liver when compared to commercial diet fed rats. Also, animals fed a high-sucrose diet containing ω 3 fatty acids had higher phosphoenolpyruvate carboxykinase activity and glycerol incorporation into TG when compared to animals fed a high-sucrose diet poor in these fatty acids. **Conclusion:** EPA and DHA improve glucose tolerance and insulin action in different diet induced insulin resistance models. The increase in PEPCK activity and glycerol incorporation into TG may contribute to lower serum TG and FFA levels. Lower TG synthesis from glucose in liver and adipose tissue may also contribute to its hypolipidemic effects. Further studies are necessary to elucidate the ω 3 fatty acids effects on hepatic glycogen synthesis and on PDH activity. The present study thus extends knowledge on EPA and DHA actions on intermediary metabolism.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: ácido araquidônico

AGPI: ácidos graxos poliinsaturados

AG: ácido graxo

AGL: ácidos graxos livres

AGS: ácido graxo sintase

AL: ácido linoléico

ALN: ácido α -linolênico

CHO: carboidrato

DHA: ácido graxo docosahexaenóico

DM2: diabetes mellitus tipo 2

DRI: Dietary Reference Intakes ou Ingestões Dietéticas de Referência

EPA: ácido graxo eicosapentaenóico

G-3-P: glicerol-3-fosfato

Grupo CONT-HP: grupo alimentado com dieta comercial padrão, controle para os animais alimentados com dieta hiperpalatável

Grupo HP-ALN: grupo alimentado com dieta hiperpalatável contendo ácidos graxos ω 3 de cadeia longa

Grupo HP-EPA/DHA: grupo alimentado com dieta hiperpalatável contendo ácidos graxos ω 3 de cadeia longa e muito longa

Grupo CONT-SAC: grupo alimentado com dieta rica em amido, controle para os animais alimentados com dieta rica em sacarose

Grupo SAC- ω 3: grupo alimentado com dieta rica em sacarose contendo ácidos graxos ω 3 de cadeia muito longa, além de ácidos graxos ω 6

Grupo SAC- ω 6: grupo alimentado com dieta rica em sacarose contendo ácidos graxos ω 6

Grupo SAT: grupo alimentado com dieta rica em gordura saturada

Grupo ω 3: grupo alimentado com dieta rica em lipídios contendo ácidos graxos ω 3 de cadeia muito longa, além de ácidos graxos ω 6

Grupo ω 6: grupo alimentado com dieta rica em lipídios contendo ácidos graxos ω 6

LHS: lipase hormônio-sensível

LIP: lipídio

PDH: complexo piruvato desidrogenase

PEPCK-c: enzima fosfoenolpiruvato carboxicinase citosólica

RI: resistência à insulina

SM: síndrome metabólica

TA: tecido adiposo

TG: triglicerídeo (triacilglicerol)

TZD: tiazolidinedionas

VLDL: very low density lipoprotein (lipoproteína de muito baixa densidade)

SREBP-1: sterol regulatory element binding protein

HNF-4: hepatic nuclear factor

PGC-1: peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1

PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor

TG-AG: triglicerídeo-ácido graxo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Turnover de AGL nos tecidos adiposos visceral e subcutâneo.....	18
Figura 2. Ciclo TG-AG em mamíferos.....	22
Figura 3. Vias de conversão de ácidos graxos insaturados em poliinsaturados de cadeia longa em animais.....	26
Figura 4. Estimativa da ingestão de ácidos graxos ao longo do tempo.....	28
Figura 5. Principais vias de produção, transporte e metabolismo de AG.....	31
Figura 6. Fontes de ácidos graxos para o fígado para síntese de TG e produção de VLDL....	39
Figura 7. Teste de tolerância à glicose em dieta hiperlipídica.....	63
Figura 8. Teste de tolerância à glicose em dieta hiperpalatável.....	63
Figura 9. Teste de tolerância à glicose em dieta hiperglicídica.....	64
Figura 10. Oxidação de piruvato em dieta hiperlipídica.....	65
Figura 11. Oxidação hepática de glicose em dieta hiperlipídica.....	65
Figura 12. Oxidação hepática de glicose em dieta hiperpalatável.....	66
Figura 13. Síntese hepática de lipídios a partir de glicose em dieta hiperpalatável.....	67
Figura 14. Síntese hepática de lipídios a partir de glicose em dieta hiperlipídica.....	67
Figura 15. Síntese hepática de lipídios a partir de glicose em dieta hiperglicídica.....	68
Figura 16. Síntese hepática global de glicogênio a partir de glicose em dieta hiperpalatável..	69
Figura 17. Síntese hepática global de glicogênio a partir de glicerol em dieta hiperpalatável.	69
Figura 18. Síntese de lipídios a partir de glicose em TA em dieta hiperlipídica.....	70
Figura 19. Síntese de lipídios a partir de glicose em TA em dieta hiperpalatável.....	71
Figura 20. Síntese de lipídios a partir de glicose em TA em dieta hiperlipídica.....	71
Figura 21. Oxidação de glicose em TA em dieta hiperpalatável.....	72
Figura 22. Atividade da PEPCCK em TA em dieta hiperglicídica.....	73
Figura 23. Síntese de lipídios a partir de glicerol em TA em dieta hiperglicídica.....	74

Figura 24. Fontes de ácidos graxos e de glicerol-3-P para síntese de triglicerídeos no tecido adiposo..... 98

Figura 25. Possíveis explicações para a menor síntese de lipídios a partir de glicose em animais tratados com óleo de peixe..... 108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas hiperglicídicas.....	46
Tabela 2. Composição das dietas hiperlipídicas.....	47
Tabela 3. Composição das dietas hiperpalatáveis.....	48
Tabela 4. Composição de ácidos graxos dos óleos utilizados.....	49
Tabela 5. Peso corporal inicial e final e peso do tecido adiposo retroperitoneal em ratas alimentadas com dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados (grupo SAT), $\omega 6:\omega 3$ na proporção 5:1 ou $\omega 6$ (grupo $\omega 6$).....	59
Tabela 6. Peso corporal inicial e final e peso do tecido adiposo retroperitoneal em ratas alimentadas com dieta hiperpalatável rica em ácidos graxos $\omega 3$ α -linolênico (grupo HP-ALN) ou α -linolênico, EPA e DHA (grupo HP-EPA/DHA) ou com dieta comercial padrão (grupo CONT-HP).....	60
Tabela 7. Peso corporal inicial e final e peso dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal em ratos alimentados com dieta hiperglicídica rica em ácidos graxos $\omega 6$ (grupo SAC- $\omega 6$), $\omega 6:\omega 3$ na proporção 2:1 (grupo SAC- $\omega 3$) ou dieta contendo amido em lugar da sacarose e ácidos graxos $\omega 6$ representando o grupo controle (grupo CONT-SAC).....	60
Tabela 8. Concentrações séricas de glicose, insulina, lipídios e concentração hepática de triglicerídeos em animais alimentados com dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados (grupo SAT), $\omega 6:\omega 3$ na proporção 5:1 ou $\omega 6$ (grupo $\omega 6$).....	61
Tabela 9. Concentrações séricas de glicose, insulina, lipídios e concentração hepática de triglicerídeos em animais alimentados com dieta hiperpalatável rica em ácidos graxos $\omega 3$ α -linolênico (grupo HP-ALN) ou α -linolênico, EPA e DHA (grupo HP-EPA/DHA) ou com dieta comercial padrão (grupo CONT-HP).....	61
Tabela 10. Concentrações séricas de glucose, lipídios e concentração hepática de triglicerídeos em animais alimentados com dieta hiperglicídica rica em ácidos graxos $\omega 6$ (grupo SAC- $\omega 6$), $\omega 6:\omega 3$ na proporção 2:1 (grupo SAC- $\omega 3$) ou dieta contendo amido em lugar da sacarose e ácidos graxos $\omega 6$ representando o grupo controle (grupo CONT-SAC).....	62

1. INTRODUÇÃO

1.1 Resistência à insulina e diabetes mellitus

A incidência global de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) tem atingido proporções epidêmicas e tende a aumentar nos próximos anos (ZIMMET et al, 2001). Dada a complexidade de sua patofisiologia, esta condição tem sido alvo de um expressivo número de estudos nos últimos 30 anos (STUMVOLL et al, 2007).

A resistência à insulina (RI) é um elemento central na patogenia da DM2 (SAVAGE et al, 2007). No entanto, esta patologia desenvolve-se na presença não apenas de progressiva resistência periférica à insulina – especialmente no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo –, mas também está associada à eventual falência da capacidade das células β -pancreáticas de secretar maiores quantidades deste hormônio para compensar esta resistência (DEFRONZO, 2004). A hiperinsulinemia resultante da disfunção destas células e a RI estão também relacionadas a outras patologias freqüentes, como obesidade, dislipidemia, doença arterial coronariana, hipertensão, entre outras (KASHYAP & DEFRONZO, 2007).

Além da suscetibilidade genética, contribuem para o surgimento da RI e da disfunção das células β um conjunto de fatores ambientais e comportamentais, como sedentarismo, dieta inadequada (rica em gordura saturada, ácidos graxos *trans* e sódio, pobre em fibras, potássio e ácidos graxos poliinsaturados, entre outras características) e obesidade (GANG HU et al, 2004).

Embora a maior parte dos indivíduos obesos não seja diabética, um certo grau mínimo de adiposidade, em geral, é necessário para o desenvolvimento de DM2 (COLDITZ et al, 1995). Conforme Chakravarthy e Booth (2004), a atual alta prevalência de obesidade é decorrente, ao menos em parte, das mudanças dos padrões alimentares e de atividade física

em relação ao período da seleção natural de nossos genes. Esta ocorreu em tempos da Era Paleolítica, quando os homens eram caçadores e coletores e necessitavam realizar maior atividade física em busca de alimentos, além de serem submetidos a períodos alternados de escassez e abundância de recursos alimentares. Neste processo foram selecionados genes úteis ao maior aproveitamento e armazenamento dos nutrientes, os chamados genes econômicos. Evidências mostram que este genoma permaneceu essencialmente inalterado nos últimos 10.000 anos. Portanto, supõe-se que o homem contemporâneo está geneticamente adaptado para o ambiente e estilo de vida de seus ancestrais. Estes mesmos genes que representavam uma vantagem seletiva no passado, agora estão sendo expostos a outro estilo de vida, caracterizado pelo sedentarismo e por uma dieta inadequada, além de um período de vida mais extenso.

Especificamente em relação à dieta dos homens desses tempos, supõe-se que as mudanças que ocorreram com a introdução da agricultura e da criação de animais (em torno de 10-14.000 anos atrás) ainda são muito recentes na escala da evolução para que haja adaptação do genoma humano. Cordain et al (2004) sugerem que diversas alterações de nossa dieta em relação à de nossos ancestrais, como a composição de ácidos graxos, entre outros fatores, têm contribuído para efeitos negativos observados em diferentes patologias.

Certamente buscar terapias, tanto medicamentosas como relacionadas ao estilo de vida (exercício físico, dieta, etc) que apresentem benefícios na prevenção e/ou tratamento da obesidade e da DM2 é de fundamental importância para diminuir a prevalência e os enormes gastos públicos gerados por estas patologias (ADA, 2007).

1.1.1 Homeostase da glicose e ações da insulina em condições normais

Apesar das freqüentes oscilações entre o jejum e o estado alimentado, a glicemia mantém-se dentro de uma estreita faixa de 4 a 7mM (aproximadamente 70 a 130mg/dL) em indivíduos saudáveis. Este fino controle é administrado pelo balanço entre a absorção intestinal, produção hepática, captação e metabolismo da glicose pelos tecidos periféricos (DEFRONZO, 2004).

A insulina aumenta a captação de glicose no músculo e no tecido adiposo, além de inibir a sua produção hepática (glicogenólise e gliconeogênese), assim exercendo importante participação no controle de sua concentração plasmática. A insulina também estimula o crescimento e a diferenciação celular e promove o armazenamento de diferentes substratos no tecido adiposo, músculo esquelético e fígado por meio do estímulo das vias de lipogênese, síntese protéica e glicogênese e da inibição das vias de lipólise e degradação protéica.

Atuando por meio de sua via de sinalização, a insulina influencia a síntese e/ou atividade de enzimas-chave destas vias metabólicas. Parte destes efeitos são mediados por sua capacidade de estimular ou inibir uma série de fatores e cofatores de transcrição, incluindo SREBP-1 (*sterol regulatory element binding protein*), HNF-4 (*hepatic nuclear factor*) e PGC-1 (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1*) (SALTIEL E KAHN, 2001).

1.1.2 Patogenia da resistência à insulina e da DM2

A DM2 caracteriza-se por defeitos na secreção de insulina e por resistência à ação deste hormônio envolvendo especialmente músculo esquelético e fígado, além do tecido adiposo. Para o seu surgimento contribuem, entre outros fatores, a glicotoxicidade e a

lipotoxicidade gerada a partir de alterações do metabolismo dos adipócitos. Apesar de muito estudadas, ainda não existe consenso a respeito do surgimento da glicotoxicidade a partir da lipotoxicidade ou vice-versa. Supõe-se ainda que a gliceroneogênese é mais uma via que pode encontrar-se alterada na RI, contribuindo para lipotoxicidade.

1.1.2.1 Secreção de insulina

Um conjunto de fatores genéticos e adquiridos tem sido implicado no progressivo prejuízo da secreção de insulina pelas células β do pâncreas (STUMVOLL et al, 2007). Tanto a glicotoxicidade (ROBERTSON et al, 2003) como a lipotoxicidade (BAYS et al, 2004) estão entre os fatores que podem alterar a sua secreção. A exposição por curto prazo das células β a um aumento fisiológico na concentração de ácidos graxos livres (AGL) estimula a secreção de insulina em conjunto com a hiperglicemia. Entretanto, a longo prazo ocorre inibição (MASON, 1999). Quando as células β falham e tornam-se incapazes de superar a resistência à insulina do fígado e tecidos periféricos, surge a diabetes (DEFRONZO, 2004).

Não existe consenso a respeito do primeiro sítio de surgimento da resistência à insulina ou de qual órgão necessariamente deve estar resistente a sua ação para que ocorra o surgimento da DM2, no entanto está comprovado que a hiperinsulinemia precede o início da DM2 (STUMVOLL et al, 2007).

1.1.2.2 Resistência hepática e muscular à ação da insulina

As ações combinadas da hiperinsulinemia e da hiperglicemia (efeito de massa da glicose que contribui para estimular seu próprio metabolismo) dependem de dois mecanismos

estritamente relacionados: supressão da liberação hepática de glicose e estímulo de sua captação por tecidos periféricos, especialmente o músculo esquelético.

1.1.2.2.1 Supressão da produção hepática de glicose

Está bem estabelecido que a supressão da produção hepática de glicose encontra-se diminuída na DM2. Este fenômeno poderia resultar do aumento da gliconeogênese e/ou glicogenólise. A maior parte dos estudos sugere que a via predominantemente elevada é a gliconeogênese (CONSOLI et al, 1989; MAGNUSSON et al, 1992), mas há também estudos que sugerem aumento da glicogenólise (STAEHR et al, 2003). Os mecanismos propostos para o aumento da gliconeogênese incluem aumento dos níveis circulantes de seus precursores (lactato, alanina, glicerol) (CONSOLI et al, 1989), AGL (STAEHR et al, 2003) e de glucagon (BARON et al, 1987). Staehr et al (2003) explicitaram que concentrações fisiológicas de AGL podem estimular tanto a glicogenólise como a gliconeogênese em diabéticos tipo 1, no jejum.

Além de alteração do controle da gliconeogênese e da glicogenólise, na RI e na DM2 outras vias metabólicas hepáticas encontram-se prejudicadas. A concentração e síntese hepática de glicogênio podem estar diminuídas (GOLDEN et al, 1979; GANNON e NUTTAL, 1997), assim como a atividade do complexo enzimático piruvato desidrogenase e a glicólise (SCHUMMER et al, 2008). A lipogênese, no entanto, apesar de ser um processo ativado pela insulina, não parece estar comprometida em estados insulino-resistentes (WEICKERT, 2006; UNGER, 2008), um dos fatores que contribui para o negativo acúmulo intra-hepático de lipídios e a produção aumentada de VLDL (very low density lipoprotein) (ADIELS, 2008).

1.1.2.2 Captação periférica de glicose (músculo esquelético)

O músculo esquelético representa o principal sítio de metabolismo periférico da glicose. No músculo esquelético, a RI manifesta-se primariamente como uma redução na síntese de glicogênio estimulada por insulina, conseqüência do transporte reduzido de glicose. Segundo a hipótese de Randle (RANDLE et al, 1963), isto se deve à utilização preferencial de ácidos graxos em lugar da glicose pelo músculo. Estudos mais recentes indicam outra explicação mais provável para menor captação de glicose: o acúmulo de lipídios intramiocelular e conseqüentes alterações na via de sinalização da insulina, a lipotoxicidade (MCGARRY, 2002).

1.1.2.3 O papel da hiperglicemia e da glicotoxicidade na DM2

A glicotoxicidade consiste em danos estruturais e funcionais causados nas células β -pancreáticas e em tecidos-alvo da insulina, causados pela hiperglicemia crônica. Alguns tipos celulares, como células endoteliais e mesangiais, não conseguem manter sua concentração intracelular de glicose normal diante da hiperglicemia e acabam sendo danificadas por diversos mecanismos: aumento do fluxo das vias do poliol e das hexosaminas, da produção intracelular de precursores de produtos de glicação avançada e ativação das proteínas cinase C β e δ . A ativação de todas estas vias parece ocorrer como resultado de um processo desencadeado inicialmente pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (BROWNLEE, 2005). A ativação destas vias pode contribuir para o desenvolvimento da DM2, assim como também oferece uma possível explicação para o surgimento das complicações micro (retinopatia, nefropatia e neuropatia diabéticas) e macrovasculares (aterosclerose, acidente vascular cerebral) relacionadas à diabetes mellitus.

1.1.2.4 O papel do adipócito na patogenia da DM2 e a lipotoxicidade

O tecido adiposo tem um importante papel no tamponamento do fluxo de AGL circulantes (FRAYN, 2002). No período pós-prandial, a insulina suprime a ação da lipase hormônio-sensível, assim diminuindo a lipólise, e estimula a captação de ácidos graxos a partir das lipoproteínas séricas por meio da ação da lipase lipoproteica. Estimula ainda a captação de glicose e a lipogênese nos adipócitos. Se esta ação tamponante encontra-se deficiente, tecidos extra-adiposos (fígado, pâncreas, músculo esquelético, etc) são expostos a um fluxo excessivo de lipídios e podem acumulá-los, desencadeando a formação de metabólitos tóxicos para as células (diacilglicerol, ceramidas, etc), os quais podem alterar cascatas de sinalização e gerar uma série de processos danosos intracelularmente (MCGARRY, 2002; SAVAGE et al, 2007). O conjunto destes danos causados por níveis persistentemente elevados de AGL é denominado lipotoxicidade (MCGARRY, 2002).

Considerando que a lipotoxicidade pode causar ou agravar alterações nos três órgãos com reconhecido importante papel no prejuízo da homeostase da glicose em diabéticos – pâncreas, fígado e músculo –, é evidente que o tecido adiposo tem importante participação na patogenia da DM2 (BAYS et al, 2004). Em acordo, os níveis séricos de AGL encontram-se elevados na obesidade e em outros estados insulino-resistentes (COPPACK et al, 1992; BODEN e SHULMAN, 2002). Além dos AGL circulantes aumentados, diabéticos e obesos geralmente também apresentam aumento da concentração intracelular de triglicerídeos no fígado e no músculo que se correlaciona proporcionalmente com a presença de resistência à insulina nestes tecidos (MCGARRY, 2002).

O tecido adiposo pode ser dividido em dois compartimentos maiores – subcutâneo e visceral – que possuem distribuição e metabolismo distintos. Indivíduos com obesidade central (também denominada intra-abdominal ou visceral) apresentam maior risco de

complicações metabólicas e cardiovasculares. Isto se deve, ao menos em parte, a diferenças nas taxas de lipólise entre os dois compartimentos e, principalmente, a sua localização. A lipólise é maior nos adipócitos viscerais do que nos subcutâneos, pois os primeiros são menos sensíveis ao efeito antilipolítico da insulina e mais sensíveis à ação lipolítica de catecolaminas. Apesar de menos sensível à lipólise, o tecido adiposo subcutâneo é maior que o visceral, assim também liberando grande quantidade de AGL. No entanto, o tecido visceral parece ser mais prejudicial, pois drena diretamente para veia porta e as altas concentrações de AGL entregues diretamente ao fígado contribuem para o acúmulo de triglicerídeos (TG), aumento da gliconeogênese e inibição do clearance da insulina. Ainda assim, os AGL liberados pelo tecido adiposo subcutâneo também têm importante implicação no surgimento da resistência à insulina, pois aumentam a exposição do músculo e do pâncreas a um fluxo lipídico aumentado (ARNER, 2001) (Figura 1).

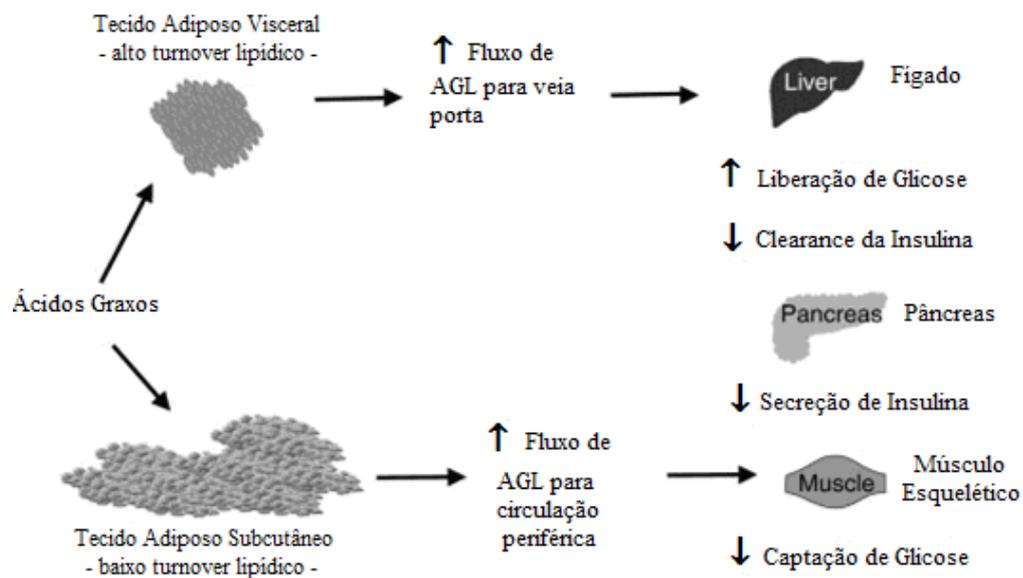


Figura 1. Turnover de AGL nos tecidos adiposos visceral e subcutâneo. O alto fluxo resultante do elevado turnover de AGL no tecido visceral drena diretamente para o fígado, pela veia porta, contribuindo para o aumento da gliconeogênese, da síntese de triglicerídeos e para o reduzido clearance da insulina. A lipólise a partir do tecido subcutâneo expõe o pâncreas e o músculo esquelético a elevados níveis de AGL, contribuindo para menor secreção de insulina e captação de glicose, respectivamente (ARNER, 2001).

Além do seu papel no armazenamento de ácidos graxos, o adipócito tem uma importante função endócrina. Produz uma variedade de adipocitocinas (adiponectina, resistina, angiotensinogênio, fator de necrose tumoral- α , leptina, entre outras) envolvidas em

funções diversas que incluem homeostase da glicose, inflamação, balanço energético, metabolismo lipídico, entre outros. Na RI, os adipócitos podem ter sua função alterada e a liberação destas proteínas pode ser modificada, havendo menor liberação de adiponectina e maior liberação de fator de necrose tumoral- α , entre outras alterações, num mecanismo que implica a participação do tecido adiposo na patogenia da DM2 (BAYS et al, 2004; GUILHERME et al, 2008). É possível que as adipocitocinas secretadas por adipócitos viscerais sejam mais prejudiciais à sensibilidade à insulina sistêmica e que isto também contribua para diferenças entre os depósitos subcutâneo e visceral, no entanto esta hipótese não está comprovada (KAHN e FLIER, 2000). Pesquisadores têm encontrado evidências que comprovam que a obesidade pode levar a um estado de inflamação crônica no tecido adiposo que também pode contribuir para esta disfunção dos adipócitos, especialmente os de maior diâmetro, menos sensíveis à insulina (GUILHERME et al, 2008).

Sendo assim, embora o tecido adiposo seja responsável pela metabolização de apenas uma pequena quantidade de glicose em relação a outros tecidos, exerce um papel muito importante na homeostase da mesma, considerando o impacto que os níveis de AGL e as adipocitocinas que são liberados pelos adipócitos têm sobre o metabolismo de outros órgãos.

1.1.2.5 Teoria glicocêntrica x teoria lipocêntrica na patogenia da RI

Tradicionalmente, a interpretação da patogenia da DM2 era dominada por uma visão glicocêntrica onde a hiperglicemia era considerada como o ponto inicial para intervenção terapêutica. Mais recentemente tem sido comprovado em diversos estudos que o aumento de AGL circulantes pode ocorrer mesmo antes da intolerância à glicose (MITTRA et al, 2008). Na literatura vigente permanecem controvérsias a respeito do surgimento da glicotoxicidade anterior à lipotoxicidade ou vice-versa (POITOUT e ROBERTSON, 2002; UNGER, 2008).

Como descrito nos tópicos anteriores, os mecanismos da glicotoxicidade envolvem vários fatores de transcrição e são, ao menos em parte, mediados pela geração crônica do estresse oxidativo. A lipotoxicidade é provavelmente mediada pelo somatório de alterações em vias de sinalização em decorrência do acúmulo de lipídios tóxicos. Apesar desta indefinição, ambos contribuem para a progressiva deterioração da homeostase da glicose e dos lipídios característica da DM2. Além disso, as vias ativadas pela glicotoxicidade a partir do estresse oxidativo parecem poder ser ativadas também pelo excesso de espécies reativas de oxigênio geradas a partir da oxidação de ácidos graxos em alguns tipos celulares (BROWNLEE, 2004). Assim, talvez ambas atuem por vias específicas e também por algumas vias em comum.

1.1.2.6 O papel da gliceroneogênese na DM2

A gliceroneogênese é uma versão abreviada da gliconeogênese: consiste na síntese *de novo* de glicerol-3-fosfato a partir de precursores diferentes de glicose ou glicerol (lactato, piruvato, alanina), para ser utilizado na síntese de TG. Esta via ocorre tanto no tecido adiposo como no fígado e foi originalmente proposta em 1967, por Richard Hanson, Lea Reshef e seus colegas, sendo também apresentada no mesmo ano por Ballard et al (HANSON e RESHEF, 2003).

Inicialmente foi observado que o tecido adiposo contém as enzimas piruvato carboxilase e a forma citosólica da fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK-c), duas enzimas que naquele tempo eram conhecidas apenas como parte da via da gliconeogênese. Nos estudos posteriores que estabeleceram a existência da gliceroneogênese, foi explicitado em ratos que a incubação *in vitro* de tecido adiposo epididimal com piruvato reduziu a liberação de AGL em 65%, embora sem alterar a lipólise (determinada pela quantidade total de glicerol

liberada para o meio). Concluiu-se assim que parte dos AGL haviam sido reesterificados e a via da gliceroneogênese foi descoberta (HANSON e RESHEF, 2003). A PEPCK-c, enzima que catalisa a conversão de oxaloacetato + GTP em fosfoenolpiruvato + GDP + CO₂, é considerada a enzima-chave da via. O seu controle não envolve modificações covalentes ou efeitos alostéricos, mas a expressão de seu gene é alterada por AMPc, glicocorticóides, insulina, hormônio da tireóide, glitazonas, além de ácidos graxos (BEALE et al, 2007).

A gliceroneogênese consome ATP e poderia ser considerada um “ciclo fútil”, pois no tecido adiposo consiste na reesterificação de ácidos graxos (AG) há pouco hidrolisados. No entanto, possui importante função neste tecido: regular a liberação de AG via um ciclo TG-AG intracelular, contribuindo para evitar o aumento de AGL circulantes que poderia culminar na lipotoxicidade e em resistência à insulina (HANSON e RESHEF, 2003).

Os ácidos graxos liberados do tecido adiposo podem ser reesterificados não apenas no interior dos adipócitos pela gliceroneogênese, como também no fígado e, possivelmente, no músculo, constituindo o que foi chamado de ciclo TG-AG por Reshef et al (2003) (Figura 2). Este pesquisador e seus colegas observaram que a fração total de AG que é hidrolisada no tecido adiposo e em seguida é reesterificada nos próprios adipócitos ou extracelularmente, conforme o ciclo TG-AG, chega a 75%. Isto ocorre tanto durante o estado alimentado como no jejum, ou seja, embora o fluxo de AG por este ciclo seja maior no jejum, esta taxa de 75% de reesterificação do total de AG originado a partir da lipólise parece permanecer constante. Conforme Reshef (2003), a análise quantitativa da reesterificação varia de acordo com o método de estudo, mas aquela que ocorre no interior dos adipócitos parece representar 20-30% do total, enquanto no fígado em torno de 50% do total de AG são reesterificados em adultos saudáveis, após um jejum noturno. Estas taxas variam conforme os diferentes modelos de estudos. Segundo Cadoudal et al (2005), a taxa de reesterificação apenas pela gliceroneogênese no adipócito pode variar de 30 a 70% do total inicialmente hidrolisado.

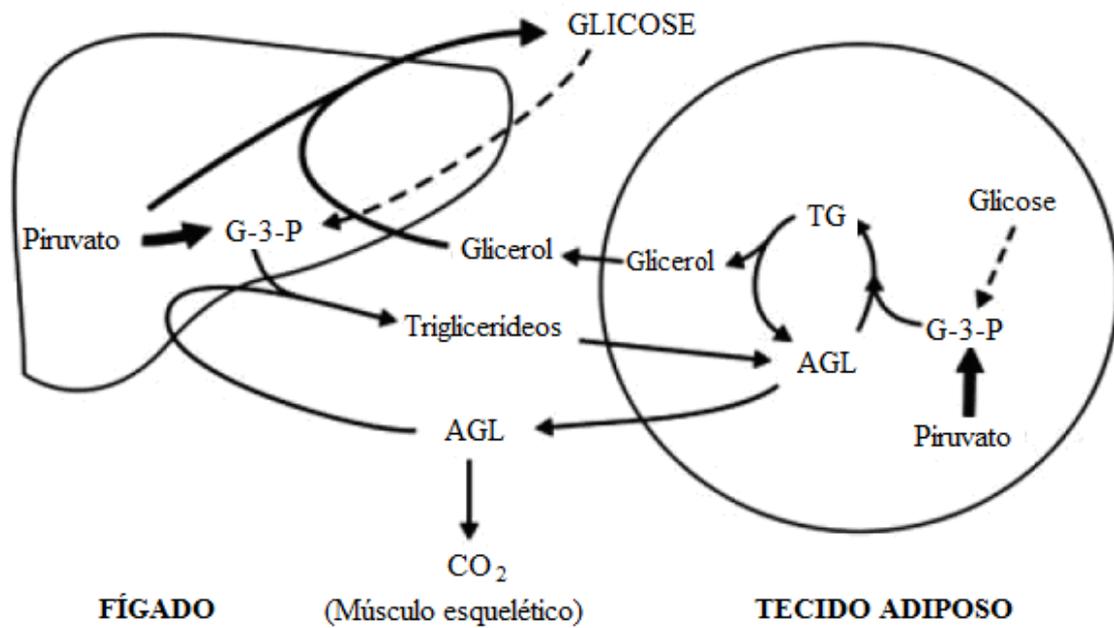


Figura 2. Ciclo TG-AG em mamíferos. A hidrólise de TG no tecido adiposo libera AG que podem ser reesterificados novamente na forma de TG intracelularmente – nos próprios adipócitos (gliceroneogênese) – ou extracelularmente – no fígado ou em outros tecidos (ex. músculo esquelético) – como parte de um ciclo geral onde há significativa reesterificação sistêmica de parte do total de ácidos graxos liberados pela lipólise. As linhas pontilhadas representam vias que se encontram pouco ativas no jejum. Estes TG formados a partir da reesterificação hepática podem ser utilizados na síntese de VLDL e reenviados ao tecido adiposo, assim fechando um ciclo. *G-3-P – glicerol-3-fosfato (RESHEF et al., 2003).

No fígado, no jejum, o glicerol-3-fosfato (G-3-P) utilizado na reesterificação de AG pode ser sintetizado pela gliceroneogênese a partir dos mesmos substratos utilizados na gliconeogênese (alanina, glicerol, piruvato). Especificamente o glicerol também pode ser convertido a G-3-P pela ação da glicerocinase, enzima que existe em maiores quantidades no fígado em relação ao tecido adiposo. No entanto, há indicações de que isso acontece em quantidade pouco expressiva no jejum, sendo a gliceroneogênese hepática a fonte maior de G-3-P para o processo de reesterificação nesta situação (RESHEF et al, 2003).

A gliceroneogênese do tecido adiposo não apenas no jejum, mas também no estado alimentado, é uma resposta à necessidade de reesterificar AG para dar suporte ao ciclo TG-AG. Supõe-se que sempre que houver pouca glicose disponível para síntese de G-3-P, como numa dieta rica em proteínas e pobre em carboidratos, a gliceroneogênese deve aumentar (BRITO et al, 2006; RESHEF et al, 2003).

A gliceroneogênese recebeu pouca atenção por muitos anos, mas estudos utilizando a deleção ou superexpressão da PEPCK-c contribuíram para mostrar sua importância (BEALE et al, 2002). Olswang et al (2002) realizaram um estudo em que a PEPCK-c foi deletada especificamente no tecido adiposo e observaram lipodistrofia em parte dos animais, enquanto Franckhauser et al (2002) observaram que a indução do aumento da expressão desta enzima resultou em obesidade, embora os animais não tenham desenvolvido DM2 e tenham apresentado algum aumento da sensibilidade à insulina. Além disso, Cadoudal et al (2007) revelaram que um dos mecanismos por meio dos quais as tiazolidinedionas (TZD), uma classe de drogas utilizada no tratamento da DM, diminuem a liberação de AGL é o aumento da expressão e da atividade da PEPCK-c.

Considerando estes estudos e o atual conhecimento sobre os danos causados pelo aumento excessivo de AGL circulantes e sua conseqüente lipotoxicidade, é possível elaborar a hipótese de que a alteração da gliceroneogênese no tecido adiposo pode ter algum papel na etiologia da DM2 (BEALE, 2002). Neste contexto, Beale et al (2004) sugerem que a desregulação da PEPCK-c neste tecido constitui um fator causal na DM2 (baixa expressão da enzima) ou obesidade (expressão excessiva da enzima), hipótese ainda não comprovada.

Além da gliceroneogênese, existem apenas outras duas vias por meio das quais glicerol-3-fosfato poderia ser sintetizado no tecido adiposo: a partir da glicose, via glicólise, ou do glicerol, pela ação da glicerocinase. Uma premissa central do metabolismo do tecido adiposo é que o glicerol liberado durante a lipólise não pode ser fosforilado e utilizado na síntese de TG, devido à baixa atividade da enzima glicerocinase neste tecido. A maior parte do glicerol liberado no jejum é captado pelo fígado e convertido em glicose, embora o músculo esquelético também possa utilizá-lo para síntese de TG (GUO e JENSEN, 1999). Ao longo dos anos tem sido encontrada presença de atividade da glicerocinase no tecido adiposo (STERN, 1983; REN-JYE HO, 1979). No entanto, segundo Reshef et al (2003), isto não

ocorre em quantidade suficiente para viabilizar as altas taxas de reesterificação necessárias para síntese de TG quando há menor disponibilidade de glicose, como ocorre no jejum. As TZD induzem a expressão desta enzima. Este pode ser o mecanismo por meio do qual estas drogas contribuem para menor liberação de AGL pelo tecido adiposo (GUAN et al, 2002).

