UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

NATÁLIA BONISSI GONÇALVES

**EFEITOS DO ÁCIDO ALFA-LINOLÊNICO EM MODELO ANIMAL DE
RESISTÊNCIA INSULÍNICA**

Ribeirão Preto
2014

NATÁLIA BONISSI GONÇALVES

EFEITOS DO ÁCIDO ALFA-LINOLÊNICO EM MODELO ANIMAL DE
RESISTÊNCIA INSULÍNICA

Dissertação de mestrado
apresentada à comissão de Pós-
Graduação do Departamento de
Clínica Médica da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto – USP
para obtenção do título de Mestre
em Clínica Médica. Área de
concentração: Investigação
Biomédica. Orientadora: Prof.^a Dr.^a
Maria Cristina Foss de Freitas.

Ribeirão preto
2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Gonçalves, Natália Bonissi

Efeitos do ácido alfa-linolênico em modelo animal de resistência insulínica. Ribeirão Preto, 2014.

111 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Área de concentração: Investigação Biomédica.

Orientadora: Foss de Freitas, Maria Cristina.

1. ácido alfa-linolênico. 2. obesidade. 3. resistência insulínica. 4. inflamação. 5. estresse do retículo endoplasmático.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Natália Bonissi Gonçalves

Efeitos do ácido alfa-linolênico em modelo animal de resistência insulínica.

Dissertação de mestrado apresentada à comissão de Pós-Graduação do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica.

Área de concentração: Investigação Biomédica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Cristina Foss de Freitas.

Aprovação em: __ / __ / ____

Banca Examinadora:

Prof.^(a) Dr.^(a) _____ Assinatura _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof.^(a) Dr.^(a) _____ Assinatura _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof.^(a) Dr.^(a) _____ Assinatura _____

Instituição _____ Julgamento _____

Dedicatória

Às minhas irmãs, Dri e Clau, e a minha Mãe, que há 20 anos, me presentearam com um brinquedo que trilhou o caminho que seguiria na vida, anos depois.

À Cris, quem teve as primeiras ideias a respeito deste trabalho, e me deu a oportunidade de realizá-lo.

Agradecimentos

Confesso que, há muito tempo, me atormenta o fato de ter que colocar em palavras os agradecimentos àqueles que contribuíram para este trabalho e para minha formação como Mestre. Talvez o que me impossibilite de fazer isto, seja o fato de saber que, se citasse uma pessoa que seja, teria que citar todas as outras, não podendo deixar nenhuma de fora disto e, infelizmente, o medo de esquecer de alguém e o meu orgulho não me deixam citar todas... sendo assim, agradeço do fundo do meu coração, todas as pessoas que estiveram presente, me ajudando, ensinando, compartilhando sabedoria comigo, ou simplesmente me fazendo companhia durante todo o tempo que me dediquei a este trabalho, o qual me orgulha muito. A todas as pessoas especiais que encontrei nesta jornada, o meu muito obrigada.

Abrindo uma exceção, faço uma nota especial a três pessoas que contribuíram diretamente para minha formação como cientista.

Ao meu primeiro mentor, antes companheiro de laboratório, hoje o Dr. Guilherme Vannucchi Portari, quem me guiou nos primeiros passos da vida acadêmica, sempre com paciência e bom humor, despertando meu amor pela pesquisa, e me ensinando seu jeitinho de trabalhar, me ajudando a descobrir o meu caminho na área. A ele o meu muito obrigada por tudo o que me ensinou, todo o companheirismo durante experimentos e todas as contribuições.

Agradeço também ao Professor Dr. Alceu Afonso Jordão Jr, meu orientador de Iniciação Científica. Desde o primeiro ano da graduação, foi quem me deu as primeiras oportunidades na área,

depositando confiança e deixando de ser somente um professor, para me mostrar o era trabalhar com pesquisa científica. Sempre brincalhão e ao mesmo tempo com muita seriedade, me ajudou a dar os primeiros passos à vida acadêmica.

E por fim, obrigada também à minha querida amiga, professora, e Orientadora Dra. Maria Cristina Foss de Freitas. Para esta faltam palavras pra agradecer tudo o que me ensinou. Sem me conhecer, acreditou que eu seria capaz de desenvolver este trabalho, depositando confiança e me passando grandes responsabilidades e oportunidades ao longo dos anos. Com muita paciência, me ajudou no processo de amadurecimento, tanto como pós-graduanda, quanto como pessoa, intercalando momentos de supervisão e participação com momentos de amizade e suporte, me mostrando o caminho para resolver meus problemas acadêmicos e pessoais, com carinho, bom humor e motivação. Realmente fui abençoada por ter uma orientadora a quem posso ter como exemplo, e que posso contar quando precisar.

A todos vocês, o meu profundo e sincero agradecimento.

“Não existe busca de conhecimento que não busque afetar o mundo. A ciência é feita por pessoas com interesses, intenções e ambições;”

(Filipe Grácio)

Resumo/Abstract

RESUMO

Gonçalves, N.B. **Efeitos do ácido alfa-linolênico em modelo animal de resistência insulínica.** 2014. 111f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Diante da ausência de dados prévios, foi pretendido estabelecer uma correlação entre as possíveis modificações metabólicas e moleculares na resistência insulínica e inflamação em modelos animais de obesidade, induzida pela dieta, recebendo a suplementação de ômega 3/ALA. Além disto, pretendeu-se obter dados que permitam uma melhor elucidação dos mecanismos envolvidos na resistência insulínica neste modelo e um possível efeito preventivo da administração de ALA sobre este processo, podendo, desta forma, auxiliar no desenvolvimento de novas terapias. O objetivo do estudo foi demonstrar que a suplementação ALA reduz a resistência à insulina e a inflamação em modelo animal de obesidade. Foram divididos 40 camundongos machos (C57/BL6) em 4 grupos: controle (C), controle + ômega 3/ALA (CW), obesos (O) e obesos + ômega 3/ALA (OW). Por um período de oito semanas, os grupos O e OW receberam uma dieta hiperlipídica com 60% de lipídeos, enquanto o C e CW receberam ração padrão. Depois, os grupos CW e OW receberam suplementação de 10% de ômega 3/ALA liofilizado, extraído de semente de linhaça, diariamente, por mais 8 semanas. Observando os resultados, todos os grupos de animais tiveram o mesmo ganho de peso, assim como consumo alimentar, eficiência energética e eficiência alimentar. O uso do ALA diminuiu o peso da gordura subcutânea no grupo OW comparado ao O e manteve os valores semelhantes entre os outros grupos, no entanto, as comparações do peso do fígado, gordura epididimal, pâncreas e músculo gastrocnêmio, foram semelhantes entre todos os grupos. Observou-se uma diminuição na resistência insulínica nos animais OW comparado ao O pelo teste de IPGTT, sendo a área sob a curva de glicose similar entre C e CW. Além disso, os níveis totais de gordura no fígado foram significativamente menores no CW e OW, em comparação com C e O, estes resultados são reforçados pela análise dos tecidos em avaliação histopatológica. Os níveis séricos de glicemia e insulina, ao final do estudo, mostraram uma redução

importante em OW comparado a CW, porém, não foi observado diferenças entre os animais obesos suplementados ou não com ômega-3/ALA. Entretanto, quanto à avaliação de resistência insulínica pelo cálculo do HOMA IR, este mostrou-se menor comprando-se OW com O. Os níveis séricos de colesterol total e HDL foram maiores no grupo CW comparados ao C, sendo que os níveis de colesterol total foram menores, também, no grupo OW comparados ao O. No entanto, os valores de triglicérides séricos foram semelhantes entre todos os grupos, assim como valores de triglicérides hepáticos. Colesterol total hepático teve um aumento significativo entre OW e O. As dosagens séricas de IL1 β , IL6 e MCP1 mostraram uma redução importante em O comparadas com OW. Já quanto a IL17 e TNF α , ambas foram equivalentes, nas comparações entre diferentes grupos. A avaliação da ativação do estresse do retículo endoplasmático mostrou que a proteína BIP teve um aumento importante tanto na comparação entre C e CW e também entre O e OW. A também chaperona HSP70 mostrou aumento significativo em ambas as comparações entre grupos, tanto em C e CW quanto em O e OW. GRP94 e IRE1 tiveram resultados semelhantes, sem diferenças entre os grupos, assim como a DAPK1. CHOP teve diminuição importante comparando-se C e CW, e O e OW. Em contrapartida, XBP1 teve diminuição importante na comparação entre os grupos C e CW. Por fim, a suplementação de ômega 3/ALA mostrou ser eficaz na prevenção de esteatose hepática, redução de resistência insulínica, diminuição do processo inflamatório, e redução da ativação do estresse do retículo endoplasmático em tecido hepático.

Palavras chave: ácido alfa-linolênico, obesidade, resistência insulínica, inflamação, estresse do retículo endoplasmático.

ABSTRACT

Gonçalves, N.B. **Effects of α -linoleic acid supplementation in insulin resistance animal model.** 2014. 111p. Master Thesis – Ribeirão Preto Medical School, São Paulo University, São Paulo, 2014.

Given the absence of previous data, it is intended to establish a possible correlation between metabolic and molecular changes in insulin resistance and inflammation in animals receiving supplementation of α -linoleic acid (ALA) found in flaxseeds oil. Furthermore, we intend to obtain data for an elucidation of the mechanisms involved in insulin resistance and preventive effect of administration of ALA on this process and may thus aid the development of new therapies. The aim of study was prove the ALA supplementation reduces insulin resistance and inflammation in an obesity animal model. 40 male mice (C57/BL6) were divided into 4 groups: control (C), control + omega 3/ALA (CW), obese (O) + omega 3/ALA and obese (OW). For a period of eight weeks, the groups O and OW received a high-fat diet with 60% fat, while the C and CW received regular chow. Then, the CW and OW groups were supplemented with 10% omega 3/ALA lyophilized, extracted from flaxseed daily, for another 8 weeks. Analyzing the results, all groups of animals had the same weight gain, and food consumption, food efficiency and energetic efficiency. The use of ALA decreased subcutaneous fat weight in group OW compared to O and remained similar values between the other groups, however, comparisons of the size of liver tissue, epididymal fat, pancreas and gastrocnemius muscle were similar among all groups. There was a decrease in insulin resistance in animals OW compared to O by GTT test, with an area under the curve of glucose similar between C and CW. Moreover, the total liver fat levels were significantly lower in CW and OW compared to C and O, these results are reinforced by histopathological tissues analysis. Serum glucose and insulin levels, at the end of the study, showed a significant reduction in OW compared to CW, however, no differences were observed between the obese animals supplemented or not with omega 3/ALA. Meanwhile, about the valuation of insulin resistance calculating by HOMA IR, this was lower in OW compared with O.

Serum total cholesterol and HDL levels were higher in CW compared to the group C, and total cholesterol levels were also lower in the OW group compared to O. However, the serum levels of triglyceride were similar among all groups as well as hepatic triglycerides values. Hepatic total cholesterol increased significantly between OW and O. Serum levels of IL1 β , IL6 and MCP1 showed a significant reduction in O compared to OW. As for IL17 and TNF α were similar for both comparisons between different groups. The evaluation of endoplasmic reticulum stress activation showed the BIP protein had a significant increase in the comparison between CW and C and also between OW and O. The also chaperone HSP70 showed a significant increase in both comparisons between groups, both in C and CW as for O and OW. GRP94 and IRE1 had similar results, with no differences between groups, as well as DAPK1. CHOP had significant decrease comparing CW and C, and O and OW. In contrast, XBP1 had significant reduction in the comparison between groups C and CW. Finally, omega 3/ALA supplementation showed to be effective in preventing hepatic steatose, the reduction of insulin resistance, inflammation decrease, and reduction of activation of endoplasmic reticulum stress in liver tissue.

Key words: alpha-linoleic acid, obesity, insulin resistance, inflammation, endoplasmic reticulum stress.

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Divisão dos grupos de animais e tempos de tratamentos..... **23**
- Figura 2.** Evolução do peso corporal (g) dos camundongos nos diferentes grupos (C, CW, O, OW) representados pela média. Tempo de pesagem 1: início do tratamento. Tempo de pesagem 2: 4 semanas de experimento. Tempo de pesagem 3: 8 semanas de experimento e início da suplementação. Tempo de pesagem 4: 12 semanas de experimento. Tempo de pesagem 5: final do experimento. *teste T Student: $p < 0,05$, comparando pesagem inicial e final. ANOVA: $p = 0,0001$ **37**
- Figura 3.** Consumo alimentar diário (Média +DP), durante o período de estudo dos animais nos grupos C, CW, O e OW..... **37**
- Figura 4.** Ganho de peso corporal total dos grupos C, CW o e OW. ANOVA: $p = 0,39$ **38**
- Figura 5.** Eficiência alimentar representada pela média do [Ganho de peso (g) / consumo alimentar (g)] das dietas controle e hiperlipídica suplementadas ou não com ômega 3/ALA..... **39**
- Figura 6.** Eficiência energética representada pela média [Ganho de peso (g) / consumo energético (Kcal)] das dietas controle e hiperlipídica suplementadas ou não com ômega 3/ALA..... **39**
- Figura 7.** Teste de Tolerância à Glicose Intraperitoneal, mostrando os níveis médios de glicemia sérica nos tempos após a administração de glicose intraperitoneal nos grupos C, CW, O e OW..... **40**
- Figura 8.** Quantificação da Áreas sob a curva de glicose dos diferentes grupos nos tempos obtidos pelo teste de IPGTT. *teste T Student: $p < 0.05$. ANOVA $p = 0,009$... **40**
- Figura 9.** Área sob a curva de glicose do teste de IPGTT. A) Média de glicemia nos diferentes tempos do teste no grupo C. B) Média de glicemia nos diferentes tempos

do teste no grupo CW. C) Média de glicemia nos diferentes tempos do teste no grupo O. D) Média de glicemia nos diferentes tempos do teste no grupo OW..... **41**

Figura 10. Níveis séricos de glicemia, representados pela Média $\pm$ DP, nos grupos C, CW, O e OW, nos tempos 1: início do experimento, tempo 2: início da suplementação de ômega 3 ALA nos grupos CW e OW, e tempo 3: final do experimento. *teste T Student: $p < 0,05$. ANOVA: $p = 0,0008$ **42**

Figura 11. Níveis séricos de Insulina nos grupos C, CW, O e OW. *teste T Student: $p < 0,05$. ANOVA: $p = 0,01$ **42**

Figura 12. Avaliação da resistência insulínica pelo índice HOMA IR calculado pela fórmula $[\text{glicose jejum (mmol/L)} \times \text{insulina jejum (mU/L)}] / 22.5$ em animais dos grupos C, CW, O e OW. *teste T Student: $p = < 0,05$. ANOVA: $p = 0,0007$ **43**

Figura 13. Avaliação da capacidade de secreção de insulina pelo índice HOMA- β , calculado pela fórmula $[20 \times \text{insulina jejum (mU/L)} / \text{glicose jejum (mmol/L)} - 3.5]$ em animais dos grupos C, CW, O e OW. ANOVA: $p = 0,69$ **43**

Figura 14. Peso do fígado no momento do sacrifício dos grupos C, CW, o e OW, corrigidos para peso corporal total dos camundongos. ANOVA: $p = 0,23$ **44**

Figura 15. Peso do pâncreas no momento do sacrifício dos grupos C, CW, o e OW, corrigidos pra peso corporal total dos camundongos. *teste T Student: $p < 0,05$. ANOVA: $p = 0,005$ **45**

Figura 16. Peso da gordura subcutânea no momento do sacrifício dos grupos C, CW, o e OW, corrigidos pra peso corporal total dos camundongos. *teste T Student: $p < 0,05$. ANOVA: $p = 0,03$ **45**

Figura 17. Peso da gordura epididimal no momento do sacrifício dos grupos C, CW, o e OW, corrigidos pra peso corporal total dos camundongos. *teste T Student: $p < 0,05$. ANOVA: $p = 0,87$ **46**

Figura 18. Peso do músculo gastrocnêmio no momento do sacrifício dos grupos C, CW, O e OW, corrigidos pra peso corporal total dos camundongos. ANOVA: p=0,76.....	46
Figura 19. Gordura hepática total (μ g/g Tecido) em animais dos grupos C, CW, O e OW. *teste T Student: p<0,05. ANOVA: p<0,0001.....	47
Figura 20. Imagens da lâminas histopatológicas dos grupos C, CW, O e OW. Aproximação de 100x.....	48
Figura 21. Quantificação de Triglicérides Hepático (μ g/g Tecido) em animais dos grupos C, CW, O e OW. ANOVA: p=0,43.....	49
Figura 22. Quantificação de Colesterol Total Hepático (μ g/g Tecido) em animais dos grupos C, CW, O e OW. *teste T Student: p<0,05. ANOVA: p=0,17.....	49
Figura 23. Quantificação de Triglicerídeos Sérico (μ g/g Tecido) em animais dos grupos C, CW, O e OW. ANOVA: p=0,16.....	50
Figura 24. Quantificação de Colesterol Total Sérico (μ g/g Tecido) em animais dos grupos C, CW, O e OW. *teste T Student: p<0,05. ANOVA: p<0,0001.....	50
Figura 25. Quantificação de HDL sérico (μ g/g Tecido) em animais dos grupos C, CW, O e OW. *teste T Student: p<0,05. ANOVA: p=0,02.....	51
Figura 26. Níveis séricos de IL1 β em pg/ml. *teste T Student: p<0,05. ANOVA: p=0,23.....	51
Figura 27. Níveis séricos de IL6 em pg/ml. *teste T Student: p<0,05. ANOVA: p=0,03.....	52
Figura 28. Níveis séricos de MCP1 em pg/ml. *teste T Student: p<0,05. ANOVA: p=0,01.....	52