1.2 Ácidos graxos poliinsaturados

1.2.1 As classes de AGPI e a descoberta de sua essencialidade

Durante o Período Paleolítico os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) já faziam parte de nossa dieta (CORDAIN et al, 2005). Estes compostos são classificados em duas famílias distintas de acordo com os ácidos graxos a partir dos quais são sintetizados: n-6 (ômega-6), que deriva do ácido linoléico (18:2 ω 6 - AL) e n-3 (ômega-3), que deriva do ácido α -linolênico (18:3 ω 3 – ALN). Contrariamente a outros ácidos graxos, LA e ALN não podem ser sintetizados *de novo*, por esta razão são ditos essenciais e devem ser obtidos a partir da dieta em quantidades adequadas. As abreviações ω 6 e ω 3 referem-se à posição da primeira insaturação a partir da porção metila (ou carbono ômega) da cadeia de carbonos do ácido graxo (BENATTI et al, 2004).

Os primeiros estudos que identificaram estes ácidos graxos como sendo compostos essenciais surgiram no final da década de 1920 e início da década de 1930. Os pesquisadores George e Mildred Burr (1929) revelaram que ratos alimentados com uma dieta isenta de lipídios após o desmame apresentavam retardo no crescimento, descamação da pele e infertilidade, entre outras alterações. Os autores observaram que, quando adicionados à dieta, banha de porco, óleo de milho e óleo de linhaça (óleo ricos em AL e/ou ALN) revertiam estas alterações. Neste período as funções distintas dos ácidos graxos AL e ALN ainda não eram

conhecidas, assim ambos foram conjuntamente identificados como “vitamina F”, termo posteriormente substituído por “ácidos graxos essenciais”. Embora amplamente utilizado na literatura, o uso deste termo tem sido questionado e outras nomenclaturas já foram propostas (SIMOPOULOS, 1999). Neste texto, o termo “AGPI” será utilizado para fazer referência às duas famílias deste tipo de ácido graxo ($\omega 3$ e $\omega 6$).

1.2.2 As famílias de ácidos graxos $\omega 3$ e $\omega 6$ e seus respectivos metabólitos

A dieta da população, em geral, contém AGPI principalmente na forma de AL e ALN. Após ingeridos, estes precursores de 18 carbonos podem passar por reações alternadas de dessaturação-alongamento. A partir de AL é sintetizado o ácido araquidônico (C20:4 $\omega 6$ - AA) e a partir de ALN são sintetizados ácido eicosapentaenóico (C20:5 $\omega 3$ - EPA) e docosahexaenóico (C22:6 $\omega 3$ DHA), entre outros compostos (Figura 3). AL e ALN utilizam as mesmas enzimas para dar origem a seus metabólitos, porém ácidos graxos da família $\omega 3$ não podem dar origem a ácidos graxos $\omega 6$ e vice-versa. O fígado é o principal sítio onde ocorrem estas reações, embora não o único (HOLMAN, 1998).

A primeira parte da via metabólica levando à formação de AA e/ou EPA ocorre no retículo endoplasmático e consiste em passos seqüenciais alternados de alongamento e dessaturação catalisados pelas enzimas ácido graxo elongase, Δ -6 e Δ -5 dessaturases. A conversão final de EPA em DHA envolve a adição de duas unidades de dois carbonos, uma segunda dessaturação pela Δ -6 dessaturase, após a qual o ácido graxo com 24 carbonos é transportado para os peroxissomos e convertido a DHA por meio de um passo de β -oxidação (SPRECHER et al, 1995). Estudos *in vitro* têm mostrado que a maior afinidade pela enzima Δ -6 dessaturase ocorre na ordem: 18:3 ω -3 > 18:2 ω -6 > 18:1 ω -9 (DRI Report, 2002).

Vegetais são a principal fonte de ácidos graxos $\omega 6$. O AL é encontrado em grandes quantidades nas dietas ocidentais no óleo de milho, girassol, soja e amendoim. O AA é encontrado em carnes e ovos (NAKAMURA et al, 2001).

1.2.4 A ingestão de AGPI ao longo da evolução do homem, a ingestão atualmente recomendada e a razão ácidos graxos $\omega 6:\omega 3$ ideal

Estudos sobre a alimentação na Era Paleolítica sugerem que os humanos desenvolveram-se consumindo uma dieta que continha quantidades menores de gordura saturada e ácidos graxos *trans* em relação à dieta atual, e uma proporção semelhante de ácidos graxos $\omega 6:\omega 3$ (1-2:1) (Figura 4). Nos últimos 100-150 anos houve um significativo aumento no consumo de ácidos graxos $\omega 6$ devido à maior ingestão de óleos vegetais (milho, girassol, soja). Além disso, a ingestão de ácidos graxos $\omega 3$ diminuiu devido ao menor consumo de peixe e à produção industrial de ração animal rica em grãos contendo AG $\omega 6$ e pobres em AG $\omega 3$.

O balanço entre AGPI $\omega 6$ e $\omega 3$ é essencial para o metabolismo e manutenção das funções de ambas classes. Atualmente, nas dietas ocidentais, a razão de ácidos graxos $\omega 6:\omega 3$ varia entre 30-20:1 em lugar da faixa tradicional de 1-2:1 (SIMOPOULOS, 1999). No entanto, ainda não existe um consenso sobre as recomendações para ingestão dietética adequada destes ácidos graxos, pois as necessidades ótimas não são completamente conhecidas (AKABAS e DECKELBAUN, 2006; HARRIS, 2007).

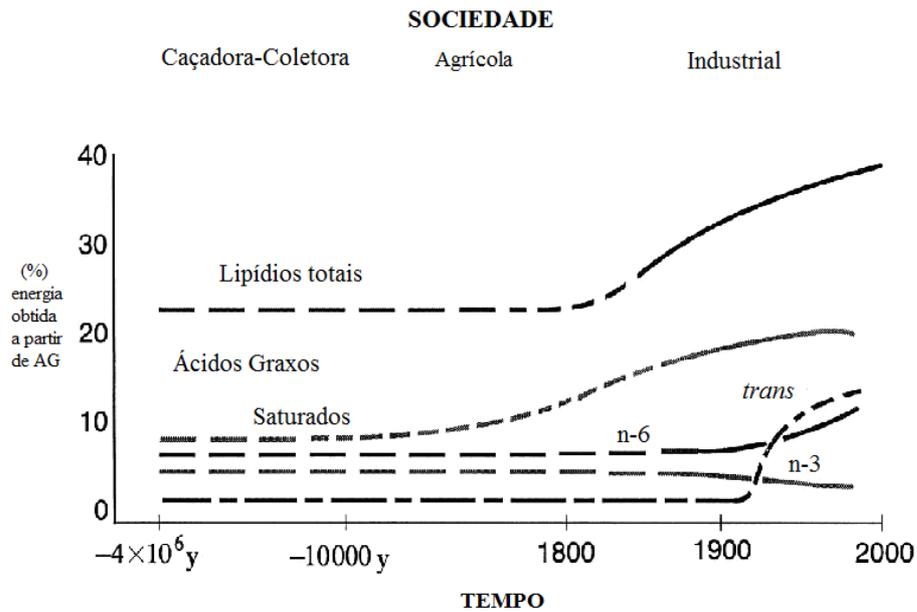


Figura 4. Estimativa da ingestão de ácidos graxos ao longo do tempo. Esquema hipotético mostra as relativas percentagens de gordura e das diferentes famílias de ácidos graxos na nutrição humana conforme extrapolação a partir de análises de estudos sobre a alimentação do homem da Era Paleolítica (homens caçadores-coletores) até os dias atuais, considerando suas supostas mudanças durante os últimos 100 anos (SIMOPOULOS, 1999).

Conforme descrito por Holman (1998), significativa inibição da via do metabolismo de AG $\omega 6$ acontece com ingestão de menos de 2% das calorias provenientes de ALN, enquanto uma supressão semelhante do metabolismo de AG $\omega 3$ requer 10 vezes mais AL. Para ser igualmente competitivos, os precursores AL e ALN teoricamente deveriam ser ingeridos numa razão 14:1. A igualdade da competição, no entanto, talvez não seja o critério que define a função ótima destes AG. Pesquisadores têm proposto diferentes razões para ingestão desses AG, mas ainda não existe um consenso, especialmente porque tem sido comprovado que as suas necessidades, principalmente de AG $\omega 3$, podem ser diferentes nas diversas etapas do desenvolvimento humano (SIMOPOULOS, 1999). Além disso, a capacidade de converter ALN em DHA difere entre as espécies de mamíferos. Em humanos, a conversão de EPA em DHA pode ser baixa, conforme estudo de Goyens et al (2005), então possivelmente não apenas a razão de AG $\omega 6:\omega 3$ seja importante, mas também os tipos específicos de ácidos graxos a ser ingeridos de cada família. A OMS, com base em estudos em animais, crianças e adultos, sugere uma dieta com a razão AL:ALN de 5:1 a 10:1.

O DRI¹ report (Dietary Reference Intakes Report) sobre macronutrientes, elaborado pelo IOM² (Institute of Medicine) da Academia Nacional de Ciências Americana (American National Academies of Sciences) recomenda que a ingestão de ácidos graxos saturados e ácidos graxos *trans* seja o mais restrita possível dentro de uma dieta que permita uma ingestão adequada de todos os nutrientes essenciais. Em relação aos AGPI, sugere uma “faixa aceitável de distribuição de macronutrientes” de 5 a 10% das calorias totais da dieta provenientes de AG ω 6, e 0,6 a 1,2% de AG ω 3. Sugere ainda que EPA e DHA podem fornecer até 10% da ingestão total de ácidos graxos ω 3 (IOM, 2002).

Reconhecendo a importância e os benefícios do consumo de AG ω 3, a Associação Americana de Diabetes e a Associação Americana do Coração recomendam a ingestão de duas ou mais porções de peixe por semana (BANTLE et al, 2008; LICHTENSTEIN et al, 2006). A FAO/OMS sugere o consumo regular de peixe (uma a duas porções por semana, cada uma contendo 200 a 500mg de EPA e DHA) (WHO, 2003).

Devido à aumentada ingestão de AG ω 6 na dieta ocidental, os eicosanóides originados a partir de AA podem ser formados em quantidades maiores que aqueles formados a partir de AG ω 3, especificamente EPA. Os eicosanóides formados a partir de AA, se formados em grandes quantidades, poderiam contribuir para formação de trombos e ateromas e para o desenvolvimento de reações alérgicas, entre outros efeitos, gerando um estado fisiológico pró-trombótico e pró-agregatório (SIMOPOULOS, 1999).

¹ DRI – grupo de valores de referência para ingestão de macro e micronutrientes baseado em outros valores que consideram a média da ingestão pela população americana de cada nutriente, o seu nível máximo tolerado sem causar malefícios e a ingestão recomendada para atingir as necessidades de 97-98% da população americana (IOM, 2003).

² O National Academies of Sciences reúne comitês de especialistas em todas as áreas científicas e tecnológicas para elaborar orientações sobre importantes questões para o governo e para o público americano que, em algumas áreas, são utilizadas por profissionais de todo o mundo.

1.2.5 Deficiência de AGPI

Os sintomas clássicos da deficiência de ácidos graxos essenciais (dermatite, retardo no crescimento e infertilidade) relacionam-se à função biológica dos ácidos graxos ω_6 , considerando que AL é um componente estrutural das ceramidas da barreira impermeável da pele, AA é precursor de eicosanóides e AG ω_6 possivelmente também exercem um papel como segundos mensageiros no processo de transdução de sinal intracelularmente. A deficiência de AL pode desenvolver-se como condição secundária em outras desordens, como desnutrição protéico-energética, má-absorção de gordura, ou nutrição parenteral total com oferta inadequada deste ácido graxo. Já a compreensão da essencialidade dos AG ω_3 vem sendo recentemente melhor entendida, e está claro que tem papéis distintos dos AG ω_6 (JUMP, 2002b). A deficiência de ω_3 pode levar à perda de DHA da retina e tecidos do SNC com compensatória substituição por AA, o que pode estar implicado na perda de memória e prejuízo da visão. Além disso, estudos em animais indicam que uma dieta deficiente em AG ω_3 favorece o surgimento de resistência à insulina (DELARUE et al, 2004).

1.2.6 Efeitos biológicos dos AGPI

Pesquisadores há anos vêm confirmando em humanos e animais efeitos benéficos dos AGPI, especialmente AG ω_3 de cadeia longa (DHA e EPA), tanto em patologias como diabetes, doenças neurodegenerativas, doenças cardíacas, entre outras, como na ausência de doenças (LOMBARDO e CHICCO, 2005; YOUNG et al, 2000; SCHMIDT, 2006).

Estes ácidos graxos são uma fonte de energia, de átomos de carbono e de componentes estruturais para as membranas celulares. Além disso, são precursores para síntese de eicosanóides e possuem importantes efeitos na expressão gênica por meio da regulação da

atividade ou abundância de fatores de transcrição (Figura 5). Sendo assim, são muitos os mecanismos que têm sido estudados com o objetivo de entender as suas ações: efeitos na integridade estrutural e fluidez da membrana, atividade de enzimas, interações lipídios-proteínas, sinalização celular e controle da expressão de genes específicos, além de seu papel como precursores de eicosanóides, como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (JUMP e CLARKE, 1999; SESSLER e NTAMBI, 1998).

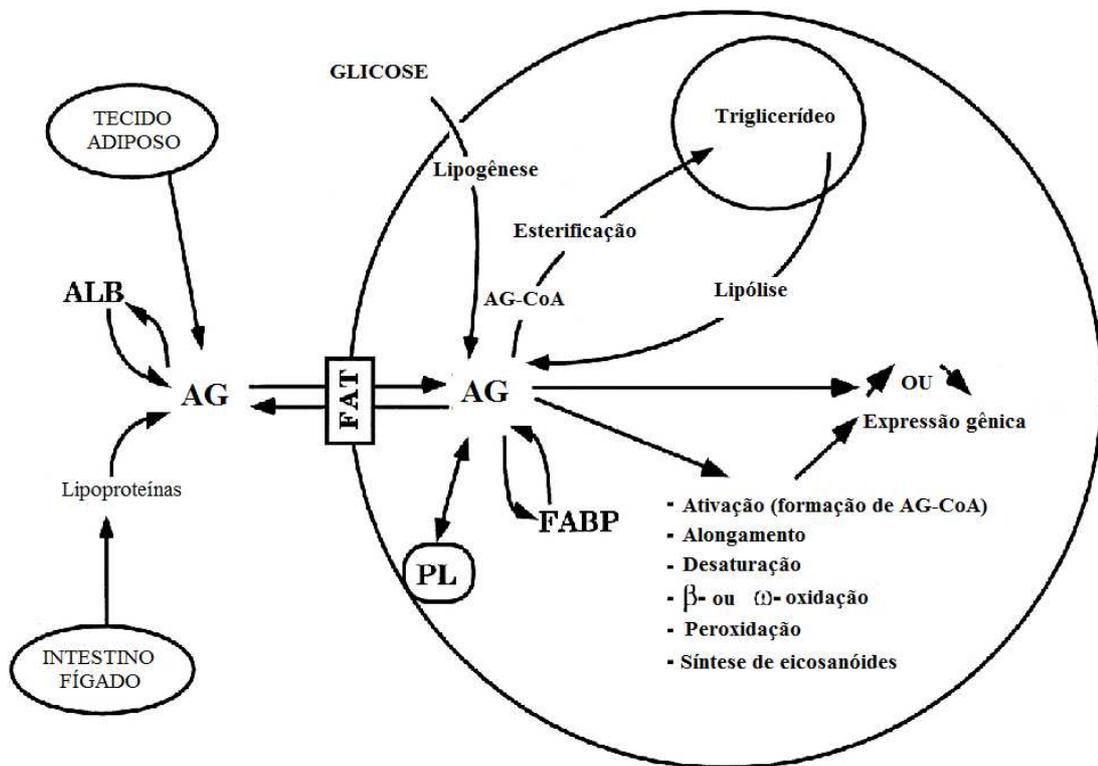


Figura 5. Principais vias de produção, transporte e metabolismo de AG. AGL são liberados do tecido adiposo por meio da lipólise. Além disso, no momento da captação destes AG pelos adipócitos a partir de lipoproteínas provenientes do intestino (quilomícrons - após uma refeição rica em lipídios) ou do fígado (VLDL), parte pode não ser captada e permanecer na circulação. AG circulam ligados à albumina (ALB) e atravessam a membrana com o auxílio de FAT (transportador de AG). Nas células lipogênicas, como hepatócitos e adipócitos, podem ser sintetizados a partir de glicose (lipogênese *de novo*). No interior da célula ligam-se a proteínas carreadoras de AG (FABP) e podem ser trocados com AG dos fosfolipídios de membrana. Principalmente no fígado e no tecido adiposo podem ser ativados a ácidos graxos-CoA e utilizados na síntese de TG. Em muitos tipos celulares, podem ser alongados e dessaturados por enzimas específicas, oxidados na mitocôndria ou nos peroxissomos, peroxidados ou participar na síntese de eicosanóides. Podem ainda ativar/inibir diretamente fatores de transcrição ou produzir metabólitos que os ativam/inibem (Duplus, 2000).

1.2.6.1 Ações de AGPI nas membranas celulares

A incorporação de AGPI nos fosfolipídios de membrana altera a sua fluidez e o seu conteúdo de colesterol e assim pode modificar a sinalização celular, exercendo significativo impacto no receptor de proteína G, cinase *Src*, MAP cinases e na sinalização pelo cálcio.

1.2.6.2 Eicosanóides

Os AGPI presentes na membrana plasmática servem como substrato para as enzimas ciclooxigenase e lipooxigenase e são convertidos em importantes compostos hormônio-like, com alta atividade, de vida curta – os eicosanóides. Estes participam de uma série de processos, entre os quais a resposta inflamatória. Sabe-se que eicosanóides influenciam a atividade da proteína cinase C (BENATTI, 2004). O fato de que tanto eicosanóides como a PKC podem modular a atividade de fatores de transcrição agrega ainda maior complexidade à compreensão dos efeitos metabólicos exercidos por AGPI.

1.2.6.3 Expressão gênica

AGPI afetam a expressão gênica por meio de vários mecanismos, incluindo mudanças na composição da membrana, nos níveis intracelulares de cálcio e na produção de eicosanóides (SAMPATH & NTAMBI, 2005).

Além disso, AGPI e/ou seus metabólitos podem agir diretamente no núcleo, ligando-se e regulando a atividade de receptores nucleares como PPAR, LXL, ChREBP e HNF4- α . Ainda, AGPI regulam a abundância nuclear dos fatores de transcrição SREBP por meio do controle do processamento proteolítico de seus precursores ou controlando a transcrição do

seu gene e o turnover de seus RNAm. AGPI $\omega 3$ e $\omega 6$ são ativadores de PPAR, enquanto estes mesmos ácidos graxos são inibidores de LXR e SREBP. Ácidos graxos saturados ativam HNF4- α , enquanto AGPI ativados antagonizam sua ação (JUMP, 2002a; SAMPATH & NTAMBI, 2005). Estes fatores de transcrição exercem um importante papel no metabolismo de carboidratos, ácidos graxos, triglicerídeos, colesterol e de sais biliares.

PPAR (*peroxisome proliferator activated receptors*) são uma família de receptores nucleares e podem ter três isoformas: α , β/δ e γ . Todas atuam formando um dímero com RXR (*retinoid X receptor*). O PPAR α também é fortemente ativado pela classe de drogas dos fibratos usada no manejo da hipercolesterolemia, enquanto o PPAR γ é alvo das tiazolidinedionas, usadas no manejo clínico da diabetes e resistência à insulina. O PPAR α é encontrado predominantemente nos hepatócitos. Os PPAR estão envolvidos com a expressão de genes da via de oxidação, alongamento e dessaturação de lipídios, entre outros (SAMPATH & NTAMBI, 2005). Em geral, são ativados por AGPI.

Outro grupo de receptores nucleares que parece mediar efeitos hipolipidêmicos de AGPI é o LXR (*liver X receptor*) que compreende receptores inibidos por estes ácidos graxos. LXR α e β ligam-se a oxisteróis endogenamente e atuam regulando genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos e colesterol (REPA e MANGELSDORF, 2000), incluindo SREBP-1c.

SREBP (*sterol regulatory element binding protein*) pertencem a uma família de fatores de transcrição e foram identificados primeiramente pela sua capacidade de ligar-se a elementos-resposta específicos encontrados na região promotora de genes envolvidos na formação de colesterol. Foram identificadas três isoformas de SREBP: SREBP-1a e 1c atuam na regulação dos genes da síntese de lipídios, enquanto SREBP-2 é importante para controlar genes envolvidos na homeostase do colesterol (JUMP, 2002). AGPI deprimem sua ação,

enquanto a insulina induz a expressão de vários genes lipogênicos por meio destes fatores de transcrição.

O HNF-4 α é um membro da “família de fatores nucleares dos hepatócitos” (hepatocyte nuclear factor family) que inclui seis diferentes isoformas. Parece indispensável para funções hepáticas como secreção de lipoproteínas e colesterol. É expresso principalmente no fígado, rins, intestino e pâncreas. Os AGPI parecem reprimir, enquanto os saturados ativam este fator (NTAMBI, 2005).

O ChREBP (*carbohydrate-responsive element-binding protein*) é um fator de transcrição que está envolvido na regulação do metabolismo de lipídios (síntese) e carboidratos. É inibido por AGPI.

Quanto à afinidade e à potência da ação de diferentes tipos de AGPI ω 3 e ω 6 sobre estes receptores nucleares e fatores de transcrição, sabe-se que existe grande variação, o que contribui para os diferentes efeitos exercidos por ácidos graxos destas duas famílias. Em geral, todos ácidos graxos ω 3 e ω 6 ativam as três isoformas de PPAR (JUMP, 2008), entretanto a afinidade de diferentes ácidos graxos com cada receptor varia. Em relação ao PPAR α , por exemplo, entre os três ácidos graxos ω 3 comumente encontrados na dieta, α -linolênico é um fraco regulador da expressão gênica hepática, enquanto EPA e DHA são fortes reguladores. O DHA é um fraco ativador do PPAR α . O metabolismo hepático, no entanto, gera EPA, um forte ativador do PPAR α . Em contraste ao PPAR α , DHA é o mais potente regulador do SREBP-1. Tanto AG ω 6 como AG ω 3 parecem suprimir ChREBP (JUMP, 2008).

Apesar do grande progresso que tem sido feito no entendimento da atuação dos AGPI sobre a expressão gênica, são necessários mais estudos sobre seus efeitos no metabolismo intermediário. Vários genes responsivos a AG são também responsivos a ativadores de PPAR e apresentam uma região para ligação deste receptor nuclear em sua região promotora. Assim,

tem sido assumido que AG regulam tais genes via PPAR. No entanto, evidências recentes sugerem que a alteração da transcrição gênica gerada por AG e ativadores de PPAR freqüentemente é desconexa, ou seja, alguns genes não respondem a AG, mesmo possuindo região para sua ligação em seu promotor. Dada toda esta complexidade, é importante realizar estudos dos efeitos dos diferentes AGPI diretamente sobre as vias de metabolização de carboidratos e lipídios sem apenas fazer suposições a partir exclusivamente de seus efeitos sobre a expressão gênica, que ainda precisam ser bastante melhor elucidados (DUPLUS et al, 2000).

Embora as ações nucleares dos AGPI tenham sido estudadas primeiramente nas células hepáticas, muitas de suas ações têm sido confirmadas em culturas de adipócitos (SESSLER & NTAMBI, 1998; TEBBEY, 1994), assim como outros tecidos, incluindo pâncreas e intestino. Conforme Benatti et al (2004), estes efeitos são mantidos enquanto o $\omega 3$ permanecer na dieta.

1.3 AGPI X RI

Pesquisadores há anos vêm confirmando a ação benéfica de AGPI, especialmente os AG $\omega 3$, na prevenção e/ou reversão dos efeitos da resistência à insulina em humanos e animais (LOMBARDO e CHICCO, 2005). Em humanos, a suplementação com óleo de peixe em diabéticos tipo 2 diminui efetivamente os triglicerídeos séricos e pode causar um leve aumento do LDL, porém não da fração mais aterogênica (FRIEDBERG et al, 1998; MONTORI et al, 2000).

Em estudos onde foram utilizadas dietas ricas nestes ácidos graxos, particularmente em AG $\omega 3$, foram relatados efeitos como aumento da sensibilidade periférica à insulina (D'ALESSANDRO et al, 2002), maior supressão da lipogênese hepática (JUMP e CLARKE,

1999) e da sua liberação de triglicerídeos (NESTEL et al, 1984; HERZBERG e ROGERSON, 1988), melhora da atividade tirosina cinase do receptor de insulina diminuída por dieta rica em sacarose (FICKOVÁ et al, 1994), aumento da fluidez da membrana plasmática relacionada a maior sensibilidade à insulina (STORLIEN et al, 1987), entre uma ampla série de outras ações.

Ácidos graxos $\omega 6$ e $\omega 3$ não possuem os mesmos efeitos e a melhora da sensibilidade à insulina tem sido, em geral, atribuída apenas a ácidos graxos $\omega 3$. Alguns estudos comparando óleos vegetais ricos em AL com óleo de peixe ricos em DHA e EPA apresentam resultados indicativos de que DHA e EPA são mais efetivos do que óleos vegetais ricos em AL (BAILLIE et al, 1999, LOMBARDO & CHICCO, 2007). Embora parte da diferença entre óleo de peixe e óleos vegetais nos efeitos possa dever-se ao fato de que AL deve passar por uma dessaturação pela $\Delta 6$ -dessaturase para tornar-se metabolicamente ativo, estudos recentes comparando AL com ALN indicam que AG $\omega 3$ continuam a ser mais potentes que AG $\omega 6$ (CLARKE, 2000). Enquanto os AG $\omega 3$ melhoram a sensibilidade à insulina (DELARUE, 2004; LOMBARDO & CHICCO; 2006), alguns estudos indicam pior RI com o uso de apenas AG $\omega 6$, na ausência de AG $\omega 3$ (STORLIEN, 1991; SASAGAWA et al, 2001).

Há um grande número de estudos por meio dos quais pesquisadores vêm explicitando a atuação dos AG $\omega 3$ no metabolismo de lipídios. Ainda assim, seus mecanismos para melhora do perfil lipídico ainda não estão completamente elucidados. Além disso, apesar da estreita comunicação do metabolismo de carboidratos e lipídios, na literatura encontra-se um volume muito menos expressivo de estudos tratando da relação entre AGPI e o metabolismo glicídico.

1.3.1 Efeitos dos AGPI no metabolismo de carboidratos

Há estudos que estabelecem que os ácidos graxos $\omega 3$ aumentam a sensibilidade periférica e hepática à insulina por meio da manutenção dos níveis normais de GLUT4 no músculo esquelético e no tecido adiposo, da inibição da atividade e expressão da glicose-6-fosfatase, entre outros efeitos (DELARUE et al, 2004; LOMBARDO & CHICCO, 2005).

Apesar dos diversos estudos sobre os efeitos de AGPI na expressão de enzimas da via glicolítica, seus efeitos sobre as vias de metabolização da glicose não são bem compreendidos e nos achados presentes na literatura encontram-se divergências. Rustan et al (1993), por meio de um estudo utilizando calorimetria indireta, concluíram que os ácidos graxos $\omega 3$ levam a uma maior oxidação de carboidratos totais, sem estabelecer, no entanto, em que sítio ocorre esta maior oxidação. O músculo esquelético é um dos principais sítios de oxidação de glicose no metabolismo periférico. D'Alessandro et al (2002) não observaram maior oxidação e síntese de glicogênio a partir de glicose no músculo esquelético, apesar de observarem maior tolerância à glicose em animais tratados com dieta rica em ácidos graxos $\omega 3$. Já Jump et al (1994) observaram menor expressão de enzimas da via glicolítica, e sugerem que a glicólise hepática encontra-se diminuída na dieta rica em AG $\omega 3$. Não encontramos na literatura estudos verificando a oxidação hepática de glicose com dietas ricas em AGPI para esclarecer estes dados.

Quanto ao metabolismo do glicogênio, os estudos são ainda mais escassos, e também há controvérsias. Davidson (2006) sugere que os AG $\omega 3$ levam a uma maior síntese de glicogênio muscular, e Clarke (2001) sugere uma maior síntese de glicogênio corporal total. Rustan et al (1993), no entanto, observaram menor concentração de glicogênio em animais que receberam dieta suplementada com AG $\omega 3$ nos dois sítios. Não encontramos na literatura estudos avaliando diretamente o efeito destes AGPI sobre a síntese de glicogênio.

1.3.2 Efeitos de AGPI no metabolismo de lipídios

Estudos sobre efeitos de AGPI na expressão gênica, especialmente ácidos graxos $\omega 3$, indicam que estes ácidos graxos atuam sobre o metabolismo de lipídios promovendo maior oxidação de ácidos graxos e menor síntese de lipídios (CLARKE, 2001; JUMP, 2008).

Sabe-se que a adiposidade corporal e os lipídios séricos têm uma importante relação metabólica. Está amplamente comprovado que AGPI $\omega 3$ levam à diminuição da adiposidade (PARRISH et al, 1990) e dos níveis de TG e de AGL séricos em animais (DAVIDSON, 2004; DELARUE 2004). Já os efeitos dos ácidos graxos $\omega 6$ nos lipídios séricos são menos evidentes.

Os TG armazenados no tecido adiposo derivam principalmente de lipoproteínas circulantes (VLDL, quilomícrons), especialmente durante dietas ricas em sacarose ou lipídios. Especula-se que um dos mecanismos por meio dos quais ácidos graxos $\omega 3$ desempenham suas ações hipolipidêmicas consiste no menor fornecimento de triglicerídeos para o tecido adiposo devido a menor síntese hepática de VLDL (CARPENTIER et al, 2006). No fígado, ácidos graxos para síntese de triglicerídeos e VLDL podem ser provenientes de quatro diferentes vias: AGL liberados pelo tecido adiposo, síntese hepática de lipídios *de novo*, excesso de ácidos graxos liberados para o pool plasmático de AGL no momento da hidrólise de triglicerídeos dos quilomícrons e captação dos remanescentes de quilomícrons (ADIELS et al, 2008) (Figura 6).

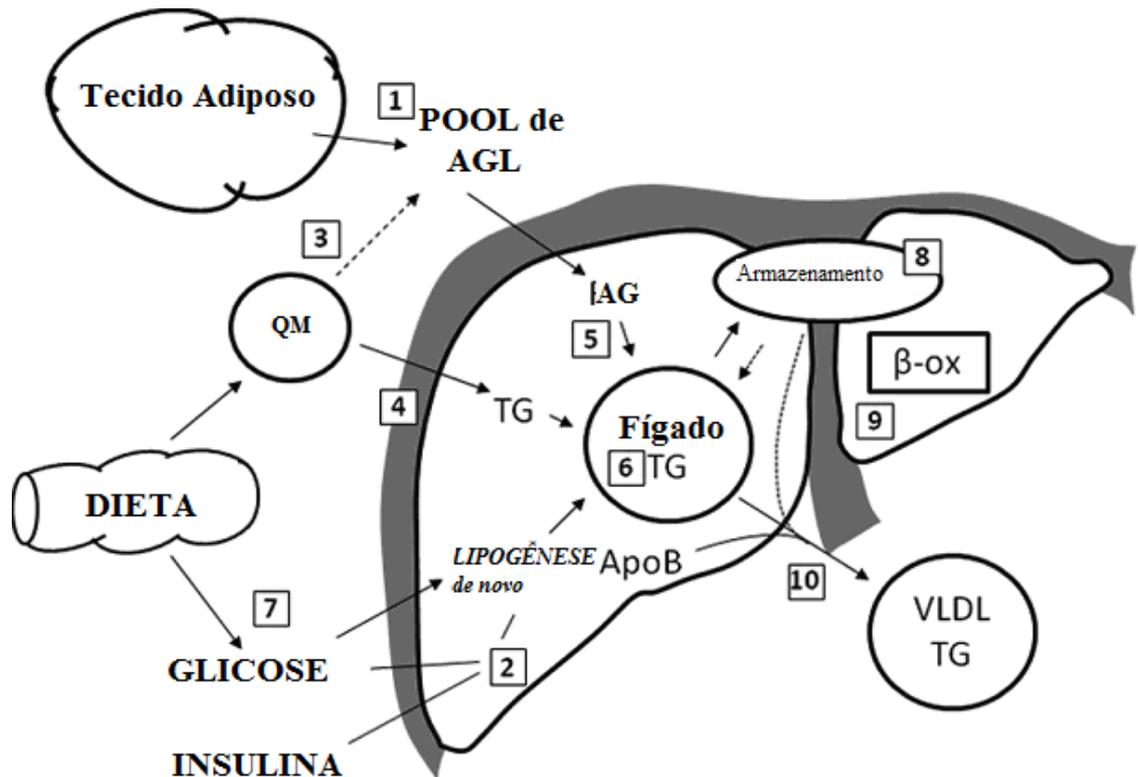


Figura 6. Fontes de ácidos graxos para o fígado para síntese de TG e produção de VLDL. Ácidos graxos (AG) utilizados pelo fígado para síntese de lipídios e VLDL podem ser provenientes de quatro diferentes vias: AGL liberados pelo tecido adiposo (1), síntese hepática de lipídios *de novo* (2), excesso de ácidos graxos liberados para o pool plasmático de AGL no momento da hidrólise de triglicerídeos dos quilomícrons (QM) (3) e captação dos remanescentes de quilomícrons (4). AGL são captados pelo fígado (5) e esterificados na forma de TG (6). A glicose serve como fonte de carbono para síntese *de novo* de AG e, em conjunto com a insulina, estimula a lipogênese (7). O fígado pode armazenar TG (6) temporariamente (8) antes de usá-los como fonte de energia para β-oxidação (β-ox) na mitocôndria (9). A maior parte dos lipídios é secretada como VLDL (10) (Adiels et al., 2008).

O fluxo de AGL para o fígado depende da taxa de lipólise e captação de ácidos graxos pelo tecido adiposo e das taxas de captação e oxidação de AGL pelo músculo esquelético, além de sua captação de lipoproteínas.

Sendo assim, existem diversos mecanismos em que os ácidos graxos $\omega 3$ possivelmente poderiam interferir para exercer seus efeitos hipolipidêmicos. Possíveis explicações para estes efeitos já foram propostas. Alguns estudos sugerem que as ações dos ácidos graxos $\omega 3$ que levam a menor concentração sérica de TG e AGL envolvem a reduzida síntese de VLDL no fígado e a menor disponibilidade de AGL provenientes da lipólise no tecido adiposo, juntamente à supressão de genes lipogênicos via inibição dos fatores de transcrição SREBP-1c, e aumento da oxidação de ácidos graxos via sua ação sobre PPAR α ,

entre outros efeitos. Além disso, uma aumentada atividade da lipase lipoproteica e maior captação de AG em tecidos extra-hepáticos também poderia contribuir para o efeito hipolipidêmico do ω 3 (CARPENTIER et al, 2006).

Em indivíduos com esteatose não-alcoólica, obesidade e hiperinsulinemia, Parks et al (2005) observaram que tanto um elevado fluxo de AGL proveniente de tecidos periféricos (tecido adiposo) como o aumento da síntese de lipídios *de novo* intra-hepática contribuem para o acúmulo de lipídios e para maior síntese de VLDL no fígado destes indivíduos no estado pós-prandial. A captação de AG pelo fígado não é regulada e, como resultado, a concentração plasmática de AGL está diretamente relacionada ao influxo de AG para o fígado. Em estados insulino-resistentes a insulina falha na supressão da lipase hormônio-sensível, o que resulta em maior lipólise.

Assim, o controle da lipólise pelo tecido adiposo possui importante papel no controle dos níveis de AGL circulantes, no seu fornecimento para o fígado e, conseqüentemente, na síntese de VLDL, assim podendo desempenhar também significativo efeito na concentração sérica de TG e na adiposidade corporal.