Figura 29. Níveis séricos de IL17 em pg/ml. ANOVA: $p=0,33$ **53**

Figura 30. Níveis séricos de TNF α em pg/ml. ANOVA: $p=0,27$ **53**

Figura 31. Resultados de imunoblotting de diferentes proteínas avaliadas em tecido hepático de animais controle (C) e obesos (O) não suplementados e animais suplementados 10%/dia de ômega 3/ALA (CW e OW). A proteína GAPDH foi utilizada para controle e normalização dos resultados..... **54**

Figura 32. Avaliação das proteínas envolvidas na ativação do Estresse do Retículo Endoplasmático em animais dos grupos C e CW, e O e OW. A) Representa a quantificação relativa da proteína BIP, comparando-se C e CW. B) Representa a quantificação relativa da proteína BIP, comparando-se O e OW. C) Representa a quantificação relativa da proteína HSP70, comparando-se C e CW. D) Representa a quantificação relativa da proteína HSP70, comparando-se O e OW. E) Representa a quantificação relativa da proteína GRP94, comparando-se C e CW. F) Representa a quantificação relativa da proteína GRP94, comparando-se O e OW. G) Representa a quantificação relativa da proteína IRE1, comparando-se C e CW. H) Representa a quantificação relativa da proteína IRE1, comparando-se O e OW. I) Representa a quantificação relativa da proteína CHOP, comparando-se C e CW. J) Representa a quantificação relativa da proteína CHOP, comparando-se O e OW. L) Representa a quantificação relativa da proteína XBP1, comparando-se C e CW. M) Representa a quantificação relativa da proteína XBP1, comparando-se O e OW. N) Representa a quantificação relativa da proteína DAPK1, comparando-se C e CW. O) Representa a quantificação relativa da proteína DAPK1, comparando-se O e OW. *teste T: $p<0,05$.
..... **55**

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição Nutricional das dietas Padrão e Manipulada Hiperlipídica (peso/100g)	24
Tabela 2. Distribuição dos Macronutrientes e Densidade Energética das dietas Padrão e Manipulada Hiperlipídica	25
Tabela 3. Dados metabólicos e inflamatórios em média $\pm$ DP, nos grupos C, CW, O e OW.....	57
Tabela 4. Valores de peso corporal e glicemia sérica em média $\pm$ DP, inicial e final, nos grupos C, CW, O e OW.....	57

Sumário

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Sumário

INTRODUÇÃO	1
JUSTIFICATIVA.....	15
HIPÓTESE	17
OBJETIVOS	19
MATERIAL E MÉTODOS	21
RESULTADOS.....	35
DISCUSSÃO	58
CONCLUSÃO	73
Anexo	75
Referências Bibliográficas	77

Introdução

INTRODUÇÃO

A prevalência da obesidade e do sobrepeso têm crescido mundialmente neste início de século, e gerado preocupação por parte de todos. A Organização Mundial de Saúde, OMS, considera a obesidade um dos dez principais problemas de saúde pública do mundo, classificando-a como epidemia.

Em 2008, 1.5 bilhão de pessoas no mundo sofriam de sobrepeso e, aproximadamente, 2.8 milhões morrem a cada ano como resultado dessa epidemia. A projeção para 2015 é de 700 milhões de obesos (WANG; BEYDOUN, 2007).

É uma doença crônica e multifatorial (BUCHWALD et al., 2004). Ocorre assim que a reserva natural de gordura aumenta, até o ponto em que passa a estar associada a certos problemas de saúde e o seu comprometimento, e/ou ao aumento da taxa de mortalidade. Além de fatores nutricionais, atuam na origem e também na manutenção da obesidade os fatores genéticos, metabólicos, psicossociais, culturais e muitos outros (CARVALHO; CUPPARI, 2005).

Operacionalmente, a obesidade é diagnosticada pelo parâmetro estipulado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1997) — o Body Mass Index (BMI), ou Índice de Massa Corporal (IMC), obtido através do cálculo da relação entre peso corpóreo (kg) e estatura (m)² dos indivíduos. Através deste parâmetro são considerados obesos os indivíduos cujo IMC encontra-se num valor superior ou igual a 30 kg/m², e com sobrepeso os acima de 25 kg/m². Além do excesso de gordura corpórea, deve-se considerar ainda sua distribuição regional, uma vez que o excesso de gordura localizada na região abdominal é um fator de risco maior de morbidade que o excesso de gordura corpórea em si (CARVALHO; CUPPARI, 2005).

O Brasil vem passando por uma “transição nutricional”, na qual ocorre a redução dos índices de desnutrição e aumento na prevalência de obesidade, de tal forma que atualmente a obesidade é o maior problema alimentar da população brasileira (MONTEIRO et al., 1995). É assim na realidade mundial também. Enquanto pessoas sofrem por falta de alimentação, carecendo da disponibilidade de macro e micronutrientes, outras são vítimas do oposto e submetem-se a repetidas dietas desgastantes e caras, na tentativa de solucionar os estragos estéticos e

fisiológicos causados pela superalimentação e a obesidade (CARVALHO; CUPPARI, 2005).

De acordo com a última Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) divulgada em 2013, realizada pelo IBGE em parceria com o Ministério da Saúde, o peso dos brasileiros vem aumentando nos últimos anos. Este excesso de peso e obesidade são encontrados com grande frequência, a partir de 5 anos de idade, em todos os grupos de renda e em todas as regiões brasileiras. Já entre os adolescentes chega a atingir 21,5%, e entre os adultos o excesso de peso, atingiu mais da metade dos homens e das mulheres.

Mundialmente, o crescimento da obesidade tem sido observado em diferentes países desenvolvidos e em países em desenvolvimento. Segundo estatísticas americanas, a obesidade atinge 33,8% da população adulta, sendo que 68% tem excesso de peso ou são obesos. Estima-se que até o ano de 2015, 75% da população dos EUA terá um aumento de peso corporal e 48% serão obesos (WANG; BEYDOUN, 2007).

De acordo com a Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO), os custos da obesidade e suas consequências negativas para a saúde foram estimados entre 0,7% e 7,0% dos gastos nacionais com saúde em todo o mundo.

Existem inúmeros métodos de tratamento para o excesso de peso. A mudança do estilo de vida envolve dietas, sendo aquela com restrição calórica a mais consagrada, e exercícios físicos, tanto aeróbicos como de resistência.

O rápido crescimento da prevalência da obesidade, e a falha dos tratamentos dietéticos e/ou farmacológicos, especialmente a longo prazo, em obesos grau III ($IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$), têm levado a uma crescente demanda para a cirurgia bariátrica. De 1990 a 2003 o número de procedimentos nos EUA cresceu de 16.000 para mais de 100.000 por ano (STEINBROOK, 2004). A cirurgia bariátrica é considerada atualmente como a ferramenta mais eficaz no tratamento e controle da obesidade grau III (KUSHNER, 2000; MAGGARD et al., 2005).

Associada a obesidade existe um conjunto de fatores de risco aos quais juntos recebem o nome de Síndrome Metabólica (SM). A predisposição genética (BOUCHARD, 1995), a alimentação inadequada (LIESE et al., 1998) e a inatividade física (LAKKA et al., 2003) estão entre os principais fatores que contribuem para o

surgimento da síndrome metabólica, cuja prevenção primária é um desafio mundial contemporâneo, com importante repercussão para a saúde pública.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, os fatores de risco mais importantes para a morbimortalidade relacionada às doenças crônicas não-transmissíveis (DNCT) são: hipertensão arterial sistêmica, hipercolesterolemia, ingestão insuficiente de frutas, hortaliças e leguminosas, sobrepeso ou obesidade, inatividade física e tabagismo (GUILBERT, 2003). Cinco destes fatores de risco estão relacionadas à alimentação e à atividade física e três deles têm grande impacto no aparecimento da síndrome metabólica.

A adoção precoce de mudanças de estilos de vida, por toda a população, relacionados com a manutenção da saúde, como dieta adequada e prática regular de atividade física, preferencialmente desde a infância, é componente básico da prevenção da síndrome metabólica.

De forma abrangente, esta síndrome metabólica é conhecida por resistência insulínica, intolerância a glicose, hiperinsulinemia, aumento de lipoproteína de muito baixa densidade, diminuição de lipoproteína de alta densidade e hipertensão arterial, e desempenha importante papel na gênese da doença cardiovascular em indivíduos obesos (CARVALHO; CUPPARI, 2005). Outros distúrbios associados a SM incluem a síndrome dos ovários micropolicísticos (SOMP), esteato-hepatite não alcoólica (NASH) e síndrome da apnéia obstrutiva do sono (SAOS) (REAVEN et al., 1976).

O aspecto comum é a resistência à insulina e provavelmente todas as outras alterações são secundárias. Resistência insulínica também é a principal alteração patogênica do diabetes mellitus tipo 2.

O diabetes mellitus é uma síndrome clínica crônica, resultante de uma deficiência insulínica (defeito de secreção e/ou ação da insulina no organismo), que determina um conjunto de anormalidades metabólicas, envolvendo metabolismo de glicose, lipídios, proteínas, água, eletrólitos e outros. É uma doença multifatorial com fatores de risco sociais, comportamentais e ambientais que atuam junto a uma forte herança poligênica.

Fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis como diabetes, doenças cardiovasculares e hipertensão arterial estão ligados diretamente a obesidade, porém, além dessas complicações, estudos recentes mostram que a associação entre densidade mineral óssea (DMO) e massa gorda podem mediar fatores hormonais secretados por adipócitos incluindo leptina, que estimula a

formação óssea, e adiponectina. Há também mediadores imunológicos como fator de necrose tumoral – TNF α , e interleucina – IL18, que são aumentados na obesidade e que podem influenciar o metabolismo ósseo (PEREIRA et al., 2007).

Outros componentes observados na SM incluem a inflamação sistêmica, um estado protrombótico e estresse oxidativo elevado (KEREIAKES; WILLERSON, 2003). Os níveis séricos elevados de citocinas, como também o TNF α , IL6 (interleucina-6) e MCP1 (proteína quimiotática de monócitos) parecem estar envolvidos nos mecanismos da SM, enquanto que níveis elevados de PAI-1 (Ativador do Inibidor do Plasminogênio) aparentemente elevam o risco de aterotrombose (SAKKINEN et al., 2000).

No fígado, há controvérsias se a produção de glicose é controlada diretamente pela insulina ou se é controlada através de efeitos metabólicos extra-hepáticos. Foi levantada a hipótese de que a insulina poderia suprimir a produção de glicose hepática através da redução do fluxo de aminoácidos e ácidos graxos livres (AGLs) do músculo e tecido adiposo para o fígado, reduzindo a gliconeogênese (CHERRINGTON, 1999; ADER; BERGMAN, 1990; GIACCA et al., 1992; MITTELMAN et al., 1997; SIDELAR et al., 1996). No entanto também foi comprovada a influência direta da insulina no fígado através de modelos animais com ablação do receptor de insulina nos tecidos adiposo e muscular que não evoluíram para DM, apesar do comprometimento na tolerância à glicose (LAURO et al., 1998). E em camundongos com ablação do receptor hepático foi observada uma resistência acentuada à insulina (MICHAEL et al., 2000; FISHER et al., 2003).

O fígado é considerado o órgão central do metabolismo. Nele ocorre o metabolismo dos lipídios, provenientes tanto da alimentação, quanto da reserva orgânica (CARVALHO; CUPPARI, 2005).

No tecido adiposo, a resistência à insulina é caracterizada pela incapacidade deste hormônio suprimir a lipólise, resultando em níveis elevados de circulação de AGLs, como pode ser observado em indivíduos obesos resistentes à insulina e nos pacientes com DM2 (CAMPBELL et al., 1994).

Nos últimos anos, o conhecimento do complexo processo envolvido na fisiopatologia da resistência insulínica induzida pelo ganho de peso ou obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e síndrome metabólica evoluiu rapidamente. Essas doenças, cujas prevalências continuam aumentando apesar de já terem atingido proporções epidêmicas, parecem estar ligadas a um processo inflamatório crônico

(HOTAMISLIGIL et al., 1993). O tecido adiposo é o sítio primário dessa inflamação. Alterações na gordura visceral tem maior associação com resistência insulínica do que as alterações da gordura subcutânea (SHOELSON et al., 2006). Vias inflamatórias, como c-jun N-terminal kinase (JNK) e fator nuclear κ B (NF κ B) estão estimuladas no tecido adiposo obeso aumentando a concentração de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6 e monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (SHOELSON et al., 2006).

Alguns estudos apontam uma relação entre obesidade e um significativo prejuízo na resposta imune. O impacto da adiposidade e função imune foi avaliado por Lamas e colaboradores (LAMAS et al., 2002; LAMAS et al., 2004) em modelos animais. Nestes estudos, observou-se que em ratos obesos (que ganharam peso por meio de dieta hipercalórica) ocorreu declínio nas respostas mitogênicas esplênicas e tendência a uma redução na atividade citotóxica das células Natural Killer (NK).

Outro estudo, realizado por Smith e colaboradores (SMITH et al., 2007), indicou uma mortalidade aumentada em ratos obesos infectados pelo vírus Influenza. Este declínio está relacionado a uma substancial diminuição na atividade citotóxica das células NK e à baixa expressão de citocinas antivirais, especialmente interferon I. Graças a estes resultados, os autores concluíram que a obesidade inibe a habilidade do sistema imune em responder apropriadamente à infecção pelo vírus influenza e criaram a hipótese de que a obesidade poderia levar a um aumento da morbidade e mortalidade devido a infecções virais.

Alguns autores também reportaram alterações nas respostas imunes de humanos obesos. Estudos indicam que a incidência e severidade de certas infecções virais são maiores em obesos do que em indivíduos de peso normal (MOULIN et al., 2009). Weber e col. (WEBER et al., 1985) demonstraram que indivíduos obesos apresentavam uma menor resposta imunitária a vacina contra hepatite B. Previamente havia sido demonstrado que crianças e adolescentes obesos apresentavam diminuição da resposta linfo-proliferativa a mitógenos, enfraquecimento da hipersensibilidade cutânea tardia e diminuição na capacidade bactericida de neutrófilos (CHANDRA, 1980).

Poucos estudos referem-se à análise de alterações imunes especificamente em obesos grau III. Destes, destacam-se alguns estudos realizados na década de 80, cujos resultados demonstraram uma menor maturação de monócitos em

macrófagos (KRISHNAN et al., 1982) e uma diminuição da capacidade bactericida dos leucócitos polimorfo nucleares (PALMBLAD et al., 1980) em pacientes obesos quando comparados à pacientes saudáveis de mesma idade.

Dadas às evidências de que altos níveis de moléculas inflamatórias associadas à obesidade podem ser a causa do desenvolvimento das comorbidades associadas e a alterações das funções imunes, muitos pesquisadores acreditam na hipótese de que com a melhora no perfil inflamatório, ou seja, com a diminuição nos níveis dos marcadores inflamatórios graças à perda de peso, haveria uma consequente redução no risco de desenvolvimento de doenças e melhora nos parâmetros imunológicos. Por isso, vários estudos empenharam-se em analisar alguns marcadores inflamatórios associados à obesidade.

A inflamação do tecido adiposo pode ser um sítio de importantes moléculas e células regulatórias normalmente responsáveis pela proteção contra uma resposta inflamatória transitória (SARTIPY, 2003; WEISBERG, 2003). Pesquisas recentes mostram que os níveis plasmáticos de IL6, TNF α e IL18 e outros marcadores inflamatórios tornam-se aumentados em indivíduos obesos (ESPOSITO et al., 2002). Estes níveis sofrem alterações após perda de peso induzida por dieta e/ou exercícios físicos regulares (BORGES et al., 2007) e intervenções cirúrgicas (ESPOSITO et al., 2002; VILARRASA et al., 2007), fato que sugere que a perda de peso pode ter importante papel na melhora do quadro inflamatório relacionado à obesidade.

Estudos recentes têm mostrado que a obesidade resulta em um estado de inflamação crônica oligo ou assintomática, caracterizada por inflamação do tecido adiposo com grande infiltração de macrófagos produtores de citocinas pro-inflamatórias (WEISBERG et al., 2003, XU et al., 2003). Estas citocinas, como TNF α , reduzem diretamente a sensibilidade à insulina por interferência na via de sinalização de insulina (PERALDI et al., 1996). Os fatores secretados por macrófagos inibem a ação da insulina através da regulação negativa dos GLUT-4 e IRS-1 (LUMENG et al., 2007). Desta maneira, é proposto que macrófagos do tecido adiposo contribuem diretamente com a resistência insulínica observada na obesidade.