Antras-Ferry et al (1995) mostraram que AGPI são potentes indutores diretos e seletivos da transcrição de *Pck1*, gene da PEPCK-c, no tecido adiposo. Observaram que esta indução é direta e não devida a um produto metabólico. Entre vários AG testados, concluíram que o DHA é o mais potente estimulador da transcrição de *Pck1* em adipócitos. Portanto, o aumento da gliceroneogênese poderia ser um dos mecanismos por meio dos quais AG ω 3 contribuem para menor concentração sérica de AGL e TG. Não encontramos na literatura estudos revelando efeitos sobre a gliceroneogênese em animais tratados com dietas ricas em AGPI.

2. OBJETIVO

Considerando que existem relativamente poucos estudos sobre os efeitos dos ácidos graxos ω 3 sobre as vias de metabolização de carboidratos, e que permanecem dúvidas em relação aos mecanismos por meio dos quais estes ácidos graxos levam a menor adiposidade, além de menores níveis de TG e AGL séricos, este trabalho tem como objetivos:

OBJETIVOS GERAIS

- Comparar os efeitos de diferentes tipos de ácidos graxos (poliinsaturados e saturados) sobre parâmetros do metabolismo lipídico pouco estabelecidos.
- Verificar os efeitos de diferentes tipos de ácidos graxos sobre diferentes vias do metabolismo de carboidratos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os efeitos de dietas com diferentes composições de lipídios - ricas em ácidos graxos ω 3, ω 6 ou saturados – sobre a oxidação hepática de glicose, a atividade do complexo PDH, a síntese de lipídios a partir de glicose em fígado e tecido adiposo retroperitoneal, o peso e a adiposidade corporal, a concentração hepática de triglicerídeos, os níveis séricos de insulina, triglicerídeos, HDL e glicose em ratas Wistar aos três meses de idade dos animais, sendo o tratamento iniciado a partir do período gestacional das ratas-mãe.

- Comparar os efeitos de dietas hiperpalatáveis contendo ácidos graxos $\omega 3$ predominantemente na forma de ácido α -linolênico ou na forma de α -linolênico, EPA e DHA sobre a síntese de glicogênio a partir de glicose e de glicerol, a oxidação de glicose no tecido adiposo e no fígado, a síntese de lipídios a partir de glicose em fígado e tecido adiposo retroperitoneal, o peso e a adiposidade corporal, a concentração hepática de triglicerídeos, os níveis séricos de insulina, triglicerídeos, HDL e glicose em ratos Wistar aos sete meses de idade, sendo o tratamento iniciado no período gestacional das ratas-mãe.
- Comparar os efeitos de dietas ricas em sacarose deficiente em ácidos graxos $\omega 3$ ou contendo ácidos graxos $\omega 6$ e $\omega 3$ sobre a atividade da PEPCCK, a síntese de lipídios a partir de glicerol e de glicose em tecido adiposo epididimal, a síntese de lipídios a partir de glicose no fígado, o peso e a adiposidade corporal, a concentração hepática de triglicerídeos, os níveis séricos de triglicerídeos e glicose em ratos Wistar após três meses de tratamento, iniciado a partir de um mês de idade dos animais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Reagentes

- [U-¹⁴C]-Glicose: atividade específica 297 mCi/mmol (Perkin Elmer)
- [U-¹⁴C]-Glicerol: atividade específica 180 mCi/mmol (Perkin Elmer)
- [¹⁴C]-Bicarbonato de sódio: atividade específica 8,4 mCi/mmol (Perkin Elmer)
- [1-¹⁴C]-Piruvato: atividade específica 5-20mCi/mmol (Perkin Elmer)
- Clorofórmio: Merck S. A. Porto Alegre - RS - Brasil
- Metanol: Merck S. A. Porto Alegre - RS - Brasil
- Tolueno: Merck S. A. Porto Alegre - RS - Brasil
- Ácido Tricloroacético: Merck S. A. Porto Alegre - RS - Brasil
- Hidróxido de Sódio: Merck S. A. Porto Alegre - RS - Brasil
- D-Glicose p.a.: Quimbrás Indústrias Químicas S.A. Rio de Janeiro - RJ - Brasil
- POP e POPOP: Sigma Chemicals Company - St. Louis/EUA
- Fibras: Blanver Farmoquímica Ltda
- Cápsulas de ácidos graxos ômega-3: Naturalis Nutrição & Farma Ltda. SP - Brasil
- Proteína isolada de soja (92% de pureza): Solae do Brasil. Barueri - São Paulo - Brasil
- Kit para dosagem de insulina: MP Biochemicals. Ohio/EUA
- Kit para dosagem de ácidos graxos livres: Roche. Alemanha
- Kits para dosagem de triglicérides e colesterol: In Vitro Diagnostica S/A. Itabira - MG - Brasil

Todos os demais reagentes e solventes foram de pureza “pró-análise” (p.a.), adquiridos de Sigma Chemical Co (St. Louis/EUA) ou Merck.

3.1.2 Animais experimentais

Foram utilizados ratos albinos Wistar, provenientes da Universidade Federal de Pelotas e da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde obtidos por meio do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de 21-23°C, com ciclo de luminosidade claro-escuro de 12/12 horas.

3.2 Métodos

3.2.1 Modelos dietéticos de indução de resistência à insulina

Animais normais alimentados com dietas ricas em carboidratos ou em lipídios tendem a desenvolver hipertrigliceridemia, aumento dos níveis séricos de AGL e do acúmulo de triglicerídeos no fígado e em alguns tecidos periféricos, como coração e músculo esquelético, hiperinsulinemia, resistência à insulina em tecidos-alvo (fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, além de moderada adiposidade (LOMBARDO et al, 2007; SOUZA, 2007; AKAGIRI et al, 2008). Portanto, estes tipos de dieta têm sido extensivamente utilizados para o estudo da resistência à insulina, inclusive para o estudo dos efeitos do óleo de peixe sobre este quadro.

Utilizamos três diferentes modelos de dieta para indução de resistência à insulina: hiperglicídica (rica em sacarose), hiperlipídica (rica em diferentes fontes de lipídios) e hiperpalatável (dieta também hiperglicídica, contendo leite condensado). Algumas análises foram realizadas com os três tipos de dieta, e outras apenas em animais tratados com uma destas, conforme especificado ao longo do texto.

Tendo em vista que o acúmulo materno de lipídios durante o início da gestação permite a criação de uma importante reserva de AGPI derivada tanto da dieta como do metabolismo materno, optamos por iniciar a intervenção dietética duas semanas antes do acasalamento das ratas-mãe que deram origem aos animais estudados nos modelos de dieta hiperpalatável e hiperlipídica para deprivá-las de AG ω 3, criando assim animais deficientes nestes AG quando este era o objetivo. Estas reservas tornam-se disponíveis para transferência através da placenta durante o último trimestre do período gestacional, quando a taxa de crescimento fetal é máxima e as necessidades de AGPI do feto aumentam significativamente (HERRERA et al, 2006).

Administramos dieta hiperpalatável com diferente composição de lipídios (rica em ALN ou ALN, EPA e DHA) a dois grupos de ratas e seus filhotes por um período total de aproximadamente oito meses, até os sete meses de idade dos filhotes, e utilizamos um grupo tratado com dieta comercial padrão como controle. Dieta hiperglicídica (rica em sacarose) contendo predominantemente AG ω 6 ou AG ω 6: ω 3 numa razão 2:1 foi administrada a dois grupos por três meses a partir de um mês de idade dos filhotes machos, filhos de mães não tratadas previamente. Neste caso, o grupo controle foi formado por animais alimentados com uma dieta contendo amido em substituição à sacarose. Por fim, oferecemos a três grupos de animais uma dieta hiperlipídica contendo lipídios predominantemente na forma de gordura saturada, AG ω 6 ou AG ω 6: ω 3 numa razão 5:1 por aproximadamente quatro meses, partindo do período pré-gestacional das ratas-mãe, até os filhotes completarem três meses de idade. O

grupo controle foi formado por animais alimentados com dieta contendo níveis normais de AG ω 3.

Seguem listadas as tabelas com a composição das dietas administradas aos grupos em estudo:

Tabela 1. Composição das dietas hiperglicídicas (ricas em sacarose)

Dieta Hiperglicídica	Controle (grupo CONT-SAC)		Sacarose - ω 6 (grupo SAC- ω 6)		Sacarose ω 6: ω 3 - 2:1 (grupo SAC- ω 3)	
	g%	kcal%	g%	Kcal%	g%	kcal%
Proteína	20	18,48	20	18,48	20	18,48
Carboidrato	59	54,5	59	54,5	59	54,5
Lipídio	13	27,02	13	27,02	13	27,02
kcal/g	4,4		4,4		4,4	
Ingredientes						
Proteína de soja (92% pureza) ¹	21,74	86,96	21,74	86,96	21,74	86,96
Amido	58	232	0	0	0	0
Sacarose	0	0	58	232	58	232
Vitaminas ²	1	4	1	4	1	4
Minerais ³	4	0	4	0	4	0
Fibra	2	0	2	0	2	0
DL-metionina	0,3	0	0,3	0	0,3	0
Óleo de girassol	13	117	13	117	8,56	117
Óleo de peixe ⁴	0	0	0	0	4,44	0
Razão ω6: ω3	48-1		48-1		02:01	

1 Proteína isolada de soja, 92% de pureza (Solae do Brasil, São Paulo, Brasil).

2 Mistura vitamínica (mg/100g de ração): vitamina A,4; vitamina D, 0,5; vitamina E, 10; menadiona, 05; colina, 200; PABA, 10; inositol, 10; niacina, 4; ácido pantotênico, 4; riboflavina, 0,8; tiamina, 0,5; piridoxina, 0,5; ácido fólico, 0,2; biotina, 0,04; vitamina B12, 0,003.

3 Composição (mg/100g de ração): NaCl, 557; KH₂PO₄,1556; MgSO₄,229; CaCO₃, 1526; FeSO₄.7H₂O, 108; MnSO₄.H₂O, 16; ZnSO₄.7H₂O, 2,2; CuSO₄.5H₂O, 1,9; CoCl₂.6 H₂O, 0,09).

4 Cápsulas de 1mL de óleo de peixe contendo 500mg de DHA e 100mg de EPA (Naturalis Nutrição & Farma Ltda. SP – Brasil).

Tabela 2. Composição das dietas hiperlipídicas

Dieta Hiperlipídica	AG SATURADOS grupo SAT		AG ω 6 grupo ω 6		AG ω 6: ω 3 - 5:1 grupo ω 3	
	G%	Kcal%	g%	kcal%	G%	kcal%
Proteína	24,99	21,18	24,99	21,18	24,99	21,18
Carboidrato	48,01	40,68	48,01	40,68	48,01	40,68
Lipídio	20	38,13	20	38,13	20	38,13
kcal/g	4,72		4,72		4,72	
Ingredientes						
Proteína isolada de soja (92% pureza) ¹	27,17	108,68	27,17	108,68	27,17	108,68
Amido	33,24	132,96	33,24	132,96	33,24	132,96
Sacarose	11,6	46,4	11,6	46,4	11,6	46,4
Vitaminas ²	1	4	1	4	1	4
Minerais ³	4	0	4	0	4	0
Fibra	2	0	2	0	2	0
DL-metionina	0,3	0	0,3	0	0,3	0
Gordura de coco	20	180	0	0	0	0
Óleo de amendoim	0	0	20	180	0	0
Óleo de milho	0	0	0	0	17,5	157,5
Óleo de peixe (DHA 500)⁴	0	0	0	0	2,5	22,5
Razão ω6:ω3					5:1	

1 Proteína isolada de soja, 92% de pureza (Solae do Brasil, São Paulo, Brasil).

2 Mistura vitamínica (mg/100g de ração): vitamina A, 4; vitamina D, 0,5; vitamina E, 10; menadiona, 05; colina, 200; PABA, 10; inositol, 10; niacina, 4; ácido pantotênico, 4; riboflavina, 0,8; tiamina, 0,5; piridoxina, 0,5; ácido fólico, 0,2; biotina, 0,04; vitamina B12, 0,003.

3 Composição (mg/100g de ração): NaCl, 557; KH₂PO₄, 1556; MgSO₄, 229; CaCO₃, 1526; FeSO₄.7H₂O, 108; MnSO₄.H₂O, 16; ZnSO₄.7H₂O, 2,2; CuSO₄.5H₂O, 1,9; CoCl₂.6 H₂O, 0,09).

4 Cápsulas de 1mL de óleo de peixe contendo 500mg de DHA e 100mg de EPA (Naturalis Nutrição & Farma Ltda. SP – Brasil).

Tabela 3. Composição das dietas hiperpalatáveis

Dieta Hiperpalatável	Nuvital CONT-HP		Óleo de Soja grupo HP-ALN		Óleo de soja e de Peixe ω 6: ω 3 - 2:1 grupo HP-EPA/DHA	
	G%	Kcal%	g%	kcal%	g%	kcal%
Proteína	22	88	25,48	101,92	25,48	101,92
Carboidrato	55	220	51,49	205,96	51,49	205,96
Lipídio	4,5	40,5	9,93	89,37	9,93	89,37
kcal/g	3,48		3,97		3,97	
Ingredientes						
Proteína de soja (92% pureza) ¹	-	-	10,9	43,9	10,9	43,9
Farelo comercial	-	-	27,77	101,14	27,77	101,14
Sacarose	-	-	7,95	31,8	7,95	31,8
Leite condensado	-	-	42,15	142,6	42,15	142,6
Vitaminas ²	-	-	1	4	1	4
Minerais ³	-	-	4	0	4	0
DL-metionina	-	-	0,3	0	0,3	0
Óleo de soja	-	-	6	54	4	36
Óleo de peixe (DHA 500)⁴	-	-	0	0	2	18
Razão ω6:ω3	-	-	9,41:1		1,5:1	

1 Proteína isolada de soja, 92% de pureza (Solae do Brasil, São Paulo, Brasil).

2 Mistura vitamínica (mg/100g de ração): vitamina A, 4; vitamina D, 0,5; vitamina E, 10; menadiona, 05; colina, 200; PABA, 10; inositol, 10; niacina, 4; ácido pantotênico, 4; riboflavina, 0,8; tiamina, 0,5; piridoxina, 0,5; ácido fólico, 0,2; biotina, 0,04; vitamina B12, 0,003.

3 Composição (mg/100g de ração): NaCl, 557; KH₂PO₄, 1556; MgSO₄, 229; CaCO₃, 1526; FeSO₄.7H₂O, 108; MnSO₄.H₂O, 16; ZnSO₄.7H₂O, 2,2; CuSO₄.5H₂O, 1,9; CoCl₂.6 H₂O, 0,09).

5 Cápsulas de 1mL de óleo de peixe contendo 500mg de DHA e 100mg de EPA (Naturalis Nutrição & Farma Ltda. SP – Brasil).

Tabela 4. Composição de ácidos graxos dos óleos utilizados

Composição Ácidos Graxos (nomes sistemático e comum)	ÓLEO DE GIRASSOL ¹	ÓLEO DE MILHO ¹	ÓLEO DE AMENDOIM ²	ÓLEO DE PEIXE ³	ÓLEO DE SOJA ¹	GORDURA DE COCO ⁴
Volume	g/100mL	g/100mL	g/100mL	g/100ml	g/100mL	g/100mL
<i>Saturados</i>	10,8	15,2	até 33,5	0	15,2	90
<i>Monoinsaturados</i>	25,4	33,4	35 - 72	0	23,3	6
<i>Polinsaturados</i>	62,6	50,9	13 - 45	60	60	2
C8:0- octanóico-caprílico	-	-	-	-	-	8
C12:0-Dodecanóico-láurico	-	-	-	-	-	44,6
C14:0-tetradecanóico-míristico	-	-	< 0,6	-	0,08	16,8
C16:0-hexadecanóico-palmitico	6,1	12,12	6,0 - 16	-	10,83	-
C16:1-hexadecenoico-palmitoleico	0,08	0,12	< 1,0	-	0,09	-
C18:0-octadecanóico-esteárico	3,42	2,18	1,3 - 6,5	-	3,36	-
C18:1 (ω -9)-octadecenoico-oléico	25,15	33,04	35 - 72	-	22,98	6
C18:2 (ω-6)-linoléico	62,22	49,94	13 - 45	-	53,85	2
C18:3 (ω-3)-linolênico	0,39	0,96	< 0,3	-	5,72	-
C20:0-eicosanóico-araquídico	0,26	0,49	1,0 - 3,0	-	0,33	-
C20:1-eicosenoico-gadoléico	-	0,23	0,5 - 2,1	-	0,6	-
C22:0-docosanóico-behênico	0,67	0,18	1, 0 - 5,0	-	0,43	-
C24:0-tetracosanóico-lignocérico	0,25	0,19	0,5 - 3,0	-	0,14	-
20:5-eicosapentaenóico (EPA)	-	-	-	10	-	-
22:6-docosahexaenóico (DHA)	-	-	-	50	-	-

1 Tabela Brasileira de Composição de Alimentos

2 Pазze Indústria de Alimentos

3 Naturalis Nutrição & Farma Ltda. SP - Brasil

4 <http://www.coconutresearchcenter.org>, acessado em 18 de setembro de 2008.

3.2.2 Teste de tolerância à glicose (TTG)

O teste de tolerância à glicose foi realizado na semana anterior ao sacrifício dos animais para cada um dos modelos de dieta utilizados. Uma solução de glicose a 50% foi injetada intraperitonealmente (2mg/g) após seis horas de jejum. O sangue foi coletado a partir de uma pequena perfuração na cauda dos animais imediatamente antes e 30, 60 e 120 minutos após a injeção. A verificação da glicemia nos diferentes tempos foi efetuada por meio de um glicosímetro (Accucheck Active, Roche Diagnostics[®], EUA).

3.2.3 Obtenção dos tecidos e do soro plasmático

Em cada um dos experimentos realizados com os diferentes modelos de dieta utilizados, os animais foram mantidos em jejum por 4 horas e então sacrificados por meio de decapitação. O fígado e os tecidos adiposos retroperitoneal (fêmeas e machos) e epididimal (machos) foram dissecados e pesados. Para os experimentos de oxidação e síntese de lipídios hepáticas foram utilizadas fatias de 80mg, e para síntese de glicogênio, fatias de 100-120mg, mantidas sob placas de Petry invertidas com papel filtro umedecido com tampão, à temperatura de 4°C. Anteriormente à incubação, foi utilizado fatiador (McIlwain chopper) obtendo-se espessura de 300 µm. Para os experimentos de oxidação e síntese de lipídios em tecido adiposo foram utilizados 50 a 60mg de tecido de cada animal, para cada substrato, divididos em três fragmentos de, em média, 20mg. O tecido foi mantido em tampão, em placa de Elisa, sendo utilizado um pocinho para os três fragmentos obtidos de cada animal. O sangue foi imediatamente coletado e, após coagulação, foi centrifugado a 2000g por 10 minutos para obtenção do soro.

3.2.4 Análises séricas

Os níveis séricos de colesterol e triglicerídeos foram verificados mediante o uso de kits enzimáticos específicos (In Vitro Diagnostica S/A, MG, Brasil), assim como a glicose e os ácidos graxos livres (Roche Diagnostics, Alemanha). A insulina foi dosada por meio de um kit de radioimunoensaio (MP Biochemicals, Ohio, EUA). Todas dosagens foram realizadas de acordo com as instruções de cada kit.

3.2.5 Solução tampão Krebs Ringer Bicarbonato (KRb)

Abaixo estão relacionados os sais utilizados na composição da solução do tampão Krebs Ringer Bicarbonato (KRb), bem como suas respectivas concentrações:

Quadro: solução tampão Krebs Ringer Bicarbonato (KRb)

Sal	Molaridade
NaCl	118,00 mM
KCl	4,61 mM
NaHCO ₃	25,00 mM
KH ₂ PO ₄	1,50 mM
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,76 mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,50 mM

Previamente ao uso, a solução foi aerada numa mistura de gases contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂ durante 15 minutos. O pH da solução foi acertado em 7,4.

3.2.6 Oxidação de [U-¹⁴C]-Glicose e [1-¹⁴C]-Piruvato a CO₂

Em fígado dos animais submetidos à dieta hiperlipídica, verificamos a oxidação de glicose e piruvato. Nos animais alimentados com dieta hiperpalatável, estudamos a oxidação de glicose em tecido adiposo retroperitoneal e em fígado.

Para quantificar a produção de CO₂ a partir de glicose, fatias de fígado e fragmentos de tecido adiposo foram incubados em tampão KRB contendo uma concentração de 5 mM de D-glicose + 0,3 µCi de [U-¹⁴C]Glicose por frasco. Frascos de penicilina contendo tampão foram gaseificados com uma mistura contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂ por um minuto. Após, cada fatia foi acrescentada a um frasco e incubada em sistema fechado (frasco de penicilina com tampa de borracha) contendo uma estrutura de vidro (pocinho) em cujo centro encontrava-se um papel filtro por uma hora, a 35°C, em banho metabólico Dubnoff, com agitação de 60 ciclos/minuto, de acordo com o método de Dunlop et al (1975). A incubação foi interrompida pela injeção de 0,2 mL de ácido tricloroacético (50%) no interior do frasco, diretamente no meio de incubação onde encontrava-se o tecido. No pocinho contendo papel filtro adicionou-se 0,1 mL de hidróxido de sódio (2N) para incorporação do CO₂. Os frascos foram devolvidos ao banho por mais 30 minutos para captação do CO₂. A seguir, o papel filtro contido nos pocinhos foi transferido para eppendorfs com auxílio de pinça e pipeta automática. Em cada eppendorf foram adicionados 1,5 mL de líquido de cintilação OPTIPHASE, e a radioatividade incorporada foi medida em contador de cintilação líquida (WALLAC 1409). Os resultados foram expressos em pmoles de glicose oxidada a CO₂/hora/mg de tecido. A oxidação de [1-¹⁴C]-Piruvato foi realizada por meio deste mesmo método sendo que o meio de incubação continha 0,2 µCi de [1-¹⁴C]-Piruvato por frasco e 1 mM de piruvato. A utilização de [1-¹⁴C]-Piruvato permite avaliar a atividade do complexo enzimático piruvato desidrogenase (PDH), pois na formação de acetil-CoA a partir da ação desta enzima sobre o piruvato, o carbono liberado na forma de CO₂ necessariamente será aquele marcado. Sendo assim, ao utilizar este radioativo não é possível obter a oxidação do total de piruvato, já que o carbono marcado será liberado na reação da PDH, mas sim a atividade deste complexo enzimático.

3.2.7 Síntese de lipídios totais a partir de [U-¹⁴C]-Glicose e [U-¹⁴C]-Glicerol

Analizamos a síntese de lipídios totais a partir de glicose em fígado e tecido adiposo nos experimentos com os três diferentes tipos de dieta utilizados (hiperlipídica, hiperpalatável e hiperglicídica). Para os experimentos com as ratas alimentadas com dieta hiperpalatável ou hiperlipídica, utilizamos o tecido adiposo retroperitoneal. Para os experimentos com ratos alimentados com dieta hiperglicídica, utilizamos o tecido adiposo epididimal. A síntese de lipídios a partir de glicerol foi avaliada apenas nos animais tratados com dieta hiperglicídica.

Para avaliação da síntese de lipídios a partir de glicose, foi utilizado tampão KRB com concentração 5mM de D-Glicose e 0,3 µCi de [U-¹⁴C]Glicose por frasco/béquer. Portanto, o tampão utilizado para verificação da oxidação de glicose é o mesmo utilizado para análise da síntese total de lipídios a partir de glicose. Para síntese de lipídios a partir de glicerol, foi utilizado tampão contendo glicerol na concentração 1mM e 0,5µCi de [U-¹⁴C]Glicerol para cada frasco/béquer contendo o tecido de um animal. No tampão preparado para incubação de tecido adiposo, foi adicionada albumina 1% para o transporte de ácidos graxos e manutenção das condições do meio análogas às condições *in vivo*.

Nos experimentos em que foi verificada apenas síntese de lipídios os frascos foram substituídos por béqueres. O banho foi mantido fechado e aerado. A reação foi interrompida com 0,2mL de ácido tricloroacético (50%) e os béqueres foram mantidos no banho por mais 30 minutos. A incubação foi completamente interrompida colocando-se os béqueres no gelo. Nos experimentos em que foram verificadas oxidação e síntese de lipídios a partir de glicose, foi realizado o processo descrito acima e, no momento em que foi retirado o pocinho, o tecido adiposo que permaneceu no frasco foi destinado para verificação da síntese de lipídios.

Para extração de lipídios a partir das fatias de fígado, após a incubação as estruturas, juntamente com o meio onde permaneceram incubadas, foram homogeneizadas em Potter

Elvjhem, o qual foi lavado com 1,0 mL de TCA 10%, e seu conteúdo transferido para tubos de ensaio. Os tubos de ensaio foram centrifugados por 10 minutos a 2000g. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com 1,0 mL de TCA 10%. Este último passo de lavagem foi repetido por mais duas vezes. Os tubos de ensaio contendo o precipitado permaneceram invertidos sobre papel absorvente por aproximadamente 12 horas.

Para extração de lipídios, o precipitado seco foi ressuscitado com 1,0 mL de clorofórmio:metanol (2:1 v:v). Os tubos de ensaio foram vedados com parafilme e submetidos a agitação por 10 minutos. Após os tubos terem sido centrifugados por 10 minutos a 2000g, o sobrenadante de cada tubo de ensaio foi transferido para vials com auxílio de pipeta Pasteur, repetindo-se este processo por mais duas vezes.

Após a evaporação total da fase clorofórmio:metanol nos vials foram acrescentados 4,0mL de líquido de cintilação POP/POPOP TOLUENO, e a radioatividade incorporada foi medida em contador de cintilação líquida WALLAC 1409. Os resultados foram expressos em pmoles de nutriente convertido a lipídios/hora/mg de tecido hepático.

Para extração de lipídios a partir das incubações de tecido adiposo, após o término da incubação, os pedaços de tecido contidos em cada frasco/béquer foram lavados com 1 mL de solução salina, retirando-se os resíduos de albumina próximos ao tecido. Colocou-se os tecidos em tubos contendo 1,5mL de uma solução de clorofórmio:metanol (2:1). Estes tubos foram fechados com tampa para evitar evaporação e agitados overnight. Após, foram acrescentados 250 µL de água em cada tubo e agitou-se os mesmos por 10 minutos. Em seqüência, o conteúdo dos tubos foi centrifugado a 2000 rotações por minuto, durante 10 minutos. O resultado foi uma mistura bifásica, sendo que a água permanece acima da camada lipídica. Esta água foi retirada e pipetou-se 250µL de uma solução contendo clorofórmio, metanol e água na proporção 3:48:47, respectivamente. Os tubos foram novamente agitados por 10 minutos, centrifugados e a fase superior foi retirada. Esta etapa foi repetida outras duas

vezes. Após, a fase apolar restante foi transferida para vials. Estes vials foram mantidos na capela para evaporação e, quando secos, acrescentou-se 5mL de líquido de cintilação POP POPOP-Tolueno a cada vial para leitura em contador de cintilação líquida. Os resultados foram expressos em pmoles de glicose ou glicerol convertidos em lipídios/hora/mg de tecido.

3.2.8 Síntese global de glicogênio a partir de [U-¹⁴C]-Glicose e [U-¹⁴C]-Glicerol e determinação de sua concentração

Verificamos a incorporação de [U-¹⁴C]-Glicose e [U-¹⁴C]-Glicerol ao glicogênio hepático nos animais tratados com dieta hiperpalatável contendo diferentes fontes lipídicas ricas em ácidos graxos ω 3 (ALN, DHA e EPA em comparação a apenas ALN).

As fatias de fígado obtidas foram incubadas em béqueres com tampão contendo 5mM de glicose e 0,3 μ Ci de [U-¹⁴C]-Glicose ou 1mM e 0,5 μ Ci [U-¹⁴C]-Glicerol. A incubação durou 1 hora, a 37°C, com agitação de 60 ciclos por minuto. Após, a reação foi interrompida colocando-se os béqueres no gelo.

As fatias foram colocadas em tubos de ensaio contendo 1mL de KOH 60%. Em seqüência, os tubos de ensaio foram colocados em banho maria a 100°C, por 20 minutos. Após esfriar, foram adicionados 3,8mL de etanol absoluto. Esta mistura foi colocada em banho maria a 70°C, por 10 minutos e, após, em gelo por 15 minutos, onde ocorreu a precipitação do glicogênio. Dando-se seqüência, efetuou-se centrifugação a 2000rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Acrescentou-se 1mL de etanol 70% e os frascos permaneceram no gelo por 15 minutos. Centrifugou-se novamente os tubos a 2000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi eliminado e o precipitado (pellet de glicogênio) foi dissolvido em 300 μ L de água de Milli Q. Todo o volume foi retirado e transferido para eppendorf de 2mL. Foi acrescentado líquido de cintilação OPTI-PHASE, e a radioatividade incorporada foi

medida em contador de cintilação líquida (WALLAC 1409). A determinação da concentração de glicogênio foi realizada a partir fatias de aproximadamente 100mg mantidas em KOH 30% que foram colocadas em banho maria a 100°C e submetidas aos demais passos subsequentes como descrito acima. Após a obtenção do pellet de glicogênio, esse foi dissolvido em água de Milli Q e uma alíquota foi retirada para estimativa do conteúdo de glicogênio pelo método colorimétrico de Krisman (1962), com reagente de cor produzido a partir de soluções de Iodeto de Potássio (KI), Iodo (I_2) e solução saturada de Cloreto de Cálcio ($CaCl_2$). A leitura foi realizada em espectrofotômetro Beckman DU 640 disponibilizado pelo Departamento de Bioquímica.

3.2.9 Determinação da atividade da PEPCK

A atividade da PEPCK foi verificada em tecido adiposo epididimal dos animais submetidos a dietas hiperglicídicas, em conjunto com o Laboratório de Fisiologia Comparada, localizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS, coordenado pela Profa. Roselis Silveira Martins da Silva.

No tecido adiposo, a PEPCK-c é a enzima-chave da gliceroneogênese. No homem, 50% do total de PEPCK presente nas células é mitocondrial e 50% citosólica. Já em ratos, 95% é citosólica e 5% mitocondrial, o que permite a realização de estudos da gliceroneogênese por meio da verificação da atividade total da enzima, sem a necessidade de separar a fração mitocondrial (BEALE et al, 2007).

A determinação da atividade da PEPCK foi realizada por meio da homogeneização de um grama de tecido adiposo epididimal obtido de cada animal em sacarose 0,25M e PMSF 1 mM. Todos os passos foram realizados mantendo-se temperatura entre 0 e 3°C. Este homogeneizado foi centrifugado a 600 x g. A fase abaixo da camada lipídica foi separada e o

restante foi descartado. A atividade da PEPCK foi determinada por meio de um método baseado na reação de troca $[H^{14}CO_3^-]$ -oxaloacetato. A PEPCK catalisa a descarboxilação nucleotídeo-dependente do ácido oxaloacético para produzir fosfoenolpiruvato. Inosina trifosfato (ITP) foi o nucleotídeo utilizado. Aliquotas do homogeneizado foram acrescentadas em solução-tampão (quadro abaixo) e incubadas por 4 minutos, a 37°C, sob agitação (60 ciclos/min). Para cada amostra de tecido obtida (uma para cada animal), foram incubadas três alíquotas em tampão contendo ITP e duas alíquotas sem ITP (branco). A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético 5%. Após centrifugação, a solução foi gaseificada por 10 minutos com CO_2 para remoção de $^{14}CO_2$ residual não incorporado ao fosfoenolpiruvato e alíquotas foram imediatamente transferidas para vials contendo Tolueno-Triton X-100 (2:1 v/v) – PPO – POPOP e lidas em contador de cintilação líquida. A média da leitura dos brancos de cada amostra em que o uso de ITP foi omitido foi descontada dos valores das incubações desta mesma amostra contendo ITP. Os valores da atividade da PEPCK foram expressos como nmoles de $H^{14}CO_3^-$ incorporados *per* mg de proteína *per* minuto. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. O conteúdo de proteína foi dosado a partir do método de Lowry (1951).

Quadro: Solução tampão para verificação da atividade da PEPCK

Oxaloacetato	0,3M
Tris HCl (3N)	0,625M
MnCl ₂	0,04M
MgCl ₂	0,4M
GSH	6,25M
NaHCO ₃	1M
NaH ¹⁴ CO ₃	1M
ITP (p/ não-branco)	0,02M
H ₂ O MilliQ (p/ branco)	-

3.2.10 Determinação da concentração hepática de triglicerídeos

A concentração hepática de triglicerídeos foi verificada nos experimentos com os três modelos experimentais de dieta utilizados. Fatias de aproximadamente 100mg de fígado foram homogeneizadas em solução salina 0,9% (1:20 peso/volume). Retirou-se uma alíquota deste homogeneizado que foi transferida para um tubo de ensaio onde foi acrescentado reagente de cor (Kit In Vitro Diagnostica S/A. MG - Brasil) e incubou-se as amostras por 5 minutos, em banho a 37°C. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro disponibilizado pelo Departamento de Bioquímica.

3.3 Análise estatística

Os resultados experimentais expressos como média e \pm desvio padrão da média (D.P.) foram submetidos ao tratamento estatístico da Análise de Variância (Anova) de uma via e ao teste de amplitude múltipla de Duncan usando-se o programa SPSS 12.0. O nível de significância considerado foi de $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Peso e adiposidade corporal

Não observamos diferença no peso corporal entre os animais tratados com os diferentes tipos de dieta utilizados, exceto nos grupos tratados com dieta hiperglicídica em relação ao seu controle. Para todas as análises, comparamos apenas os grupos que receberam o mesmo tipo de dieta contendo diferentes tipos de ácidos graxos entre si. Não comparamos os grupos que receberam diferentes tipos de dieta em relação à composição de macronutrientes (hiperpalatável, hiperglicídica e hiperlipídica). No entanto, observamos significativa diminuição do peso do tecido adiposo retroperitoneal e epididimal nos grupos alimentados com ácidos graxos $\omega 3$ de cadeia muito longa (óleo de peixe – EPA e DHA) em relação aos demais grupos (Tabelas 5, 6 e 7).

Tabela 5. Peso corporal inicial e final e peso do tecido adiposo retroperitoneal em ratas alimentadas com dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados (grupo SAT), $\omega 6:\omega 3$ na proporção 5:1 ou $\omega 6$ (grupo $\omega 6$)¹

	SAT	$\omega 6$	$\omega 3$
Peso corporal inicial, g (1 mês de idade)	85,17 \pm 3,19 ^a	79,63 \pm 4,07 ^a	83,5 \pm 4,12 ^a
Peso corporal final, g (aos 3 meses de idade)	240 \pm 11,3 ^a	235 \pm 18,87 ^a	236,16 \pm 17,29 ^a
Tecido adiposo retroperitoneal, g	6,06 \pm 1,38 ^a	5,26 \pm 1,24 ^{a,b}	4,23 \pm 0,97 ^b

¹ Os valores representam média \pm D.P., n = 10. Médias em uma mesma linha contendo letras sobrescritas diferentes apresentam diferença quando comparadas entre si (P < 0.05).

Tabela 6. Peso corporal inicial e final e peso do tecido adiposo retroperitoneal em ratas alimentadas com dieta hiperpalatável rica em ácidos graxos $\omega 3$ α -linolênico (grupo HP-ALN) ou α -linolênico, EPA e DHA (grupo HP-EPA/DHA) e com dieta comercial padrão (grupo CONT-HP)¹

	CONT-HP	HP-ALN	HP-EPA/DHA
Peso corporal inicial, g (1 mês de idade)	83,2 \pm 5,2 ^a	78,25 \pm 4,27 ^a	80,67 \pm 5,75 ^a
Peso corporal final, g (aos 7 meses de idade)	261,12 \pm 7,43 ^a	270,2 \pm 13,93 ^a	258,33 \pm 18,07 ^a
Tecido adiposo retroperitoneal, g	6,24 \pm 1,7 ^a	14,4 \pm 1,53 ^b	10,27 \pm 1,86 ^c

¹ Os valores representam média \pm D.P., n = 10. Médias em uma mesma linha contendo letras sobrescritas diferentes apresentam diferença quando comparadas entre si (P < 0.05).