Além dos efeitos negativos nos processos de sinalização insulínica, a obesidade leva ao estresse de várias organelas vitais (GREGOR et al., 2007). O retículo endoplasmático (RE) é uma destas organelas vitais que mostra disfunções

significativas na obesidade e resistência insulínica. O RE participa da síntese biológica de proteínas e lipídios, assim como do armazenamento e secreção de Ca^{2+} , fazendo do RE importante na organogênese, atividade transcricional, resposta ao estresse e apoptose (BERRIDGE et al., 2002). Porém sua principal função é o processamento de proteínas, uma vez que as proteínas recém formadas são transportadas ao RE pelo complexo Sec61 (PILON et al., 1998), onde sofrerão o processo do enovelamento para adquirir a configuração tri-dimensional necessária para exercer sua função biológica (EIZIRIK et al., 2008). Em situações fisiológicas a proteína chaperona (auxiliar/acompanhante) Bip encontra-se, além de em abundância no interior do RE, ligada a três proteínas transmembrana: inositol requiring ER-to-nucleus signal kinase (IRE1), activating transcription factor (ATF) 6 e double-strained RNA-activated kinase (JUUL et al., 2006; ZHANG et al., 2006). Quando ocorre um acúmulo de proteínas não processadas no interior do RE, a chaperona Bip é deslocada para o lumen da organela e estas proteínas IRE1, ATF e PERK, então desbloqueadas, se auto-fosforilam desencadeando o processo de estresse do retículo endoplasmático que faz parte, do processo de resposta a proteínas não processadas (Unfolded protein response - UPR). O processo de UPR inicia uma série de mecanismos de adaptação, visando à proteção da homeostase celular, que inclui a diminuição na transferência de proteínas para o interior do RE; aumento na quantidade de proteínas chaperonas que irão neutralizar as proteínas não enoveladas até seu processamento; aumento no retorno das proteínas não enoveladas para o citoplasma onde serão degradadas em proteossomas; e em situações em que todos os mecanismos de adaptação acima são insuficientes, ativa-se os mecanismos de apoptose celular (ZHANG, 2008; HOSOI, 2010).

A proteína PERK (*protein kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase*) é ativada após a dissociação da chaperona BIP, sofrendo dimerização e auto-fosforilação e age inibindo a síntese proteica global através da fosforilação do eIF2 α (eukariotic translation initiation factor-2 α subunit) além de aumentar a tradução do RNAm do ATF4, que estimulam a produção de chaperona e ERAD (ER associated degradation – maquinaria que degrada proteínas mal-formadas) e enzimas que reduzem o estresse oxidativo. Alternativamente, se o ERE (estresse do retículo endoplasmático) é cronicamente ativado, o ATF4 estimula o aumento na concentração de CHOP (C/EBP homologous protein), podendo levar a apoptose

celular. A via da PERK é a primeira via estimulada na UPR (SCHRÖDER et al., 2005).

A IRE1 (uma endoribonuclease – RNase) também sofre dimerização e autofosforilação após a dissociação da BIP e age no RNA mensageiro do XBP1 (X-box binding protein 1) provocando splicing alternativo e traduzindo a proteína XBP1, que, por sua vez, ativa genes-alvo da UPR, aumentando a produção das chaperonas e EDEM (proteína transmembrana do RE que degrada as proteínas mal-formadas). Se o ERE (estresse do retículo endoplasmático) é cronicamente ativado, o IRE ativa vias inflamatórias do JNK (c-jun N-terminal kinase) e IKK (SCHRÖDER et al., 2005).

O ATF6, após dissociação do BIP, sofre redução e é translocada para o complexo de Golgi e, após reação com proteases, resulta em um fator transcricional ativo (p50 ATF6), agindo no núcleo de maneira análoga ao ATF4 e XBP1 (SCHRÖDER et al., 2005).

Estudos com modelos animais de camundongos submetidos cronicamente à dieta hiperlipídica, têm mostrado que os níveis de PERK e IRE1 fosforilados, além da atividade de JNK estão significativamente aumentados no tecido hepático e adiposo quando comparados ao animal magro. De forma semelhante, isso também foi observado com o modelo ob/ob (TSUTSUMI et al., 2011). Por outro lado, foi demonstrada uma redução do ERE quando camundongos obesos (geneticamente ou induzidos por dieta hipercalórica) são submetidos à dieta de restrição calórica (TSUTSUMI et al., 2011).

Em cultura de células, a expressão do XBP1 parece proteger as células do ERE e da resistência insulínica, associado à resolução da UPR, enquanto que células deficientes do XBP1 apresentaram altos níveis de resistência insulínica e ERE (PARK, 2010).

Em condições normais, o RE nos adipócitos se adapta ao aumento nas demandas de síntese e secreção de proteínas, armazenamento de energia na forma de triglicérides, entre outras funções próprias desta célula especializada. Quando a quantidade de nutrientes é patologicamente excessiva e, portanto, ocorre acúmulo de proteínas não processadas no RE com a ativação da resposta a proteínas não processadas. A ativação deste processo está relacionado ao desenvolvimento de resistência insulínica (OZCAN, 2006; GREGOR et al., 2007; OZCAN, 2004).

Alguns estudos mostram a resposta do RE em doenças hepáticas e seus mecanismos. Hepatócitos, assim como outras células secretoras, são ricas em ER.

Por causa da sua grande capacidade de síntese proteica, é fácil falar que a UPR/resposta do estresse ER tem importante papel em prevenir e mediar várias doenças hepáticas (DARA et al., 2011).

O estresse do ER induz TRB3 via ATF4 e CHOP. TRB3 inibe a atividade da Akt, uma quinase sensibilizadora de insulina que medeia a sinalização de insulina em hepatócitos. Estudos recentes mostram que a expressão do TRB3 está aumentada no fígado de ratos diabéticos, mostrando que a diminuição da expressão hepática de TRB3 leva a melhor tolerância à glicose (DU et al., 2003; KOO et al., 2004).

Nas hepatites, a replicação do vírus tipo C envolve muitas organelas intracelulares, inclusive o ER. A rápida replicação viral e acúmulo de proteínas virais no ER poderia desencadear a UPR. Além disso, provoca a inibição da transcrição do EDEM, enzima do ER responsável pela degradação de proteínas mal formadas (DARA et al., 2011). Estudos recentes *in vivo*, em biópsias de fígado de pacientes infectados com HCV, mostraram ativadas as vias de resposta do estresse ER (ATF6, IRE1, PERK) (ASSELAH et al., 2010).

Ativação da UPR e ativação de genes responsáveis pelo estresse do ER, tais como GRP78, CHOP, e estresse oxidativo mitocondrial foram bem mostrados em modelos de colestase em animais estudados (BERNSTEIN et al., 1999).

Nutrientes com ação farmacológica têm sido estudados como medida terapêutica no controle do processo inflamatório. Destacam-se os ácidos graxos poliinsaturados n-3 e n-6, que têm funções metabólicas distintas e opostas. Os ácidos graxos poliinsaturados n-6 (n-6PUFA) promovem a inflamação, ao passo que os ácidos graxos poliinsaturados n-3 (n-3PUFA) a inibem (BROWNING, 2003). Parece que as proporções desses dois tipos de ácidos graxos na alimentação são mais importantes do que a quantidade total de cada um deles (HARBIGE, 2003).

Os ômega 3 são úteis em casos de hipertrigliceridemia, atuam através da inibição da síntese da VLDL e da apolipoproteína B, inibem a agregação plaquetária, reduzem os radicais livres e adesão dos macrófagos, além de estudos epidemiológicos demonstrarem que em populações onde ocorre um consumo em alto grau de fontes de ômega 3 existe uma baixa prevalência de intolerância a glicose e resistência insulínica. Estudos de intervenção em seres humanos têm demonstrado efeito antiinflamatório dos ômega 3 em pacientes portadores de

condições inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide, asma, Doença de Crohn e psoríase (HAMAZAKI et al., 2003; BRESLOW, 2006).

Após a ingestão, ácidos graxos poliinsaturados ômega 6 (cujo principal representante é o ácido linoleico) e ômega 3 (principalmente encontrado na natureza como ácido α -linolênico, precursor dos EPA - ácido ecosapentaenóico, e DHA - ácido docosahexaenóico) competem pelo mesmo sítio na membrana celular, pois ambos são ácidos carboxílicos isômeros, possuem 3 ligações duplas cis e diferem no início da ligação dupla, o linoléico tem o início da ligação dupla no carbono 6 e o linolênico tem o início da dupla no carbono 3. Esses ácidos são importantes componentes da membrana celular animal e vegetal. Portanto quanto maior a ingesta de ômega 3, maior a proporção desse ácido nas membranas quando comparado com o ômega 6. Os ômega 6 são metabolizados em ácido araquidônico, e através da ação das ciclooxigenases e lipooxigenases ativam vias pró-inflamatórias (prostaglandinas, tromboexanos e leucotrienos), por exemplo, a prostaglandina E2 induz febre, dor, vasodilatação e permeabilidade vascular, enquanto o leucotrieno B4 é quimiotático para leucócitos e induz a liberação de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos e citocinas inflamatórias (TNF α , IL1 e IL6) pelos macrófagos. O balanço da ingesta de ômega 3 e ômega 6 é fundamental para a homeostase e o desenvolvimento celular (YOG, 2010; OLIVER et al., 2010; HARBIGE, 2003).

Os ômega 3 modulam a expressão gênica de diversos sistemas através da regulação de fatores transcricionais, tais como PPAR, fator hepático X e proteína ligante do elemento regulador do esteroide 1c (sterol regulatory element binding protein 1c – SREBP1c), esses receptores têm papel fundamental na regulação no metabolismo dos ácidos graxos, o receptor hepático X ativa a expressão do SREBP1c, um regulador da lipogênese, enquanto que o PPAR promove a β -oxidação dos ácidos graxos por expressão gênica, sendo que o PPAR- α age no fígado promovendo o catabolismo lipídico e homeostase hepática, enquanto o PPAR- γ aparenta ter um papel primário na diferenciação do adipócito. Agonistas do PPAR- γ , como as tiazolidinedionas (glitazonas) aumentam a sensibilidade insulínica e são úteis no tratamento do DM2. A ativação do PPAR promove aumento de genes responsáveis pela oxidação de ácidos graxos, tais como, acil-CoA oxidase, acil-CoA sintetase e hidroximetilglutaril-CoA sintetase e também foi demonstrada a inibição de genes inflamatórios (genes que regulam TNF α , IL-1, IL-8, IL-6, ciclooxigenase-2,

molécula de adesão vascular-1, óxido nítrico sintetase, metaloproteinases da matriz e proteínas de fase aguda). Os ômega 3 podem agir também através da inibição direta da regulação do NF- κ B, promovendo uma diminuição da inflamação, além de poder agir através do GPR-120 (receptor ligado a proteína G-120) com, também, ação anti-inflamatória. No entanto, o exato mecanismo resultante da diminuição da inflamação, entre macrófagos, tecido adiposo e os efeitos dos ômega 3, ainda necessitam de mais estudos (OH et al., 2010).

Entretanto os ômega 3 promovem uma redução dos triglicerídeos (20-30%) em estudos em animais e humanos (dose de 1 a 4g/dia), além de poderem reduzir o LDL (lipoproteína de baixa densidade) e HDL (lipoproteína de alta densidade). Também foi observada uma baixa prevalência de doença coronariana isquêmica em estudos epidemiológicos, diminuição da resistência insulínica em estudos com animais, além de agir na obesidade em estudos com animais e alguns estudos em humanos (FIGUERAS et al, 2011; TODORIC et al., 2006; FLACHS et al., 2009).

Apesar das evidências citadas, os mecanismos exatos da ação anti-inflamatória dos ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 ainda não foram totalmente elucidados. No entanto, estudos em animais mostraram que uma dieta com elevado teor de gordura, rica em ácidos graxos saturados e monoinsaturados, aumentou a infiltração de macrófagos no tecido adiposo. A inclusão de ácidos graxos de cadeia longa poliinsaturados n-3 na dieta preveniu a infiltração de macrófagos no tecido adiposo e alterou a expressão de genes inflamatórios (TODORIC et al., 2006).

Por outro lado, estudos epidemiológicos evidenciaram baixa prevalência de intolerância à glicose e resistência insulínica em populações consumindo grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados n-3, como os esquimós da Groenlândia e os nativos do Alaska (KROMANN; GREEN, 1980; ADLER, 1994; SCHRAER et al., 1999). Porém, os resultados são conflitantes. Alguns estudos em animais sugerem que os ácidos graxos de cadeia longa poliinsaturados n-3 podem afetar de forma diferente o músculo, tecido adiposo e o fígado no que diz respeito à resistência insulínica, o que explicaria os resultados conflitantes. Storlien e colaboradores, mostraram que a substituição dos ácidos graxos saturados ou monoinsaturados na dieta hipergordurosa (60% da fonte energética) por ácidos graxos poliinsaturados n-3 por 3 semanas em ratos, preveniu a resistência insulínica induzida pela dieta no fígado e no músculo (STORLIEN et al., 1991). Taouis e colaboradores comparou o efeito de 2 dietas com alto teor de gordura, uma rica em

ácidos graxos poliinsaturados n-3 e outra rica em poliinsaturados n-6 em ratos Wistar (TAOUI et al., 2002). Ambas induziram hiperglicemia e hiperinsulinemia, sinais de resistência insulínica. A dieta com alto teor de ácidos graxos poliinsaturados n-3 manteve o conteúdo de GLUT4, receptor de insulina, IRS-1 fosforilação de tirosina e a atividade da fosfatidilinositol quinase no músculo, mas não no fígado. Além disso, não foram observadas alterações no GLUT4 e no RNAm da leptina no tecido adiposo, ao passo que os ácidos graxos poliinsaturados n-6 provocaram a diminuição dos mesmos (STORLIEN et al., 1991).

Sendo pouco estudado, o ácido alfa-linolênico (ALA) é um ácido graxo poliinsaturado presente em grandes proporções no óleo de linhaça. O ALA é o precursor dos ácidos eicosapentaenoico (20:5n-3) e docosaexaenoico (20:6n-3), que estão associados à prevenção de doenças cardiovasculares (MARTIN et al., 2006). Facilmente encontrado em uma dieta balanceada, ele está presente sobretudo nas sementes e oleaginosas.

Precursor de EPA e DHA, o ALA - ômega 3 de origem vegetal está mais acessível na mesa dos brasileiros, tendo sua ingestão maior do que os de origem animal – óleos de peixe, por exemplo. O ALA é encontrado em pequenas quantidades na carne, em muito pequenas quantidades em diversos vegetais e em quantidades relativamente grandes na soja, nozes, óleo de canola, linhaça e óleo de linhaça, óleo de cânhamo, óleo de camelina e óleo de sementes de chia; EPA e DHA são encontrados sobretudo em peixes gordos selvagens, em pequenas quantidades em ovos e em muito pequenas quantidades em algas (TACO, 2010).

O ALA, ingerido na dieta, pode ter duas distintas vias metabólicas. A primeira, correspondente de 60 a 85% do ALA dietético, é a sua utilização energética por meio da β -oxidação e a posterior reciclagem de carbono que será utilizado para produzir outros AGs, aminoácidos, esteróis, em tecidos como o fígado (POUMES-BALLIHAUT, 2001). O segundo destino metabólico, seguido por uma menor porcentagem do ALA ingerido, é o que envolve os processos de alongação e dessaturação (BARCELÓ-COBLIJN, 2009).

O consumo de ácidos graxos de origem animal têm sido bem relacionados na prevenção de doenças crônicas, envolvendo processo inflamatório, diminuindo o nível de marcadores de inflamação circulantes (Mello et al., 2011). Entretanto são escassas as informações relacionando o consumo de ácidos graxos de origem vegetal, com marcadores de inflamação e modificações metabólicas, entre outras

alterações (Mello et al., 2011). Nesse contexto, devido a poucas pesquisas na literatura relacionadas a estes temas, com este estudo pretendeu-se estudar as alterações metabólicas, inflamatórias e ativação do estresse do retículo endoplasmático, em modelos animal de obesidade e resistência insulínica, induzidos por dieta hiperlipídica, suplementados de ácido graxo ômega 3 ALA.

Justificativa

JUSTIFICATIVA

Diante da ausência de dados prévios, pretendeu-se avaliar os efeitos da suplementação de ômega 3 ALA em possíveis modificações metabólicas e moleculares na resistência insulínica, inflamação e ativação do estresse do retículo endoplasmático, em modelo animal de obesidade, induzido por dieta hiperlipídica.

Além disto, pretendeu-se obter dados que permitam uma melhor elucidação dos mecanismos envolvidos na resistência insulínica neste modelo e um possível efeito preventivo da administração de ALA sobre este processo, podendo, desta forma, auxiliar no desenvolvimento de novas terapias.

Hipótese

HIPÓTESE

A suplementação de ALA melhora a resistência insulínica, a inflamação, e a ativação do estresse do retículo endoplasmático, em modelo animal de obesidade, induzido por dieta hiperlipídica.

Objetivos

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos metabólicos e em mecanismos envolvidos com o desenvolvimento da resistência insulínica, na suplementação do ácido graxo alfa-linolênico, em modelos animais de obesidade induzida por dieta.

Objetivos Específicos

- Avaliar a sensibilidade à insulina pelo cálculo do índice HOMA IR/ β e pelo IPGTT.
- Avaliar o perfil lipídico pela dosagem sérica de colesterol total, triglicerídeos e HDL-colesterol.
- Avaliar a quantidade de lipídeos totais, e frações, em tecido hepático.
- Avaliar o nível de esteatose hepática por análise histopatológica.
- Avaliar o processo inflamatório subclínico associado à resistência insulínica através da dosagem sérica de IL17, IL1 β , IL6, MCP1, TNF α .
- Avaliar a ativação do estresse do retículo endoplasmático pela análise das proteínas BIP, HSP70, GRP94, IRE1a, CHOP, XBP1, e DAPK1, no tecido hepático.

Material e Métodos

Material e Métodos

Aprovação pela Comissão de Ética em Experimento Animal

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimento Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, em reunião do dia 25 de Março de 2013, protocolo nº 010/2013 (Anexo 1).

Animais e tratamento

Foram estudados 40 camundongos C57/BL6 macho, com 6 semanas de vida, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto.

Estes, foram mantidos no Biotério da Clínica Médica, em gaiolas coletivas, com 5 animais em cada, separados aleatoriamente, mantidos à temperatura de 25°C num ciclo claro-escuro de 12 horas com água e ração padrão (NUVILAB CR1) *ad libitum*, por um período de adaptação de 2 semanas.

Após a adaptação, os animais foram randomizados e divididos aleatoriamente em 2 grupos, de 20 camundongos cada, para 8 semanas de tratamento inicial:

- Grupo Controle: 20 animais recebendo dieta padrão do Biotério.
- Grupo Obeso e Resistente à Insulina: 20 animais alimentados com dieta manipulada hiperlipídica, com aproximadamente 60% de lipídeos.

Depois destas 8 semanas de tratamento inicial, os grupos foram randomizados entre si, e divididos em subgrupos de 10 camundongos em cada para mais 8 semanas de tratamento e determinados os grupos definitivos de estudo deste trabalho:

- Grupo Controle (C): 10 animais recebendo dieta padrão do biotério.
- Grupo Controle suplementado com ômega 3 (CW): 10 animais recebendo dieta padrão do biotério, suplementados com ômega 3 de origem vegetal (ALA) em concentração de 10%/Kg de dieta.

- Grupo Obeso (O): 10 animais alimentados com dieta manipulada hiperlipídica, com aproximadamente 60% de lipídeos.
- Grupo Obeso suplementado com ômega 3 (OW): 10 animais alimentados com dieta manipulada hiperlipídica, com aproximadamente 60% de lipídeos, suplementados com ômega 3 de origem vegetal (ALA) em concentração de 10%/Kg de dieta.

Os animais foram avaliados a cada 4 semanas com medidas de peso corporal, em balança digital (Filizola S.A., São Paulo, Brasil), dosagens de glicemia após jejum de 6hrs (Accu-Chek, Active, Roche, Brasil).

Uma semana antes do sacrifício os animais foram submetidos a um teste de tolerância a glicose intraperitoneal (IPGTT - *Intraperitoneal glucose tolerance test*) (descrito abaixo).

A divisão dos grupos de animais está ilustrado na figura a seguir (Figura 1):

Figura 1 – Divisão dos grupos de animais e tempos de tratamentos.

Dietas e ingestão de alimentos

O Biotério da Clínica Médica da FMRP-USP utiliza a ração padrão Nuvilab CR1, baseada na recomendação pelo *American Institute of Nutrition*, AIN-93, para roedores em crescimento.

A dieta manipulada hiperlipídica teve a seguinte composição:

- 400g de ração padrão Nuvilab CR1,
- 100g de sacarose,
- 20g de óleo de soja,
- 170g de banha de porco,
- 400g de leite em pó,
- 0,04g de BHT.

A suplementação de 10% de Omega-3/ALA foi realizada segundo protocolo desenvolvido pelo grupo o que representou aproximadamente 24% do total de lipídeos ingerido. Inicialmente foi feita a trituração e hidratação da dieta padrão utilizada no biotério, seguido pela incorporação manual dos demais ingredientes para obtenção da dieta hiperlipídica, assim como do ômega-3/ALA em forma de pó (Henrifarma Produtos Químicos E Farmacêuticos Ltda, São Paulo, SP).

A distribuição dos macronutrientes e densidade energética das dietas está descrita na Tabela 1 e a composição nutricional das dietas está na Tabela 2.

Tabela 1 – Distribuição dos Macronutrientes e Densidade Energética das dietas Padrão e Manipulada Hiperlipídica.

	Padrão	Padrão + Ômega 3	Hiperlipídica	Hiperlipídica + Ômega 3
Carboidratos	62,50%	50,37%	34,50%	29,80%
Lipídeos	11,80%	28,89%	51,60%	58,30%
Proteínas	25,60%	20,60%	14,25%	12,30%
Densidade Energética (Kcal/Kg)	3710	4610	5619	6519
Kcal/dia/animal (média)	14,13	24,24	27,5	31,94

Fonte: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO Versão 2

Tabela 2 – Composição Nutricional das dietas Padrão e Manipulada Hiperlipídica (peso/100g).

	Nuvilab CR1	Hiperlipídica
Carboidratos	580,61g	485,82g
Proteínas	237,44g	200,25g
Lipídeos	48,64g	322,29g
Fibras	*	*
Ferro	50mg	21,94mg
Cálcio	10,0g	7,65g
Fósforo	8g	3,1 g
Potássio	*	5321,64mg
Sódio	2700mg	2566mg
Magnésio	*	338,08mg
Zinco	60mg	37,58mg
Manganês	60mg	24,17mg
Cobre	10mg	4,36mg
Ácido Fólico	6mg	2,4mg
Tiamina	14,4mg	5,9mg
Riboflavina	11mg	9,2mg
Vitamina B12	60mcg	24mcg
Vitamina A	25500Ui	13888Ui
Vitamina E	60Ui	34,7Ui
Colesterol	*	553,6mg
Ácidos Graxos Saturados	*	138,84g
Ácidos Graxos Monoinsaturados	*	115,73g
Ácidos Graxos Poliinsaturados	*	33,95g

* Valores não estabelecidos

Fonte: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO Versão 2

Peso corporal

O peso corporal foi medido pré-tratamento e a cada 4 semanas. O ganho de peso foi calculado pela diferença entre o peso final e inicial e os dados estão expressos em grama (g) representados na Tabela 3.

Taxa de eficiência alimentar e energética

A taxa de eficiência alimentar foi calculada pela razão entre ganho de peso corporal e consumo alimentar, enquanto que a eficiência energética foi calculada pela razão entre ganho de peso corporal e consumo energético. Os dados são expressos em g/g consumo dieta ou g/Kcal, respectivamente para a eficiência alimentar e energética (Tabela 3).

Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (IPGTT)

O IPGTT (*Intraperitoneal glucose tolerance test*) foi realizado após jejum de 6 a 8 horas 2 dias antes do sacrifício. Foi administrado 2g de glicose/Kg de peso por via intraperitoneal.

A glicemia foi determinada em sangue total da cauda utilizando glicosímetro (Accu-Chek, Roche, Brasil), sendo realizado a dosagem de glicemias nos tempos 0', 30', 60', 90' e 120'.

Para cada animal foi construído uma curva de tempo *versus* glicemia para o cálculo da área sob a curva (AUC – *area under the curve*).

Sacrifício dos animais

Ao final do experimento os animais foram eutanasiados por decapitação e amostras de tecidos e sangue foram coletados para as análises histológicas e bioquímicas.

Amostras de tecido hepático, tecidos adiposo subcutâneo e visceral (epidídimo), pâncreas e músculo gastrocnêmio foram coletados, pesados e imediatamente mantidos em nitrogênio líquido e posteriormente conservados em freezer -70°C.

Adicionalmente, amostras de tecido hepático foram coletadas e acondicionadas em solução de formaldeído 5% tamponada, para posterior inclusão em parafina e processamento histopatológico.

No momento do sacrifício dos animais foi coletado, também, o sangue que foi prontamente centrifugado a 3500 rpm, à 4°C durante 15 minutos para obtenção do soro, o qual foi armazenado em freezer -70°C.

Todos os procedimentos nos animais foram realizados em jejum de 10hs.

Determinação do índice HOMA

O índice de HOMA permite determinar a resistência insulínica (HOMA- IR) e a capacidade funcional das células β -pancreáticas (HOMA-BETA).

O índice HOMA (Homeostatic Model Assessment Index) foi calculado a partir da dosagem de glicemia e insulina em amostras de sangue após 6 h de jejum. A glicemia foi quantificada em sangue total utilizando glicosímetro (Accu-CheK) e a insulina através de Kit Ultrasensitive ELISA (DRG Diagnostics, Marburg, Germany). O índice HOMA-IR foi obtido pela fórmula:

$$[\text{glicemia (mmol/L)} \times \text{Insulina (mcU/L)} / 22.5]$$

e o HOMA- β pela fórmula:

$$[20 \times \text{insulina (mcU/L)} / \text{glicemia (mmol/L)} - 3.5].$$

Insulina

A quantificação de insulina presente no soro dos camundongos foi dosada por um Kit Elisa Ultrassensível (Insulin Mouse Ultrasensitive ELISA, DRG Instruments GmbH).

Este kit é um imunoenensaio enzimático bilateral. Ele baseia-se em uma técnica sanduíche, em que dois anticorpos monoclonais são dirigidos contra determinantes antigênicos distintos na molécula de insulina. Durante a incubação, a insulina na amostra reage com os anticorpos anti-insulina conjugados com peroxidase, e também com os anticorpos anti-insulina ligados ao poço de microtitulação. A etapa de lavagem simples remove enzima não ligadas ao anticorpo marcado. A ligação conjugada é detectada por reação com 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. A reação é parada por adição de ácido para se obter um ponto final colorimétrico que é lido espectrofotômetro.

Gordura total hepática

A determinação da gordura hepática total foi realizada de acordo com o método proposto por Bligh e Dyer (1959).

O tecido hepático (aproximadamente 200mg) foi homogeneizado com 0,8mL de água destilada, em tubos de 10mL e em seguida foi adicionado 2mL de metanol e 1 mL de clorofórmio. As amostras foram submetidas à agitação em vórtex por 1 minuto. Posteriormente foram adicionados 1mL de água e 1 mL de clorofórmio e submetidos a nova agitação por 2 minutos e então as amostras foram centrifugadas à 1000rpm por 5 minutos, para separação do clorofórmio da fase aquosa. A fase inferior (clorofórmio), aproximadamente 1,3mL, foi transferida para um tubo de ensaio contendo 1g de sulfato de sódio anidro para remoção dos traços de água. A alíquota de 0,5mL da fase de clorofórmio livre de água foi transferida para um béquer, previamente pesado, e levado a estufa, com circulação forçada de ar, na temperatura de 75°C para evaporação de todo o clorofórmio e nova pesagem do béquer.

O resultado final foi calculado através da diferença das pesagens do béquer, em relação à massa inicial do tecido utilizado.

Triglicerídeos e colesterol total hepáticos

As frações lipídicas foram dosadas no fígado após a extração da gordura total pelo método de Bligh e Dyer (1959), ressuspensas em 1ml de Trizol e posteriormente determinados por kits comerciais.

A determinação dos triglicerídeos totais (TG) hepáticos foi realizada pela metodologia colorimétrica enzimática através de kit comercial (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil). A hidrólise dos triglicérides foi realizada pela lipase da lipoproteína, liberando o glicerol, que foi convertido em glicerol-3-fosfato, pela glicerokinase. O glicerol-3-fosfato foi então oxidado à dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. Posteriormente foi realizada uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalizada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina com absorbância máxima em 505nm, sendo que a intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração dos triglicerídeos da amostra.

O colesterol total (CT) foi determinado pelo método de colorimétrico enzimático através de kit comercial (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil). Os ésteres de colesterol foram hidrolisados pela colesterol esterase a ácidos graxos e a colesterol livre, que foi então oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-en-ona e a peróxido de hidrogênio. O fenol e a 4-aminoantipirina foram oxidados, na presença da peroxidase e peróxido de hidrogênio, formando a antipirilquinonimina com absorvância máxima à 500nm, com intensidade da cor vermelha formada na reação final diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra.

Para os kits, foram usados 10µL de amostras, com 1mL dos respectivos reagentes de cor para TG e CT. Ambos foram incubados e depois foi feita a leitura da cor em espectrofotômetro. Para o padrão, foi usado reagente fornecido pelo kit.

Os resultados foram calculados a partir da diferença do resultado da absorvância das amostras, divididas pela absorvância do padrão, conforme recomendações do protocolo.

Triglicerídeos, colesterol total e HDL séricos

Teores de triglicerídeos totais, colesterol total e HDL séricos, foram obtidos através de Kits comerciais.

O princípio de ação dos kits de TG e CT foram descritos anteriormente nas dosagens hepáticas, agora feitos no soro dos camundongos.

Quanto ao HDL, este foi determinado no soro pelo método de colorimétrico enzimático através de kit comercial (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil). Neste, as lipoproteínas de muito baixa intensidade (VLDL) e as proteínas de baixa densidade (LDL) foram quantitativamente precipitadas e, após centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (colesterol HDL) foi determinado no sobrenadante.

Após a precipitação, alíquotas de 10µL foram adicionadas a 1mL de reagente de cor, encubados e então foi feita a leitura em espectrofotômetro. Para o padrão, foi usado reagente fornecido pelo kit.

Os resultados de todas as dosagens foram calculados a partir da diferença do resultado da absorvância das amostras, divididas pela absorvância do padrão, conforme recomendações do protocolo.

Análise histopatológica

As biópsias foram mantidas acondicionadas por 24 horas em solução de formaldeído 5% tamponada, e incluídas em parafina para posterior processamento histológico. Foram realizados cortes de 5µm que foram submetidos à coloração de hematoxilina e eosina.

As lâminas coradas foram visualizadas no microscópio óptico LEICA® DM-4000B com câmera LEICA® DFC- 280 ligado ao computador com o software LAS® - Leica Application Suite (version 3.3.0) para captura das imagens.

Quantificação sérica de citocinas

A determinação sérica de citocinas foi feita por um imuno ensaio através do Kit “Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel” (MILLIPLEX® Map, Luminex® Technology).

Este ensaio envolve um processo de coloração com microesferas de poliestireno com dois fluorocromos espectrais distintos. Utilizando uma proporção destes dois fluorocromos, são criados conjuntos de esferas. Cada uma dessas esferas é conjugada a um anticorpo analítico específico. Estas microesferas são combinadas em um único poço de reação. Os ensaios se fundamentam na metodologia “sanduíche” convencional de dois sítios, onde a mistura de microesferas é incubada com padrões e amostras em formato de placa de 96 poços, utilizando anticorpo biotinilado e incubados com o conjugado repórter “estreptavidina-ficoeritrina” (SA-PE).

Por fim, as microesferas são lidas no equipamento Luminex 200 (Millipore, EUA) através de sistema duplo de lasers que incide sob as microesferas, à medida que estas fluem através do fluxo celular. Um feixe de laser detecta a microesfera (o código de cor é específico para o ensaio) e o outro laser quantifica o sinal de leitura em cada microesfera. As microesferas passam através do fluxo celular Luminex, e cada microesfera é identificada e o sinal SA-PE associado a elas é quantificado.

Extração de proteína total

A proteína total foi extraída de tecido hepático utilizando-se o tampão RIPA como descrito resumidamente a seguir: Foi adicionado 1 mL de tampão RIPA a aproximadamente 100 mg de tecido adiposo, seguido de homogeneização por 30 segundos e incubado por 1 h a 4°C. As amostras foram centrifugadas (12000 rpm por 20 min a 4°C), o sobrenadante foi transferido a outro tubo e a concentração de proteína total medida pelo Kit BCA (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). As

amostras separadas em pelo menos 3 alíquotas e preparadas para a concentração de 100µg.

Western Blot

A técnica de western blot foi realizada para a avaliação da expressão proteica em tecido hepático e descrito abaixo

Eletroforese em gel de poliacrilamida

Foi utilizado gel de 12% de poliacrilamida e SDS. Às amostras de proteínas na concentração desejada, foi adicionado tampão corante seguida de aquecimento a 90°C por 10 minutos para que ocorresse a desnaturação e a seguir a aplicação no gel. A eletroforese foi iniciada a 90V por 30 minutos e, então, por aproximadamente por 2 horas a 110V, ou até que o marcador ou “ladder” atingisse aproximadamente 24 kDa.

Transferência

As membranas de nitrocelulose foram tratadas com água destilada e aplicadas ao gel para ocorrer a transferência das proteínas com a passagem de corrente elétrica de 25 V por 30 minutos utilizando o sistema de transferência semi seco Trans-blot (Bio Rad). Após este período as membranas foram bloqueadas com solução TBS (*Tris-Buffered Saline*) com 5% de leite desnatado por 1 hora em temperatura ambiente.

Incubação com anticorpos

A membrana foi incubada com o anticorpo primário “overnight” seguida de 3 lavagens com tampão TBST (*Tris-Buffered Saline and Tween 20*). Em seguida foi realizada a incubação com o anticorpo secundário marcado com HRP, seguido de 3 lavagens com TBST para a remoção dos anticorpos não ligados e posteriormente a detecção das sondas ligadas por quimiluminescência com kit Immun-Star HRP Substrate (Bio-Rad, CA, USA). A leitura das membranas e a quantidade de proteína em cada blot foi determinada pelo software Image Lab (Bio Rad).