Tabela 7. Peso corporal inicial e final e peso dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal em ratos alimentados com dieta hiperglicídica rica em ácidos graxos $\omega 6$ (grupo SAC- $\omega 6$), $\omega 6$: $\omega 3$ na proporção 2:1 (grupo SAC- $\omega 3$) ou dieta contendo amido em lugar da sacarose e ácidos graxos $\omega 6$ representando o grupo controle (grupo CONT-SAC)¹

	CONT-SAC	SAC- $\omega 6$	SAC- $\omega 3$
Peso corporal inicial, g (1 mês de idade)	87,4 \pm 6,2 ^a	90,3 \pm 9,8 ^a	91,3 \pm 11 ^a
Peso corporal final, g (aos 4 meses de idade)	343,2 \pm 6,3 ^a	371,4 \pm 7,92 ^b	366 \pm 12,27 ^b
Tecido adiposo retroperitoneal, g	10,15 \pm 2,5 ^a	12,74 \pm 2,18 ^b	8,04 \pm 1,3 ^c
Tecido adiposo epididimal, g	8,03 \pm 1,3 ^a	11,16 \pm 1,57 ^b	7,33 \pm 1,15 ^a

¹ Os valores representam média \pm D.P., n = 10. Médias em uma mesma linha contendo letras sobrescritas diferentes apresentam diferença quando comparadas entre si (P < 0.05).

4.2 Dosagens séricas

Não observamos diferença na glicemia entre os animais tratados com os diferentes tipos de dieta utilizados. Para todas as análises, comparamos apenas os grupos que receberam o mesmo tipo de dieta contendo diferentes tipos de ácidos graxos entre si. Não comparamos os grupos que receberam diferentes tipos de dieta em relação à composição de macronutrientes (hiperpalatável, hiperglicídica e hiperlipídica). Contudo, observamos

insulinemia aumentada nos grupos HP-ALN e SAT em relação aos grupos tratados com a mesma dieta contendo ácidos graxos $\omega 3$ de cadeia muito longa (EPA e DHA). Não observamos diferença nos níveis de HDL-col entre os animais tratados com dieta hiperpalatável ou hiperlipídica. No entanto, verificamos níveis aumentados de triglicerídeos, tanto séricos como intra-hepáticos, e de ácidos graxos livres nos animais que receberam dieta rica hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados, hiperpalatável rica em ALN ou hiperglicídica rica em ácidos graxos $\omega 6$ em relação aos grupos que receberam as mesmas dieta contendo ácidos graxos $\omega 3$ de cadeia muito longa (Tabelas 8, 9 e 10).

Tabela 8. Concentrações séricas de glicose, insulina, lipídios e concentração hepática de triglicerídeos em animais alimentados com dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados (grupo SAT), $\omega 6:\omega 3$ na proporção 5:1 ou $\omega 6$ (grupo $\omega 6$)¹

	SAT	$\omega 6$	$\omega 3$
Glicose, mg/dL	111,9 \pm 13,76 ^a	128,55 \pm 11,1 ^a	117,62 \pm 14,27 ^a
Insulina, μ U/mL	53,33 \pm 7,18 ^a	49,15 \pm 4,06 ^a	39,01 \pm 5,16 ^b
Ácidos graxos livres, μ M/mL	885,85 \pm 202,07 ^a	717,2 \pm 193,13 ^{a,b}	574,58 \pm 108,28 ^b
Triglicerídeos, mg/dL	147,1 \pm 30,32 ^a	112 \pm 25,19 ^b	85,11 \pm 20,08 ^c
HDL-c, mg/dL	29,1 \pm 4,37 ^a	25,2 \pm 2,28 ^a	26,1 \pm 5,23 ^a
Concentração hepática de triglicerídeos, mg %	1,47 \pm 0,20 ^a	1,21 \pm 0,17 ^a	0,83 \pm 0,1 ^b
Concentração hepática de glicogênio, mg%	4,46 \pm 0,54 ^a	3,19 \pm 0,18 ^b	2,78 \pm 0,23 ^c

¹ Os valores representam média \pm D.P., n = 10. Médias em uma mesma linha contendo letras sobrescritas diferentes apresentam diferença quando comparadas entre si (P < 0.05).

Tabela 9. Concentrações séricas de glicose, insulina, lipídios e concentração hepática de triglicerídeos em animais alimentados com dieta hiperpalatável rica em ácidos graxos $\omega 3$ α -linolênico (grupo HP-ALN) ou α -linolênico, EPA e DHA (grupo HP-EPA/DHA) e com dieta comercial padrão (grupo CONT-HP)¹

	CONT-HP	HP-ALN	HP-EPA/DHA
Glicose, mg/dL	96,55 \pm 12,57 ^a	108,85 \pm 14,14 ^a	109,71 \pm 14,63 ^a
Insulina, μ U/mL	30,06 \pm 7,18 ^a	42,04 \pm 4,31 ^b	34,07 \pm 6,98 ^a
Ácidos graxos livres, μ M/mL	518,57 \pm 79,0 ^a	563,69 \pm 70,26 ^a	377,035 \pm 60,86 ^b
Triglicerídeos, mg/dL	61,37 \pm 14,98 ^a	84 \pm 19,69 ^b	45 \pm 10,88 ^a
HDL-c, mg/dL	25,5 \pm 5,85 ^a	26,55 \pm 3,04 ^a	24 \pm 3,28 ^a
Concentração hepática de triglicerídeos, mg %	0,73 \pm 0,14 ^a	1,82 \pm 0,29 ^b	1,17 \pm 0,16 ^c
Concentração hepática de glicogênio	4,48 \pm 0,51 ^a	2,99 \pm 0,32 ^b	2,64 \pm 0,37 ^b

¹ Os valores representam média \pm D.P., n = 10. Médias em uma mesma linha contendo letras sobrescritas diferentes apresentam diferença quando comparadas entre si (P < 0.05).

Tabela 10. Concentrações séricas de glicose, lipídios e concentração hepática de triglicerídeos em animais alimentados com dieta hiperglicídica rica em ácidos graxos $\omega 6$ (grupo SAC- $\omega 6$), $\omega 6:\omega 3$ na proporção 2:1 (grupo SAC- $\omega 3$) ou dieta contendo amido em lugar da sacarose e ácidos graxos $\omega 6$ representando o grupo controle (grupo CONT-SAC)¹

	CONT-SAC	SAC- $\omega 6$	SAC- $\omega 3$
Ácidos graxos livres, $\mu\text{M}/\text{mL}$	408,3 \pm 58,85 ^a	514,4 \pm 40,42 ^b	351,7 \pm 54,41 ^c
Triglicerídeos, mg/dL	96,3 \pm 10,4 ^a	129,3 \pm 11,7 ^b	75,1 \pm 8,2 ^a
Concentração hepática de triglicerídeos, mg %	0,92 \pm 0,26 ^a	1,64 \pm 0,23 ^b	1,09 \pm 0,18 ^a
Concentração hepática de glicogênio, mg %	5,33 \pm 0,41 ^a	5,22 \pm 0,47 ^a	4,62 \pm 0,26 ^b

¹ Os valores representam média \pm D.P., n = 10. Médias em uma mesma linha contendo letras sobrescritas diferentes apresentam diferença quando comparadas entre si (P < 0.05).

4.3 Teste de tolerância à glicose

Observamos que, mediante uma dieta hiperlipídica, a presença de ácidos graxos $\omega 3$ na proporção de 1 para 5 em relação aos AG $\omega 6$ contribuiu para maior tolerância à glicose em relação a ácidos graxos saturados e $\omega 6$ (Figura 7). Nos animais alimentados com uma dieta HP, observamos que a suplementação com AG $\omega 3$ de cadeia muito longa (EPA e DHA) é capaz de atenuar, mas não de prevenir completamente defeitos na tolerância à glicose comparados aos animais que receberam dieta contendo AG $\omega 3$ apenas na forma de ALN (Figura 8). Nos animais tratados com dieta rica em sacarose observamos uma tendência a uma maior tolerância nos animais tratados com óleo de peixe, mas não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 9). É provável que um maior período de tratamento levaria a tais alterações.

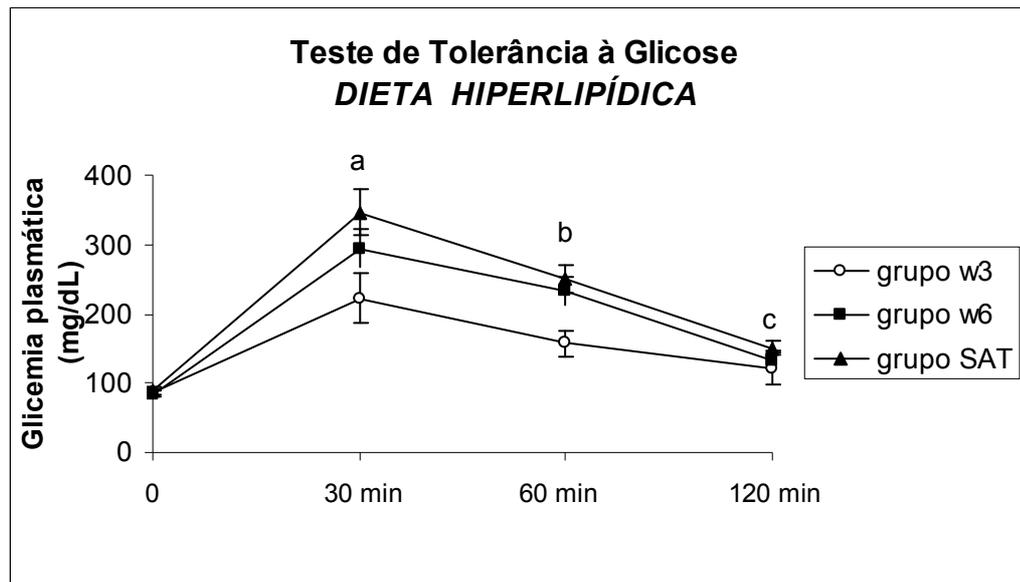


Figura 7. Teste de tolerância à glicose em dieta hiperlipídica. Teste de tolerância à glicose após injeção intraperitoneal de glicose (2mg/kg) em ratos de três meses de idade submetidas à dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados (grupo SAT), $\omega 6:\omega 3$ na proporção 5:1 ou $\omega 6$ (grupo $\omega 6$) desde o período gestacional, mantidas em jejum nas 6 horas anteriores ao teste. Os valores representam média \pm D.P., n = 6. (a) Todos os grupos diferem entre si; (b) O grupo $\omega 3$ difere dos demais; (c) Grupo $\omega 3$ e grupo SAT diferem entre si e são iguais ao grupo controle. ($P < 0,05$),

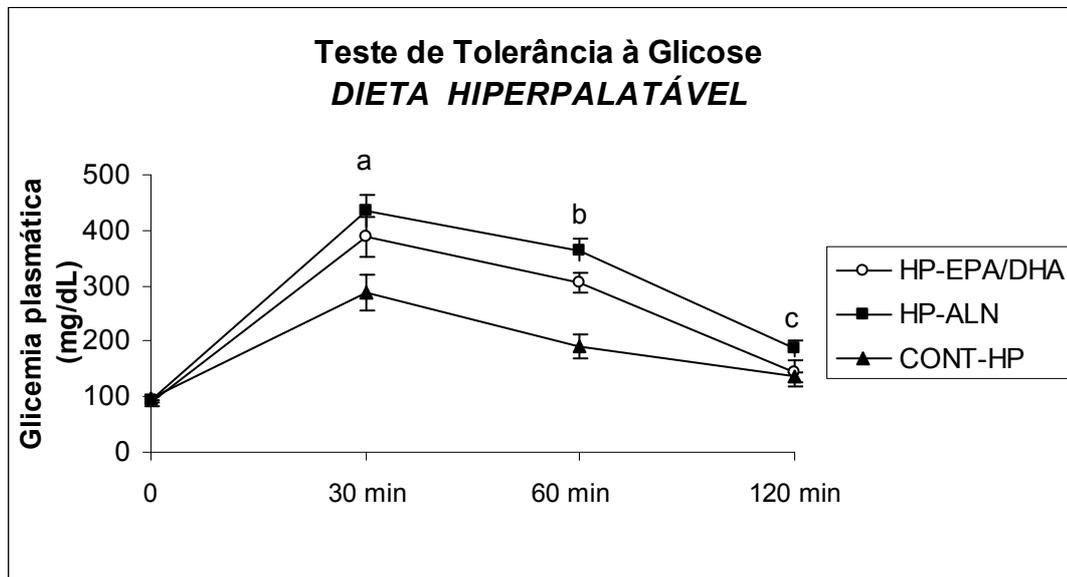


Figura 8. Teste de tolerância à glicose em dieta hiperpalatável. Teste de tolerância à glicose após injeção intraperitoneal de glicose (2mg/kg) em ratos com sete meses de idade submetidas a dieta hiperpalatável rica em ácidos graxos $\omega 3$ α -linolênico (grupo HP-ALN) ou α -linolênico, EPA e DHA (grupo HP-EPA/DHA) e com dieta comercial padrão (grupo CONT-HP) desde o período gestacional, mantidas em jejum nas 6 horas anteriores ao teste. Os valores representam média \pm D.P., n = 6. (a) e (b) Todos os grupos diferem entre si; (c) HP-EPA/DHA e controle são iguais entre si e diferentes de HP-LNA ($P < 0,05$).

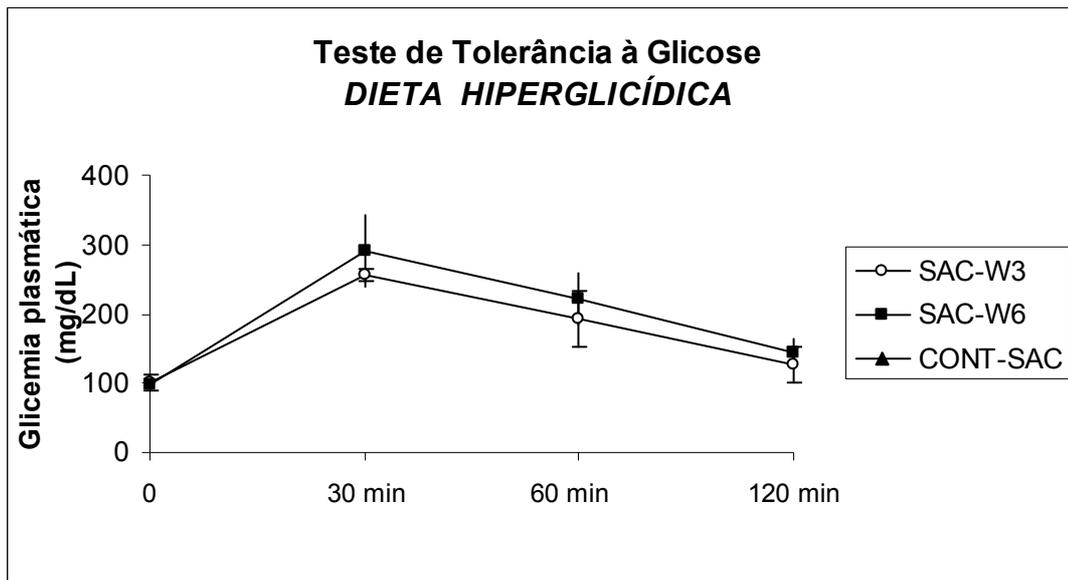


Figura 9. Teste de tolerância à glicose em dieta hiperglicídica. Teste de tolerância à glicose após injeção intraperitoneal de glicose (2mg/kg) em ratos de quatro meses de idade submetidos à dieta hiperglicídica rica em ácidos graxos $\omega 6$ (grupo SAC- $\omega 6$), $\omega 6:\omega 3$ na proporção 2:1 (grupo SAC- $\omega 3$) ou dieta contendo amido em lugar da sacarose e ácidos graxos $\omega 6$ representando o grupo controle (grupo CONT-SAC) a partir de um mês de idade, mantidos em jejum nas 6 horas anteriores ao teste. Os valores representam média \pm D.P., n = 6. Não há diferença entre os grupos ($P < 0,05$).

4.4 Efeitos de AGPI no Fígado

4.4.1 Oxidação Hepática de Piruvato [$1-C^{14}$]

Com o objetivo de investigar possíveis diferenças no fluxo da via glicolítica nos três grupos de animais submetidos à dieta hiperlipídica, utilizamos a oxidação de piruvato [$1-C^{14}$] para verificar a atividade do complexo PDH. Considerando que o carbono marcado é o único que pode ser liberado na forma de CO_2 ($^{14}CO_2$) na reação catalisada por esta enzima para formação de acetil-CoA, o uso deste substrato possibilita avaliar sua atividade. Se o acetil-CoA for completamente oxidado liberará carbonos não marcados, e todo CO_2 marcado liberado será proveniente da reação catalisada pela PDH. Observamos significativa maior atividade da PDH no grupo $\omega 3$ em relação aos demais grupos (Figura 10).

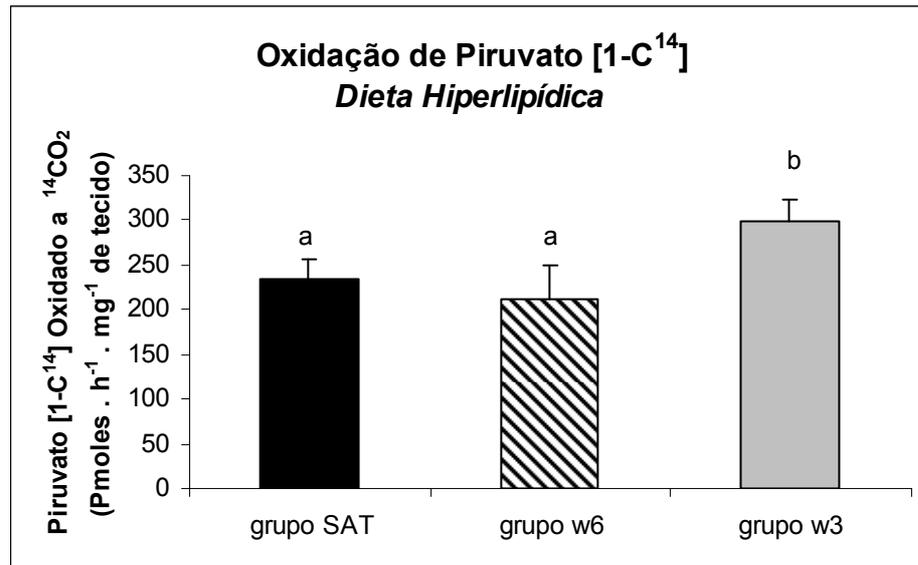


Figura 10. Oxidação de piruvato em dieta hiperlipídica. Efeito de dietas ricas em lipídios contendo diferentes fontes lipídicas na oxidação hepática de piruvato [1-C¹⁴] em animais de três meses de idade, com intervenção a partir do período gestacional. Os valores representam média \pm D.P., n = 10. (a) Grupo SAT e ω 6 diferem do grupo ω 3. $P < 0,05$.

4.4.2 Oxidação Hepática de Glicose

Para analisar possíveis diferenças na metabolização hepática da glicose entre os três diferentes grupos tratados com dieta hiperlipídica, verificamos a oxidação de glicose a CO₂. Apesar da diferença na atividade da PDH observada por meio da oxidação de piruvato [1-C¹⁴], não observamos diferença na oxidação de glicose (Figura 11).

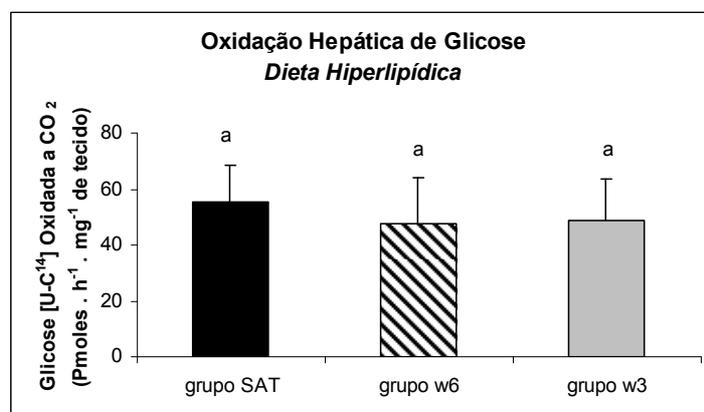


Figura 11. Oxidação hepática de glicose em dieta hiperlipídica. Efeito de dietas ricas em lipídios contendo diferentes fontes lipídicas na oxidação hepática de glicose em animais de três meses de idade, com intervenção a partir do período gestacional. Os valores representam média \pm D.P., n = 10. (a) todos os grupos são iguais comparados entre si ($P < 0,05$).

Analisamos possíveis diferenças na metabolização hepática da glicose também entre os grupos tratados com dieta hiperpalatável rica em ALN ou ALN, EPA e DHA por meio da oxidação de glicose a CO₂. Observamos que os animais que receberam dieta hiperpalatável contendo AG ω3 predominantemente na forma de ALN apresentaram menor oxidação em relação ao grupo com dieta suplementada com óleo de peixe contendo EPA e DHA (Figura 12).

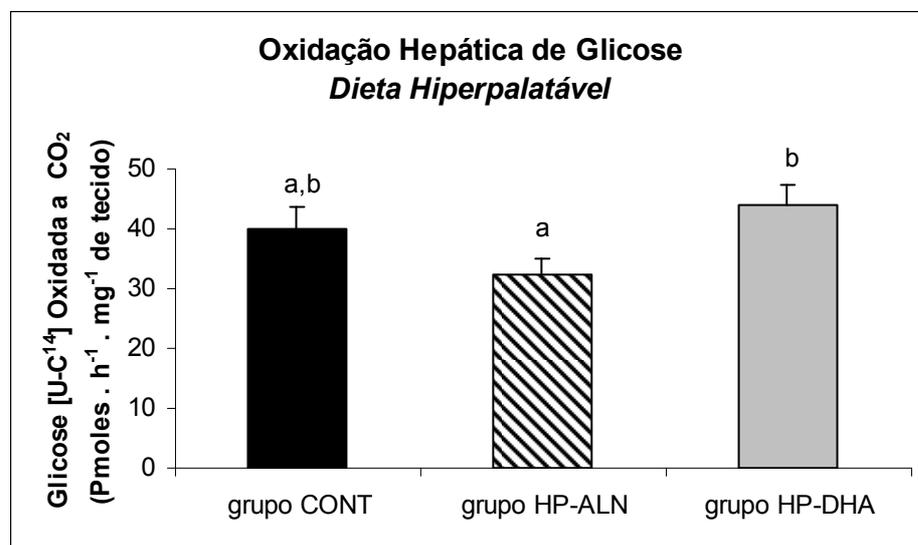


Figura 12. Oxidação hepática de glicose em dieta hiperpalatável. Efeito de dietas hiperpalatáveis contendo diferentes fontes de ácidos graxos ω3 na oxidação hepática de glicose em animais de sete meses de idade, com intervenção a partir do período gestacional. Os valores representam média ± D.P., n = 7. (a) O grupo HP-ALN é semelhante ao grupo CONT e difere do grupo HP-EPA/DHA. (a,b) semelhante aos demais grupos (P < 0,05).

4.4.3 Síntese hepática de lipídios a partir de glicose

Além de avaliar a oxidação de glicose, verificamos também a síntese de lipídios a partir deste substrato para analisar qual seu destino preferencial quando convertido em piruvato e posteriormente em acetil-CoA pela ação da PDH. Este teste foi realizado com todos os tipos de dieta utilizados (hiperlipídica, hiperpalatável e hiperglicídica). Encontramos síntese de lipídios significativamente reduzida nos grupos que receberam dieta suplementada

com óleo de peixe em relação aos demais grupos que receberam dieta contendo a mesma composição de macronutrientes, porém contendo predominantemente ácidos graxos saturados, $\omega 6$ ou ALN (Figuras 13, 14 e 15).

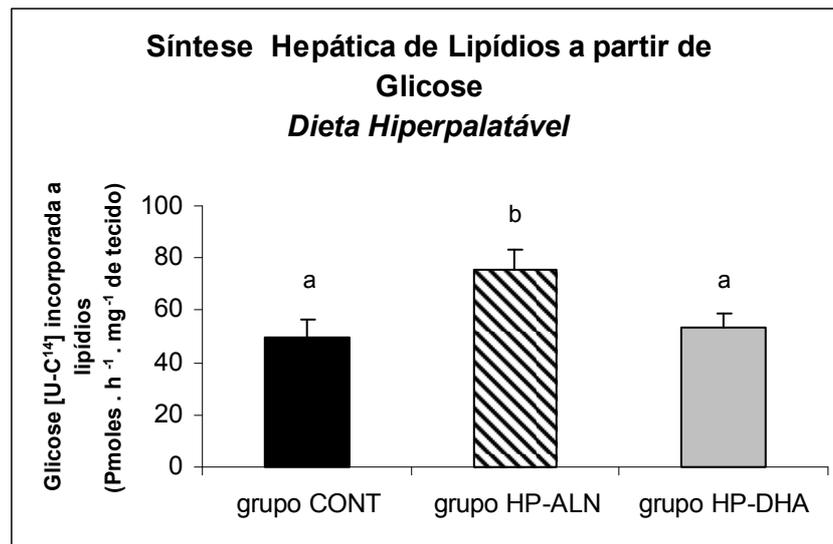


Figura 13. Síntese hepática de lipídios a partir de glicose em dieta hiperpalatável. Efeito de dietas hiperpalatáveis contendo diferentes fontes de ácidos graxos $\omega 3$ na síntese de lipídios hepática a partir de glicose em animais de sete meses de idade, com intervenção a partir do período gestacional. Os valores representam média \pm D.P., n = 7. (a) Grupo CONT-HP e grupo HP-EPA/DHA são semelhantes entre si e diferem do grupo HP-ALN ($P < 0,05$).

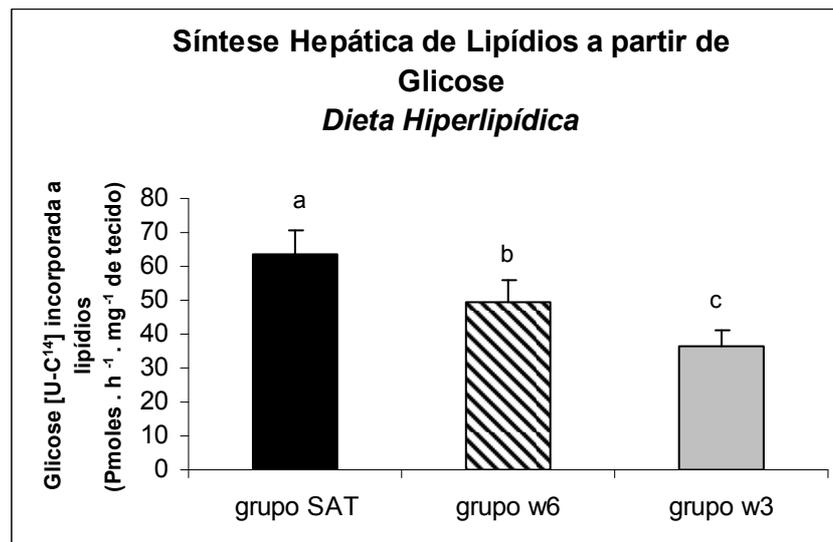


Figura 14. Síntese hepática de lipídios a partir de glicose em dieta hiperlipídica. Efeito de dietas ricas em lipídios contendo diferentes fontes lipídicas na síntese hepática de lipídios a partir de glicose em animais de três meses de idade, com intervenção a partir do período gestacional. Os valores representam média \pm D.P., n = 10. Todos os grupos diferem quando comparados entre si ($P < 0,05$).

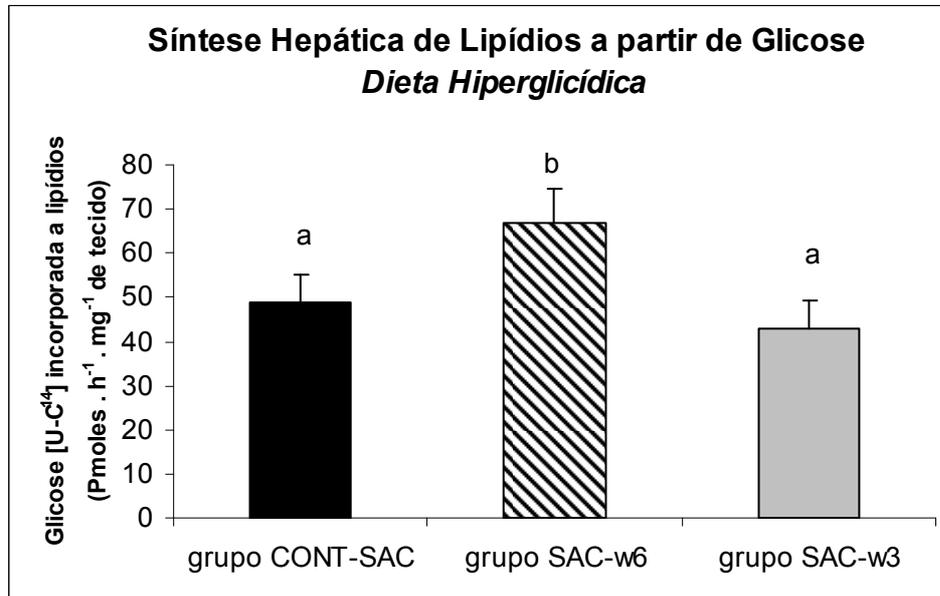


Figura 15. Síntese hepática de lipídios a partir de glicose em dieta hiperglicídica. Efeito de dietas hiperglicídicas ricas em ácidos graxos $\omega 6$ (grupo SAC- $\omega 6$), $\omega 6:\omega 3$ na proporção 2:1 (grupo SAC- $\omega 3$) ou dieta contendo amido em lugar da sacarose e ácidos graxos $\omega 6$ representando o grupo controle (grupo CONT-SAC) a partir de um mês de idade, na síntese de lipídios a partir de glicose. Os valores representam média \pm D.P., n = 10. (a) Grupo CONT-SAC e SAC- $\omega 3$ são semelhantes entre si e diferentes do grupo SAC- $\omega 6$ ($P < 0,05$).

4.4.4 Síntese hepática global de glicogênio a partir de glicose e glicerol

Com o objetivo de avaliar outras possíveis alterações no metabolismo de carboidratos mediante a ingestão de diferentes tipos de ácidos graxos $\omega 3$, comparamos o efeito de dietas hiperpalatáveis contendo estes ácidos graxos na forma de ALN ou ALN, EPA e DHA sobre a síntese hepática global de glicogênio (resultado da glicogênese somada à glicogenólise) a partir de glicose e glicerol. Observamos menor síntese nos animais alimentados com dieta HP em relação ao grupo controle, independentemente do tipo de AG $\omega 3$ contido em cada dieta (Figuras 16 e 17).

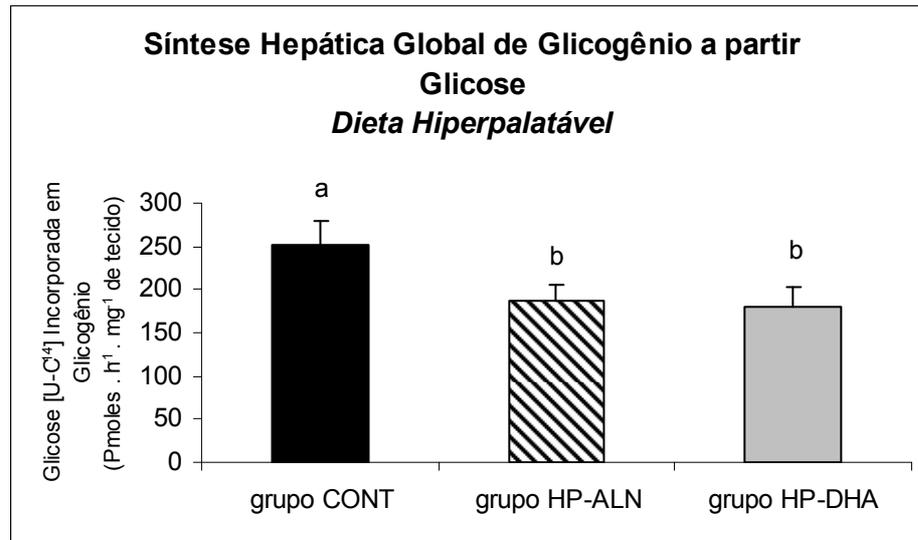


Figura 16. Síntese hepática global de glicogênio a partir de glicose em dieta hiperpalatável. Efeito de dietas hiperpalatáveis contendo diferentes fontes de ácidos graxos ω 3 na síntese hepática global de glicogênio a partir de glicose em animais de sete meses de idade, com intervenção a partir do período gestacional. Os valores representam média \pm D.P., n = 10. (a) Grupos HP diferem do grupo CONT-HP ($P < 0,05$).

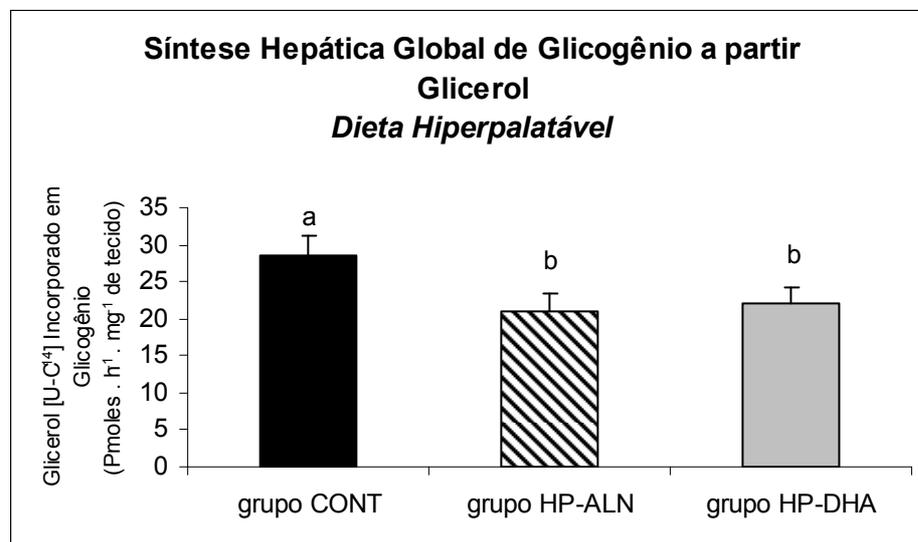


Figura 17. Síntese hepática global de glicogênio a partir de glicerol em dieta hiperpalatável. Efeito de dietas hiperpalatáveis contendo diferentes fontes de ácidos graxos ω 3 na síntese hepática global de glicogênio a partir de glicerol em animais de sete meses de idade, com intervenção a partir do período gestacional. Os valores representam média \pm D.P., n = 10. (a) Grupos HP diferem do grupo CONT-HP ($P < 0,05$).

4.5 Efeitos de AGPI em tecido adiposo

4.5.1 Síntese de lipídios a partir de glicose

Com o objetivo de avaliar efeitos por meio dos quais ácidos graxos $\omega 3$ interferem no metabolismo de adipócitos, levando a uma menor adiposidade corporal e menor concentração plasmática de ácidos graxos livres e triglicerídeos em ratos, avaliamos a síntese de lipídios a partir de glicose em tecido adiposo. Este teste foi realizado com todos os tipos de dieta utilizados (hiperlipídica, hiperpalatável e hiperglicídica). Encontramos síntese de lipídios significativamente reduzida nos grupos que receberam dieta suplementada com óleo de peixe em relação aos demais grupos que receberam dieta contendo a mesma composição de macronutrientes, porém contendo predominantemente ácidos graxos saturados ou $\omega 6$. No entanto, nos animais tratados com dieta hiperpalatável observamos menor síntese de lipídios a partir de glicose nos animais alimentados com dietas HP em relação ao grupo controle, porém maior no grupo HP-EPA/DHA em relação ao grupo HP-ALN (Figuras 18, 19 e 20).