Avaliação do Estresse do Retículo Endoplasmático

Para a avaliação do estresse do retículo endoplasmático foi utilizado a técnica de western blot descrita cima, utilizando-se anticorpos primários específicos anti HSP-70 (SC-71060R), anti-CHOP (GADD 153) (SC-575) e anti XBP-1 (M186) (SC-7176) adquiridos do laboratório Santa Cruz Biotechnology, Inc. Os anticorpos anti-IRE1a (#14C10), anti-HSP90 (GRP94) (#2104S), anti-DAPK1 (#3008S), anti-BIP (#C50B12) e o anticorpo secundário anti-rabbit IgG, HRP-linked (#7074) foram adquiridos do laboratório Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA).

Análise dos dados

Os dados obtidos foram tabulados e analisados utilizando-se o software Graph Pad Prisma® para Mac OS X, versão 5.0c.

Os resultados foram apresentados por média $\pm$ desvio padrão e também mediana com intervalo entre quartis, quando apropriado.

Para comparação dos resultados entre os quatro grupos foi aplicado o teste ANOVA e o pós-teste de Tukey, considerando $p < 0,05$ como nível de significância.

Para comparação dos resultados entre dois grupos foi feito Teste *t Student*, adotando o mesmo nível de significância (de 5%).

Resultados

RESULTADOS

Os dados referentes a ganho de peso, consumo alimentar, eficiência alimentar, consumo energético e eficiência energética, assim como valores de glicose sérica, insulina sérica, índice HOMA-IR e índice HOMA β , área sob a curva de glicose, triglicerídeos e colesterol total, séricos e hepáticos, HDL sérico, e citocinas séricas, dos diferentes grupos estudados, encontram-se descritos na Tabela 3.

Na Tabela 4 estão representados os valores, inicial e final, do peso corporal e glicemia sérica nos grupos controle (C), controle + ômega 3/ALA (CW), obeso (O) e obeso + ômega 3/ALA (OW).

Avaliação metabólica

Comparando-se os diferentes grupos (C, CW, O e OW), quanto à evolução do peso dos animais, todos os grupos tiveram um aumento significativo no peso corporal, ou seja um crescimento significativo, mostrando que o peso final, foi diferente do início do experimento dentro dos grupos (Figura 2). O teste ANOVA mostra que todos os grupos foram diferentes entre si ($p=0,0001$).

Quando é feita a comparação do consumo alimentar das dietas dos animais nos diferentes grupos, este foi semelhante entre todos os grupos, com tendência discreta de aumento quando adicionado o ômega 3/ALA nos grupos que receberam esta suplementação (CW e OW) (Figura 3).

Figura 2 – Evolução do peso corporal (g) dos camundongos nos diferentes grupos (C, CW, O, OW) representados pela média. Tempo de pesagem 1: início do tratamento. Tempo de pesagem 2: 4 semanas de experimento. Tempo de pesagem 3: 8 semanas de experimento e início da suplementação. Tempo de pesagem 4: 12 semanas de experimento. Tempo de pesagem 5: final do experimento. *teste T Student: $p < 0,05$, comparando pesagem inicial e final. ANOVA: $p = 0,0001$.

Figura 3 – Consumo alimentar diário (Média +DP), durante o período de estudo dos animais nos grupos C, CW, O e OW.

Já o ganho de peso total foi semelhante nos animais que receberam a dieta hiperlipídica (O e OW), independente da suplementação ou não de ômega 3/ALA. O mesmo resultado pode ser observado nos animais que receberam a dieta controle suplementada (CW) com o ácido graxo, e os que receberam essa mesma dieta sem a suplementação (C) (Figura 4). Apesar da leve tendência mostrada na figura, de que os grupos CW e OW tiveram um crescimento maior do que os grupos C e O, o teste ANOVA mostrou semelhança entre os diferentes grupos ($p=0,39$).

Figura 4 – Ganho de peso corporal total dos grupos C, CW o e OW. ANOVA: $p=0,39$.

A eficiência alimentar foi calculada pela razão entre o ganho de peso e consumo alimentar. Esta, foi menor nos grupos que receberam a suplementação com ômega 3/ALA (CW e OW), quando comparados aos grupos sem a suplementação (C e O), como pode ser observado na Figura 5.

Apesar da maior densidade energética nas dietas suplementadas com o ômega 3/ALA, não foi observado um ganho de peso mais acentuado nos animais que receberam essas dieta, sugerindo uma menor eficiência energética, o que foi confirmado com o calculo da razão entre ganho de peso e consumo energético (Figura 6).

Figura 5 – Eficiência alimentar representada pela média do [Ganho de peso (g) / consumo alimentar (g)] das dietas controle e hiperlipídica suplementadas ou não com ômega 3/ALA.

Figura 6 – Eficiência energética representada pela média [Ganho de peso (g) / consumo energético (Kcal)] das dietas controle e hiperlipídica suplementadas ou não com ômega 3/ALA.

A obesidade, induzida pela dieta hiperlipídica, determinou tolerância diminuída à glicose (Figura 7) e um aumento na resistência insulínica, como observado pelo cálculo da área sob a curva (Figura 8) ilustrado pelos gráficos de glicose no teste de tolerância à glicose administrada por via intraperitoneal (IPGTT) (Figura 8). Observou-se que os animais dos grupos O e OW apresentavam maior área sob a curva de glicose obtida pelo teste em relação aos grupos controles (C e

CW) Porém, a suplementação de ômega 3/ALA melhorou a resposta à sobrecarga de glicose quando comparados os grupos O e OW individualmente (ANOVA: $p=0,009$) (Figura 9).

Figura 7 – Teste de Tolerância à Glicose Intraperitoneal, mostrando os níveis médios de glicemia sérica nos tempos após a administração de glicose intraperitoneal nos grupos C, CW, O e OW.

Figura 8 – Quantificação da Áreas sob a curva de glicose (mU/2hr) dos diferentes grupos nos tempos obtidos pelo teste de IPGTT. *teste T Student: $p<0.05$. ANOVA $p=0,009$.

Figura 9 – Área sob a curva de glicose do teste de IPGTT. A) Média de glicemia nos diferentes tempos do teste no grupo C. B) Média de glicemia nos diferentes tempos do teste no grupo CW. C) Média de glicemia nos diferentes tempos do teste no grupo O. D) Média de glicemia nos diferentes tempos do teste no grupo OW.

Quando observados os valores de glicemia dos animais no momento do sacrifício, os níveis séricos de glicose foram semelhantes entre os grupos C e CW, porém, paradoxalmente, enquanto que a suplementação de ômega 3/ALA aumentou significativamente o nível de glicemia no grupo controle ($p < 0.001$), no grupo que recebeu a dieta hiperlipídica, a suplementação reduziu a glicemia não significativamente em comparação aos grupos controle suplementados ou não (Figura 10). O teste ANOVA, feito no tempo 3 (momento do sacrifício dos animais), mostrou diferença entre todos os grupos ($p = 0.0008$), onde observa-se níveis elevados de glicemia no grupo CW em relação aos demais ($p < 0.05$). Quanto aos níveis de insulina sérica, estavam diminuídos nos animais obesos suplementados

em comparação com os controles suplementados ($p < 0.01$) (Figura 11). Adicionalmente a suplementação do ômega 3/ALA mostrou uma tendência em reduzir os níveis glicêmicos no grupo OW em comparação aos O ($p = 0.06$) (Figura 10), sendo observada a mesma tendência nos níveis de insulina (Figura 11). Pelo ANOVA, foi observada divergência entre os diferentes grupos ($p = 0.01$).

Figura 10 – Níveis séricos de glicemia, representados pela Média $\pm$ DP, nos grupos C, CW, O e OW, nos tempos 1: início do experimento, tempo 2: início da suplementação de ômega 3 ALA nos grupos CW e OW, e tempo 3: final do experimento. *teste T Student: $p < 0,05$. ANOVA: $p = 0,0008$.

Figura 11 – Níveis séricos de Insulina nos grupos C, CW, O e OW. *teste T Student: $p < 0,05$. ANOVA: $p = 0,01$.

Através dos dados de glicose e insulina de jejum, ambos no momento do sacrifício dos animais, foi calculado o índice HOMA IR e HOMA β conforme descrito previamente. Não foi observado um aumento significativo no índice HOMA-IR nos animais que receberam a dieta hiperlipídica. Em relação a suplementação de ômega 3/ALA, esta determinou um aumento não significativo no índice HOMA-IR no grupo CW comparado ao grupos C, e uma redução significativa no OW em comparação com os grupos C ($p=0.04$), CW ($p=0.01$) e O ($p=0.04$) (Figura 12). Quanto ao ANOVA feito para HOMA-IR, pode se perceber que os grupos foram diferentes entre si ($p=0,0007$). Desta maneira a suplementação de ômega 3/ALA foi capaz de reduzir a resistência insulínica sem alterar o índice HOMA β (Figura 13), evidenciado pelo teste ANOVA mostrando semelhança entre os grupos ($p=0,69$).

Figura 12 – Avaliação da resistência insulínica pelo índice HOMA IR calculado pela fórmula [glicose jejum (mmol/L) x insulina jejum (mU/L)/22.5] em animais dos grupos C, CW, O e OW. *teste T Student: $p < 0,05$. ANOVA: $p = 0,0007$.

Figura 13 – Avaliação da capacidade de secreção de insulina pelo índice HOMA- β , calculado pela fórmula $[20 \times \text{insulina jejum (mU/L)} / \text{glicose jejum (mmol/L)} - 3.5]$ em animais dos grupos C, CW, O e OW. ANOVA: $p = 0,69$.

No momento do sacrifício dos animais foi realizada a pesagem dos tecidos hepático e adiposo subcutâneo e epididimal, pâncreas e músculo gastrocnêmio. O peso dos tecidos foram corrigidos para peso corporal total de cada camundongo e os valores finais estão representados nas Tabela 3.

Não foi observada diferenças no peso do tecido hepático entre todos os grupos (ANOVA: $p=0,23$), apesar do grupo OW ter mostrado uma leve tendência de diminuição comparado ao grupo O (Figura 14).

Figura 14 – Peso do fígado no momento do sacrifício dos grupos C, CW, o e OW, corrigidos para peso corporal total dos camundongos. ANOVA: $p=0,23$.

Em relação ao peso do pâncreas, no momento do sacrifício, também corrigido pra peso corporal total dos camundongos, o grupo OW mostrou ser significativamente menor do grupo CW (Figura 15) e pelo ANOVA, todos os grupos diferentes entre si ($p=0,0055$).

Figura 15 – Peso do pâncreas no momento do sacrifício dos grupos C, CW, o e OW, corrigidos pra peso corporal total dos camundongos. *teste T Student: $p < 0,05$. ANOVA: $p = 0,005$.

O peso da gordura subcutânea mostrou ser diferente entre todos os grupos (ANOVA: $p = 0,03$) e quando comparados os grupos suplementados com os não suplementados, esta foi menor no grupo OW, comparado aos grupos O e CW (Figura 16). Por outro lado, quanto a gordura epididimal, foi observado que esta manteve-se semelhante em todos os grupos (ANOVA: $p = 0,87$) (Figura 17).

Figura 16 – Peso da gordura subcutânea no momento do sacrifício dos grupos C, CW, o e OW, corrigidos pra peso corporal total dos camundongos. *teste T Student: $p < 0,05$. ANOVA: $p = 0,03$.

Figura 17 – Peso da gordura epididimal no momento do sacrifício dos grupos C, CW, o e OW, corrigidos pra peso corporal total dos camundongos. *teste T Student: $p < 0,05$. ANOVA: $p = 0,87$.

O músculo gastrocnêmio, assim como a gordura epididimal, também mostrou semelhança entre todos os grupos (ANOVA: $p = 0,76$) (Figura 18).

Figura 18 – Peso do músculo gastrocnêmio no momento do sacrifício dos grupos C, CW, o e OW, corrigidos pra peso corporal total dos camundongos. ANOVA: $p = 0,76$.

A quantificação de gordura hepática total mostrou que a dieta hiperlipídica dos grupos O e OW determinou maiores níveis de gordura tecidual comparados aos com dieta controle, nos grupos C e CW (Figura 19). A suplementação com ômega 3/ALA foi capaz de reduzir a gordura total tanto no grupo dos controles quanto no grupo dos obesos, comparando grupos suplementados (OW e CW) e grupos não

suplementados (O e C), com todos os grupos diferentes entre si (ANOVA: $p < 0,0001$). Adicionalmente estes resultados foram confirmados pela análise histopatológica, em blocos de parafina em lâminas do tecido hepático com coloração em hematoxilina-eosina, mostrando concentrações de gordura maiores nos grupos O e OW, comparados com os grupos C e CW, e também uma mudança do padrão de concentração da gordura no grupo OW comparado com o grupo O. Foi observado uma diminuição no tamanho dos grânulos de gordura assim como um padrão de distribuição focal (seta) com áreas de concentração da gordura no tecido hepático de animais obesos suplementados com ômega 3/ALA, confirmando que a suplementação do ômega 3/ALA foi eficaz na prevenção de esteatose hepática (Figura 20).

Figura 19 – Gordura hepática total (μ g/g Tecido) em animais dos grupos C, CW, O e OW. *teste T Student: $p < 0,05$. ANOVA: $p < 0,0001$.

Figura 20 – Imagens da lâminas histopatológicas dos grupos C, CW, O e OW. Aproximação de 100x.

Em relação aos triglicerídeos e colesterol total dosados no tecido hepático, foi observado níveis semelhantes entre os grupos com relação aos triglicerídeos (Figura 21), evidenciados pelo ANOVA ($p=0,43$). Por outro lado, a suplementação de ômega 3/ALA determinou níveis significativamente mais elevados de colesterol total hepático nos animais do grupo OW quando comparado aos do grupo O. (Figura 22).

Figura 21 – Quantificação de Triglicérides Hepático (μ g/g Tecido) em animais dos grupos C, CW, O e OW. ANOVA: $p=0,43$.

Figura 22 – Quantificação de Colesterol Total Hepático (μ g/g Tecido) em animais dos grupos C, CW, O e OW. *teste T Student: $p<0,05$. ANOVA: $p=0,17$.

Análogo aos dados obtidos na avaliação do tecido hepático, a dosagem sérica de triglicerídeos mostrou ser semelhante entre todos os grupos estudados (ANOVA: $p=0,16$) (Figura 23).

Figura 23 – Quantificação de Triglicerídeos Sérico (μ g/g Tecido) em animais dos grupos C, CW, O e OW. ANOVA: $p=0,16$.

Quanto a dosagem de colesterol total sérico, esta teve um aumento significativo nos grupos O e OW, comparados aos grupos C e CW, assim como comparando-se suplementados e não suplementados, entre os grupos C e CW, e O e OW, mostrando diferença importante, evidenciados pelo ANOVA ($p<0,0001$) (Figura 24).

Figura 24 – Quantificação de Colesterol Total Sérico (μ g/g Tecido) em animais dos grupos C, CW, O e OW. *teste T Student: $p<0,05$. ANOVA: $p<0,0001$.

Entretanto, a quantificação sérica de HDL colesterol também mostrou um aumento importante na comparação entre os grupos O e C, e também no grupo CW comparado ao grupo C (Figura 25) e diferença pelo ANOVA, com $p=0,02$.

Figura 25 – Quantificação de HDL sérico (μ g/g Tecido) em animais dos grupos C, CW, O e OW. *teste T Student: $p < 0,05$. ANOVA: $p = 0,02$.

Avaliação inflamatória

A dosagem sérica de citocinas, mostrou uma redução significativa nos níveis de IL-1 β , IL-6 e MCP-1 do grupo O comparado ao grupo OW ($p = 0,04$; $p = 0,03$; $p = 0,03$; respectivamente) (Figuras 26, 27 e 28, respectivamente). Porém a comparação entre todos os grupos, não mostrou diferenças significativas nos níveis de IL-1 β ($p = 0,23$). No entanto, os níveis de IL-6 e MCP-1 estavam diferentes entre os grupos na análise realizada pelo teste ANOVA. Adicionalmente, os níveis séricos de MCP-1 estavam significativamente menores no grupo OW comparado com o grupo CW ($p = 0,01$).

Figura 26 – Níveis séricos de IL1 β em pg/ml. *teste T Student: $p < 0,05$. ANOVA: $p = 0,23$.

Figura 27 – Níveis séricos de IL6 em pg/ml. *teste T Student: $p < 0,05$. ANOVA: $p = 0,03$.

Figura 28 – Níveis séricos de MCP1 em pg/ml. *teste T Student: $p < 0,05$. ANOVA: $p = 0,01$.

Por outro lado as dosagens séricas de IL17 e TNF α foram semelhantes e não mostraram diferenças significativas entre os grupos (Figura 29, Figura 30, respectivamente).

Figura 29 – Níveis séricos de IL17 em pg/ml. ANOVA: $p=0,33$.

Figura 30 – Níveis séricos de $\text{TNF}\alpha$ em pg/ml. ANOVA: $p=0,27$.

Ativação do Estresse do Retículo Endoplasmático

Devido as alterações encontradas no tecido hepático, como diminuição no peso e teor de gordura total, optou-se por iniciar a investigação dos possíveis efeitos do ômega 3/ALA nos mecanismos envolvidos com o desenvolvimento de resistência insulínica neste tecido. O envolvimento do estresse do retículo endoplasmático neste processo vem sendo estudado e por sua inter-relação com inflamação, optamos por avaliar suas vias de ativação no tecido hepático. Desta maneira, após a extração de proteínas totais, foi realizado a avaliação das proteínas BIP, HSP70, GRP94, IRE1 α , CHOP, XBP1 e DAPK1 pela técnica de Western Blot.