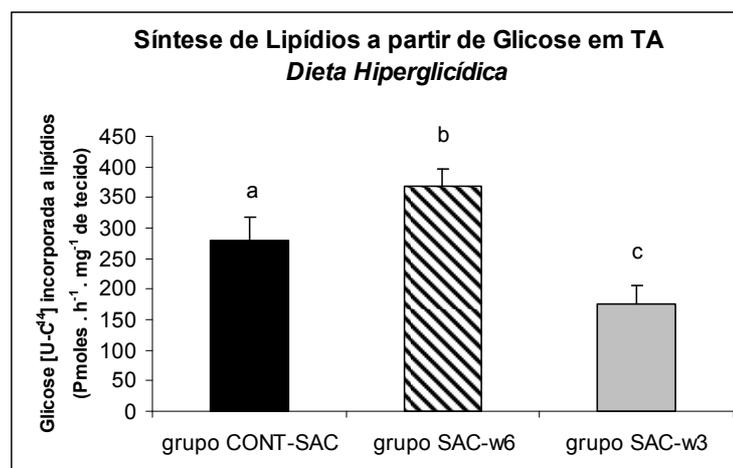


Figura 18. Síntese de lipídios a partir de glicose em TA em dieta hiperlipídica. Efeito de dietas hiperglicídicas (sacarose) ricas em ácidos graxos $\omega 6$ (grupo SAC- $\omega 6$), $\omega 6:\omega 3$ na proporção 2:1 (grupo SAC- $\omega 3$) ou dieta contendo amido em lugar da sacarose e ácidos graxos $\omega 6$ representando o grupo controle (grupo CONT-SAC) a partir de 1 mês de idade, na síntese de lipídios a partir de glicose em tecido adiposo retroperitoneal. Os valores representam média \pm D.P., n = 10. Todos os grupos diferem entre si (P < 0,05).

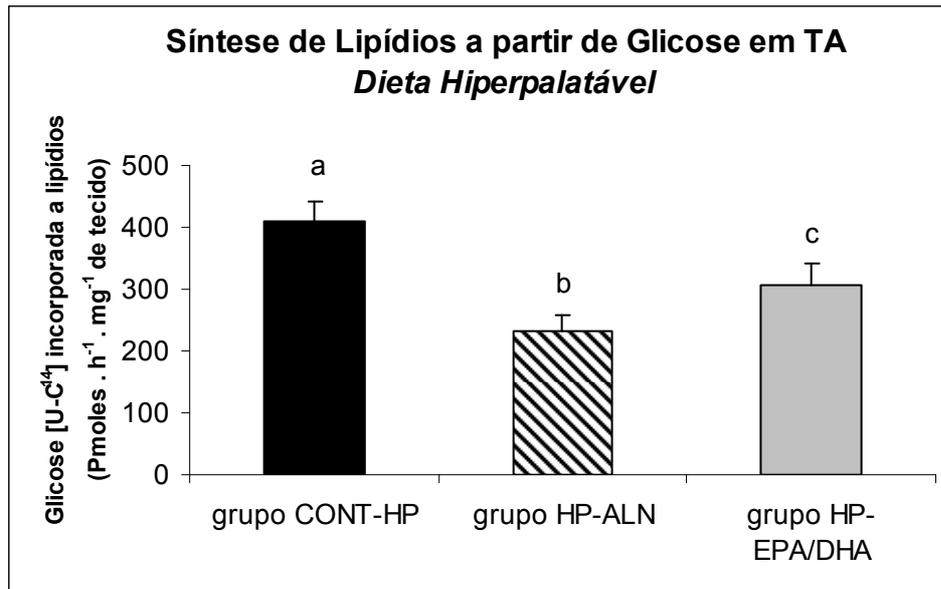


Figura 19. Síntese de lipídios a partir de glicose em TA em dieta hiperpalatável. Efeito de dietas hiperpalatáveis contendo diferentes fontes de ácidos graxos $\omega 3$ na síntese de lipídios a partir de glicose em tecido adiposo retroperitoneal de animais de sete meses de idade, com intervenção a partir do período gestacional. Os valores representam média \pm D.P., n = 7. Todos diferem entre si ($P < 0,05$).

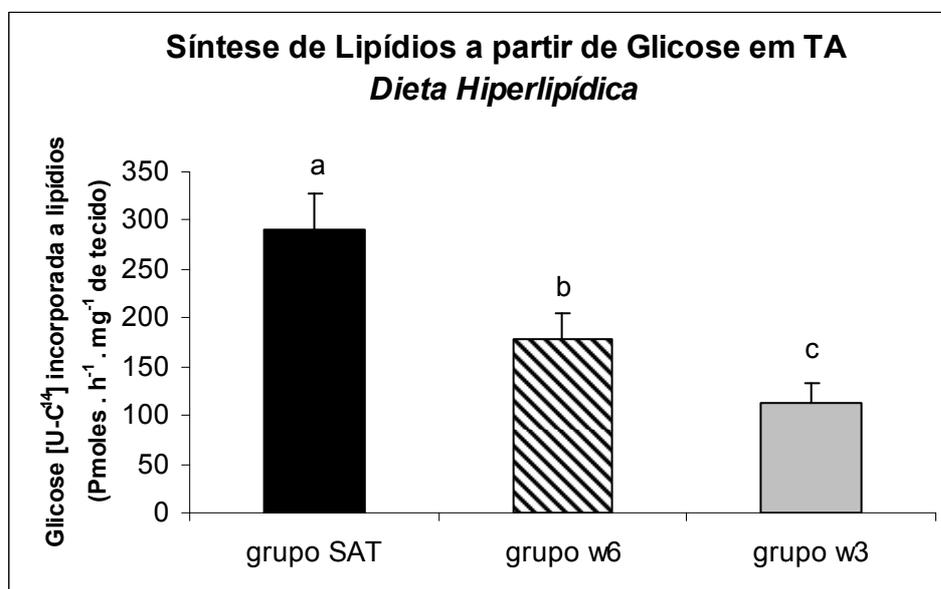


Figura 20. Síntese de lipídios a partir de glicose em TA em dieta hiperlipídica. Efeito de dietas ricas em lipídios contendo diferentes fontes lipídicas na síntese de lipídios a partir de glicose em tecido adiposo epididimal de animais de três meses de idade, com intervenção a partir do período gestacional. Os valores representam média \pm D.P., n = 10. Todos os grupos diferem quando comparados entre si ($P < 0,05$).

4.5.2 Oxidação de glicose a CO₂ em tecido adiposo

Para verificar os efeitos no metabolismo da glicose de diferentes tipos de AG ω 3 em tecido adiposo, avaliamos a oxidação de glicose a CO₂ nos animais tratados com dieta hiperpalatável. Observamos menor oxidação de glicose nos animais alimentados com dietas HP em relação ao grupo controle, porém maior no grupo HP-EPA/DHA em relação ao grupo HP-ALN (Figura 21).

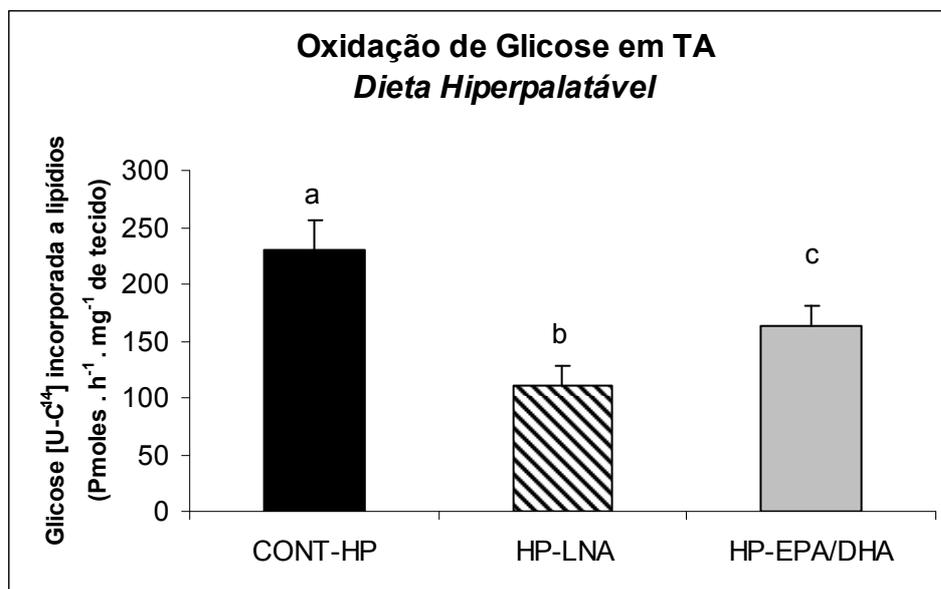


Figura 21. Oxidação de glicose em TA em dieta hiperpalatável. Efeito de dietas hiperpalatáveis contendo diferentes fontes de ácidos graxos ω 3 na oxidação de glicose em tecido adiposo retroperitoneal de animais de sete meses de idade, com intervenção a partir do período gestacional. Os valores representam média \pm D.P., n = 7. Todos diferem entre si (P < 0,05).

4.5.2 Atividade da PEPCK em tecido adiposo

Buscando avaliar efeitos por meio dos quais ácidos graxos ω 3 interferem no metabolismo de adipócitos, levando a uma menor adiposidade corporal e menor concentração plasmática de ácidos graxos livres e triglicerídeos em ratos, avaliamos também a atividade da PEPCK, enzima-chave da gliceroneogênese, em tecido adiposo epididimal de animais tratados com dieta hiperglicídica. Observamos uma expressiva diminuição da atividade desta enzima nos animais alimentados com dieta rica em sacarose em relação ao controle, porém o

grupo tratado com óleo de peixe apresentou atividade maior em comparação ao grupo tratado com dieta rica apenas em AG $\omega 6$ (Figura 22).

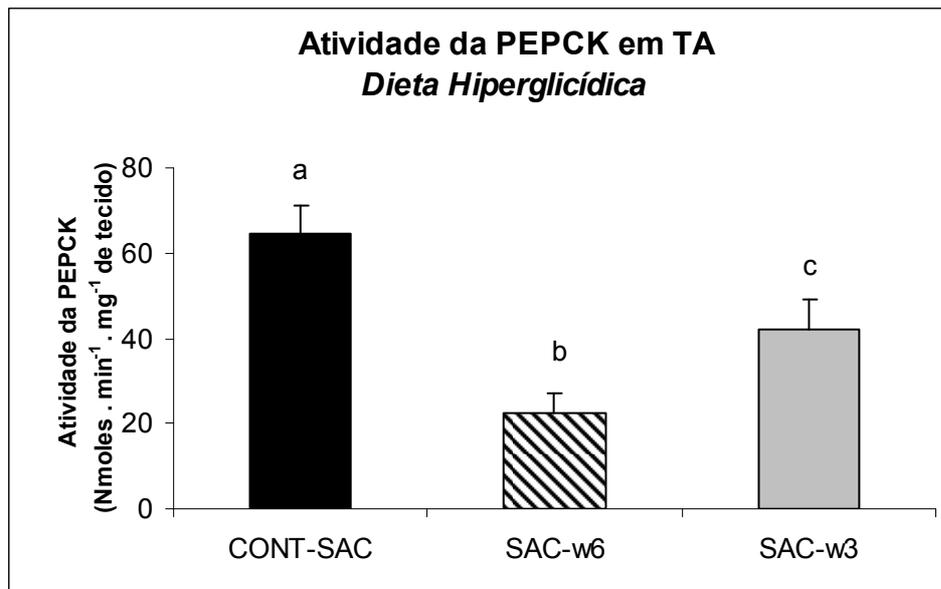


Figura 22. Atividade da PEPCK em TA em dieta hiperglicídica. Efeito de dietas hiperglicídicas ricas em ácidos graxos $\omega 6$ (grupo SAC- $\omega 6$), $\omega 6:\omega 3$ na proporção 2:1 (grupo SAC- $\omega 3$) ou dieta contendo amido em lugar da sacarose e ácidos graxos $\omega 6$ representando o grupo controle (grupo CONT-SAC) a partir de um mês de idade, na atividade total da PEPCK em tecido adiposo epididimal. Os valores representam média \pm D.P., n = 7. Todos diferem entre si ($P < 0,05$).

4.5.3 Síntese de lipídios a partir de glicerol em tecido adiposo

Considerando a hipótese de que AGPI poderiam interferir na atividade da glicerocinase, verificamos a síntese de lipídios a partir de glicerol nos animais tratados com dieta hiperglicídica. Observamos maior incorporação de glicerol a lipídios totais nos animais alimentados com dieta rica em sacarose, e maior naqueles alimentados com óleo de peixe e girassol em relação àqueles alimentados apenas com óleo de girassol como fonte lipídica (Figura 23).

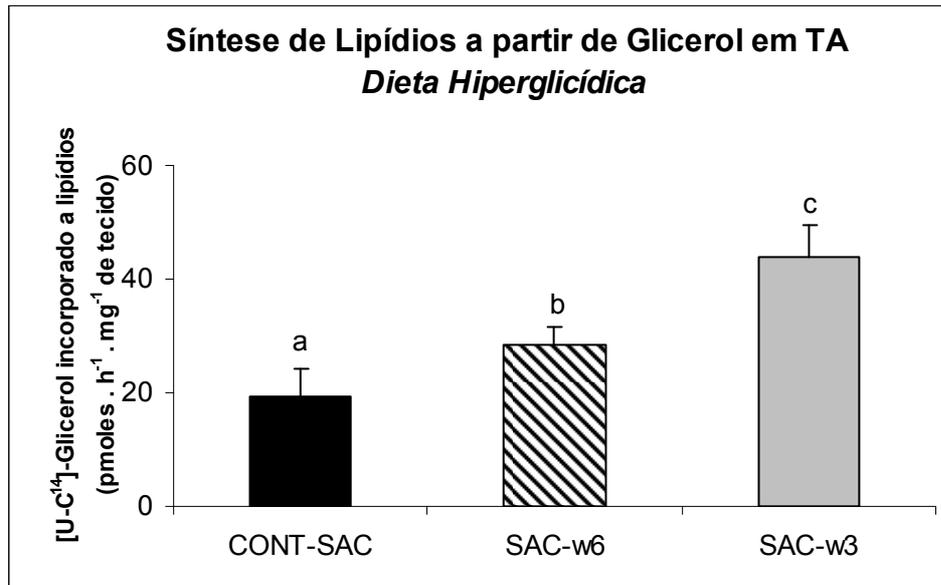


Figura 23. Síntese de lipídios a partir de glicerol em TA em dieta hiperglicídica. Efeito de dietas hiperglicídicas ricas em ácidos graxos $\omega 6$ (grupo SAC- $\omega 6$), $\omega 6:\omega 3$ na proporção 2:1 (grupo SAC- $\omega 3$) ou dieta contendo amido em lugar da sacarose e ácidos graxos $\omega 6$ representando o grupo controle (grupo CONT-SAC) a partir de um mês de idade, na atividade incorporação de glicerol a lipídios totais em tecido adiposo epididimal. Os valores representam média \pm D.P., n = 10. Todos diferem entre si (P < 0,05).

5. DISCUSSÃO

Este trabalho analisou efeitos de AGPI sobre algumas vias do metabolismo intermediário envolvendo carboidratos e lipídios. O estudo revela que os modelos experimentais de dieta hiperlipídica, hiperpalatável e hiperglicídica que contêm ácidos graxos ω 3, especialmente aqueles de cadeia longa (EPA e DHA), previnem ou atenuam o desenvolvimento de resistência à insulina.

5.1 Efeitos de ácidos graxos poliinsaturados no peso corporal e nas concentrações plasmáticas de TG, AGL, glicose, insulina e HDL-col

Verificamos que os grupos de ratos alimentados com as dietas suplementadas com ácidos graxos ω 3 de cadeia muito longa (EPA e DHA – óleo de peixe) apresentaram maior sensibilidade à insulina em relação aos grupos que receberam as dietas contendo os ácidos graxos α -linolênico, linoléico ou saturados como fonte lipídica predominante. Esta afirmação é fundamentada pelos seguintes resultados obtidos: menor concentração hepática e sérica de triglicerídeos, menor concentração sérica de AGL, além de menor insulinemia (Tabelas 8, 9 e 10). Observamos ainda maior tolerância à glicose nos animais alimentados com óleo de peixe nos tratamentos com as dietas hiperlipídica e hiperpalatável (Figuras 7 e 8). Não houve diferença na glicemia entre os diferentes grupos de cada tipo de dieta utilizado (hiperlipídica, hiperglicídica e hiperpalatável) (Tabelas 8, 9 e 10). A coexistência de hiperinsulinemia e normoglicemia nos animais que não receberam óleo de peixe sugere resistência à ação da insulina.

O teste de tolerância à glicose reflete a oxidação deste substrato e a sua utilização por vias não-oxidativas (ex. glicogênese), predominantemente no músculo esquelético e no fígado

(SCHUMMER et al, 2008; DEFRONZO, 2004). Neste estudo não analisamos todos estes parâmetros, mas observamos que, mediante uma dieta hiperlipídica, a presença de ácidos graxos $\omega 3$ na proporção de 1 para 5 em relação aos AG $\omega 6$ contribuiu para maior tolerância à glicose em relação a ácidos graxos saturados ou apenas $\omega 6$ (Figura 7), dando a entender que a quantidade e proporção utilizadas são efetivas na manutenção da sensibilidade à insulina em ratos. Já mediante a utilização de uma dieta HP, observamos que a suplementação com ácidos graxos $\omega 3$ de cadeia muito longa é capaz de atenuar, mas não de prevenir completamente defeitos na tolerância à glicose, quando comparados aos animais alimentados com AG $\omega 3$ na forma de ALN e ao controle (Figura 8). Nos animais tratados com dieta rica em sacarose observamos uma tendência a uma maior tolerância nos animais tratados com óleo de peixe, mas não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 9). É possível que um maior período de tratamento levasse a tais alterações. Provavelmente os efeitos dos AG $\omega 3$ no músculo esquelético contribuíram para estes resultados. Lombardo et al (2007) mostraram que a adição de óleo de peixe a uma dieta rica em sacarose reverte o acúmulo de TG e diacilglicerol no interior dos miócitos em músculo esquelético, assim evitando um prejuízo da sinalização da insulina e uma possível menor captação de glicose. Em acordo com nossos resultados, D'Alessandro et al (2002) mostraram maior sensibilidade periférica à insulina utilizando um clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico em animais que receberam dieta com suplementação de AG $\omega 3$ como fonte lipídica predominante (óleo de peixe 7% + 1% óleo de milho) em comparação a um grupo com uma dieta rica em AG $\omega 6$ (8% óleo de milho).

Quanto aos níveis séricos de insulina, nos estudos em que foram analisados, observamos concentração semelhante entre os grupos controle e os animais tratados com AG $\omega 3$, EPA e DHA, e aumentada nos animais submetidos a dietas sem a presença destes AG (Tabelas 8 e 9). Pighin et al (2003) mostraram que AG $\omega 3$ são capazes de reverter os efeitos prejudiciais da lipotoxicidade induzida por uma dieta rica em sacarose nas células β -

pancreáticas e de normalizar a secreção de insulina, o que está em acordo com os níveis de insulina que observamos em animais tratados com dieta hiperpalatável. Comparando uma dieta deficiente em AG $\omega 3$ e outra com níveis normais destes AG, Cancelas et al (2007) observaram maior secreção de insulina e intolerância à glicose nos primeiros, de forma condizente com nosso resultado nos animais tratados com dieta hiperlipídica.

Em relação aos triglicerídeos, nossos resultados estão de acordo com o obtido por Ide et al (2000), que utilizaram dietas contendo óleo de palma como fonte de gordura saturada, óleo de açafrão como fonte de AG $\omega 6$ e óleo de peixe como fonte de AG $\omega 3$, e também observaram diminuição da concentração de TG séricos, além de menor conteúdo hepático de TG nos animais alimentados com óleo de peixe em relação aos demais grupos. Estes efeitos sobre os TG, além da diminuição dos AGL séricos observados também nos animais alimentados com dieta rica em sacarose contendo óleo de peixe, estão de acordo com os estudos de Lombardo et al (2007) e Peyron-Caso et al, (2002).

Está amplamente comprovado que AGPI $\omega 3$ levam à diminuição da adiposidade visceral mesmo sem alteração do peso corporal total (PARRISH et al,1990; LOMBARDO et al, 2007; PEYRON-CASO, 2003), embora não pareçam alterar o acúmulo de tecido adiposo subcutâneo (PEYRON-CASO et al, 2003). Em nossos resultados, observamos diferença no peso corporal apenas nos animais tratados com dieta hiperglicídica em relação ao seu controle, mas observamos menor tecido adiposo epididimal e/ou retroperitoneal nos animais alimentados com óleo de peixe adicionado às dietas hiperglicídica, hiperlipídica e hiperpalatável, em relação aos grupos alimentados com a mesma composição de macronutrientes, porém sem óleo de peixe (Tabelas 5, 6 e 7).

Em síntese, observamos que ácidos graxos $\omega 3$ de cadeia muito longa (EPA e DHA) são efetivos na prevenção total, ou ao menos parcial, do desenvolvimento de intolerância à glicose, aumento da concentração intra-hepática TG, dos níveis séricos de AGL, TG e

insulina característicos de estados insulino-resistentes que podem ser desencadeados pelos modelos de dietas hiperlipídica, hiperpalatável ou hiperglicídica utilizados em nosso estudo.

5.2 Efeitos dos ácidos graxos poliinsaturados no metabolismo hepático

O fígado exerce um papel central no metabolismo de carboidratos e lipídios e várias de suas vias metabólicas podem ser reguladas por AGPI por meio de mudanças na atividade e/ou abundância de diferentes famílias de fatores de transcrição, incluindo PPAR, SREBP e LXR, entre outros meios.

Neste estudo verificamos os efeitos de três dietas com diferentes composições de lipídios – ricas em ácidos graxos saturados (gordura de coco), $\omega 6$ (óleo de amendoim) ou com proporção de ácidos graxos $\omega 6:\omega 3$ igual a 5:1 – na oxidação de glicose e atividade do complexo PDH, além da síntese de lipídios a partir de glicose em fígado de ratos Wistar de três meses de idade submetidos a estas dietas a partir da gestação.

Observamos maior atividade hepática da PDH no grupo $\omega 3$ em relação aos demais grupos, porém não observamos diferença na oxidação de glicose neste mesmo tecido (Figuras 10 e 11). O grupo $\omega 3$ apresentou menor síntese de lipídios a partir de glicose em relação aos demais grupos (Figura 14), além de menor concentração hepática e sérica de triglicerídeos e menor concentração sérica de AGL (Tabela 8).

A menor oxidação de piruvato [$1-C^{14}$] pelos grupos SAT e $\omega 6$ em relação ao $\omega 3$ sugere uma menor atividade da PDH nos animais submetidos a estas dietas. Estes animais também apresentaram maior concentração sérica de AGL (Tabela 8). Schummer et al (2008) mostraram que a atividade deste complexo enzimático encontra-se diminuída na resistência à insulina e que isto pode estar relacionado, em parte, ao aumento dos níveis séricos de AGL. Estes pesquisadores revelaram que ácido graxos livres aumentados podem contribuir para o

aumento da atividade e abundância das enzimas PDH cinase 2 e 4, assim contribuindo para fosforilação e conseqüente diminuição da atividade do complexo PDH. Em acordo, Bajotto et al (2006) observaram uma maior concentração e abundância de PDK4 em fígado de animais normais que receberam uma injeção intraperitoneal de óleo, produzindo assim um aumento de AGL, simulando o aumento característico em animais insulino-resistentes. Além disso, em seu estudo em um modelo animal de diabetes observaram um aumento de AGL que, da mesma maneira, foi associado a maior atividade e abundância de PDK4, além de PDK2, e menor atividade do complexo PDH antes e após o início de franca diabetes, sugerindo assim que AGL persistentemente elevados em ratos normais ou diabéticos contribuem para maior expressão de PDK2 e PDK4 no fígado e conseqüente menor atividade da PDH. A atividade da PDH encontrou-se diminuída também no grupo $\omega 6$ em relação ao $\omega 3$.

Embora este grupo não tenha apresentado níveis séricos de AGL significativamente maiores quando comparado ao grupo $\omega 3$, houve uma clara tendência de aumento. Além disso, a concentração sérica e intra-hepática mais elevada de TG no grupo $\omega 6$ poderia contribuir para alteração da sinalização da insulina por meio dos efeitos prejudiciais da lipotoxicidade (SAVAGE et al, 2007) e conseqüente ativação deficiente da PDH por este hormônio. Em acordo, utilizando uma dieta hiperlipídica (59% da calorias provenientes de lipídios), Neschen et al (2001) observaram que, em comparação ao óleo de açafrão (rico em $\omega 6$), os animais alimentados com óleo de peixe apresentaram concentração duas vezes menor de diacilglicerol (DAG) intra-hepático. Níveis intracelulares aumentados de DAG podem ativar a PKC- ϵ , que se liga e inativa o receptor de insulina e sua atividade cinase, resultando na redução da fosforilação de IRS-1 e IRS-2 estimulada por insulina (SAVAGE, 2007).

Apesar da aumentada atividade da PDH no grupo $\omega 3$, não encontramos diferença na oxidação de glicose entre os três grupos estudados (Figura 11). Diferentemente do nosso resultado, utilizando o método de calorimetria indireta, Rustan et al (1993) encontraram maior

oxidação de carboidratos (CHO) tanto no estado alimentado como em jejum em animais tratados com dieta rica em óleo de peixe em relação a animais tratados com dieta rica em banha (gordura saturada). No entanto, os tecidos que apresentam maior oxidação de CHO não foram investigados (fígado, músculo, SNC, etc).

O aumento da atividade da PDH sem conseqüente maior oxidação de glicose no grupo $\omega 3$ não pode ser explicado pelo desvio do substrato formado (acetil-CoA) para síntese de lipídios (glicerol-3-fosfato ou ácidos graxos), já que encontramos menor síntese de lipídios neste grupo em relação aos demais (Figura 14). Esta glicose poderia ser desviada para síntese de glicogênio. No entanto, encontramos menor concentração no grupo $\omega 3$ em relação ao SAT (Tabela 8), então esta hipótese não é muito provável. Outra possibilidade seria o desvio desta glicose para síntese de fosfolipídeos (HARRIS e BULCHANDANI, 2006) ou, embora pouco provável, para síntese de corpos cetônicos (WONG et al, 1984). Portanto, não temos uma explicação pertinente para este resultado.

Diferentemente do resultado que obtivemos ao analisar os efeitos de dietas hiperlipídicas sobre a oxidação hepática de glicose, num estudo onde utilizamos dietas hiperpalatáveis ricas em sacarose contendo diferentes tipos e quantidades de ácidos graxos $\omega 3$, observamos maior oxidação deste substrato no grupo HP-EPA/DHA em relação ao grupo HP-ALN (Figura 12).

Silva et al (1992) observaram que dietas ricas em sacarose ou lipídios podem exercer diferentes efeitos sobre a atividade da PDH hepática. Após 15 dias de tratamento, observaram um aumento da atividade desta enzima em animais tratados com excesso de carboidratos simples, mas uma diminuição naqueles tratados com maior quantidade de lipídios. Relataram ainda um marcante efeito dos ácidos graxos de cadeia longa $\omega 3$ (óleo de peixe) na prevenção deste aumento induzido pela dieta rica em sacarose. É importante considerar que este estudo utilizou um tratamento de apenas 15 dias, o que pode significar o não envolvimento dos níveis

de AGL séricos nestes resultados, pois neste curto período de tratamento é possível que permaneçam ainda inalterados.

Bajotto et al (2006) sugeriram que o aumento de AGL sérico pode contribuir para inibição da atividade PDH hepática tanto em animais normais como em animais diabéticos. No entanto, utilizando um período de tratamento mais prolongado com um modelo de dieta rica em sacarose contendo 8% de óleo de milho, Lombardo et al (2007) observaram um significativo aumento dos níveis de AGL séricos associado a um aumento da atividade do complexo PDH hepático e não a sua diminuição. Observaram ainda que, quando acrescentado à dieta em substituição ao óleo de milho por dois meses (após seis meses prévios de tratamento com a primeira dieta), ácidos graxos $\omega 3$ (óleo de peixe) foram capazes de reverter este efeito, diminuindo a atividade da PDH a níveis semelhantes aos do grupo controle. A oxidação de glicose não foi analisada neste estudo, portanto a maior atividade da PDH pode representar apenas aumento da lipogênese, que permanece sendo estimulada pela insulina mesmo em estados de resistência à sua ação (WEICKERT E PFEIFFER, 2006), e não necessariamente também da oxidação de glicose no grupo que não recebeu ácidos graxos $\omega 3$. Além disso, não encontramos estudos da literatura que indiquem se os efeitos de AGL sobre a PDH diferem numa dieta rica em CHO ou LIP.

É possível que a dieta rica em sacarose, a curto prazo, leve a um aumento da atividade da PDH, enquanto os ácidos graxos $\omega 3$ podem manter seus níveis normais (SILVA et al, 1992). Porém, a longo prazo, efeitos da resistência à insulina sobre a sua própria cascata de sinalização podem resultar em prejuízo na ativação desta enzima por este hormônio e num aumento da sua inibição por níveis elevados de AGL, mas não o bastante para que seus níveis retornem aos valores observados em animais tratados com dieta controle conforme observado por Lombardo et al (2007). É importante ressaltar que tanto no tratamento com dieta hiperpalatável como no tratamento com dieta hiperlipídica observamos aumento de AGL

séricos em determinados grupos (Tabelas 8 e 9). Pelo fato de não termos analisado a atividade da PDH nos animais tratados com dieta HP, além do período de tratamento e da quantidade e tipo de ácidos graxos ω 3 utilizados diferirem nestes estudos, nossos dados não nos permitem inferir se estes AG atuam de maneira diferente sobre a atividade da PDH quando associados a uma dieta hiperlipídica ou hiperglicídica, e qual a contribuição dos níveis de AGL neste quadro. São necessários mais estudos para esta análise.

Em associação a menor oxidação de glicose, observamos maior síntese de lipídios a partir deste substrato no grupo HP-ALN em relação aos demais grupos (Figura 13). Estes resultados indicam que a PDH poderia estar mais ativa no grupo HP-ALN, porém desviando acetil-CoA para síntese de lipídios. No entanto, não podemos descartar a hipótese de que a PDH estivesse igualmente ativa nos dois grupos, considerando que as duas dietas contêm ácidos graxos ω 3, embora em quantidades e tipos diferentes, e que o acetil-CoA apenas tenha sido destinado em proporções diferentes para as vias de oxidação a CO_2 e lipogênese entre os mesmos. Para este resultado pode ter contribuído o fato de o grupo HP-ALN ter apresentado maior insulinemia e níveis séricos de AGL (Tabela 9), sendo que o primeiro pode aumentar a via de lipogênese e, juntamente com o maior fluxo de AGL, pode contribuir para o maior desvio de glicose para síntese total de lipídios. Além disso, antes mesmo da reação da PDH, a glicose pode ter sido desviada para síntese de glicerol-3-P nestes animais para formação de TG possivelmente necessário em maior quantidade nestes animais em relação ao grupo HP-EPA/DHA devido a maior quantidade de substrato (AGL séricos e sintetizados *de novo*).

A insulina regula o fluxo da glicogênese e a via glicolítica simultaneamente por meio do estímulo da glicogênio sintase e da piruvato desidrogenase. Por esta razão e considerando estudos indicando alterações no metabolismo hepático de glicogênio em estado insulino-resistentes, nos animais tratados com dieta hiperpalatável analisamos também possíveis

alterações na síntese global de glicogênio a partir de glicose e a partir de glicerol, além da oxidação de glicose e síntese de lipídios a partir deste substrato.

Ambos grupos de animais tratados com dieta hiperpalatável apresentaram concentração e síntese de glicogênio a partir de glicose e glicerol menores em relação ao grupo controle (Figuras 16 e 17). A insulina encontrou-se elevada no grupo HP-ALN em relação aos demais grupos, porém não houve diferença na glicemia entre os grupos analisados (Tabela 9).

Os dados obtidos em relação à síntese de glicogênio, conforme mensurados neste estudo, são o resultado dos fluxos simultâneos de glicogênese e glicogenólise (SAVAGE et al, 2007), e por esta razão utilizaremos o termo “síntese global de glicogênio”. Nossos resultados em relação à concentração hepática de glicogênio estão de acordo com Oakes et al (1997), que utilizaram um modelo de dieta rica em lipídios (59% das calorias totais) para induzir resistência à insulina e observaram menor concentração nos animais tratados em relação ao grupo controle. Diversos estudos mostram que a concentração hepática de glicogênio de animais diabéticos no estado alimentado encontra-se diminuída (GOLDEN et al, 1979; GANNON e NUTTAL, 1997).

Acreditamos que a menor síntese global de glicogênio nos animais tratados com a dieta HP em relação ao controle (dieta comercial padrão) pode ser resultado da alteração de enzimas-chave da glicogênese e da glicogenólise, ou ainda de diferenças no fluxo de glicose na via glicolítica. A maior oxidação de glicose observada no grupo HP-EPA/DHA (Figura 12) poderia ter contribuído para menor síntese e concentração de glicogênio nestes animais pela diminuição de substrato disponível, porém, pelo fato de este grupo também ter apresentado menor síntese de lipídios a partir de glicose (Figura 13), não podemos afirmar que houve diferença da utilização deste substrato na via glicolítica entre os grupos HP-ALN e HP-EPA/DHA.

Portanto, acreditamos que a diferença observada no metabolismo de glicogênio entre o grupo controle e os grupos submetidos à dieta HP em nosso estudo pode ser resultado da alteração das vias de síntese e degradação deste polímero de glicose. A síntese global de glicogênio é diretamente regulada por duas enzimas: glicogênio sintase e fosforilase. Na literatura encontram-se diversos estudos em relação aos efeitos da resistência à insulina e diabetes sobre estas enzimas, porém estudos em relação aos possíveis efeitos de ácidos graxos poliinsaturados são mais escassos.

Elevada atividade hepática da glicogênio fosforilase ocorre em vários modelos animais de resistência à insulina (ROESLER e KHANDELWAL, 1986; AISTON et al, 2000) e pode ser, ao menos em parte, responsável pelo prejuízo na síntese global de glicogênio observada nestes animais, especialmente no grupo HP-ALN, que apresentou evidências de maior resistência à insulina em relação ao grupo HP-EPA/DHA (hiperinsulinemia, aumento de TG e AGL séricos), embora o TTG evidencie que ambos grupos desenvolveram intolerância à glicose (Figura 8). Além disso, AGPI e a resistência à insulina exercem efeitos contrários sobre a atividade da glicose-6-fosfatase, enzima que catalisa o passo final para liberação da glicose após a glicogenólise ou gliconeogênese. Os primeiros diminuem a atividade da enzima e a última, pode aumentar (DELARUE, 2004). Sendo assim, é possível que os animais com a dieta HP tenham sintetizado maior quantidade de glicogênio em relação ao grupo controle, porém podem ter degradado mais concomitantemente por maior glicogenólise e atividade da G-6-Pase, especialmente o grupo HP-ALN, onde foi observado aumento dos níveis séricos de AGL que poderiam estimular a glicogenólise (ARNER, 2001). No entanto, esta hipótese é pouco provável, já que não encontramos diferenças na glicemia entre os grupos controle e HP (Tabela 9) e o TTG indicou que os animais do grupo HP-ALN apresentaram menor tolerância à glicose (Figura 8) e, portanto, provavelmente apresentariam maior glicemia que os demais

grupos, já que estariam liberando maior quantidade a partir do fígado e metabolizando menos em tecidos periféricos.

Em relação à glicogênio sintase hepática (GS), pesquisadores confirmaram que a atividade total desta enzima pode estar aumentada em animais diabéticos, porém a percentagem de glicogênio sintase na forma ativa (GSa) é significativamente menor em relação ao observado em animais controle (GANNON e NUTTAL, 1997; VAN AUKEN et al, 1996). Quanto à síntese de glicogênio a partir de glicose, em um modelo animal de resistência à insulina (*fa/fa*), Aiston et al (2000), da mesma maneira que observamos em nosso estudo (Figura 16), encontraram diminuição em relação a um grupo controle. Alterações na cascata de sinalização da insulina que leva à desfosforilação e ativação da glicogênio sintase podem ser a razão de sua atividade encontrar-se diminuída na diabetes (LIBAL-WEKSLER et al, 2001). Uma possível explicação para alterações da cascata de sinalização da insulina encontrada na literatura refere-se ao acúmulo intra-hepático de lipídios. Efeitos inibitórios de ácidos graxos de cadeia longa ativados sobre a glicogênio sintase hepática já foram reportados (WITITSUWANNAKUL e KIN, 1977). Além disso, o aumento na concentração intracelular de diacilglicerol devido à lipogênese aumentada e/ou diminuída oxidação de ácidos graxos mitocondrial ativa PKC- ϵ , que se liga e inativa o receptor de insulina e sua atividade cinase, resultando na redução da fosforilação de IRS-1 e IRS-2 estimulada por insulina. Isto, por sua vez, resulta em redução da ativação da PI-3 cinase e AKT2. Reduzida ativação da AKT2 resulta em menos fosforilação da GSK3, que pode contribuir para menor síntese de glicogênio estimulada por insulina (SAVAGE et al, 2007; OAKES et al, 1997).

Em relação à suplementação dietética com AG ω 3, diferentes autores sugerem que estes ácidos graxos atuam como “coordenadores do metabolismo”, direcionando os ácidos graxos, de maneira geral, para maior oxidação somada a sua menor síntese *de novo*, com consequente diminuição do acúmulo intra-hepático de lipídios, além de direcionar a glicose

para maior síntese de glicogênio (CLARKE, 2000; DAVIDSON, 2004). Em acordo, Ficková et al (1994) comprovaram que ácidos graxos $\omega 3$ previnem a diminuição da atividade tirosina cinase do receptor de insulina mediante uma dieta rica em sacarose em fígado de ratos. Além disso, estudos preliminares de Jump et al (2008) indicam que DHA, assim como a insulina, induz a fosforilação e conseqüente inativação da GSK3- β . Inativada, a GSK3- β poderia deixar de fosforilar a GS e contribuir para que a enzima permanecesse na sua forma mais ativa, desta maneira também possivelmente contribuindo para maior síntese de glicogênio.

Considerando estas evidências, poderíamos esperar um aumento da síntese de glicogênio no grupo HP-EPA/DHA em relação ao grupo HP-ALN, já que observamos menor concentração hepática de triglicerídeos no primeiro em relação ao segundo (Tabela 9), além de menor síntese de lipídios a partir de glicose (Figura 13). Além disso, o óleo de peixe é rico em DHA, diferentemente do óleo de soja. No entanto, existem controvérsias, pois Corporeau et al (2005) não observaram reversão de alterações na via de sinalização da insulina induzidas por dexametasona em fígado de ratos mediante o uso de dietas contendo 6% de óleo de amendoim (rico em AG- $\omega 3$) ou 2,2% deste óleo substituídos por óleo de peixe.

Contrariamente às suposições de Clarke (2000) e Davidson (2004), Rustan et al (1993) encontraram diminuída concentração hepática de glicogênio ao tratar animais com dietas contendo 19,5% de banha somados a 1,5% de óleo de soja (por peso) ou 13% de banha somados a 6,5% de uma mistura de DHA e EPA e 1,5% de óleo de soja. Em seu estudo os animais encontravam-se no estado alimentado. Gaiva et al (2003) também encontraram menor concentração hepática de glicogênio em animais que receberam dieta com 15% de óleo de peixe ou 12,5% de óleo de soja somados a 2,5% de óleo de peixe em relação ao grupo controle (ração comercial) no estado alimentado. Em acordo, em nosso estudo com dietas hiperlipídicas observamos menor concentração hepática de glicogênio nos animais tratados

com dieta contendo ácidos graxos $\omega 3$ em relação ao grupo com dieta rica em gordura saturada (Tabela 8).

Considerando, portanto, que não existe consenso a respeito dos efeitos dos ácidos graxos $\omega 3$ de maneira geral, ou de seus tipos específicos (EPA e DHA *versus* ALN), sobre o metabolismo hepático de glicogênio, pois alguns estudos sugerem que poderia haver um aumento e outros sugerem diminuição da concentração do mesmo, e considerando ainda que não encontramos na literatura outros estudos com relação aos efeitos destes ácidos graxos sobre a síntese global de glicogênio a partir de glicose ou glicerol, algumas das hipóteses que elaboramos para explicação de nossos resultados são as seguintes: (a) é possível que ácidos graxos $\omega 3$ levem a uma diminuição do glicogênio, como sugerem os resultados dos estudos de Gaiva et al (2003) e Rustan et al (1993) e não a um aumento (concentração e/ou síntese), como sugerem Clarke (2000), Davidson et al (2004) e Jump et al (2008). Neste caso, ambos grupos poderiam ter apresentado menor síntese global de glicogênio por efeitos dos AG $\omega 3$; (b) Ácido α -linolênico poderia ter um efeito menos pronunciado na diminuição da síntese global de glicogênio, mas poderia ter apresentado um resultado semelhante ao grupo HP-EPA/DHA pelo fato de, possivelmente, ter desenvolvido alterações da cascata de sinalização da insulina relacionadas ao acúmulo intra-hepático de lipídios com conseqüente prejuízo da ativação da GS; (c) AG $\omega 3$ poderiam contribuir para maior (ou menor) formação de glicogênio e, independente dos resultados indicativos de maior resistência à insulina no grupo HP-ALN, ambos grupos podem ter apresentado menor formação deste polímero de glicose por alteração da sinalização hepática da insulina e menor ativação da GS, ambos tipos de AG $\omega 3$ – ALN ou DHA + EPA – não tendo revertido este defeito, caracterizando assim um efeito predominante da resistência à insulina sobre o efeito dos AG $\omega 3$.

Assim, concluímos que nosso estudo não permite precisar se as alterações observadas resultaram de efeitos da resistência à insulina, de efeitos específicos dos diferentes tipos de

ácidos graxos $\omega 3$ utilizados nas dietas ou ambos. São necessários mais estudos para elucidar melhor estes resultados e verificar se AG $\omega 3$, isoladamente, de fato alteram a síntese total de glicogênio e se há diferenças na ação dos diferentes tipos destes AG na glicogênese e na glicogenólise.

Embora possíveis diferenças na ação dos AG $\omega 3$ ALN ou EPA e DHA sobre o metabolismo de glicogênio permaneçam pouco compreendidas, um estudo recente mostrou que estes tipos de AG exercem diferentes efeitos sobre a lipogênese hepática, sendo que o primeiro não a suprime, contrariamente aos últimos. Sealls et al (2008) mostrou que ALN pode ser eficientemente convertido em DHA e EPA, no entanto, ainda assim, animais recebendo dietas com quantidades diferentes destes AG apresentam efeitos contrários na lipogênese hepática.

Em fígado, verificamos o efeito de ácidos graxos $\omega 3$ sobre a síntese de lipídios a partir de glicose utilizando dietas hiperlipídicas, hiperpalatáveis e hiperglicídicas. Em todos os estudos em que este parâmetro foi avaliado observamos uma menor síntese na presença de EPA e DHA (Figuras 13, 14 e 15). No estudo em que utilizamos dietas hiperlipídicas, observamos uma menor incorporação de glicose a lipídios no grupo que recebeu uma dieta contendo ácidos graxos $\omega 6:\omega 3$ numa proporção 5:1 (grupo $\omega 3$) em relação ao grupo que recebeu predominantemente AG $\omega 6$ (grupo $\omega 6$) e uma menor incorporação neste em relação ao grupo que recebeu uma dieta rica em AG saturados (grupo SAT) (Figura 14). Utilizando dietas ricas em sacarose contendo $\omega 6:\omega 3$ na proporção 2:1 (sac- $\omega 3$) ou predominantemente AG- $\omega 6$ (sac- $\omega 6$) foi observada síntese lipídica semelhante a partir de glicose no grupo sac- $\omega 3$ em relação ao controle (amido + óleo de girassol) e menor neste grupo em relação ao sac- $\omega 6$ (Figura 15). Já no estudo em que utilizamos dietas hiperpalatáveis contendo diferentes quantidades e tipos de AG- $\omega 3$, encontramos síntese de lipídios a partir de glicose semelhante ao controle (dieta comercial padrão) naqueles animais alimentados com óleos de soja e peixe,

contendo ALN, EPA e DHA respectivamente (HP-EPA/DHA), e maior síntese naqueles alimentados apenas com óleo de soja (HP-ALN) (Figura 13).

Além disso, em todos estes estudos observamos menor concentração intra-hepática de TG nos animais tratados com EPA e DHA, além de menor concentração sérica de TG e AGL (Tabelas 8, 9 e 10). Estes resultados estão em acordo com o observado por outros pesquisadores (LOMBARDO et al, 2007; PEYRON-CASO et al, 2002; OGUZHAN et al, 2006).

Conforme dados da literatura, acreditamos que a menor síntese de lipídios a partir de glicose encontrada em nossos resultados pode ser atribuída a menor lipogênese *de novo* somada a maior oxidação de AG induzidas pelos AG ω 3 (CLARKE, 2000). Além disso, pode ter contribuído para este resultado o menor fluxo de AGL para o fígado e conseqüente menor utilização de glicose na síntese glicerol-3-P para formação de TG, já que observamos menores concentrações séricas de AGL em todos os grupos tratados com EPA e DHA (óleo de peixe). O somatório destes efeitos dos AG ω 3 pode contribuir para as menores concentrações de VLDL observadas tanto em animais como em humanos mediante a ingestão destes lipídios. Os AGL entregues ao fígado são oxidados ou esterificados na forma de TG. A maior parte dos TG sintetizados *de novo* é armazenada no citosol e uma pequena fração é secretada na forma de VLDL (WIGGINS e GIBBONS, 1992). No entanto, o tamanho do pool citosólico de TG correlaciona-se diretamente com a secreção de VLDL (ADELI et al, 2001). Portanto, o aumento da concentração intra-hepática de TG que observamos nos animais que receberam dietas contendo pequena ou nenhuma quantidade de AG ω 3 constitui um indicativo de que o aumento dos níveis de TG séricos observados nestes animais deve representar um aumento de VLDL, embora esta lipoproteína não tenha sido dosada.

Conforme Harris e Bulchandani (2006), uma menor síntese de TG para incorporação à VLDL poderia ser causada por três diferentes mecanismos: (1) menor disponibilidade de AG

para síntese de TG que poderia ser secundária: (a) ao aumento da β -oxidação, (b) ao menor fluxo de AGL para o fígado ou de TG (captação de remanescentes de quilomícrons), (c) à diminuição da síntese hepática *de novo* de AG; (2) aumento da síntese de fosfolípidos com conseqüente menor uso de AG para formar TG; (3) diminuição da atividade de enzimas da via de síntese de triglicerídeos, como diacilglicerol aciltransferase ou ácido fosfatídico fosfolidrolase. Estes autores fizeram uma revisão de estudos sobre estes mecanismos incluindo apenas aqueles realizados em animais, publicados entre 1966 e 2006, todos envolvendo o uso de óleo de peixe, DHA e/ou EPA. Apesar da grande variação no tempo de duração dos estudos, da quantidade de AG ω 3 utilizada, entre outros fatores, o efeito mais consistentemente observado foi a diminuição da lipogênese *de novo* hepática (13 entre 16 estudos). Aumento da β -oxidação também foi reportado, mas esteve presente em apenas dois terços, e não na totalidade dos estudos em que foi analisada, e em relação à atividade das enzimas de síntese de TG, quase a totalidade dos estudos indicou que não houve alteração ou houve diminuição, mas raros mostraram aumento. Todos estes efeitos poderiam contribuir para menor produção de VLDL mediante ingestão de AG ω 3.

Em acordo, Herzberg e Rogerson (1988) verificaram menor lipogênese hepática *in vivo*, menor atividade de enzimas lipogênicas (acetil-CoA carboxilase, ácido graxo sintetase, ATP citrato-liase), tanto no jejum como no estado alimentado, no fígado de animais tratados com dieta rica em glicose (60% em relação ao peso total) suplementada com óleo de peixe (10%-peso) em relação a grupos alimentados com óleo de milho (rico em ω 6) ou com uma fonte de gordura saturada. A lipogênese *de novo* encontrada foi menor no grupo que recebeu AG ω 3 em relação aos demais e menor no grupo que foi alimentado com AG ω 6 em relação ao que recebeu AG dieta contendo gordura saturada, em acordo com o que encontramos em relação à síntese total de lípidios a partir de glicose (Figuras 13, 14 e 15), o que indica que a menor lipogênese deve ter contribuído significativamente para nosso resultado. No estudo de

Hertzberg et al (1988), apenas o grupo $\omega 3$ apresentou menor secreção hepática de VLDL. Analogamente, Wong et al (1984) verificaram menor lipogênese em fígados isolados perfundidos retirados de animais alimentados com óleo de peixe (15% - peso) em relação a um grupo que recebeu dieta com óleo de açafrão (rico em $\omega 6$). Além disso, também observaram menor síntese de VLDL a partir de ácidos graxos sintetizados *de novo* nos animais alimentados com óleo de peixe em relação ao grupo açafrão quando comparados em relação ao controle (dieta comercial). A liberação total de TG na forma de VLDL também foi significativamente reduzida nos animais alimentados com AG $\omega 3$, mas não naqueles alimentados com óleo de açafrão. Wong et al (1984) avaliaram também a cetogênese e verificaram que esteve significativamente aumentada no grupo alimentado com óleo de peixe em relação aos demais, o que esteve relacionado a uma menor sensibilidade da CPT-1 à inibição por malonil-CoA em mitocôndrias isoladas. Este efeito no grupo tratado com óleo de açafrão foi intermediário entre o efeito obtido com o óleo de peixe e o controle. Sendo assim, Wong et al sugerem que os efeitos hipotrigliceridêmicos do óleo de peixe refletem: menor lipogênese *de novo*, maior oxidação de AG, possivelmente em peroxissomos, e menor secreção de VLDL do fígado.

Uma recente revisão realizada pela Cochrane que incluiu 33 ensaios clínicos randomizados controlados envolvendo diabéticos tipo 2 que receberam suplementação de ômega-3, concluiu que esta suplementação diminui os níveis de TG e VLDL-colesterol séricos em humanos (HARTWEG, 2008).

Jump et al (1994) comprovaram que uma dieta contendo 10% de óleo de peixe contendo apenas DHA, EPA ou uma mistura de ambos diminui significativamente os níveis dos RNAm que codificam as enzimas lipogênicas ácido graxo sintase (AGS) e enzima málica em comparação a uma dieta contendo 10% de trioleína (ácido oléico) ou óleo de oliva em hepatócitos em animais. Estudos em cultura primária de hepatócitos confirmaram que AL,

ALN, AA e EPA foram igualmente efetivos na supressão dos níveis de RNAm codificando AGS. No entanto, existem diferenças na intensidade do efeito de acordo com o ácido graxo. O óleo de peixe utilizado foi duas a quatro vezes mais efetivo na supressão da atividade e RNAm da AGS do que óleo de milho. Recentemente, ao comparar os efeitos de óleos ricos em AG saturados, AL e ALN ou EPA e DHA, além de um grupo com ração comercial, Sealls et al (2008) observaram que AL e ALN não suprimem a lipogênese e a expressão de SREBP-1 hepática tão eficientemente como DHA e EPA. Isto evidencia a diferença entre a ação não só de AG $\omega 3$ ou $\omega 6$, mas também entre os AG de cada uma destas famílias.

Contrariamente a maior parte dos demais estudos, Gaiva et al (2003) observaram maior lipogênese, apesar de menor atividade das enzimas ATP-citrato liase e enzima málica em animais tratados com AG $\omega 3$ por meio de dietas comerciais nas quais foram adicionados contendo 15% de óleo de soja, 15% de óleo de peixe ou os dois óleo numa proporção 5:1, respectivamente (por peso).

Com relação à oxidação de AG, utilizando dietas contendo 15% de óleo de açafrão, de palma, perila (rico em ALN) ou óleo de peixe, Ide et al (2000) verificaram que tanto o óleo perila como o óleo de peixe aumentaram significativamente a taxa de oxidação peroxissomal em relação aos demais grupos, evidenciando assim um maior efeito dos AG $\omega 3$ em relação aos $\omega 6$ neste mecanismo que pode contribuir para diminuição dos níveis de AG que servem como substrato para síntese de TG. Além disso, neste estudo os óleos ricos em AG $\omega 3$ também aumentaram significativamente a atividade da CPT1 em relação aos AG $\omega 6$ e saturados.

Após estes estudos, outros pesquisadores fizeram ver como AGPI podem alterar a expressão gênica para produzir tais efeitos. Estudos relacionados aos efeitos destes AG sobre a expressão gênica indicam que os mesmos atuam como “direcionadores do metabolismo” levando a uma maior expressão de genes da via de oxidação e menor expressão de genes da

via de lipogênese de AG no fígado (CLARKE, 2000; JUMP, 2008). Os mecanismos por meio dos quais estes AG controlam a expressão gênica são bastante complexos e ainda deverão ser melhor esclarecidos, porém evidências indicam a participação do fator de transcrição PPAR α no aumento de oxidação de AG induzido por AGPI, enquanto a redução da lipogênese está relacionada à supressão dos fatores SREBP-1 e ChREBP (JUMP, 2008).

É importante considerar que, apesar de AG ω 3 estarem associados a maior sensibilidade à insulina (LOMBARDO & CHICCO, 2005), muitas de suas ações diferem daquelas deste hormônio. Por exemplo, a insulina induz a lipogênese hepática, enquanto estes ácidos graxos diminuem. A insulina aumenta os fatores de transcrição SREBP-1c e ChREBP, enquanto eles diminuem, entre outras diferenças, evidenciando que atuam por diferentes vias do metabolismo (JUMP, 2008). Resistência à ação da insulina no metabolismo da glicose, mas sensibilidade à sua ação na lipogênese é um paradoxo. Uma explicação molecular para este paradoxo foi relatada em 2000, quando ficou comprovado que a insulina suprime IRS-2, enquanto induz a produção de SREBP-1c, fator de transcrição que estimula a lipogênese. Isto explicaria como o fígado continua sintetizando lipídios, enquanto resiste à supressão mediada pela insulina da produção hepática de glicose (SHIMOMURA et al, 2000). Um dos importantes efeitos dos AGPI no fígado é a supressão de SREBP-1c.

Neschen et al (2002) observaram um aumento das concentrações intra-hepáticas de TG e DAG mediante o tratamento com dieta hiperlipídica contendo 59% do total de calorias provenientes do óleo de açafrão, enquanto o óleo de peixe, mesmo presente em uma quantidade que caracteriza uma dieta hiperlipídica, não desencadeou este efeito e, além disso, induziu maior oxidação peroxissomal de AG evidenciando assim um outro mecanismo, além da alteração da expressão gênica, por meio do qual os AG ω 3 podem prevenir RI hepática à insulina.

Os mecanismos que levam ao aumento da produção de VLDL característico em estados insulino-resistentes ainda não são completamente compreendidos, contudo um número crescente de estudos tem apontado para a importância do aumento da lipogênese *de novo*, alterações da sinalização da insulina com prejuízo na inibição da liberação de VLDL por este hormônio e, especialmente, do aumento do fluxo de AGL a partir de tecidos periféricos para o fígado (ADELI et al, 2001). É provável que alterações do fluxo de AGL também tenham efetuado importante participação na diminuição da síntese de TG a partir de glicose observada em nosso estudo nos animais que receberam dietas contendo EPA e DHA (Figuras 13, 14 e 15), já que a glicose pode ser utilizada também na síntese de glicerol-3-P para incorporação de ácidos graxos e esta provavelmente será maior se houver elevada quantidade dos mesmos como substrato para síntese de TG.

Portanto, os resultados que observamos em relação à síntese de lipídios diminuída com o acréscimo de AG $\omega 3$ (EPA e DHA) às diferentes dietas, provavelmente resultaram da menor síntese *de novo* de AG, possivelmente associada a maior β -oxidação. Além disso, os grupos onde os níveis séricos de AGL encontraram-se elevados (Tabela 8, 9 e 10) devem ter apresentado maior síntese de TG também em razão do aumento de substrato. É importante colocar que, na presença de diabetes induzida por estreptozotocina, um estudo de Martins-Santos et al (2007) indicou que o glicerol-3-P utilizado na síntese de TG provem em quantidade significativa da gliceroneogênese hepática, além da via glicolítica, apesar destes animais freqüentemente apresentarem também elevada gliconeogênese e de ambas vias utilizarem substratos em comum (piruvato, lactato e alanina). Já a atividade da glicerocinase hepática parece não sofrer alterações conforme este estudo.

Em suma, observamos que as diferentes fontes lipídicas utilizadas resultaram em efeitos diferentes nos parâmetros do metabolismo de carboidratos e lipídios estudados no fígado. Quanto ao complexo PDH hepático, acreditamos que o excesso de ácidos graxos

saturados ou $\omega 6$ pode diminuir sua atividade, possivelmente por meio da alteração da sinalização da insulina e pelo aumento dos níveis plasmáticos de AGL, e que os AG $\omega 3$ podem evitar este efeito quando acrescentados em dietas hiperlipídicas ricas em AG $\omega 6$.

Em relação à oxidação de glicose, não encontramos uma explicação pertinente para o fato de não termos observado um esperado aumento nos animais que receberam dieta hiperlipídica contendo AG $\omega 3$ associado a maior atividade da PDH que foi observada nos mesmos. Já os animais tratados com dieta HP, EPA e DHA foram capazes de manter níveis de oxidação de glicose semelhantes ao controle enquanto ALN diminuiu a oxidação, mas não podemos afirmar se este resultado é consequência de alteração da atividade da PDH ou de maior desvio do acetil-CoA formado por ação desta enzima para síntese de lipídios a partir glicose. No entanto, os resultados obtidos com as dietas HP nos permitem concluir que os efeitos dos AG $\omega 3$ sobre o metabolismo de CHO diferem de acordo com os tipos de AG desta família utilizados.

Quanto aos resultados relacionados ao metabolismo do glicogênio obtidos por meio do tratamento com a dieta HP, concluímos que ambos grupos tratados com esta dieta apresentaram menor concentração e síntese global deste polímero a partir de glicerol e glicose, mas são necessários mais estudos para esclarecer melhor se os mecanismos que levaram a este efeito são resultantes da ação da resistência hepática à insulina, dos ácidos graxos $\omega 3$ ou ambos.

Em relação à síntese de lipídios, EPA e DHA efetivamente diminuem a síntese de lipídios a partir de glicose e é provável que a menor lipogênese *de novo* e maior oxidação de AG, além de, possivelmente, um menor fluxo de AGL para o fígado a partir do tecido adiposo e menor síntese de glicerol-3-P a partir de glicose tenham contribuído para nossos resultados.

5.3 Efeitos de ácidos graxos polinsaturados no metabolismo do tecido adiposo

No tecido adiposo, uma importante consequência da resistência à insulina é o aumento da lipólise e a menor captação e esterificação de AGL (BAYS et al, 2004), levando a um maior fluxo destes para o músculo e o fígado e contribuindo para o desenvolvimento das complicações geradas pela lipotoxicidade (MCGARRY et al, 2002) nestes e em outros locais.

Diversos pesquisadores vêm mostrando que AG ω 3 contribuem para a diminuição da adiposidade visceral em animais, além de diminuir os níveis séricos de AGL. No entanto, os mecanismos subjacentes a tais efeitos não são completamente compreendidos. Além disso, existe um significativo volume de estudos sobre a atuação de AGPI na expressão de genes envolvidos nas vias do metabolismo de carboidratos e lipídios, especialmente no fígado, porém os efeitos destes ácidos graxos sobre estas vias no tecido adiposo são menos entendidos. Por esta razão, em tecido adiposo, verificamos o efeito de ácidos graxos ω 3 sobre a síntese de lipídios a partir de glicose utilizando os modelos de dieta hiperlipídica, hiperpalatável e hiperglicídica. Analisamos ainda a oxidação de glicose neste tecido nos animais tratados com dietas hiperpalatável e a atividade da PEPCK, além da síntese de lipídios a partir de glicerol nos animais tratados com dieta rica em sacarose.

Nos adipócitos, os AG incorporados a TG podem ser provenientes da lipogênese *de novo* a partir da glicose, da lipólise do próprio tecido adiposo (disponíveis para re-esterificação por meio da gliceroneogênese) ou ainda podem ser captados a partir de lipoproteínas circulantes. No último caso, por sua vez, podem ser originados da dieta (quilomícrons) ou da síntese de VLDL hepática. Para síntese de TG são necessários glicerol-3-P e AG ativados. O glicerol-3-P pode ser formado a partir de três diferentes vias: por fosforilação do glicerol, via glicerocinase, ou pela redução de diidroxiacetona-P, que pode ser originada tanto a partir da glicólise, tendo a glicose como substrato inicial, como a partir da gliceroneogênese (síntese *de novo* de G-3-P a partir de precursores outros que não glicose ou

glicose a lipídios reduzida no tecido adiposo retroperitoneal em relação ao controle (dieta comercial padrão), porém aumentada no grupo HP-EPA/DHA, que recebeu óleos contendo ALN, EPA e DHA, em relação ao grupo HP-ALN, que recebeu AG ω 3 predominantemente apenas na forma de ALN (Figura 19).

Acreditamos que alterações em diversos pontos do metabolismo de lipídios e carboidratos do tecido adiposo podem estar envolvidas nestes resultados. A glicose incorporada a estes lipídios pode ser proveniente da lipogênese *de novo* a partir de glicose e sua incorporação a AG ou da formação de glicerol-3-P a partir deste substrato na via glicolítica. Além disso, existe a possibilidade de a glicose ir a lactato e após ser incorporada a TG por síntese de glicerol-3-P via gliceroneogênese. Nossos dados não permitem fazer a distinção das diferentes formas como a glicose foi incorporada aos lipídios dosados.

É possível que a lipogênese *de novo* a partir de glicose tenha sido menor nos grupos tratados com AG ω 3. Em acordo com esta hipótese, Raclot et al (1997) analisaram os efeitos de dietas contendo 20% de lipídios na forma de AG saturados em conjunto com ácidos graxos monoinsaturados (controle) ou diferentes tipos de AG ω 3 (EPA, DHA, EPA + DHA ou óleo de peixe) sobre os níveis do RNAm da enzima ácido graxo sintase (AGS), e os grupos contendo AG ω 3 apresentaram níveis diminuídos da mesma em relação ao controle no tecido adiposo retroperitoneal. Conforme estudo de Benhizia et al (1994), o óleo de peixe parece ser mais efetivo na supressão da atividade e RNAm da AGS no tecido adiposo em comparação ao óleo de milho, rico em ω 6.

Flachs et al (2005) compararam o efeito de dietas hiperlipídicas ricas em ALN ou na associação de ALN, DHA e EPA sobre a lipogênese e observaram que os animais que receberam AG ω 3 de cadeia longa apresentaram diminuição desta via em comparação ao primeiro grupo em tecido adiposo epididimal, mostrando que DHA e EPA são mais eficientes na supressão da lipogênese *de novo* não apenas no fígado, mas também no tecido adiposo.

Diferentemente, Peyron-Caso et al (2003) utilizaram por três semanas dietas ricas em sacarose (57,5g/100g) contendo 14% de óleo de peixe ou uma mistura de óleos contendo gordura vegetal e animal e observaram um aumento da atividade da AGS no tecido adiposo retroperitoneal dos animais que receberam AG ω 3, embora no epididimal não tenha sido observada diferença entre os grupos, inclusive em relação ao controle (dieta comercial). Portanto, não há consenso na literatura em relação aos efeitos de AGPI na lipogênese *de novo* em adipócitos, porém, como mostram alguns estudos, esta via aparentemente pode ser suprimida por AG ω 3, o que poderia ter contribuído para menor síntese de TG a partir de glicose no tecido adiposo em nossos estudos.

Outro fator que pode ter contribuído diretamente para as diferenças observadas na síntese de lipídios a partir de glicose são os diferentes efeitos que AGPI podem exercer sobre a captação deste substrato pelos adipócitos. Os AG ω 3 parecem favorecer a captação, enquanto sua ausência tem efeito contrário. É o que mostraram Oguzhan et al (2006) que ao utilizar a segunda geração de animais submetidos a uma dieta contendo óleo de girassol (rico em ω 6 – 5%) ou óleo de soja (rico em ω 3 e ω 6), observaram uma menor captação de [U- 14 C] glicose por adipócitos incubados *in vitro* no grupo deficiente em ω 3 obtidos a partir de animais no estado alimentado.

Em animais alimentados com dieta rica em sacarose (57,5%/peso) por quatro semanas, Peyron-Caso et al (2002) utilizaram uma dieta contendo 14% de lipídios, sendo 10% de óleo de peixe e no grupo controle substituíram estes 10% por óleos ricos em AG ω 6 e gordura saturada, além de utilizar amido em lugar da sacarose, e observaram aumento do transporte de glicose estimulado por insulina nos adipócitos epididimais de animais alimentados com óleo de peixe, além de concentração de GLUT4 e de seu RNAm semelhantes às concentrações do controle, sendo que em outros grupos com dieta rica em sacarose houve uma diminuição do transporte de glicose. Este estudo foi realizado no estado pós-absortivo. Já no estado

alimentado, utilizando uma dieta hiperpalatável com alto teor de sacarose pelo mesmo período de aproximadamente quatro semanas, Chaves et al (2006) observaram maior captação de glicose em adipócitos epididimais e retroperitoneais no grupo tratado em relação ao controle (dieta padrão comercial).

Em acordo com o estudo de Peyron-Caso (2002), Luo et al (1996) fizeram ver que menor transporte de glicose, oxidação e incorporação aos lipídios totais estimulados por insulina foram evitados quando o óleo de peixe (30%) representou a principal fonte de lipídios em animais alimentados com dieta rica em sacarose (50% do peso) por seis semanas em comparação a um grupo que recebeu uma mistura de óleos vegetais e animais. Em contrapartida, utilizando uma dieta com 63% (das calorias) de sacarose, suplementada ou não com 19% (das calorias) de óleo de peixe por duas semanas, Macho et al (1998) determinaram o transporte de glicose por meio de incubação de adipócitos do tecido epididimal obtido de animais no estado pós-prandial com 2-deoxi-D-³H-glicose e observaram menor captação nos animais tratados com óleo de peixe tanto basal como estimulada por insulina em relação ao controle (dieta comercial) e a um grupo tratado com dieta rica em sacarose e uma mistura de óleos vegetais e animais, deficiente em AG ω 3. No estado basal, o grupo com dieta rica em sacarose apresentou maior captação de glicose que o grupo controle.

Em acordo com os efeitos positivos dos AG ω 3 sobre a captação de glicose, Corporeau et al (2006) confirmaram que estes AG evitam alterações da cascata de sinalização da insulina em adipócitos, a qual, em geral, é necessária para translocação adequada do GLUT4 para membrana.

Portanto, as evidências relacionadas aos efeitos de AGPI sobre o transporte de glicose em adipócitos variam de acordo com a duração da intervenção, a presença ou ausência de estímulo por insulina, o estado alimentar – alimentado, pós-absortivo –, além composição da dieta, porém, na maior parte dos estudos AG ω 3 parecem favorecer a captação de glicose no

tecido adiposo. Uma captação aumentada de glicose pelos animais que receberam dieta contendo óleo de peixe (rico em EPA e DHA) não justificaria a menor síntese de lipídios a partir de glicose que observamos no estudo com dietas hiperglicídica e hiperlipídica nas quais foram adicionados estes AG. No entanto, a síntese total de lipídios a partir deste substrato depende do destino do mesmo entre as diferentes vias em que pode ser utilizado no interior do adipócito e não apenas de sua captação.

Podem contribuir ainda para a alteração da síntese de lipídios a partir de glicose alterações na oxidação deste substrato. Em nossos animais tratados com dieta hiperpalatável, observamos uma menor oxidação de glicose no grupo HP-ALN em relação ao grupo HP-EPA/DHA e nestes em relação ao grupo controle (dieta comercial) (Figura 21). Portanto, a ingestão de EPA e DHA resultou numa maior oxidação de glicose, embora ainda menor que no grupo controle. Acreditamos que é possível que AG ω 3 aumentem a oxidação da glicose em adipócitos devido a maior captação deste substrato associada a sua menor utilização na lipogênese *de novo*, conforme os estudos citados acima, com conseqüente maior quantidade de substrato para oxidação ou síntese de outros compostos da glicólise úteis a outras vias metabólicas. Acreditamos que a diferença em relação ao grupo controle, neste caso, provavelmente seja resultado de uma menor captação de glicose, considerando que estes animais foram tratados com dieta HP por sete meses e o TTG evidenciou importante intolerância à glicose em ambos grupos, embora menor nos animais que receberam EPA e DHA (Figura 8). Nos animais tratados com dieta HP, dado o período mais prolongado de tratamento, acreditamos que a sinalização da insulina e a translocação do GLUT4 para membrana poderiam estar mais prejudicadas e é possível que ALN, EPA e DHA tenham sido mais eficientes que ALN, isoladamente, na manutenção da captação de glicose, o que justificaria a maior síntese no grupo HP-EPA/DHA em relação ao HP-ALN. Em acordo, Luo et al (1996) encontraram maior oxidação de glicose em animais tratados com dieta rica em

sacarose suplementada com óleo de peixe. Além disso, o fato de estes animais terem sido tratados desde o período gestacional com as respectivas dietas no nosso estudo, pode ter contribuído para as alterações na sensibilidade à insulina e tolerância à glicose observadas nos animais tratados com dieta HP (Tabela 9 e Figura 8). Em acordo, revisão feita por Armitage (2005) sugere que a supernutrição materna é prejudicial à saúde da prole e pode levar os filhotes a desenvolverem um fenótipo característico da resistência à insulina.

Outro fator que pode interferir na síntese de lipídios a partir de glicose em adipócitos é a quantidade de AG captados pelo tecido adiposo para serem armazenados na forma de TG. Como para esterificação de AG faz-se necessária a disponibilidade de glicerol-3-P e a glicose constitui um dos possíveis precursores para sua síntese, a maior captação de AG poderia resultar na maior incorporação de glicerol-3-P formado a partir de glicose aos lipídios totais que analisamos. Em relação aos efeitos de AGPI sobre a captação de AG pelos adipócitos por meio da LPL, Rustan et al (1993) encontraram uma diminuição do RNAm desta enzima em animais tratados com dieta suplementada com AG ω 3 em tecido adiposo retroperitoneal. Em acordo com a hipótese de que AG ω 3 diminuem a captação de AG a partir da circulação, Oguzhan et al (2006) observaram uma menor captação de [U- 14 C] palmitato por adipócitos de animais submetidos a uma dieta contendo ω 3 e ω 6 em comparação a uma dieta deficiente em AG ω 3 incubados *in vitro*, sendo que o estudo foi realizado no estado alimentado. Em acordo, Haug e Hostamrk (1987) concluíram que a atividade da LPL no tecido adiposo foi diminuída por uma alimentação rica em óleo de peixe (22% em relação ao peso) em comparação a uma dieta rica em gordura de coco (saturada). É importante ressaltar que, como sugerem estes autores, a diminuição na atividade da LPL pode ser uma resposta adaptativa a menor concentração de substrato para essas enzimas, ou seja, uma consequência dos níveis diminuídos de VLDL provenientes do fígado. Carpentier et al (2007) estudaram efeitos de uma dieta contendo AG ω 3 em relação a uma dieta deficiente nestes AG sobre o destino de

lipídios circulantes em animais no estado alimentado e também observaram menor captação de TG e AGL séricos nos primeiros em comparação aos últimos.