A quantificação relativa da expressão destas proteínas está representada na Figura 31, e as imagens obtidas pela técnica estão ilustradas na Figura 32.

Observou-se que a suplementação de ômega 3/ALA determinou o aumento na expressão da proteína BIP tanto no grupo CW (94%, $p=0,01$) quanto no grupo OW (51%, $p=0,04$) comparado aos grupos C e O. O mesmo resultado foi encontrado na proteína HSP70, tendo sua expressão aumentada no grupo CW, comparado ao C (17%, $p=0,03$) e também no grupo OW, comparado ao O (76%, $p=0,02$).

Quanto à proteína GRP94, a suplementação de ômega 3/ALA fez com que não houvesse alterações na sua expressão, mostrando valores semelhantes entre os grupos C e CW ($p=0,88$) e também entre os grupos O e OW ($p=0,67$). O mesmo aconteceu com a expressão da IRE1 α , com semelhança entre C e CW ($p=0,29$) assim como entre O e OW ($p=0,63$).

A suplementação de ômega 3/ALA foi eficaz também na diminuição da expressão da proteína CHOP, entre C e CW (33%, $p=0,04$), e entre O e OW (39%, $p=0,03$), e em contrapartida também reduziu a expressão da proteína XBP1, entre C e CW (24%, $p=0,04$), sendo semelhante entre os grupos O e OW ($p=0,49$).

Por fim, quanto a expressão da proteína DAPK1, esta mostrou-se semelhante entre C e CW ($p=0,17$) assim como entre O e OW ($p=0,41$).

Figura 31 – Resultados de imunoblotting de diferentes proteínas avaliadas em tecido hepático de animais controle (C) e obesos (O) não suplementados e animais suplementados com 10%/dia de ômega 3/ALA (CW e OW). A proteína GAPDH foi utilizada para controle e normalização dos resultados.

Figura 32 – Avaliação das proteínas envolvidas na ativação do Estresse do Retículo Endoplasmático em animais dos grupos C e CW, e O e OW. A) Representa a quantificação relativa da proteína BIP, comparando-se C e CW. B) Representa a quantificação relativa da proteína BIP, comparando-se O e OW. C) Representa a quantificação relativa da proteína HSP70, comparando-se C e CW. D) Representa a quantificação relativa da proteína HSP70, comparando-se O e OW. E) Representa a quantificação relativa da proteína GRP94, comparando-se C e CW. F) Representa a quantificação relativa da proteína GRP94, comparando-se O e OW. G) Representa a quantificação relativa da proteína IRE1, comparando-se C e CW. H) Representa a quantificação relativa da proteína IRE1 α , comparando-se O e OW. I) Representa a quantificação relativa da proteína CHOP, comparando-se C e CW. J) Representa a quantificação relativa da proteína CHOP, comparando-se O e OW. L) Representa a quantificação relativa da proteína XBP1, comparando-se C e CW. M) Representa a quantificação relativa da proteína XBP1, comparando-se O e OW. N) Representa a quantificação relativa da proteína DAPK1, comparando-se C e CW. O) Representa a quantificação relativa da proteína DAPK1, comparando-se O e OW. *teste T: $p < 0,05$.

Tabela 3 – Dados metabólicos e inflamatórios em média±DP, nos grupos C, CW, O e OW.

	C	CW	O	OW
Ganho de peso (g)	7,2±1,5	9,4±1,7	9,0±2,0	8,6±3,0
Consumo Alimentar (g)	2022	2791	2331	2351,5
Eficiência Alimentar (g/g)	0,0035	0,0032	0,0039	0,0037
Consumo Energético (Kcal)	7501,6	12866,5	13097,9	15329,4
Eficiência Energética (g/Kcal)	0,00095	0,00070	0,00069	0,00056 ^b
Glicose Final (mg/dL) [#]	133,5±4,8	214,6±47,9 ^a	142,8±49,0 ^b	94,4±11,6 ^b
Insulina (pmol/L) [#]	8,2±2,8	10,7±4,1	4,2±3,8	2,9±2,2
Índice HOMA IR [#]	0,4±0,14	0,7±0,30	0,2±0,16	0,1±0,06 ^{a,b,c}
Índice HOMA β	5,9±1,6	4,2±1,7	3,5±3,4	6,3±6,4
AUC (mU/2hr)	4562±1436	4797±1854	8549±1213	5465±1724
Fígado (g/g de peso)	4,20±0,51	4,21±0,31	4,61±0,21	4,35±0,24
Pâncreas (g/g de peso) [#]	0,49±0,11	0,62±0,07	0,48±0,04	0,38±0,11 ^b
Gordura Subcutânea (g/g de peso) [#]	0,75±0,29	1,07±0,16	1,02±0,33	0,63±0,16 ^{b,c}
Gordura Epididimal (g/g de peso)	1,20±0,57	1,41±0,58	1,28±0,14	1,00±0,41
Músculo Gastrocnêmio (g/g de peso)	0,58±0,08	0,59±0,05	0,63±0,06	0,59±0,07
Colesterol Sérico Total (mg/dL) [#]	108,8±8,3	139,0±15,9 ^a	193,3±21,1 ^a	251,9±46,7 ^{b,c}
Triglicerídeos Sérico (mg/dL)	93,4±26,9	127,1±67,8	132,7±57,9	158,6±48,9
HDL Sérico (mg/dL) [#]	73,7±10,8	93,1±5,5 ^a	101,6±4,5 ^a	84,9±18,1
Colesterol Hepático Total (mg/dL)	5,9±5,1	5,1±3,9	2,2±1,3	7,9±3,1 ^c
Triglicerídeos Hepático (mg/dL)	72,7±12,8	57,4±28,9	82,8±30,4	53,5±35,3
TNF-α Sérico (pg/mL)	3,61±1,2	4,14±1,6	3,47±1,3	2,64±1,5
IL 6 Sérico (pg/mL) [#]	19,58±13,0	11,55±7,2	11,21±7,6	5,44±2,2 ^c
IL 1β Sérico (pg/mL)	6,65±5,9	4,18±1,4	6,26±3,3	2,63±2,1 ^c
IL 17 Sérico (pg/mL)	3,19±0,5	3,13±0,9	3,80±1,4	2,95±0,8
MCP1 Sérico (pg/mL) [#]	32,92±14,8	22,96±8,7	23,17±11,1	11,55±4,2 ^{b,c}

Resultados expressos em Média±DP. C: Controle, dieta padrão, CW: Controle+ômega-3, dieta padrão suplementada de 10% de ômega 3/ALA, O: Obeso, dieta hiperlipídica com 60% de lipídeos, OW: Obeso + ômega-3, dieta hiperlipídica com 60% de lipídeos suplementada de 10% de ômega 3/ALA. TNF-α: Fator de necrose tumoral - alpha, IL6: Interleucina 6, IL1β: Interleucina 1 beta, IL17: Interleucina 17, MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos-1. teste T: ^a p<0,05 vs C. ^b p<0,05 vs CW. ^c p<0,05 vs O. #teste ANOVA p<0.05.

Tabela 4 – Valores de peso corporal e glicemia sérica em média±DP, inicial e final, nos grupos C, CW, O e OW.

	C		CW		O		OW	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Peso (g) [#]	26,75±1,7	34,0±2,2*	26,0±0,7	35,4±1,3*	24,5±1,9	33,5±1,9*	23,2±2,7	30,8±1,1*
Glicemia (mg/dL) [#]	122±3,7	133,5±4,8*	129,4±9,5	194,6±28,9*	63,25±5,1	142,75±42,1*	73,6±8,4	94,4±11,6*

Resultados expressos em Média±DP. C: Controle, dieta padrão, CW: Controle+ômega-3, dieta padrão suplementada de 10% de ômega 3/ALA, O: Obeso, dieta hiperlipídica com 60% de lipídeos, OW: Obeso + ômega-3, dieta hiperlipídica com 60% de lipídeos suplementada de 10% de ômega 3/ALA., *teste T entre Final e Inicial: p<0.05, #teste ANOVA p<0.05.

Discussão

DISCUSSÃO

No presente estudo foi utilizado, para a suplementação da dieta dos animais, o ácido graxo alfa-linolênico – ALA. Muitos são os estudos a respeito de outros ácidos graxos (AGs) ômega 3, como por exemplo o EPA e o DHA, mas poucos são os a respeito do ALA. Enquanto que fontes de EPA e DHA são na sua maioria de origem animal, ALA é encontrado mais facilmente em alimentos de origem vegetal (TACO, 2006). Visto que este, é o mais acessível a população brasileira, foi pretendido estudá-lo e elucidar seu efeito modulador.

A maioria dos estudos encontrados sobre a suplementação de ácidos graxos, cita o óleo de peixe como elemento fundamental destes. Peixe marinhos gordurosos, como por exemplo o salmão, são ricos em Ômega 3. Estes são ricos em EPA e DHA, uma vez que, ao se alimentarem de muitas plantas marinhas, especialmente as algas unicelulares de fito plâncton, ingerem o ácido graxo Ômega 3 em sua forma sintetizada, porém somente os peixes selvagens tem este comportamento, enquanto que os criados em cativeiro, alimentam-se de ração, na maioria das vezes industrializada, sem a adição de ômega 3 (Calder, 2001).

Por outro lado, o ALA, é encontrado principalmente em peixes marinhos de água fria, vegetais e folhas de coloração verde escura e em algumas sementes de plantas (TACO, 2010). O consumo deste AGs vem aumentando, associado ao fato do maior acesso e hábitos de consumo da população a alimentos como linhaça e chia, assim como outros alimentos funcionais, ou conhecidos como “super alimentos”.

É recente este conceito de funcionalidade dos alimentos, ou seja, a propriedade do alimento que vai além da sua qualidade de fonte de nutrientes.

Todavia é de percepção geral que o consumo destes alimentos funcionais vem aumentando bastante por parte da população, como resultado de uma preocupação individual com a saúde (COLLI et al., 2009). Porém esta concepção alcançou elevada abrangência com o conceito de prevenção de doenças, merecendo uma atenção maior de escolha por parte de todos, de como usar estes alimentos, visto que muitos desses produtos não possuem ação comprovada cientificamente (COLLI et al., 2009).

O óleo de linhaça, derivado da semente de linho (*Linum usitatissimum*), é a fonte mais rica de ALA, que pode ser convertido no organismo em EPA e DHA (POMPEIA et al., 2000).

De acordo com a recente divulgação da Pesquisa de Orçamentos Familiares da população brasileira, é difícil o acesso a alimentos de origem selvagem, como por exemplo os peixes gordurosos ricos em Ômega 3.

O consumo de produtos de origem marinha está sujeito à influência de diversos agentes e a hábitos culinários da população. Observam-se as más condições de distribuição destes produtos, que na maioria das vezes não se cumprem corretamente, e que resultam em preços pouco atrativos para o consumidor, além do fato de que grande parte dos produtos que chegam a mesa da população são criados em cativeiro, sendo assim, não ricos em AGs.

Uma alternativa para suplementar a ingestão de ácido graxo Ômega 3 em nossa alimentação é através de consumo direto de produtos que contenham este ácido já na forma de concentrados (cápsulas, emulsões de óleos marinhos e de azeites vegetais, ou de preparos que contenham estes ácidos graxos) (BORN, 1998).

Os óleos de peixes são mais suscetíveis à deterioração que outros óleos e gorduras, devido a rapidez com que o processo de oxidação ocorre quando lipídeos poliinsaturados são expostos ao ar (STANDBY, 1990). Além disso, apresentam variação em sua composição de ácido graxo, devido a vários fatores como: disponibilidade de alimentos, idade e sexo dos animais, temperatura da água, localização geográfica e estação do ano (BADOLATO et al., 1991). Um fato importante é a baixa aceitabilidade do óleo de peixe pela população em geral, devido à inconveniência peculiar do odor e paladar, e pela necessidade de ingerir altas doses por longo períodos de tempo (BELDA; POURCHET, 1991).

Este presente estudo, fez uso do extrato da linhaça, em pó, com concentração conhecida, e garantida, mostrando ser mais acessível a reprodução deste e sua extrapolação para o cotidiano da população brasileira, que tem fácil obtenção desta, e outras fontes de origem vegetal do ALA, na alimentação regular.

Os resultados deste experimento mostram que a suplementação do ALA nas dietas padrão e hipercalórica promoveram respostas diferentes nos dos camundongos. Entretanto, verificou-se que determinados animais submetidos à suplementação não apresentaram as respostas esperadas para este tipo de dieta

suplementada. Este contexto também pode ser observado em animais que receberam a dieta sem suplementação.

A obesidade pode levar a diversas complicações no metabolismo de lipídeos e glicose, como o desenvolvimento de hiperlipidemia, resistência insulínica, diabetes tipo 2, culminando em síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (KENNEDY, 2009). Nesse trabalho é discutido também se a dieta hiperlipídica proposta, resulta em um estado de obesidade e quais parâmetros seriam alterados por isto.

O crescimento dos camundongos ao longo das 16 semanas de estudo, está dentro do esperado, visto que isto é natural e faz parte do crescimento habitual dos animais estudados.

O ganho peso corporal dos camundongos não apresentou diferença comparando-se os grupos durante o experimento, embora fosse um dos objetivos primários do presente trabalho em discussão. A ausência de maior ganho de peso, nos que receberam dieta hiperlipídica, também é observada em outros estudos que utilizam o modelo experimental de dietas com alto teor de gorduras (CATON et al., 2009). A adaptação à dieta hiperlipídica resulta na manutenção da ingestão energética diária dos animais e estes podem não desenvolverem o aumento de peso e obesidade (LARTER; YEH, 2008).

Estudos recentes mostram que o uso de dietas com grandes quantidades de lipídeos, por períodos prolongados, faz com que a quantidade de energia consumida pelos animais caia ao longo das semanas (SOUTH et al., 2014), fazendo com que animais que ingerem ração padrão, tenham o mesmo consumo energético daqueles que fazem uso de dietas hiperlipídica, corroborando com o presente estudo. Vale ressaltar também que a ingestão de lipídeos estimulam a liberação de colecistoquinina, hormônio da saciedade. Neste trabalho, o consumo diário de ração não diferiu entre os grupos, assim como encontrado na literatura, mostrando que embora dietas que apresentem alto teor de gordura estejam associadas a hiperfagia, trabalhos feitos com ratos Wistar também não observaram diferenças no consumo entre dietas padrão e rica em gorduras e a redução de consumo dos animais que consumiram dieta hiperlipídica pode ser devido a este fato (DUARTE et al., 2006).

Sendo assim, a eficiência alimentar, ou seja, conversão de calorias consumidas em peso corporal, manteve-se semelhante entre os grupos, assim como a eficiência energética, calculo da razão entre ganho de peso e consumo energético,

equivalentes a estudos prévios que também fizeram uso de dietas hiperlipídicas em animais (NASCIMENTO, 2006).

Estes dados são conflitantes, pois grande parte da literatura mostra que dietas hiperlipídicas são bons veículos de aumento de peso em modelo animal, comparados a dietas com quantidades normais de gordura (DUARTE et al., 2006).

Observou-se que o uso da dieta hiperlipídica, ou a suplementação do ALA não alterou o peso do tecido hepático, corroborando com estudos recentes, onde a modulação da dieta também não diferenciou controles e suplementados (DUARTE et al., 2006), porém quando o tecido não é corrigido para o peso total do animal, este aparece com um aumento importante modulado pela dieta rica em gorduras (FERNANDES et al., 2011). Em contrapartida, outros estudos mostraram que a suplementação do ALA, pode aumentar o peso do fígado, usado em dietas controle, e diminui-lo, usando em dietas hiperlipídicas (POUDYAL et al., 2012).

Em relação a estudos sobre mudanças no padrão de gordura epididimal, é bem estabelecido que dieta e suplementação de ômega 3/ALA, podem reduzir quantidades deste tipo de gordura, porém, estudos diferem dos resultados encontrados no trabalho atual (POUDYAL et al., 2012), onde não observamos modificações na gordura epididimal com o uso de ômega-3/ALA. Entretanto, estes pesquisadores mostraram que a dieta e a suplementação do ALA, além de reduzir quantidades de gordura epididimal, diminuem também quantidades de gordura subcutânea, englobando todos os tipos de gordura branca (POUDYAL et al., 2012). Corroborando com essa informação, foi mostrado que a suplementação de ALA na dieta hiperlipídica é eficiente nesta redução do padrão de gordura subcutânea. (POUDYAL et al., 2012).

Previamente, pesquisadores demonstraram que a dieta hiperlipídica alterou o peso relativo do pâncreas nos animais suplementados com o ALA comparados aos controles suplementados (CHEN, 2006). Estes autores citam que a redução na massa de células beta e a perda progressiva das mesmas, tem sido responsáveis por indução da resistência insulínica e aparecimento de diabetes mellitus tipo 2 em indivíduos.

O tamanho relativo do músculo gastrocnêmico manteve-se semelhante em todos os grupos estudados. Apesar da similaridade dos resultados, vale ressaltar que a literatura atual faz uma relação de deficiência de insulina que está geralmente associada com atrofia muscular esquelética. Estudos mostram que, após a indução

de diabetes mellitus em animais, utilizando Streptozotocina, ocorrem variações temporais na atividade das diferentes vias proteolíticas no músculo, sendo observado aumento na proteólise muscular na fase aguda e uma redução deste em períodos mais prolongados de deficiência de insulina (CORREIA-SANTOS, 2012). Assim é possível concluir que a redução das reservas lipídicas, podem acarretar em uma perda de massa corporal de animais diabéticos.