Contrariamente aos estudos citados, Kemin QI et al (2008) avaliaram os efeitos de AG ω 3 sobre a síntese hepática e remoção sérica de TG em camundongos. Utilizaram dietas contendo 18% (peso) de óleo de soja, de peixe ou uma mistura de ambos. Observaram maior atividade da LPL (plasmática e pós-heparina) em animais no estado alimentado que receberam por 4 meses dieta contendo óleo de peixe quando comparados a um grupo que recebeu apenas óleo de soja, porém semelhante ao controle (6% soja). Além disso, os animais que receberam apenas óleo de peixe apresentaram menor síntese de apoB e maior clearance de quilomícrons. Em humanos, Park e Harris (2003) também observaram maior atividade da LPL (pré-heparina - analisada no plasma) durante o estado alimentado e clearance de quilomícrons mediante a suplementação de 4g de EPA e DHA em comparação com a suplementação de 4g de óleo de açafrão (rico em ω 6). A medida que aumenta a RI, a LPL tende a tornar-se resistente aos efeitos da insulina sobre sua atividade, o que prejudica a captação de AG e contribui para hipertrigliceridemia e aumentos dos níveis séricos de AGL (Picard et al, 2002). Estes estudos evidenciam que os efeitos de AG ω 3 sobre a captação de AG séricos permanecem pouco compreendidos. Provavelmente contribuíram para os diferentes resultados obtidos nestes estudos, diferenças no estado de resistência à insulina, no tempo de tratamento, na quantidade e tipo de AG ω 3 utilizado, entre outros fatores. Considerando nossos resultados, a menor síntese de lipídios totais a partir de glicose nos animais que receberam óleo de peixe (Figuras 18, 19 e 20) poderia também, em parte, ser resultado de uma menor captação de AG e conseqüente menor formação de TG com glicerol-3-P sintetizado a partir de glicose.

A menor captação de AG poderia contribuir para diminuída síntese total de TG a partir de glicose, enquanto menor lipólise poderia ter o efeito contrário. Existem evidências de que

AG $\omega 3$ inibem a HSL em tecido adiposo retroperitoneal de ratos e assim poderia diminuir a liberação de AGL a partir do tecido adiposo (RACLOT et al, 1997). Ghafoorunissa et al (2005) utilizaram diferentes dietas ricas em sacarose contendo AG $\omega 6$ e $\omega 3$ em diferentes proporções por 12 semanas para verificar se a maior quantidade AG $\omega 3$ é mais efetiva na prevenção de parâmetros relacionados à RI. Animais que receberam uma dieta rica em sacarose com proporção de AG $\omega 6:\omega 3$ de 210:1 apresentaram maior lipólise estimulada por norepinefrina e menor inibição da lipólise pela insulina, além de menor captação de glicose estimulada por insulina. O uso da proporção 10:1 ou 5:1 reverteu parcialmente estas alterações na lipólise e totalmente aquelas no transporte de glicose, revelando indícios de prevenção do aumento da lipólise pelos AG $\omega 3$ mediante uma dieta que tende a aumentá-la.

Estudos com adipócitos isolados evidenciaram menor lipólise basal após tratamento de animais com AG $\omega 3$, porém maior lipólise estimulada por norepinefrina em relação à dieta rica em AG saturados (RUSTAN et al, 1993). Gaiva et al (2001), por sua vez, utilizaram dietas que não induzem RI - ração comercial padrão com a adição de 15% de óleo de soja, de peixe ou ambos na proporção 5:1 (por peso). A intervenção durou 8 semanas e os autores observaram uma menor lipólise tanto basal como estimulada por norepinefrina nos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal em animais alimentados com dieta contendo óleo de peixe. Oguzhan et al (2006) não observaram diferenças na taxa basal de lipólise por adipócitos de animais submetidos a uma dieta rica em AG $\omega 6$ em relação a uma dieta contendo AG $\omega 3$ e $\omega 6$ incubados *in vitro*, no entanto observaram maior liberação de glicerol provocada por teofilina no grupo que recebeu apenas AG $\omega 6$ em comparação ao outro grupo no estado alimentado. Carpentier et al (2007) estudaram efeitos de uma dieta deficiente em AG $\omega 3$ sobre o destino de lipídios circulantes em animais no estado alimentado. Observaram maior lipólise nos animais submetidos à dieta deficiente em AG $\omega 3$ em relação ao grupo

controle (dieta comercial). Portanto, a maior parte dos estudos citados indica uma menor lipólise mediante o uso de dietas contendo AG ω 3 contidos no óleo de peixe.

A partir dos estudos citados acima podemos supor que a menor síntese de TG partindo de glicose em adipócitos retroperitoneais ou epididimais observada em nossos estudos nos animais que receberam óleo de peixe (EPA + DHA) poderia ser resultado de uma maior captação associada a uma maior oxidação de glicose e uma menor lipogênese *de novo* a partir deste substrato. É importante colocar que a hiperinsulinemia observada nos animais que receberam dietas deficientes em AG ω 3 ou com estes AG na forma de apenas de ALN poderia ter contribuído para que estes também tenham apresentado maior captação de glicose pelo tecido adiposo e aumento da captação de AGL (CHAVES et al, 2006), todos estes fatores contribuindo para uma maior síntese de lipídios a partir de glicose no tecido adiposo via aumento da lipogênese *de novo* e síntese de glicerol-3-P neste tecido.

A menor captação de AG em decorrência da menor atividade da LPL e/ou da menor disponibilidade de VLDL observada em animais tratados com AG ω 3, por sua vez, poderia resultar em menor quantidade de substrato para síntese de TG, levando a uma menor formação e incorporação de glicerol-3-P formado a partir de glicose em TG. Além disso, a possível maior síntese de glicerol-3-P via gliceroneogênese e glicerocinase induzidas pelos AG ω 3 também poderiam contribuir tanto para menor lipólise observada nos estudos citados acima, como para menor síntese de glicerol-3-P a partir de glicose. Estes mecanismos contribuiriam para explicar a menor síntese total de lipídios a partir de glicose (Figuras 18, 19 e 20), a menor adiposidade (Tabelas 5, 6 e 7), os menores níveis séricos de AGL e TG (Tabelas 8, 9 e 10) observados mediante o uso de dietas contendo óleo de peixe em nossos resultados (Figura 25). É importante ressaltar que todos os mecanismos citados acima são suposições feitas a partir da literatura que poderiam explicar a menor síntese total de lipídios a partir de glicose que observamos, exceto a questão do possível aumento da gliceroneogênese

e da glicerocinase, que serão discutidos a seguir. Cabe colocar que em todos os passos sugeridos para estes mecanismos de ação dos AG ω 3 no tecido adiposo existem controvérsias. Além disso, os estudos encontrados na literatura diferem no período de intervenção, composição da dieta, modelo animal, entre uma série de outros fatores. Portanto, mais estudos são necessários para elucidar os reais mecanismos que poderiam explicar a menor síntese total de lipídios a partir de glicose que observamos em nossos estudos no tecido adiposo.

Esta é uma hipótese baseada em uma visão simplificada dos efeitos de AGPI sobre o metabolismo lipídico, pois existem ainda muitos outros fatores que também podem interferir na ação de AG ω 3 no metabolismo de TG e AGL. Como exemplo, um aumento da captação de ácidos graxos pelo fígado também poderia contribuir para diminuir os AGL séricos caso não exista de fato menor lipólise mediante a ingestão de AG ω 3, como sugerido por Peyron-Caso et al (2003). Isto não seria condizente com a menor síntese de TG hepática, mas sim com a maior β -oxidação. Além disso, o músculo esquelético poderia captar e oxidar mais AGL. Tsuboyama-Kasaoka et al (1999) observaram um maior consumo de oxigênio e aumento dos RNAm da UCP2 no fígado e da UCP3 no músculo esquelético em animais alimentados com AG ω 3, propondo assim que um aumento da termogênese nestes locais poderia contribuir para a diminuição de AGL e TG séricos.

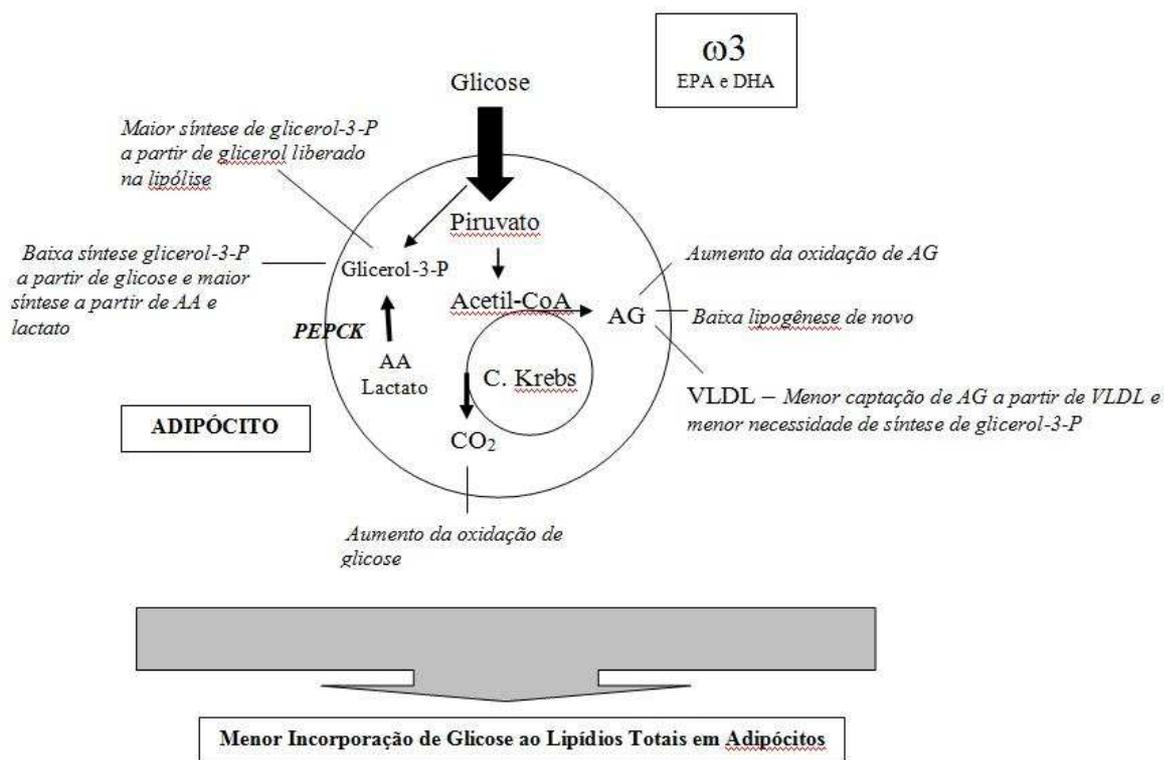


Figura 25. Possíveis explicações para a menor síntese de lipídios a partir de glicose em animais tratados com óleo de peixe. Estes mecanismos baseiam-se em dados deste estudo e dados encontrados na literatura.

Okuno et al (1997), por sua vez, observaram adipócitos com menor volume em animais alimentados com dieta rica em AG ω 3 (12% peso-óleo de peixe) por quatro meses em relação a animais alimentados com óleos ricos em gordura saturada ou mono, que caracteristicamente são mais sensíveis à insulina, fator que poderia contribuir para os efeitos dos AG ω 3 no metabolismo de lipídios. Estes mesmos autores revelaram que os AG ω 3 previnem o crescimento excessivo do tecido adiposo epididimal, ao menos em parte, pela supressão da segunda fase de diferenciação do adipócito, já que estes animais apresentaram menor expressão de genes característicos desta fase (PPAR α , adipina e P2 do adipócito) em relação a animais alimentados com dieta rica em AG saturados.

Há que se considerar ainda que alterações inflamatórias no tecido adiposo também parecem estar envolvidas em complicações da obesidade e da DM2, e estudos evidenciam que AG ω 3 podem prevenir a inflamação do tecido adiposo induzida por uma dieta rica em

gordura saturada em animais diabéticos e obesos (TODORIC et al, 2005), hipótese também suportada pelo estudo de Pérez-Echarri et al (2008). Portanto, estes constituem outros mecanismos por meio dos quais podem ocorrer as alterações observadas no metabolismo dos adipócitos evitadas mediante dietas ricas em AG ω 3, mais especificamente EPA e DHA, já que adipocitocinas inflamatórias, como o TNF- α , também podem interferir na lipólise, além de exercer outros efeitos. Estes AG podem ainda alterar os níveis de leptina e prevenir mudanças na expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos relacionados a esta adipocitoquina induzidos por dieta rica em gordura saturada, como o neuropeptídeo Y, entre outros (WANG et al, 2002). Rossi et al (2005) observaram que os AG ω 3 são capazes de reverter uma diminuição dos níveis de adiponectina induzidos por uma dieta rica em sacarose.

Flachs et al (2005) mostraram um aumento da β -oxidação no tecido adiposo de animais alimentados com óleo de peixe, o que também poderia contribuir para a menor adiposidade nestes animais e a menor síntese de lipídios a partir de glicose, como resultado da diminuição da quantidade de AG como substrato para síntese de TG e menor necessidade de glicerol-3-P. Por outro lado, a diminuição de VLDL isoladamente já poderia contribuir para um menor fornecimento de AG para o tecido adiposo, além de menor liberação de AGL para corrente sangüínea derivados da ação da LPL sobre esta lipoproteína.

Não podemos deixar de considerar ainda que os efeitos benéficos dos AG ω 3 podem ter relação com o impedimento da glicotoxicidade e suas vias prejudiciais. Em acordo, Suresh et al (2003) comprovaram que AG ω 3 podem atenuar o estresse oxidativo observado em animais com diabetes tipo 1 induzida por aloxan e o estresse oxidativo possui estreita relação com os mecanismos da glicotoxicidade. Portanto, o universo de fatores compreendidos pela ação de AGPI realmente é amplo e complexo.

Muitos destes efeitos observados no tecido adiposo também provavelmente são mediados por efeitos dos AGPI sobre a expressão gênica, ou ainda pelos eicosanóides

formados a partir destes AG (MADSEN et al, 2005). Porém, os efeitos dos AGPI sobre a expressão gênica no tecido adiposo são menos compreendidos que seus efeitos no fígado (SESSLER & NTAMBI, 1998).

Diversos estudos mostraram uma diminuição dos AGL séricos com o uso de dietas ricas em ácidos graxos ω 3. Devido à complexa inter-relação metabólica que envolve o metabolismo de AGL, esta questão ainda é muito estudada e permanecem questionamentos sobre como de fato ocorre esta diminuição.

Mais especificamente em relação à lipólise, estudos citados acima indicam que AG ω 3 podem contribuir para sua diminuição, no entanto existem controvérsias. Peyron-Caso et al (2003), por exemplo, não observaram menor lipólise em animais tratados com dieta rica em sacarose contendo 14% de óleo de peixe e sugeriram que estes AG fornecem um maior fluxo de AGL para o fígado. Neste local, estes AG seriam oxidados em maior quantidade e isto explicaria os menores níveis séricos observados mediante a ingestão de AG ω 3.

Com objetivo de avaliar se existe uma maior reesterificação de AG no interior dos adipócitos que interferiria nas taxas de liberação de AGL a partir do tecido adiposo mediante o uso de AG ω 3, avaliamos a síntese de TG a partir de glicerol e a atividade da PEPCK neste tecido. Optamos por um modelo de dieta rica em sacarose para verificar o efeito de AG ω 3 sobre a atividade da PEPCK com base em estudos que mostram que a atividade desta enzima é diminuída pelo elevado teor de CHO na dieta (CHEN et al, 2005; CHAVES et al, 2006). Além disso, dietas ricas em carboidratos simples também aumentam os níveis séricos de AGL (LOMBARDO et al, 2005). Nosso objetivo, portanto, foi observar se nestas condições AG ω 3 interfeririam neste aumento e se isto poderia estar relacionado a maior ou menor reesterificação de AGL liberados pela lipólise no interior dos adipócitos por meio da alteração da atividade da PEPCK, enzima-chave da gliceroneogênese, e da glicerocinase, analisada por meio da síntese de lipídios a partir de glicerol. Considerando que Antras-Ferry (1995) relatou

que ácidos graxos $\omega 6$ e $\omega 3$ aumentam os níveis de RNAm da PEPCK, porém mostrou que os segundos aumentam mais expressivamente sua presença, optamos por uma dieta rica em sacarose deficiente em AG $\omega 3$ e outra contendo ambos $\omega 6$ e $\omega 3$ na proporção 2:1, respectivamente.

No tecido adiposo, a PEPCK-c (fosfoenolpiruvato carboxicinase citosólica) contribui para o fornecimento de glicerol-3-P para síntese de triglicerídeos. Enquanto a insulina inibe a PEPCK no tecido adiposo e no fígado, AGPI induzem o RNAm da PEPCK em adipócitos 3T3, sendo este aumento muito mais expressivo mediante tratamento das células com DHA do que com outros AGPI, conforme estudo de Antras-Ferry et al (1995). Evidências mostram que a indução da PEPCK por ácidos graxos no tecido adiposo não requer síntese protéica ou metabolismo de ácidos graxos a eicosanóides. Esta indução por AGPI é específica do tecido adiposo, mas a mesma resposta não é observada no fígado, onde a PEPCK atua também na gliconeogênese e na cataplerose (BEALE, 2007).

Contrariamente, Raclot et al (1997) observaram menor expressão da PEPCK em dietas com a presença de gordura saturada associada com DHA ou óleo de peixe em relação a um grupo controle (gordura saturada + monoinsaturada).

A glicose geralmente é considerada a principal fonte de carbono para síntese de G-3-P no tecido adiposo branco, especialmente no estado alimentado (CHEN et al, 2005; CHAVES et al, 2006), embora este dado recentemente tenha sido contestado na literatura (NYE et al, 2008). O que é menos compreendido é o papel que a gliceroneogênese exerce na síntese de TG no tecido adiposo sob estados fisiológicos alterados, como mediante uma dieta hiperglicídica com diferentes quantidades de AGPI.

A PEPCK-c é considerada a enzima chave na via da gliceroneogênese nos adipócitos. Esta enzima leva à formação de fosfoenolpiruvato a partir de oxaloacetato, sendo este

originado a partir de piruvato ou de outros substratos, como alanina e lactato, que podem ser convertidos em piruvato.

Em nosso estudo observamos uma menor atividade da PEPCK-c nos animais tratados com uma dieta rica em sacarose em relação ao grupo controle (Figura 22). No entanto, o grupo sac- ω 3 apresentou uma atividade maior em relação ao grupo sac- ω 6. Observamos ainda uma maior síntese de lipídios a partir de glicerol no grupo sac- ω 3 em relação ao grupo sac- ω 6 e neste em relação ao grupo controle (Figura 23).

Acreditamos que a maior atividade da PEPCK-c no grupo sac- ω 3 em relação ao grupo sac- ω 6 pode sugerir um aumento da gliceroneogênese com conseqüente maior reesterificação de AGL no tecido adiposo e sua menor liberação para a circulação, justificando assim, em parte a diferença dos níveis de AGL séricos entre estes dois grupos (Tabela 10). No entanto, ambos grupos tratados com dieta rica em sacarose apresentaram menor atividade desta enzima em relação ao grupo controle.

Na literatura, diferentes resultados têm sido observados em relação ao efeito de uma dieta rica em carboidratos sobre a gliceroneogênese e a atividade da PEPCK-c. Alguns pesquisadores afirmam que esta via pode estar aumentada em períodos de menor disponibilidade de glicose para síntese de glicerol-TG (glicerol-3-P incorporado a TG), como no jejum (HANSON e RESHEF, 2003) ou numa dieta pobre em carboidratos (BOTION et al, 1998). Já utilizando uma dieta de cafeteria onde carboidratos contribuíram para cerca de 65% da ingestão de energia em comparação a uma dieta comercial padrão (controle) na qual em torno de 63% das calorias estão na forma de CHO, foi observada menor gliceroneogênese a partir de piruvato e menor atividade da PEPCK-c nos animais tratados em relação ao controle (CHAVES et al, 2006). Em acordo, Chen et al (2005) observaram *in vivo* uma diminuição significativa da contribuição da gliceroneogênese em relação a outras vias de formação de glicerol-3-P (glicerocinase e glicólise) em diferentes tipos de tecido adiposo (epididimal,

mesentérico, retroperitoneal e inguinal) utilizando uma dieta rica em CHO (70% CHO e 10% LIP) em comparação a uma dieta pobre em CHO (35% CHO e 45% LIP) oferecidas a camundongos durante 75 dias. No tecido adiposo epididimal, particularmente, a contribuição máxima de glicerol-3-P pela gliceroneogênese esteve em $20 \pm 7\%$ com uma dieta rica em CHO e em 50 ± 10 com uma dieta pobre em CHO. Neste estudo não foi verificada a atividade da PEPCK-c.

Contrariamente, em um estudo recente Nye et al (2008) sugerem que a gliceroneogênese, em contraste à glicólise, é quantitativamente a fonte predominante de glicerol-TG no tecido adiposo tanto durante o jejum como durante uma dieta rica em sacarose. Nye et al (2008) não observou diferenças nas taxas de gliceroneogênese no tecido adiposo epididimal e mesentérico em animais submetidos a um jejum de 48 horas em relação ao controle (7 horas de jejum), no entanto observou aumento dessa via com a dieta rica em sacarose, diferentemente do sugerido nos estudos de Chen et al (2005) e Chaves et al (2006). Ainda em resposta à dieta rica em sacarose (tratamento por 5 dias + infusão contínua de glicose por 7 horas anteriores à finalização do experimento), a síntese de TG-glicerol via glicólise também aumentou nestes tecidos em relação ao controle, porém a gliceroneogênese permaneceu quantitativamente maior quando comparada à contribuição da glicose. O fato de a gliceroneogênese estar aumentada em animais que apresentaram também lipogênese *de novo* e deposição de TG aumentadas no tecido adiposo levou os autores a concluir que a gliceroneogênese é a maior fonte de glicerol-TG em lugar da glicose, tanto no jejum como na presença de glicose e lipogênese aumentadas, e que este glicerol-TG aumentado pode ser usado não apenas na reesterificação de AG liberados pela lipólise, mas na esterificação daqueles há pouco sintetizados *de novo* ou captados a partir de lipoproteínas séricas.

É importante ressaltar que estes estudos apresentaram diferentes períodos de duração, o que pode ter contribuído para as diferenças observadas em seus resultados. No entanto, estas

diferenças não podem ser atribuídas à variação da glicemia entre os grupos, pois tanto Nye et al (2008) como Chaves et al (2006) observaram glicemia semelhante entre seus grupos tratado e controle e os primeiros realizaram seus estudos fazendo uso de infusão contínua de glicose, enquanto os últimos utilizaram animais no estado alimentado. Portanto, não existe consenso na literatura a respeito da relação entre as taxas de captação de glicose e a formação de glicose a partir de glicerol-3-P ou a partir da gliceroneogênese.

Nosso estudo não permite afirmar se a gliceroneogênese de fato esteve alterada, mas a maior parte dos estudos desta via no tecido adiposo tem revelado uma maior atividade da PEPCK-c associada a um maior fluxo da via e vice-versa. Chaves et al (2006) e Cadoudal et al (2007) observaram alterações no fluxo da via sob diferentes condições positivamente relacionadas a modificações na atividade e/ou expressão da enzima. Além disso, animais com superexpressão desta enzima no tecido adiposo apresentaram aumento de sua atividade associado a significativo aumento da gliceroneogênese, além de tornarem-se obesos, porém com baixos níveis séricos de AGL e sensibilidade periférica à insulina preservada (FRANCKHAUSER, 2002). Portanto, este estudo também indica que a atividade aumentada da PEPCK no tecido adiposo pode contribuir significativamente para o aumento da gliceroneogênese.

Entretanto, é importante citar que, diferentemente, associado ao período de maior fluxo desta via, a atividade da PEPCK encontrou-se em seus menores níveis no decorrer do estudo de Nye et al (2008), resultado não esperado pelos pesquisadores. Os autores verificaram estes dados em animais submetidos a um período de cinco dias de dieta rica em CHO seguida por 7 horas de infusão contínua de glicose, além de [$^3\text{H}_2$]O para verificação da gliceroneogênese. É importante ressaltar que neste estudo a taxa de gliceroneogênese verificada resulta da análise da incorporação de hidrogênio no glicerol dos TG a partir de [$^3\text{H}_2$]O após 7 horas, enquanto a atividade da PEPCK-c foi analisada apenas ao final deste

período. Os autores sugeriram que o alto fluxo gliceroneogênico associado à baixa atividade da enzima observado em seu estudo indica que esta via pode depender do fornecimento de substrato (tanto piruvato, lactato e/ou alanina como AGL), o que poderia ter alterado a atividade da enzima. Sugeriram também que pode haver um regulador alostérico ainda não identificado que atue no controle da PEPCCK no tecido adiposo. É necessário considerar também que esta enzima pode ter outros papéis ainda não conhecidos no tecido adiposo, além da gliceroneogênese (NYE et al, 2008).

Para verificar se uma dieta rica em sacarose contendo ácidos graxos $\omega 3$ de fato gera alterações na gliceroneogênese diferentes daquelas geradas por uma dieta sem estes ácidos graxos seria necessário verificar a síntese de glicerol-3-P a partir desta via. O aumento da atividade da enzima que encontramos nos animais suplementados com AG $\omega 3$ em relação aos não suplementados nos permite, portanto, sugerir um possível aumento da gliceroneogênese que necessita de estudos mais detalhados para ser ou não confirmado, pois, conforme discutido acima, uma alteração da atividade da enzima não necessariamente reflete alterações do fluxo da via, apesar de ela ser considerada a sua enzima-chave. Além disso, não existe consenso a respeito da diminuição ou aumento da via em resposta a uma dieta rica em CHO (CHEN et al, 2005; CHAVES et al, 2006; NYE et al, 2008).

Embora não possamos afirmar se houve alteração no fluxo da via, observamos menor atividade desta enzima nos animais tratados com dieta rica em sacarose em relação aos animais do grupo controle, e maior atividade no grupo sac- $\omega 3$ em relação ao sac- $\omega 6$, apesar das três dietas comparadas neste nosso estudo possuírem o mesmo teor de CHO (Figura 22). A menor atividade da enzima nos animais tratados com sacarose está de acordo com o observado por Chaves et al (2006). Neste estudo animais foram alimentados com uma dieta de cafeteria ou uma dieta controle (dieta comercial padrão) e ingeriram quantidades semelhantes de CHO (análise a partir do controle de ingestão). Nos primeiros, foi observada menor

gliceroneogênese a partir de piruvato e menor atividade da PEPCK-c em comparação aos últimos. Os autores atribuíram este resultado, em parte, à captação de glicose aumentada na dieta hiperpalatável e, portanto, à sua maior disponibilidade para síntese de glicerol-3-P e conseqüente menor necessidade de obtenção deste substrato para síntese de TG a partir da gliceroneogênese. Concluíram, assim, que a gliceroneogênese pode ser inibida para adequar o suprimento de glicerol-3-P em relação à quantidade deste substrato originado a partir da glicose, via glicólise, conforme a demanda necessária para esterificação, dependendo da captação de AG a partir de lipoproteínas séricas, dos níveis de lipólise intracelulares e da lipogênese *de novo* no interior dos adipócitos. O fluxo da via glicolítica, por sua vez, depende dos níveis de captação de glicose.

Nos estudos de Nye et al (2008) e Chen et al (2006) mencionados acima, não foi verificada a presença ou não de resistência à insulina. Em nosso estudo, supomos que é possível que a alteração da captação de glicose e dos níveis de insulina possam ter contribuído para diminuição da atividade da PEPCK nos grupos tratados com dieta rica em sacarose em relação ao grupo controle, tratado com amido, apesar da mesma concentração de CHO nas três dietas utilizadas.

Uma dieta rica em sacarose, num período anterior ao desenvolvimento de franca DM2, pode aumentar os níveis séricos de insulina (CHAVES et al, 2006, LOMBARDO, 2005), a captação de AG pelo tecido adiposo e a lipogênese *de novo* neste mesmo tecido (CHAVES et al, 2006), todos estes fatores contribuindo para uma maior necessidade de glicerol-3-P para formação de TG. Por outro lado, o aumento da insulina pode inibir a expressão da PEPCK-c. O resultado seria um aumento da síntese de glicerol-3-P via glicólise e uma diminuição via gliceroneogênese. Isto possivelmente explicaria nosso resultado observado no grupo sac- ω 6. Uma hiperinsulinemia pode ter resultado em uma maior captação de glicose (superior ao aumento que os AG ω 3 também podem gerar conforme dados da literatura), uma diminuição

da expressão de PEPCK-c e estimulado a via de lipogênese *de novo*. Isto contribuiria para a menor atividade da PEPCK observada neste grupo, além da maior síntese de lipídios em relação ao grupo sac- ω 3. Além disso, os AG ω 3 podem ter aumentado a expressão da PEPCK conforme sugerido pelo estudo de Antras-Ferry (1995). É importante considerar que podem existir diferenças na gliceroneogênese nos diferentes tecidos adiposos (CHEN et al, 2005) e que nossos resultados referem-se apenas ao tecido adiposo epididimal neste estudo. Além disso, permanece por ser determinado se o gene da PEPCK-c (PCK1) é controlado nos humanos pelos vários fatores que o regulam em ratos, incluindo AMPc, glicocorticóides, insulina, além de ácidos graxos (BEALE, 2007). Portanto, é necessário cautela na extrapolação destes resultados.

O grupo tratado com AG ω 3 apresentou ainda maior síntese de lipídios a partir de glicerol em relação aos demais grupos, e o grupo sac- ω 6 apresentou maior síntese em comparação ao controle (Figura 23). Esta enzima é pouco considerada em relação ao metabolismo dos adipócitos, pois estas células expressam seu gene em quantidade pouco expressiva. A maior parte do glicerol liberado no jejum é captado pelo fígado e convertido em glicose, embora o músculo também possa utilizá-lo para síntese de TG (GUO & JENSEN, 1999). Ao longo dos anos estudos têm revelado presença de atividade da glicerocinase no tecido adiposo (STERN, 1983; REN-JYO HO, 1979), no entanto, segundo Reshef et al (2003), não o suficiente para viabilizar as altas taxas de reesterificação necessárias para síntese de TG quando há menor disponibilidade de glicose, como ocorre no jejum. No entanto, em acordo com nossos resultados, Chaves et al (2006) encontraram maior incorporação de glicerol marcado em TG em animais submetidos a uma dieta de cafeteria, rica em CHO.

Não encontramos estudos que apresentem efeitos dos AG ω 3 sobre a atividade da glicerocinase em adipócitos. No entanto, um estudo recente revelou que tiazolidinedionas

(drogas utilizadas no tratamento da DM) são capazes de induzir um aumento da expressão e atividade desta enzima via PPAR γ (GUAN et al,2002). É possível que AG ω 3 também atuem por meio destes ou outros fatores de transcrição aumentando a expressão da glicerocinase em adipócitos. Contudo, apesar do aumento na atividade desta enzima, foi subseqüentemente comprovado *in vitro* por Todjman et al (2003) que o fluxo pela glicerocinase em adipócitos tratados com rosiglitazona permanece um contribuinte quantitativamente menor para síntese de TG-glicerol em relação a gliceroneogênese, via também induzida por estas drogas (CADOUDAL et al, 2007) e, portanto, para supressão da liberação de AG. Assim, uma extrapolação destes resultados poderia nos levar a conclusões erradas e mais estudos são necessários para avaliar a representatividade do aumento da síntese de lipídios a partir de glicerol, indicativo de maior atividade da glicerocinase, que observamos em nossos estudos.

Em nossos resultados, a maior atividade da PEPCK e da glicerocinase no sac- ω 3 não explicariam a menor adiposidade que observamos em relação ao grupo ω 6, contrariamente, contribuiriam para uma maior adiposidade. Portanto, além da menor síntese total de lipídios a partir de glicose observada no grupo sac- ω 3, acreditamos que o menor fluxo de VLDL proveniente do fígado nos animais tratados com estes AG possui um papel também muito importante neste quadro complexo que envolve os efeitos dos mesmos sobre a adiposidade corporal e os níveis séricos de AGL e TG, ou ainda a maior captação e oxidação de AGL pelo músculo esquelético e a maior β -oxidação de AG no próprio tecido adiposo.

Portanto, a partir de nossos resultados, acreditamos que os AG ω 3, quando suplementados na proporção de AG ω 6: ω 3 2:1, em uma dieta com 13% de lipídios (peso), reduz os efeitos de prejuízo da tolerância à glicose, o aumento das concentrações hepática e sérica de triglicerídeos, dos níveis séricos de AGL e da adiposidade corporal por meio de uma possível menor produção hepática de VLDL, como conseqüência de uma provável menor lipogênese *de novo*, possivelmente associada a uma maior β -oxidação de ácidos graxos, e de

um menor fluxo de AGL provenientes do tecido adiposo, em razão do aumento da reesterificação de AG pelo possível aumento gliceroneogênese (resultante da maior atividade da PEPCK) e da síntese de lipídios a partir de glicerol.

O grupo sac- ω 6 pode ter sintetizado mais TG por possíveis maior fluxo de ácidos graxos para o fígado e menor β -oxidação, também devido provavelmente a uma menor oxidação de AG pelo músculo, assim contribuindo para sua maior produção de VLDL e adiposidade. Supomos que o aumento de AGL poderia ser explicado, ao menos em parte, pela menor gliceroneogênese neste grupo.

Alguns estudos relacionados à expressão gênica indicam que tanto os AG ω 3 como ω 6 podem diminuir a expressão de genes lipogênicos e aumentar a expressão de outros envolvidos da oxidação de AG no fígado, mas que AG ω 6 não diminuam a produção de VLDL (HERTZBERG et al, 1988). Acreditamos que o fato destes AG serem menos eficientes na diminuição do VLDL, na prevenção da resistência à insulina e do acúmulo intra-hepático de lipídios, além do aumento dos níveis séricos de AGL e TG, possa ser resultado, ao menos em parte, de um maior fluxo de AGL para o fígado a partir do tecido adiposo ou resultante da menor oxidação deste substrato por tecidos extra-hepáticos nos animais alimentados com estes ácidos graxos na ausência de AG ω 3.

6. CONCLUSÕES FINAIS

- Ácidos graxos ω 3 previnem, ao menos parcialmente, a diminuição da tolerância à glicose tanto em animais tratados com dietas hiperlipídicas, hiperglicídicas ou hiperpalatável, sendo EPA e DHA mais efetivos em relação ao ALN quando adicionados a uma dieta hiperpalatável.
- Ácidos graxos ω 3 diminuem a concentração hepática de TG, as concentrações séricas de TG e AGL e a adiposidade visceral em animais tratados com dietas hiperlipídicas, hiperglicídicas ou hiperpalatável.
- A atividade da PDH hepática, a oxidação de glicose e a síntese de lipídios a partir deste substrato podem sofrer alterações mediante o uso de dietas contendo AG ω 3, sendo que estes ácidos graxos aumentaram a atividade da PDH quando adicionados ao modelo de dieta hiperlipídica utilizado e diminuíram a síntese hepática de lipídios a partir de glicose quando adicionados a quaisquer das diferentes dietas utilizadas neste estudo, além de normalizar a oxidação de glicose alterada por uma dieta hiperpalatável. Ácidos graxos ω 3 de cadeia muito longa (EPA e DHA) são mais efetivos na diminuição da síntese total de lipídios a partir de glicose no fígado em comparação a ALN quando adicionados a uma dieta hiperpalatável.
- Ácidos graxos ω 3 parecem exercer efeitos sobre o metabolismo hepático de glicogênio, porém nossos estudos não nos permitiram definir com maior clareza se os efeitos observados foram decorrentes da resistência à insulina, dos tipos específicos de AG ω 3 utilizados ou ambos. Mais estudos são necessários para esclarecer tais efeitos.