Já quando avaliada quantidades de gordura total hepática, esta concorda com resultados encontrados na maioria dos estudos observados em animais e humanos. A dieta hiperlipídica aumenta significativamente a quantidade de gordura presente no fígado, porém a suplementação do ALA muda o padrão de esteatose alterando a distribuição das infiltrações macro vesiculares (POUDYAL et al., 2012). Apesar de serem poucos os estudos descritos na literatura em camundongos, foram encontrados relatos de que o ALA reduziu significativamente quantidades de lipídeos presentes no fígado destes, assim como o presente estudo (RIEDIGER et al., 2008). Estes citam relatos semelhantes em experimentos feitos com óleo de peixe, sugerindo a ideia de que altas concentrações de ALA podem ter uma conversão eficiente de ALA em EPA e DHA, o que pode ter sido fundamental para a similaridade dos resultados.

A suplementação do ALA na dieta rica em gorduras, causou uma redistribuição lipídica, tanto no padrão de tecido adiposo branco, quanto no fígado, reduzindo a esteatose hepática. Estes resultados foram encontrados também, avaliando a quantidade de gordura hepática, utilizando-se a combinação de EPA e DHA, o que mostra que para este fim, a suplementação de ALA induz efeitos similares aos da suplementação de óleo de peixe (RATNAYAKE, 2009).

Estes resultados são reforçados pela análise dos tecidos em avaliação histopatológica, que mostram claramente a mudança no padrão de distribuição lipídica no tecido hepático. Esta mudança de padrão foi confirmada por comparações da literatura que apresentam a mesma redistribuição em animais que fizeram uso de dietas hiperlipídicas suplementadas com ALA (POUDYAL et al., 2012). Neste trabalho, a adiposidade presente no fígado, apresenta um padrão aglomerado nos suplementados, quando comparados aos sem suplementação, com leve tendências de diminuição desta.

Em relação a quantificação de lipídeos séricos, semelhante a resultados descritos previamente, o aumento de valores de HDL encontrado nos animais

controles suplementados, corrobora com resultados observados em camundongos que fizeram uso do também acréscimo de ALA na dieta, em condições semelhantes ao estudo atual (RIEDIGER et al., 2008). Porém estes resultados foram observados em animais que fizeram uso da dieta hiperlipídica suplementada, comparado aos diets hiperlipídica sem suplementação, não tendo como grupo estudado, controles com a suplementação. Entretanto, quanto aos resultados deste trabalho, na comparação entre animais que foram alimentados com dieta hiperlipídica, aos controles, estes resultados entram em conflito com a maioria dos estudos observados, que relatam que grandes quantidades de gordura na alimentação, diminuem significativamente valores de HDL séricos (RIEDIGER et al., 2008).

Valores de colesterol total sérico observados neste estudos, entram em conflito com os estudos encontrados. A maioria dos autores, cita diminuição de valores deste em animais que se alimentaram com dieta hiperlipídica acrescida de ALA, comparado a animais que se alimentaram de somente dieta hiperlipídica, indicando a similaridade com resultados de estudos que usaram EPA e DHA (RIEDIGER et al., 2008) (POUDYAL et al., 2012). Contudo, quando tratam-se dos controles, o aumento de CT nos animais suplementados com ALA, corrobora com achados da literatura que estudaram o efeito de diversos ácidos graxos em ratos (POUDYAL et al., 2012).

Quando quantificado no tecido hepático, valores de colesterol total diferem da literatura, que mostra similaridades nestes valores, comparando o uso de ALA em camundongos obesos e controles (RIEDIGER et al., 2008).

Já analisando-se resultados de triglicerídeos totais dosados tanto no soro, quando no fígado, estes concordam com estudo semelhante encontrado. Este mostra que tanto camundongos que fizeram uso de dieta padrão, quanto aqueles com hiperlipídica, suplementados de ALA ou não, mantiveram seus valores semelhantes quando comparados entre si (RIEDIGER et al., 2008). Todavia, são muitas as divergências quanto a isto na literatura, ora mostrando aumento, ora mostrando diminuições, sendo assim, um aprofundamento melhor quanto a isto será necessário para se elucidar os efeitos do ALA neste tipo de delineamento.

No momento do sacrifício, observou-se um aumento na glicemia em jejum dos animais controle que fizeram uso da suplementação de ALA, mas nas comparações entre obesos e controles, não houve diferença importante. Estes resultados corroboram com estudos prévios onde pesquisadores observaram

também a elevações nos níveis de glicose plasmático em ratos, em trabalhos que utilizaram-se de períodos de experimento semelhantes e mesmas condições de aferição (DUARTE et al., 2006). Contudo, entram em conflito com outros estudos que registram ocorrências de hiperglicemia em animais tratados com dieta hiperlipídica (BERNARDES et al., 2004) (CHEIK, 2006), todavia é interessante notar que estes estudos fizeram uso de animais alimentados para a aferição da glicemia, enquanto que no estudo apresentado, as dosagens de glicemia foram realizadas após 8 a 10 horas de jejum.

No que relaciona-se à glicemia de jejum, é bem estabelecida a relação entre o aumento de tecido adiposo ao aumento dos níveis plasmáticos de glicose após indução por dieta hiperlipídica. Contudo, o tempo de observação desse fenômeno é variável, onde alguns autores observaram, em camundongos C57BL/6J, aumento da glicemia após 12 semanas de dieta hiperlipídica, enquanto que outros observaram esse efeito somente após 20 semanas de tratamento (HOGAN et al., 2011).

Entretanto, a administração da dieta hiperlipídica suplementada com o ALA durante o experimento tendeu a reduzir os valores de insulina circulantes sem alterar significativamente a glicemia de jejum desses animais. Embora estudos tenham registrado hiperinsulinemia como efeito agudo da administração de dieta hiperlipídica (CRUCIANI et al., 2005), nossos dados mostraram que, após 8 semanas de dieta, a insulinemia se normalizou corroborando com trabalhos mais recentes que fizeram uso da administração da dieta semelhantes a este (DUARTE et al., 2006).

Na literatura observa-se que, em um quadro de obesidade associada à resistência à insulina, inicialmente, há um aumento dos níveis de insulina na tentativa de manter a homeostase glicêmica. Contudo, com o tempo, haveria uma exaustão das células β pancreáticas, responsáveis pela produção deste hormônio, e consequente queda nos níveis de insulina, com intolerância à glicose e hiperglicemia, caracterizando um quadro de diabetes do tipo 2 (WHITE et al., 2013). No presente estudo, mostrou-se que o aumento de gordura saturada na dieta favoreceu o desenvolvimento da resistência à ação da insulina, sendo possivelmente pela exaustão das células β . Desta maneira, extrapola-se que o tempo necessário para desenvolver anormalidades na secreção insulínica pancreática, possa estar condicionado à percentagem de lipídios contidos na dieta.

Quando calculados os índices HOMA, a dieta hiperlipídica ou a suplementação do ALA, não foram suficientes para alterar valores do HOMA- β ., sugerindo que a capacidade funcional das células β -pancreáticas não sofreu alteração verificada por meio do aumento do Homa- β . Estes resultados corroboram com estudos que mostram ilhotas pancreáticas de tamanho normal, níveis normais de insulina e Homa- β normal foram encontrados em grupos tratados com dieta hiperlipídica (SOUZA-MELLO et al., 2010). No entanto, é descrito que na vigência de resistência à insulina, as ilhotas hipertrofiam e hipersecretam insulina numa tentativa de compensar a reduzida captação de glicose e normalizar a glicemia até que ocorra a exaustão pancreática (BONORA, 2008).

Analisando o efeito do uso do ALA nos animais que se alimentaram de dieta hiperlipídica, no que concerne ao HOMA-IR, este corrobora com estudos encontrados que citam a diminuição deste índice, em camundongos que também se alimentaram de dieta hiperlipídica, mas fizeram uso de exercício físico, com aqueles que se alimentaram desta mesma dieta, porém mantiveram-se sedentários (VIEIRA et al., 2009). Extrapolando este resultados, o uso do ALA tem efeitos semelhantes ao exercício físico em obesos, quanto aos benefícios sobre a resistência insulínica.

Porém, no presente estudo não foi observado um aumento do HOMA-IR nos animais do grupo obeso, comparados ao controle, divergindo da maioria dos casos descritos de resistência insulínica induzida por alimentação ricas em gordura (VIEIRA et al., 2009).

O uso do ALA como fator de diminuição da resistência à insulina, utilizando valores do HOMA-IR para esta análise, os dados obtidos neste estudo são semelhantes aos encontrados por outros autores, o que reforça o efeito positivo desta suplementação (ENOS et al., 2014). Segundo Enos et al, a suplementação de ALA por 12 semanas reduz os valores de HOMA IR em camundongos obesos. Este mesmo estudo também sugere que quanto maior é o tempo de suplementação, maior é a eficiência do ALA, e isto se deve provavelmente à capacidade deste em conversão de EPA e DHA, e diminuição da presença de ômega 6 circulantes. É importante destacar que o trabalho em questão apresentou dados semelhantes em apenas 8 semanas de tratamento, sugerindo que os efeitos do ALA em metabolismo energético podem ser mais precoces.

Ainda tentando estabelecer comprovações a respeito da resistência insulínica dos animais do presente estudo, foi analisada a curva sob a área de glicose do gráfico do teste de tolerância. Os resultados observados corroboram com a grande maioria dos estudos encontrados que tratam sobre este assunto. A dieta hiperlipídica aumenta significativamente valores da área sob a curva do teste de GTT, comparados aos que receberam alimentação normolipídica (CORREIA-SANTOS et al., 2012). Estes autores do estudo citado também determinaram a área sob a curva da glicose, onde foi maior nos animais alimentados com a dieta rica em lipídeos, em relação aos animais que receberam dieta padrão, apresentando características de intolerância à glicose. Este também fizeram a comparação com animais induzidos com Streptozotocina, com um aumento relativamente grande, e significativamente importante da área da curva do teste de tolerância, extrapolando a comparação dos animais deste estudo induzidos à obesidade com dieta, ao modelo animal que reproduz a história natural e as características metabólicas comuns da diabetes tipo 2 em humanos (CORREIA-SANTOS et al., 2012).

Entretanto, quando comparados animais que receberam a suplementação na dieta hiperlipídica com os que receberam esta sem a adição do ALA, é observado que o ALA modula o teste, mostrando que as áreas sob as curvas destas, quando comparadas, fazem com que o grupo suplementado tenha uma área menor dos animais sem a suplementação. Este mesmo resultado foi encontrado em estudo que usou a suplementação de TRAIL/apo2L. Usado como anticancerígeno, o tratamento com TRAIL reduziu significativamente a hiperglicemia e a hiperinsulinemia durante o IPGTT exibida por ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Coerente com isso, tratamento com TRAIL melhorou sua resposta periférica à insulina, diminuindo os níveis de glicose significativamente durante um ITT (BERNARD, 2012). Usado como um potencial terapêutico anti-aterosclerótica e anti-diabetogênico, podemos comparar o uso do ALA, como um melhorador da diabetes mellitus, devido às suas propriedades pró-apoptóticas contra macrófagos ativados e células T (BERNARD, 2012).

Em resumo, foi possível observar por estes resultados do trabalho em questão, os benefícios da utilização do ômega 3/ALA, em camundongos obesos, induzidos por dieta, no controle da resistência insulínica.

No presente estudo, foram explorados também os efeitos do ômega 3/ALA, assim como da dieta rica em lipídeos, em alguns marcadores inflamatórios presentes na corrente sanguínea dos camundongos.

Dosado sericamente, valores de TNF α não apresentaram nenhuma diferença entre os grupos estudados, assim como estudos encontrados em humanos, que fizeram uso de óleo de linhaça diariamente por 8 semanas e também não notaram mudanças neste padrão, comparados ao uso de óleo de peixe, usado pelo mesmo período de tempo (KONTOGIANNI, et al., 2012). Porém, em outros estudos valores séricos de TNF α aumentam significativamente em camundongos que se alimentaram com dieta hipergordurosa, comparados àqueles que fizeram uso de dieta controle, sem diminuição quando estes animais passam por períodos de exercício físico diário ou restrição calórica na dieta (WASINSKI, 2013). Por outro lado, em estudos com suplementação de óleo de canola, também rico em ALA, foram observadas reduções significativas de TNF α presentes no soro de animais (GUEBRE-EGZIABHER, 2008). No entanto, o pequeno tamanho da amostra destes estudos e poucas características a respeito da intervenção dietética, não podem permitir quaisquer conclusões sobre os impactos do ALA sobre este marcador inflamatório. Outros autores também citam a diminuição de valores séricos de TNF α em ratos engordados com dieta hiperlipídica e diabéticos induzidos por Streptozotocina, que receberam a suplementação oral, por gavagem, de ômega 3/ALA diariamente por 4 semanas (XIE et al., 2011).

A suplementação do ômega 3/ALA, nos grupos estudados, parece não ter efeitos sobre valores séricos de IL17. Confirmando valores encontrados neste estudo, autores citam também ausência de alterações desta citocina, em camundongos tratados com ômega 3 (EPA/DHA), comparados a grupos semelhantes tratados com ômega 9 (CARDOSO et al., 2010).

Reduções nos valores da citocina MCP1, assim como no presente trabalho, foram encontrados em estudos que fizeram uso de 60 minutos de atividade física diária, por 16 semanas, em camundongos que se alimentaram com dieta rica em gorduras (WASINSKI, 2013). Esta diminuição em valores séricos de MCP1 também foi encontrada por outros pesquisadores que observaram a influência da perda de peso em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica seguida de período de restrição calórica (WANG, et al., 2011).

Observando o estudo atual, valores de IL6 dosados no sangue dos animais, tiveram uma redução significativa, contrário a dados da literatura que citam um aumento considerável em animais que passaram por períodos diários de exercício físico durante 16 semanas, porém, estes valores caem bruscamente quando estes animais passam por períodos de intervenção dietética com teores reduzidos de lipídeos na alimentação, corroborando a achados do presente trabalho (WASINSKI, 2013). Reforçando o resultado encontrado no estudo atual, outros autores também citam a diminuição de valores séricos de IL6 em ratos obesos e diabéticos, engordados com dieta hiperlipídica e induzidos por Streptozotocina, que receberam a suplementação oral e por gavagem, de ômega 3/ALA diariamente por 4 semanas (XIE et al., 2011)

O mesmo acontece com a IL1 β , onde estudos citam que após intervenção dietética, ou exercícios físicos, em animais obesos induzidos por dieta hiperlipídica, os valores séricos de IL1 β diminuem, aproximando-se dos valores de animais do grupos controle, que tiveram uma alimentação equilibrada (WASINSKI, 2013). Outros autores também demonstraram que o aumento da ingestão de ALA pode induzir efeitos anti-inflamatórios através da inibição de IL1 β , assim como IL6 e TNF α citados no estudo, em cultura de células monocleares do sangue periférico (ZHAO et al., 2007). Os mecanismos pelos quais os ácidos graxos alimentares inibem a produção de citocinas não são claros até agora.

Adicionalmente, outros estudos mostram que dietas a base de semente de linhaça, ou seja, ricas em ômega 3/ALA, tem ações benéficas no organismo, podendo inibir aterosclerose via antiproliferativa e ações anti-inflamatórias em um nível celular (DUPASQUIER et al., 2007).

Tomados em conjunto, estes resultados são de grande relevância quando é considerado o papel do ômega 3/ALA no controle da resposta inflamatória em camundongos induzidos a obesidade.

Recentemente, foi demonstrado que a obesidade induz ao estresse do retículo endoplasmático, e este, por sua vez, desempenha um papel central no desenvolvimento da resistência à insulina e diabetes (Ozcan et al., 2004).

Neste presente estudo, foi observado alterações no estresse do RE, em fígado de animais induzidos, ou não, a obesidade por dieta hiperlipídica, e tratados com ômega 3/ALA.

A proteína *Heat Shock* 70 – HSP70, uma proteína chaperona que desempenha importante papel na diminuição do estresse do RE, esta relacionada com a recuperação das proteínas desnaturadas ou mal-formadas em situações de estresse (NEGRATO et al., 2013). A diminuição significativa em níveis de HSP70 foi relatada por pesquisadores que estudaram o fígado de ratos machos agudamente estressados (FILIPOVIC et al., 2008). No trabalho em questão, foi observado que a suplementação do ALA tem efeito modulador no estresse do retículo endoplasmático, visto que níveis da proteína HSP70 foram significativamente maiores nos grupos que fizeram uso do ômega 3.

A também proteína chaperona, BIP (GRP78), teve um aumento significativo induzido pela suplementação do ALA. O aumento desta proteína, associado a diminuição da ativação do estresse do retículo endoplasmático, também foi encontrada por outros pesquisadores, que observaram uma expressão aumentada da BIP em fígado de camundongos obesos que tiveram uma melhora da ativação do estresse do RE associado a diminuição da resistência insulínica e diminuição da esteatose hepática (KAMMOUN et al., 2009). Entretanto, ao contrário do estudo atual, o uso de ALA não foi capaz de promover um aumento na expressão da proteína BIP, em cultura de células renais, com ativação do estresse do retículo endoplasmático promovido pelo uso de ácido palmítico, (KATSOULIERIS et al., 2009). O ácido palmítico é relatado como um significativo produtor de aumento da expressão de marcadores do estresse do retículo endoplasmático, que também foi considerado um importante causador de apoptose celular (ZHANG et al., 2011) (KATSOULIERIS et al., 2009).