- Quando acrescentados a uma dieta hiperglicídica, AGPI ω 3 levaram ao aumento da atividade da PEPCCK e da síntese de lipídios a partir de glicerol em tecido adiposo epididimal, o que poderia resultar em uma menor liberação de ácidos graxos pelo tecido adiposo nestes animais. Estes constituem mais alguns dos mecanismos que podem contribuir para o esclarecimento das ações por meio das quais estes ácidos graxos atuam na prevenção da resistência à insulina e da lipotoxicidade em animais. Mais estudos são necessários para esclarecer se a gliceroneogênese de fato encontra-se aumentada mediante o uso destes AG.
- Dietas hiperpalatáveis contendo óleos ricos em ALN, EPA e DHA ou apenas ALN diminuíram a síntese total de lipídios a partir da glicose em relação a um grupo controle em tecido adiposo, porém a dieta contendo EPA e DHA manteve seus níveis maiores em comparação à dieta ALN por meio de mecanismos que precisam ser melhor estudados.
- A síntese total de lipídios a partir de glicose encontrou-se diminuída em adipócitos de animais tratados com dietas hiperlipídicas ou hiperglicídicas contendo EPA e DHA, em tecido adiposo epididimal ou retroperitoneal. Mais estudos são necessários para esclarecer se estes efeitos são resultado de alterações na captação de glicose, síntese de glicerol-3-P a partir deste substrato, lipogênese *de novo* ou oxidação do mesmo, entre outras vias. Além disso, mais estudos são necessários para compreensão da relação deste resultado em relação ao aumento da atividade da PEPCCK e da síntese de lipídios a partir de glicerol observados que sugerem uma maior reesterificação de AG na forma de TG no tecido adiposo de animais tratados com EPA e DHA.

7. PERSPECTIVAS

- Verificar a síntese de lipídios a partir de piruvato [1-C^{14}] para analisar tanto a atividade da PDH como a gliceroneogênese em tecido adiposo de animais submetidos a uma dieta rica em sacarose ou lipídios contendo óleo de peixe ou um óleo rico em AG $\omega 6$ e deficiente em AG $\omega 3$ em comparação a um grupo controle.
- Dosar a liberação basal de ácidos graxos livres para um meio de incubação de tecido adiposo, além da liberação estimulada por norepinefrina ou inibida por insulina, visando analisar a taxa de lipólise no tecido adiposo de animais submetidos à dieta rica em sacarose ou em lipídios contendo óleo de peixe ou um óleo rico em AG $\omega 6$ e deficiente em AG $\omega 3$, em comparação a um grupo controle para verificar a relação entre as taxas de lipólise e gliceroneogênese em animais submetidos a estas dietas.
- Analisar a captação 2-deoxi-D-glicose, a oxidação de glicose [$U\text{-C}^{14}$] e o imunocontéudo da enzima acetil-CoA carboxilase no tecido adiposo de animais submetidos à dieta rica em sacarose ou em lipídios contendo óleo de peixe ou um óleo rico em AG $\omega 6$ e deficiente em AG $\omega 3$, em comparação a um grupo controle para verificar alguns dos possíveis mecanismos que levaram a menor síntese total de lipídios a partir de glicose em nossos resultados.
- Estudar a atividade das enzimas glicogênio sintase e glicogênio fosforilase em animais submetidos a uma dieta hiperpalatável contendo óleos ricos em ALN ou o conjunto de ALN, EPA e DHA.

- Pesquisar a síntese de glicogênio a partir de glicose e glicerol, além da atividade das enzimas glicogênio sintase e glicogênio fosforilase em animais submetidos uma dieta normolipídica e normoglicídica contendo óleos ricos em ALN, AL, EPA + DHA ou gordura saturada, em comparação a um grupo controle com dieta comercial tanto no jejum, como no estado alimentado, para verificar os efeitos de AGPI sobre o metabolismo de glicogênio sob condições normais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELI K.; TAGHIBIGLOU, C.; VAN IDERSTINE, S.; LEWIS, G. Mechanisms of Hepatic Very Low Density Lipoprotein Overproduction in Insulin Resistance. **Journal of Biological Chemistry**, n. 275, v. 12, p. 8416-8425, mar. 2000.

ADIELS M. et al. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, n. 28, p. 1225-1236, jul. 2008.

AISTON, S.; PEAK, M.; AGIUS, L. Impaired glycogen synthesis in hepatocytes from Zucker fatty fa/fa rats: the role of increased phosphorylase activity. **Diabetologia**, n. 43, p. 589-597, 2000.

AKABAS, S. R. et al. Summary of a workshop on n-3 fatty acids: current status of recommendations and future directions. **American journal of clinical nutrition**, n. 83, v. 6, p. 1536-1538, jun. 2006.

AKAGIRI S.; NAITO Y.; ICHIKAWA H.; MIZUSHIMA K.; TAKAGI T.; HANDA O.; KOKURA S.; YOSHIKAWA T. A. Mouse Model of Metabolic Syndrome; Increase in Visceral Adipose Tissue Precedes the Development of Fatty Liver and Insulin Resistance in High-Fat Diet-Fed Male KK/Ta Mice. **Journal of Clinical Biochemistry Nutrition**, n. 42, v. 2, p. 150-157, mar. 2008.

ANTRAS-FERRY, J. et al. Fatty acids and fibrates are potent inducers of transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in adipocytes. **European Journal of Biochemistry**, n. 234, v. 2, p. 390-396, dec. 1995.

ARMITAGE, J.; ARMITAGE; TAYLOR, P.; POSTON, L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. **The Journal of Physiology**, v. 565, n. 1, may. 2005.

ARNER, P. Free fatty acids – do they play a central role in type 2 diabetes? **Diabetes, Obesity & Metabolism**, n. 3, v. 1, p. 11-19, ago. 2001.

BAILLIE, R. A. et al. A coordinate induction of peroxisomal acyl-CoA oxidase and UCP-3 by dietary fish oil: a mechanism for decreased body fat deposition. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, n. 60, v. 5-6, p. 351-356, mai.-jun. 1999.

BAJOTTO G.; MURAKAMI T.; NAGASAKI M.; BOLIN QIN; MATSUO Y.; MAEDA K.; OHASHI M.; OSHIDA Y.; SATO Y.; SHIMOMURA Y. Increased expression of hepatic pyruvate dehydrogenase kinases 2 and 4 in young and middle-aged Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats: induction by elevated levels of free fatty acids. **Metabolism**, v. 3, n. 22, p. 317-323, mar. 2006.

BALLARD, F. J.; HANSON, R. W.; LEVEILLE, G. A. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue. **Journal of Biological Chemistry**, n. 10, v. 242, p. 2746-2750, jun. 1967.

BANTLE J. P. et al. Nutrition recommendations and interventions for diabetes: A position statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, n. 31, p. 61-78, mar. 2008.

BARON, A. D. et al. Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics. **Diabetes**, n. 36, v. 3, p. 274-283, 1987.

BAYS, H.; MANDARINO, L.; DEFRONZO, R. A. Role of the Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, n. 89, v. 2, p. 463-478, fev. 2004.

BEALE, E. G. et al. Disregulated glyceroneogenesis: PCK1 as a candidate diabetes and obesity gene. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, n. 15, v. 3, p. 129-135, abr. 2004.

BEALE, E. G. et al. Glyceroneogenesis comes of age. **Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, n. 16, p. 1695-1696, 2002.

BEALE, E. G. PCK1 and PCK2 as candidate diabetes and obesity genes. **Cell Biochem Biophys**, v. 48, p. 89-95, 2007.

BENATTI, P. et al. Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. **Journal of the American College of Nutrition**, n. 4, v. 23, p. 281-302, 2004.

BENHIZIA, F. et al. Effects of a fish oil-lard diet on rat plasma lipoproteins, liver FAS, and lipolytic enzymes. **AJP - Endocrinology and Metabolism**, n. 267, v. 6, p. 975-982, 1994.

BODEN, G.; SHULMAN, G. I. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta cell dysfunction. **European Journal of Clinical Investigation**, n. 32, v. 3, p 14-23, jun. 2002.

BOTION, L. M. et al. Glucose contribution to in vivo synthesis of glyceride-glycerol and fatty acids in rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. **Metabolism**, v. 47, p. 1217-1221, 1998.

BOUCHÉ, C. et al. The cellular fate of glucose and its relevance in type 2 diabetes. **Endocrine Reviews**, v. 25, p. 807-830, 2004.

BRITO, S. C. Increased glyceroneogenesis in adipose tissue from rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet: role of dietary fatty acids. **Metabolism**, n. 55, v. 1, p. 84-89, jan. 2006.

BRITO, S.C.; FESTUCCIA, W. L.; KAWASHITA, N. H.; MOURA, M. F.; XAVIER, A.R., GARÓFALO, M. A.; KETTELHUT, I. C.; MIGLIORINI, R. H. Increased glyceroneogenesis in adipose tissue from rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet: role of dietary fatty acids. **Metabolism**. v. 55, n. 1, p. 84-89, jan. 2006.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, n. 54, v. 6, p. 1615-1525, jun. 2005.

BULCHANDANI, D. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 17, v. 4, p. 387-393.

BURR, G. O.; BURR, M. M. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. **Journal of Biological Chemistry**, n. 82, p. 345-367, mai. 1929.

CADOUDAL T. et al. Acute and selective regulation of glyceroneogenesis and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in adipose tissue by thiazolidinediones in type 2 diabetes. **Diabetologia**, n. 50, v. 3, p. 666-675, mar. 2007.

CADOUDAL T. et al. Proposed involvement of adipocyte glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase in the metabolic syndrome. **Biochimie**, n. 87, p. 27-32, 2005.

CANCELAS, J. et al. Glucose intolerance associated to insulin resistance and increased insulin secretion in rats depleted in long-chain omega3 fatty acids. **Hormone and Metabolic Research**, n. 39, v. 11, p. 823-825, nov. 2007.

CARPENTIER Y. A.; PELTIER S.; PORTOIS L.; CHARDIGNY J. M.; SKBKDIO J. L.; LEVERVE X.; MALAISSE W. J.; Revue Accelerated clearance of plasma triglycerides and free fatty acids in ω 3-depleted rats. **Hormone and Metabolic Research**, v. 39, n. 4, p. 295-305, 2007.

CHAKRAVARTHY, M. V.; BOOTH, F. W. Eating, exercise, and “thrifty” genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. **Journal of Applied Physiology**, n. 96, p. 3-1/0, 2004.

CHAVES, V. et al. Glyceroneogenesis Is Reduced and Glucose Uptake Is Increased in Adipose Tissue from Cafeteria Diet-Fed Rats Independently of Tissue Sympathetic Innervation. **Journal of Nutrition**, n. 136, p. 2475-2480, out. 2006.

CHEN, J. L. et al. Physiologic and Pharmacologic Factors Influencing Glyceroneogenic Contribution to Triacylglyceride Glycerol Measured by Mass Isotopomer Distribution Analysis. **Journal of Biological Chemistry**, n. 280, v. 27, p. 25396-25402, jul. 2005.

CHERRINGTON, A. D. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. Banting Lecture, **Diabetes**, n. 48, p. 1198-1214, 1999.

CLARKE S. D. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. **British Journal of Nutrition**, n. 83, v. 1, p. 59-66, mar. 2000.

CLARKE, S. D. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. **The Journal of Nutrition**, n. 131, v. 4, p. 1129-1132, abr. 2001.

CLARKE, S. D.; TURINI, M.; JUMP, D. B. Polyunsaturated fatty acids regulate lipogenic and peroxisomal gene expression by independent mechanisms. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, n. 57, p. 65-69, 1997.

COLDITZ, G. A. et al. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. **Annals of Internal Medicine**, n. 122, v. 7, p. 481-486, 1995.

CONSOLI, A. et al. Predominant role of gluconeogenesis in increased hepatic glucose production in NIDDM. **Diabetes**, n. 38, v. 5, p. 550-557, 1989.

COPPACK, S. W. et al. Adipose tissue metabolism in obesity: lipase action in vivo before and after a mixed meal. **Metabolism**, n. 41, p. 264-272, 1992.

CORDAIN, L. et al. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. **American Journal of Clinical Nutrition**, n. 81, p. 341-354, 2005.

CORPOREAU, C., et al. Adipose tissue compensates for defect of phosphatidylinositol 3'-kinase induced in liver and muscle by dietary fish oil in fed rats. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 290, n. 1, p. 78-86, jan. 2006.

D'ALESSANDRO, M. E. et al. Effect of dietary fish oil on insulin sensitivity and metabolic fate of glucose in the skeletal muscle of normal rats. **Annals of Nutrition and Metabolism**, n. 46, p. 114-120, 2002.

DA SILVA L. A.; DE MARCUCCI O. L.; CARMONA A. Adaptive changes in total pyruvate dehydrogenase activity in lipogenic tissues of rats fed high-sucrose or high-fat diets. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 2, p. 407-411, 1992.

DAVISON, M. H. Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. **The American Journal of Cardiology**, n. 21, p. 270-331, ago. 2006.

DEDRONZO, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Medical Clinics of North America**, n. 88, p. 787-835, 2004.

DELARUE, J. D. et al. N-3 long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity? **Reproduction Nutrition Development**, n. 44, v. 3, p. 289-299, mai.-jun. 2004.

DELARUE, J.; LEFOLL, C.; CORPOREAU, C.; LUCAS, D. N-3 long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity? **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 44, n. 3, p. 289-299, mai.-jun. 2004.

DONNELLI, K. L. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of Clinical Investigation**, n. 115, v. 5, p. 1343-1351, mai. 2005.

DUNLOP, D. S.; VAN ELDEN, W.; LAJTHA, A.; RANDALL, R. J. Protein synthesis in incubated slices of brain rat. **Brain**, n. 99, p. 303-318, 1975.

DUPLUS, E. et al. Fatty acid regulation of gene transcription. **Journal of Biological Chemistry**, n. 275, v. 40, p. 30749-30752, out. 2000.

ECONOMIC costs of diabetes in the U.S In 2007. **Diabetes Care**, n. 31, p. 596-615, mar. 2008.

FICKOVÁ M. et al. Dietary fish oil and olive oil improve the liver insulin receptor tyrosine kinase activity in high sucrose fed rats. **Endocrine Regulations**, n. 28, p. 187-197, 1994.

FLACHS, P.; HORAKOVA, O.; BRAUNER, P.; ROSSMEISL, M.; PECINA, P.; FRANSSEN N.; RUZICKOVA, J.; SPONAROVA, J. Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. **Diabetologia**, v. 48, n. 11, p. 2365-2375, nov. 2005.

FOREST, C. et al. Regulation of gene transcription by fatty acids, fibrates and prostaglandins: the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene as a model. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, n. 57, v. 1, p. 47-56, jul. 1997.

FRANCKHAUSER, S. Increased fatty acid re-esterification by PEPCCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. **Diabetes**, n. 51, v. 3, p. 624-630, mar. 2002.

FRAYN, K. N. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. **Diabetologia**, n. 45, p. 1201-1210, 2002.

FRIEDBERG, C. E. et al. Fish oil and glycemic control in diabetes. A meta-analysis. **Diabetes Care**, n. 21, v. 4, p. 494-500, abr. 1998.

GAIVA M. H. G.; COUTO R. C.; OYAMA L. M.; COUTO G. E. C.; SILVEIRA V. L. F.; RIBERIO E. B.; NASCIMENTO C. M. O.; Polyunsaturated fatty acid-rich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 86, n. 3, p. 371-377, 2001.

GAIVA, M.; COUTO, R.; OYAMA M.; COUTO E. C.; SILVEIRA, L. F.; RIBEIRO B.; NASCIMENTO M. O. Diets rich in polyunsaturated fatty acids: Effect on hepatic metabolism in rats. **Nutrition**, v. 19, n. 2, p. 144-149, 2003.

GANG HU et al. Physical activity, body mass index, and risk of type 2 diabetes in patients with normal or impaired glucose regulation. **Archives of Internal Medicine**, n. 164, p. 892-896, 2004.

GANNON, M. C.; NUTTALL, F. Q. Effect of feeding, fasting, and diabetes on liver glycogen synthase activity, protein and mRNA in rats. **Diabetologia**, n. 40, p. 758-763, 1997.

GHAFOORUNISSA, A.; RAJKUMAR, L.; ACHARYA, V. Dietary (n-3) Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids Prevent Sucrose-Induced Insulin Resistance in Rats. **Journal of Nutrition**, v. 135, p. 2634-2638, nov. 2005.

GOLDEN, S. et al. Glycogen Synthesis by hepatocytes from diabetic rats. **Biochemical Journal**, n. 182, p. 727-734, 1979.

GOYENS, P. L. et al. Compartmental modeling to quantify alpha-linolenic acid conversion after longer term intake of multiple tracer boluses. **Journal of Lipid Research**, n. 46, p. 1474-1483, 2005.

GUAN, H. et al. A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. **Nature Medicine**, n. 8, v. 10, p. 1122-1128, out. 2002.

GUILHERME, A. et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, n. 9, v. 5, p. 367-377, mai. 2008.

GUO, Z.; JENSEN, M. D. Blood glycerol is an important precursor for intramuscular triacylglycerol synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, n. 274, v. 34, 23702-23706, ago. 1999.

HANSON, R. W.; RESHEF, L. Glyceroneogenesis Revisited. **Biochimie**, n. 85, v. 12, p. 1199-1205, 2003.

HARRIS, W. S. International recommendations for consumption of long-chain omega-3 fatty acids. **Journal of Cardiovascular Medicine**, n. 8, v.1, p. 50-52, set. 2007.

HARRIS, W. S.; BULCHANDANI, D. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? **Current Opinion in Lipidology**, n. 17, p. 387-393, 2006.

HARTWEG, J.; PERERA, R.; MONTORI, V.; DINNEEN, S.; NEIL, H. A.; FARMER, A. Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) for type 2 diabetes mellitus. **Cochrane Database Syst Review**, jan. 2008.

HAUG, A.; HOSTMARK, A. T. Lipoprotein upases, lipoproteins and tissue lipids in rats fed fish oil or coconut oil. **Journal of Nutrition**, n. 117, p. 1011-1017, 1987.

HERRERA E., AMUSQUIVAR E., LÓPEZ-SOLDADO I., ORTEGA H. Maternal Lipid Metabolism and Placental Lipid Transfer. *Hormone Research*, 65(suppl 3):59–64, 2006.

HERZBERG, G. R.; ROGERSON, M. Hepatic fatty acid synthesis and triglyceride secretion in rats fed fructose-or glucose-based diets containing corn oil, tallow or marine oil. **Journal of Nutrition**, n. 118, v. 9, p. 1061-1067, set. 1988.

HERZBERG, G. R.; ROGERSON, M. The effect of dietary fish oil on muscle and adipose tissue. **Lipids**, n. 24, p. 351-353, 1989.

HIGUCHI, T. et al. Reduction in plasma glucose after lipid changes in mice fed fish oil, docosahexaenoic acid, and eicosapentaenoic acid diets. **Annals of Nutrition and Metabolism**, n. 50, p. 147-154, 2006.

HIGUSHI, T. et al. Levels of plasma insulin, leptin and adiponectin, and activities of key enzymes in carbohydrate metabolism in skeletal muscle and liver in fasted ICR mice fed dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, n. 19, v. 9, p. 577-586, set. 2008.

HOLMAN, R. T. The Slow Discovery of the Importance of $\nu 3$ Essential Fatty Acids in Human Health. **Journal of Nutrition**, n. 128, p. 427–433, 1998.

HONGQIN, W.; STORLIEN, H.; HUANG, X. Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and ARC leptin receptor, NPY, and AgRP mRNA expression. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, n. 282, v. 6, p. 1352-1359, jun. 2002.

IDE, T.; KOBAYASHI, H.; ASHAKUMARY, L.; ROUYER, I. A.; TAKAHASHI, T.; AOYAMA, T.; HASHIMOTO, T.; MIZUGAKI, M. Comparative effects of perilla and fish oils on the activity and gene expression of fatty acid oxidation enzymes in rat liver. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 6, p. 23-35, mai. 2000.

INSTITUTE of Medicine, Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids, National Academies Press, Washington, DC (2002)

JUMP, D. B. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. **Current Opinion in Lipidology**, n. 13, p. 155-164, 2002b.

JUMP, D. B. et al. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **Journal of Nutrition**, n. 135, v. 11, p. 2503-2506, nov. 2005.

JUMP, D. B. et al. Polyunsaturated fatty acids inhibit S14 gene transcription in rat liver and cultured hepatocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 90, p. 8454–8458, 1993.

JUMP, D. B. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **Current Opinion in Lipidology**, n. 19, v. 3, p. 242-247, jun. 2008.

JUMP, D. B. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Journal of Biological Chemistry**, n. 277. v. 11, p. 8755-8758, mar. 2002a.

JUMP, D. B.; CLARKE, S. D. Regulation of gene expression by dietary fat. **Annual Review of Nutrition**, n. 19, p. 63-90, 1999.

JUMP, D. B.; CLARKE, S. D.; LIIMATTA, M. Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. **Journal of Lipid Research**, n. 35, v. 6, p. 1076-1084, jun. 1994.

KAHN, B. B.; FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, n. 15, p. 473-481, ago. 2000.

KASHYAP, S. R.; DEFRONZO, R. A. The insulin resistance syndrome: physiological considerations. **Diabetes and Vascular Disease Research**, n. 4, p. 13-19, 2007.

KRISMAN, C. R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. **Analytical Biochemistry**, v. 4, p. 17-23, 1962.

LAMBERT, M. S. et al. Variations in composition of dietary fats affect hepatic uptake and metabolism of chylomicron remnants. **Biochemical Journal**, n. 310, v. 3, p. 845-852, set. 1995.

LANGIN, D. Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. **Comptes Rendus Biologies**, n. 329, v. 8, p. 598-607, ago. 2006.

LIBAL-WEKSLER, Y. et al. Diet and diabetic state modify glycogen synthase activity and expression in rat hepatocytes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, n. 12, p. 458-464, 2001.

LICHTENSTEIN, A. H. et al. Diet and lifestyle recommendations revision 2006: A scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. **Circulation**, n. 9, v. 10, p. 114-196, 2006.

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

LOMBARDO, Y.; 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. 427-437, 2007.

LOMBARDO, Y.; 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. 427-437, 2007.

LOWRY, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological and Chemistry**, n. 193, p.295-275, 1951.

LUO, J. et al. Dietary (n-3) Polyunsaturated fatty acids improve adipocyte insulin action and glucose metabolism in insulin-resistant rats: relation to membrane fatty acids. **Journal of Nutrition**, n. 126, p. 1951-1958, 1996.

MACHO, L.; FICKOVÁ, M.; SEBÖKOVÁ, E.; MITKOVÁ, A.; KLIMES, I. Effect of dietary fish oil on 2-deoxy-D-3H glucose uptake in isolated adipocytes of rats fed various diets. **The New York Academy of Sciences**. v. 14, p. 237-243, jun. 1993.

MADSEN, L.; PETERSEN, R. K.; KRISTIANSEN, K. Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1740, n. 2, p 266-286, 2005.

MAGNUSSON, I. et al. Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ¹³C nuclear magnetic resonance study. **The Journal of Clinical Investigation**, n. 90, v. 4, p. 1323-1327, out. 1992.

MANCO, M. et al. Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, n. 6, v. 6, p. 402-413, nov. 2004.

MARTINS-SANTO, M.; CHAVES, V.; FRASSON, D.; BOSCHINI, R.; GARÓFALO, M.; KETTELHUT, I.; MIGLIORINI, H. Glyceroneogenesis and the supply of glycerol-3-phosphate for glyceride-glycerol synthesis in liver slices of fasted and diabetic rats. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, p. 1352-1357, ago. 2007.

MASON, T. M. et al. Prolonged elevation of plasma free fatty acids desensitizes the insulin secretory response to glucose in vivo in rats. **Diabetes**, n. 48, v. 3, p. 524-530, mar. 1999.

MCGARRY, J. D. Dysregulation of Fatty Acid Metabolism in the Etiology of Type 2 Diabetes. **Diabetes**, n. 51, p. 7-18, 2002.

MCGARRY, J. D. What if Minkowski had been ageusic? An alternative angle on diabetes. **Science**, n. 258, v. 5083, p. 766-770, 1992.

MITTRA, S. et al. From a glucocentric to a lipocentric approach towards metabolic syndrome. **Drug Discovery Today**, n. 13, v.5-6, p. 211-218, mar. 2008.

MONTORI, V. M. et al. Fish oil supplementation in type 2 diabetes: a quantitative systematic review. **Diabetes Care**, n. 23, v. 9, p. 1407-1415, set. 2000.

NAKAMURA, M. T. et al. Metabolism and functions of highly unsaturated fatty acids: an update. **Lipids**, n. 36, v. 9, p. 961, 964, set. 2001.

NAKAMURA, M. T.; NARA, T. Y. Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta 5, and delta9 desaturases. **Annual Reviews of Nutrition**, n. 24, p. 345-376, 2004.

NESCHEN, S. et al. Contrasting effects of fish oil and safflower oil on hepatic peroxisomal and tissue lipid content. **American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism**, n. 282, p. 395-401, 2002.

NESTEL, P. J. et al. Suppression by diets rich in fish oil of very low density lipoprotein production in man. **The Journal of Clinical Investigation**, n. 74, p. 82-89, 1984.

NYE, C.; HANSON, R.; KALHAN, S. Glyceroneogenesis Is the Dominant Pathway for Triglyceride Glycerol Synthesis in Vivo in the Rat. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 41, p. 27565-27574, out. 2008,

OAKES, N. D. et al. Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. **Diabetes**, n. 46, p. 1768-1774, 1997.

OGUZHAN, B.; SANCHO, V.; ACITORES, A.; et al. Alteration of adipocyte metabolism in omega3 fatty acid-depleted rats. **Hormone and metabolic research**, v. 38, n. 12, p. 789-798, dec. 2006.

OKUNO, M.; KAJIWARA, K.; IMAI, S.; KOBAYASHI, T.; HONMA, N.; MAKI, T.; SURUGA, K.; GODA, T.; TAKASE, S.; MUTO, Y.; MORIWAKI, H. Perilla Oil Prevents the Excessive Growth of Visceral Adipose Tissue in Rats by Down-Regulating Adipocyte Differentiation. **Journal of Nutrition**, v. 127, n. 9, p. 1752-1757, set. 1997.

OLSWANG, Y. et al. A mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-binding site in the gene for the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase reduces adipose tissue size and fat content in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 99, v. 2, p. 625-630, jan. 2002.

PARRISH, C. C.; PATHY, D. A.; ANGEL, A. Dietary fish oils limit adipose tissue hypertrophy in rats. **Metabolism**, n. 39, v. 3, p. 217-219, mar, 1990.

PENNACCHIOTTI, G. L. et al. Major clofibrat effects on liver and plasma lipids are independent of changes in polyunsaturate fatty acid composition induced by dietary fat. **Lipids**, n. 36, v. 2, p. 121-127, fev. 2001.

PÉRREZ-ECHARRI, N.; PÉREZ-MATUTE, P.; MARCOS-GÓMEZ, B. BAENA, M. J.; MARTI, A.; MARTÍNEZ, J. A.; MORENO-ALIAGA, M. J. Differential inflammatory status in rats susceptible or resistant to diet-induced obesity: effects of EPA ethyl ester treatment. **European Journal of Nutrition**, v. 47, n. 7, p. 380-386, out. 2008.

PEYRON-CASO E.; FLUTEAU-NADLER S.; KABIR M.; GUERRE-MILLO M.; QUIGNARD-BOULANGE A.; SLAMA G.; RIZKALLA S. W. Regulation of glucose transport and transporter 4 (GLUT-4) in muscle and adipocytes of sucrose-fed rats: Effects of N-3 poly- and monounsaturated fatty acids. **Hormone and Metabolic Research**, v. 34, n. 7, p. 360-366, 2002.

PEYRON-CASO, E. Dietary Fish Oil Increases Lipid Mobilization but Does Not Decrease Lipid Storage-Related Enzyme Activities in Adipose Tissue of Insulin-Resistant, Sucrose-Fed Rats. **Journal of Nutrition**, v. 33, p. 2239-2243, jul. 2003.

PICARD, F.; BOIVIN, A.; LALONDE, J.; DESHAIES, Y. Resistance of adipose lipoprotein lipase to insulin action in rats fed an obesity-promoting diet. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, v. 282, p. 412-418, out. 2001.

PIGHIN, D., KARABATAS, L.; ROSSI, A.; CHICCHO, A.; BASABE, L.; LOMBARDO, Y. Biochemical and Molecular Actions of Nutrients Fish Oil Affects Pancreatic Fat Storage, Pyruvate Dehydrogenase Complex Activity and Insulin Secretion in Rats Fed a Sucrose-Rich Diet. **Journal of Nutrition**, dec. 2003.

POITOUT, V.; ROBERTSON, R. P. Secondary β -cell failure in type 2 diabetes – A Convergence of Glucotoxicity and Lipotoxicity. **Endocrinology**, n. 143, v. 2, p. 339-342, 2002.

RACLOT et al. Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissues. **Journal of Lipid Research**, n. 38, p. 1963-1972, 1997.

RANDLE, P. J. et al. The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, n. 1, p. 785-789, 1963.

REN-JYE HO. Comparison of adipose glycerol kinase of hyperglycemic obese mice and lean litter-mates. **Molecular and Cellular Biochemistry**, n. 27, v. 2, out. 1979.

REPA, J. J.; MANGELSDORF, D. J. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, n. 16, p. 459-481, 2000.

RESHEF, L. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. **Journal of Biological Chemistry**, n. 278, v. 33, 2003.

REVERS, R. R. et al. Influence of hyperglycemia on insulin's in vivo effects in type II diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, n. 73. 664-672, 1984.

ROBERTSON, R. P. et al. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. **Diabetes**, n. 52, v. 3, p. 581-587, 2003.

ROESLER, W. J.; KHANDELWAL, R. L. Quantitation of glycogen synthase and phosphorylase protein in mouse liver: correlation between enzymatic protein and enzyme activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, n. 244, v. 2, p. 397-407, fev. 1986.

ROSSI, A.; LOMBARDO, Y.; LACORTE, J.; CHICCO, A.; ROUALT, C.; SLAMA, G.; RIZKALLA, W. Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in sucrose-fed, insulin-resistant rats. **American Journal of Physiology**, n. 289, p. 486-494, 2005.

RUSTAN, A. C.; HUSTVEDT, B. E.; DREVON, C. A. Dietary supplementation of very long-chain n-3 fatty acids decreases whole body lipid utilization in the rat. **Journal of Lipid Research**, n. 34, v. 8, p. 1299-1309, ago. 1993.

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

SAMPATH, H.; NTAMBI, J. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. **Annual Review of Nutrition**, n. 25, p. 317-340, 2005.

SASAGAWA, T. et al. The effect of dietary polyunsaturated fatty acid on insulin sensitivity and lipid metabolism in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, n. 64, v. 3, p. 181-187, 2001.

SAVAGE, D. B. et al. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. **Physiological Reviews**, n. 87, p. 507-520, 2007.

SCHIMIDT, E. B. et al. Fish, marine n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary heart disease: a minireview with focus on clinical trial data. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, n. 75, v. 3, p. 191-195, set. 2006.

SCHUMMER, C. M. et al. Dysregulated pyruvate dehydrogenase complex in Zucker diabetic fatty rats. **American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism**, n. 294, p. 88-96, 2008.

SEALLS, W.; GONZALEZ, M.; BROSNAN, J.; BLACK, P.; DIRUSSO, C. Dietary polyunsaturated fatty acids (C18:2 omega6 and C18:3 omega3) do not suppress hepatic lipogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1781, n. 8, p. 406-414, ago. 2008.

SESSLER, A. M.; NTAMBI, J. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. **Journal of Nutrition**, n. 128, p. 923-926, 1998.

SHIMOMURA, I. et al. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. **Molecular Cell**, v. 6, n. 1, p. 77-86, jul. 2000.

SIMOPOULOS, A. Essential fatty acids in health and chronic disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 560-569, 1999.

SOUZA, C. G.; MOREIRA, J. D.; PEREIRA, A. G.; RIEGER, D. D.; SOUZA, D. O., SOUZA, T. M.; PORTELA, L. V.; PERRY, M. L. Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Life Sciences*, v. 81, n. 3, p. 198-203, 2007.

SPRECHER, H. et al. Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. **Journal of Lipid Research**, n. 36, p. 2471-2477, 1995.

STAEHR, P. et al. Effects of free fatty acids per se on glucose production, gluconeogenesis, and glycogenolysis. **Diabetes**, n. 52, p. 260-267, 2003.

STERN, J. S. et al. Glycerol Kinase Activity in Adipose Tissue of Obese Rats and Mice: Effects of Diet Composition. **Journal of Nutrition**, n. 113, p. 714-720, 1983.

STORLIEN, L. H. et al. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipids. **Diabetes**, n. 40, v. 2, p. 280-289, 1991.

STORLIEN, L.; HULBERT, A. J.; ELSE, P. L. Polyunsaturated fatty acids, membrane function and metabolic diseases such as diabetes and obesity. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, p. 559-563, 1998.

STUMVOLL, M.; GOLDSTEIN, B. J.; HAEFTEN, T. W. Pathogenesis of type 2 diabetes. **Endocrine Research**, n. 32, v. 1-2, p. 19-37, 2007.

SURESCH, Y.; DAS, U. N. Effect of omega-3 fatty acids. Long-chain polyunsaturated fatty acids and chemically induced diabetes mellitus. **Nutrition**, v. 19, n. 3, p. 213-228, mar. 2003.

TAKAHASHIA, Y.; TAKASHI, I. Dietary n-3 fatty acids affect mRNA level of brown adipose tissue uncoupling protein 1, and white adipose tissue leptin and glucose transporter 4 in the rat. **British Journal of Nutrition**, v. 84, p. 175-184, 2000.

TEBBEY, P. W. et al. Arachidonic acid downregulates the insulin-dependent glucose transporter (GLUT-4) gene in 3T3-L1 adipocytes by inhibiting transcription and enhancing mRNA turnover. **Journal of Biological Chemistry**, n. 269, p. 639-644, 1994.

TODORIC, J.; LÖFFLER, M.; HUBER, J.; REIMERS, M.; ZEYDA, W.; WALDHÄUSL, W.; STULNIG, M. Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. **Journal Diabetologia**, v. 49, n. 9, set. 2006.

TORDJMAN, J., et al. Regulation of glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase by fatty acids, retinoic acids and thiazolidinediones: potential relevance to type 2 diabetes. **Biochimie**, v. 85, n. 12, p. 1213-1218, dec. 2003.

TSUBOYAMA-KASAOKA, N. et al. Up-Regulation of liver uncoupling protein-2 mRNA by either fish oil feeding or fibrate administration in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 257, v. 3, p. 879-885, abr. 1999.

UNGER, R. Reinventing Type 2 Diabetes. Pathogenesis, Treatment and Prevention. **Journal of the American Medical Association**, n. 299, v. 10, p. 1185-1187, 2008.

VAN AUKEN, M. et al. Improved hepatocytes culture system for studying the regulation of glycogen synthase and the effects of diabetes. **Journal of Physiology**, n. 166, p. 208-216, 1996.

WEICKERT, M. O. PFEIFFER, A. F. H. Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism. **Diabetologia**, n. 49, p. 1732-1741, 2006.

WHO - World Health Organization: regular fish consumption (one to two servings per week; each serving should provide the equivalent of 200 to 500 mg EPA_DHA. **Diet, Nutrition, and the Prevention of Chronic Diseases**, FAO/WHO Technical Report, n 916, 2003.

WIGGINS, D.; GIBBONS, G. F. The lipolysis/esterification cycle of hepatic triacylglycerol. Its role in the secretion of very-low-density lipoprotein and its response to hormones and sulphonylureas. **Biochemical Journal**, v. 284, p. 457-462, jun. 1992.

WITITSUWANNAKUL, D.; KIM, K. H. Mechanism of palmitoyl coenzyme A inhibition of liver glycogen synthase. **Journal of Biological Chemistry**, n. 10, v. 252, p. 7812-7817, nov. 1977.

WONG, S. H. et al. The adaptive effects of dietary fish and safflower oil on lipid and lipoprotein metabolism in perfused rat liver. **Biochim Biophys Acta**, n. 792, v. 2, p. 103-109, fev. 1984.

YOUDIM, K. A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J. A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **International Journal of Developmental Neuroscience**, n. 18, v. 4-5, p. 383-399, jul.-ago. 2000.

ZIMMET, P.; ALBERT, K.; SAHW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, n. 414, p. 782-787, dec. 2001.