Por outro lado, a suplementação do ômega 3/ALA parece não ter efeito sobre a proteína XBP1 nos obesos, não alterando sua expressão. No entanto, quanto ao grupo dos controles, esta teve uma diminuição significativa na expressão, contrário ao objetivo inicial deste trabalho, pois pesquisadores demonstraram que em situações de ativação do estresse do retículo endoplasmático, a expressão da XBP1 está diminuída (LIN et al., 2007). Paralelamente, outros autores também correlacionam a expressão da XBP1, em adultos obesos resistentes a insulina, que tinham a expressão desta proteína aumentada no fígado e tecido adiposo, e tiveram reduções significativas desta expressão após cirurgia bariátrica com consequente redução de peso (BODEN et al., 2008).

A proteína reguladora de glicose, GRP94, também não sofreu efeitos da suplementação do ômega 3/ALA no trabalho em questão. Desta maneira, estes resultados observados, corroboram com estudos encontrados a respeito da expressão desta proteína. Em outros estudos também não foram observadas alterações na expressão da GRP94 em fígado de porcos, induzidos a deficiência de ascorbato por dieta, para ativação do estresse do RE, suplementados com altas doses de vitamina C para inibição desta ativação (MARGITTAI et al., 2005).

Semelhantemente, a proteína DAPK1, não apresentou alterações através da suplementação do ômega 3/ALA, tanto nos controles quanto no grupo do obesos do estudo atual. Recentemente, foi descoberto que o estresse do RE promove uma atividade catalítica da DAPK1; esta desempenha um papel crucial na sinalização do estresse do RE, transmitindo sinais do estresse para duas direções distintas, tanto para a ativação de caspase e autofagia, e conduzindo para apoptose celular (GOZUACIK et al., 2008). Estes pesquisadores relacionaram morte celular induzida por DAPK1, envolvendo a ativação do estresse do retículo endoplasmático em camundongos (GOZUACIK et al., 2008).

A suplementação o ômega 3/ALA também parece não ter efeitos sobre a proteína IRE1 α nos animais deste estudo. Estudos encontrados na literatura, mostram que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por 2 semanas, com aproximadamente 60% de lipídeos, não apresentaram alterações na expressão de IRE1 α , avaliados no fígado, comparando-os com os que tiveram alimentação normolipídica, porém outro grupo de animais que receberam dieta rica em frutose, tiveram a expressão de IRE1 α aumentada (REN et al., 2012). Estes pesquisadores também relacionam este aumento de IRE1 α , com aumento do estresse ER como um importante mecanismo integrando várias vias que levam à resistência à insulina durante a obesidade (REN et al., 2012).

Por outro lado, corroborando com o presente trabalho, o uso do ALA desenvolveu um papel protetor capaz de reduzir significativamente a expressão da proteína CHOP em cultura de células renais que tiveram o estresse do retículo endoplasmático promovido pelo uso de ácido palmítico (KATSOULIERIS et al., 2009). Outros pesquisadores também observaram modificações na ativação do estresse do RE, assim como o estudo em questão, em cultura de hepatócitos, que na presença de ômega 3/ALA, o estresse do RE, mediado por ácido palmítico foi significativamente reduzido, principalmente pela redução da expressão da CHOP

(ZHANG et al., 2011). No mesmo conceito, os mesmos pesquisadores também observaram que o uso do ALA é benéfico em diminuições na expressão da CHOP, em cultura de hepatócitos incubados com ácido esteárico para a ativação do estresse do RE (ZHANG et al., 2011).

Em resumo, todos estes resultados confirmam a hipótese inicial do trabalho e demonstram que a esteatose hepática, a resistência a insulina, a via inflamatória e o estresse de retículo endoplasmático em tecido hepático, ativados pela obesidade, podem ser reduzidos pela suplementação do ômega 3/ALA.

Entretanto alguns dos dados encontrados neste trabalho divergem da literatura, sendo necessário um maior aprofundamento sobre os benefícios o ômega 3/ALA, assim como o consumo da linhaça como alimento funcional.

Dados recentes mostram que o consumo de alimentos funcionais, como a linhaça, correspondem a 5 a 7% do mercado mundial de alimentos, porém há uma demanda excessiva destes e paralelamente uma dificuldade efetiva de comprovação de resultados do consumo destes alimentos (COLLI et al., 2009).

Por outro lado, o Brasil é rico em produtos naturais e alimentos ainda inexplorados, assim, cabe aos pesquisadores, cientistas e profissionais da área da saúde, dirigir pesquisas que possam comprovar a eficácia, e possíveis riscos, da utilização destes alimentos, entre outros.

Conclusão

CONCLUSÃO

Diante dos resultados aqui apresentados e discutidos anteriormente, pode-se concluir que a dieta hiperlipídica proposta foi capaz de:

- alterar metabolicamente o modelo animal estudado, através de aumento da área sob a curva de glicose do teste de IPGTT, e valores de gordura total hepática, quantidades de gordura subcutânea, e valores de colesterol total sérico.

Pode-se concluir também que a suplementação de ômega 3/ALA foi capaz de:

- aumentar a sensibilidade à insulina através de diminuição da área sob a curva de glicose do teste de IPGTT, e valores do índice HOMA-IR;
- reduzir a esteatose hepática, nos animais que se alimentaram com dieta hiperlipídica, mudando o padrão de distribuição de gordura hepática, assim como quantidades totais desta no fígado;
- reduzir o processo inflamatório subclínico, associado a resistência insulínica, com diminuição das citocinas MCP1, IL6 e IL1 β no sangue dos camundongos obesos;
- reduzir a ativação do estresse do retículo endoplasmático através do aumento das proteínas BIP e HSP70 e redução da proteína CHOP.

Em resumo, houveram mudanças nos efeitos metabólicos e em mecanismos envolvidos com o desenvolvimento da resistência insulínica, favorecidos pela suplementação do ácido graxo alfa-linolênico, em modelos animais de obesidade induzida por dieta.

Anexos

Anexo 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal

3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 010/2013-1, sobre o projeto intitulado “*Efeitos Metabólicos do ácido graxo ômega-3 no tecido hepático de modelos animal de resistência insulínica.*”, sob a responsabilidade da **Professora Doutora Maria Cristina Foss de Freitas** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 25 de março de 2013.

We certify that the protocol nº 010/2013-1, entitled “*Metabolic Effects Of Omega-3 Fatty Acid in Liver Tissue From Animal Models Of Insulin Resistance*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 03/25/2013.

Ribeirão Preto, 25 de março de 2013.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal FMRP-USP

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADER, M., Bergman, R.N., Peripheral effects of insulin dominate suppression of fasting hepatic glucose production. *Am J Physiol.* 1990; 245: E1020-E1032.

ADLER, A.I., et al., Lower prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes associated with daily seal oil or salmon consumption among Alaska Natives. *Diabetes Care*, 1994. 17(12): p. 1498-501.

ASSELAH, T., Bieche, I., Mansouri, A., Laurendeau, I., Cazals-Hatem, D., Feldmann, G., Bedossa, P., et al. In vivo hepatic endoplasmic reticulum stress in patients with chronic hepatitis C. *J Pathol* 2010; 221:264-274.

Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica - ABESO. Custos da obesidade no Brasil e no mundo [online]. Disponível em: <http://www.abeso.org.br/>.

Badolato ESG, Carvalho JB, Tavares M. Determinação do ácido eico- sapentaenóico (EPA) em óleo de sardinha brasileira e em suplementos alimentares à base de óleo de sardinha. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 1991; 51(1-2):75-81.

Barceló-Coblijn G, Murphy EJ. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog Lipid Res* 2009; 48(6): 355-374.

Belda MCR, Pourchet CMA. Ácidos graxos essenciais em nutrição: uma visão atualizada. *Ciênc Tecnol Aliment.* 1991;11(1):5-35.

Bernardes D, Manzoni MSJ, Souza CP, Tenório N, Dâmaso AR. Efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação sobre o metabolismo de recuperação ao exercício em ratos. *Rev Bras Educ Fis Esp.* 2004; 18(2):191-200.

BERNSTEIN, H., Payne, C.M., Bernstein, C., Schneider, J., Beard, S.E., Crowley, C.L., Activation of the promoters of genes associated with DNA damage, oxidative stress, ER stress and protein malfolding by the bile salt, deoxycholate. *Toxicol Lett* 1999;108:37-46.

- BERRIDGE, M.J., The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium*, 2002. 32(5-6): p. 235-49.
- BLIGH, E. G., Dyer, W. J. , A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v37, p.911-917, 1959.
- Boden G, Duan X, Homko C, et al. Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes*. 2008; 57:2438–44.
- BONORA, E. Protection Of Pancreatic Beta-Cells: Is It Feasible? *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, v. 18, n. 1, p. 74-83, jan. 2008.
- BORGES, R.L., et al., [Impact of weight loss on adipocytokines, C-reactive protein and insulin sensitivity in hypertensive women with central obesity]. *Arquivos Brasileiros De Cardiologia*, 2007. 89(6): p. 409-14.
- Born F. W-3 products; from research to retail. *World Review of Nutrition and Dietetics*. 1998;83:166-75.
- BOUCHARD, C., Genetics and the metabolic syndrome. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 1995. 19 Suppl 1: p. S52-9.
- BRESLOW, J.L., n-3 Fatty acids and cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2006; 83: 1477-1482.
- BROWNING, L.M., n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation and obesity-related disease. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2003. 62(2): p. 447-53.
- BUCHWALD, H. et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *Jama*; 292(14):1724-37, 2004.
- Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids*. 2001;36(9):1007-24.
- CAMPBELL, P.J., Carlson, M.G., Nurjhan N. Fat metabolism in human obesity. *American Journal of Physiology*. 1994; 266: E600-E605.
- Cardoso C.R. et al. Oleic acid modulation of the immune response in wound healing: A new approach for skin repair / *Immunobiology* 216 (2011) 409–415.

CARVALHO, Kênia Mara Baiocchi de. - Cap8 - Guia de Nutrição: Nutrição Clínica no adulto / coordenação Lilian CUPPARI – 2. ed. rev. e ampl. – Barueri, SP: Manole , 2005 (Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar / editor Nestor Schor)

Caton, S. J., B. Yinglong, et al. (2009). "Low-carbohydrate high-fat diets: regulation of energy balance and body weight regain in rats." *Obesity* (Silver Spring) 17(2): 283-9.

CHANDRA, R.M.; KUTTY, K.M. Immunocompetence in obesity. *Acta Paediatr. Scand*; 69(1): 25-30, 1980.

Cheik, N. Efeitos de diferentes intervenções nutricionais e do exercício físico sobre a regulação hormonal da ingestão alimentar e do metabolismo lipídico em ratos [tese]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 2005.

Chen L, Nyomba BLG. Glucose intolerance and resitin expression in rat offspring exposed to ethanol in utero: modulation by postnatal high-fat diet. *Endocrinology*. 2003; 144(2):500-8.

CHERRINGTON, A.D., Banting Lecture 1997. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. *Diabetes*. 1999; 48: 1198-1214.

Correia-Santos AM, Suzuki A, Anjos JS, Rêgo TS, Almeida KCL, Boaventura GT. Modelo animal de diabetes tipo 2. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2012;45(4): 436-44.

Cruciani-Guglielmacci C, Vincent-Lamon M, Rouch C, Orozco M, Magnan C. Early changes in insulin secretion and action induced by high fat diet are related to a decreased sympathetic tone. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005; 288(1):E1 48-54.

DARA, L., Cheng, J.,Kaplowitz, N., The Contribution of Endoplasmic Reticulum Stress to Liver Diseases. *American Association for the Study of Liver Diseases*, 2011. *HEPATOLOGY*, Vol. 53, No. 5, 1752-1763.

DU, K., Herzig, S., Kulkarni, R.N., Montminy, M., TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science*, 2003; 300:1574-1577.

DUARTE, ACGO et al. High-fat diet and secretory capacity of insulin in rats. *Rev. Nutr.*, Campinas, 19(3):341-348, maio/jun., 2006

Dupasquier CM, Dibrov E, Kneesh AL, et al. Dietary flaxseed inhibits atherosclerosis in the LDL receptor-deficient mouse in part through antiproliferative and anti-inflammatory actions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H2394eH2402.

EIZIRIK, D.L., A.K. Cardozo, and M. Cnop, The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev*, 2008. 29(1): p. 42-61.

Enos RT, et al. (2014) Reducing the Dietary Omega-6:Omega-3 Utilizing α -Linolenic Acid; Not a Sufficient Therapy for Attenuating High-Fat-Diet-Induced Obesity Development Nor Related Detrimental Metabolic and Adipose Tissue Inflammatory Outcomes. *PLoS ONE* 9(4): e94897. doi:10.1371/journal.pone.0094897

ESPOSITO, K., et al., Weight loss reduces interleukin-18 levels in obese women. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. 87(8): p. 3864-6.

FIGUERAS, M., Olivan, M., et al. Effects of eicosapentaenoic acid (EPA) treatment on insulin sensitivity in an animal model of diabetes: Improvement of the inflammatory status. *Obesity*. 2011; 19(2): 362-369.

Filipovic´ D, Gavrilovic´ L, Dronjak S, Demajo M and Radojcic´ MB 2008. Liver glucocorticoid receptor and heat shock protein 70 levels in rats exposed to different stress models. *Physiological Research* 57, 205–213.

FISHER, S.J., Kahn, C.R.,. Insulin signaling is required for insulin's direct and indirect action on hepatic glucose production. *J Clin Invest*. 2003; 111: 463-468.

FLACHS, P., et al. Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. *Clinical Science*. 2009; 116: 1-16.

GIACCA, A., Fisher, S.J., Shi, Z.O., et al. Importance of peripheral insulin levels for insulin-induced suppression of glucose production in depancreatized dogs. *J Clin Invest*. 1992; 90: 1769-1777.

Gozuacik D, Bialik S, Raveh T, Mitou G, Shohat G, Sabanay H, Mizushima N, Yoshimori T, Kimchi A (2008) DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. *Cell Death Differ* 15:1875–1886.

GREGOR, M.F. and G.S. Hotamisligil, Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. J Lipid Res, 2007. 48(9): p. 1905-14.

GREGOR, M.G. and G.S. Hotamisligil, Adipocyte stress: The endoplasmic reticulum and metabolic disease. J Lipid Res, 2007.

Guebre-Egziabher F, Rabasa-Lhoret R, Bonnet F, Bastard JP, Desage M, Skilton MR, et al. Nutritional intervention to reduce the n-6/n-3 fatty acid ratio increases adiponectin concentration and fatty acid oxidation in healthy subjects. Eur J Clin Nutr 2008;62:1287-93.

GUILBERT, J.J., The world health report 2002 - reducing risks, promoting healthy life. Educ Health (Abingdon), 2003. 16(2): p. 230.

HAMAZAKI, K., et al. n-3 Long-chain FA decrease serum levels of TG and remnant-like particle-cholesterol in humans. Lipids. 2003; 38: 353-358.

HARBIGE LS. Fatty acids, the immune response and autoimmunity: a question of n-6 and n-3. Lipids 2003; 38:323:341. doi: 10.1007/s11745-003-1607-z.

HARBIGE, L.S., Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. Lipids. 2003; 38 (4): 323-341.

Hogan S, et al. Dietary supplementation of grape skin extract improves glycemia and inflammation in diet-induced obese mice fed a western high fat diet. J Agric Food Chem. 2011;59:3035-41.

HOSOI, T. and K. Ozawa, Endoplasmic reticulum stress in disease: mechanisms and therapeutic opportunities. Clin Sci (Lond), 2010. 118(1): p. 19-29.

HOTAMISLIGIL, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science, 1993. 259(5091): p. 87-91.

IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Trabalho e Rendimento, Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009, Rio de Janeiro, 2010.

Igarashi M, DeMar Jr JC, Ma K, et al. Upregulated liver conversion of alpha-linolenic acid to docosahexaenoic acid in rats on a 15 week n-3 PUFA-deficient diet. *J Lipid Res* 2007; 48: 152–164.

JUUL, A.B., et al., Effect of perioperative beta blockade in patients with diabetes undergoing major non-cardiac surgery: randomised placebo controlled, blinded multicentre trial. *BMJ*, 2006. 332(7556): p. 1482.

Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, Luquet S, Magnan C, Koike T, et al. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest*. 2009; 119(5):1201–1215.

Katsoulis E. et al. α -Linolenic acid protects renal cells against palmitic acid lipotoxicity via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *European Journal of Pharmacology* 623 (2009) 107–112.

Kennedy A, Martinez K, Chuang CC, LaPoint K, McIntosh M. Saturated fatty Acid-Mediated Inflammation And Insulin Resistance In Adipose Tissue: Mechanisms Of Action And Implications. *J Nutr*. 2009;139:1-4

KEREIAKES, D.J., Willerson, J.T., Metabolic syndrome epidemic. *Circulation*. 2003; 108: 1552-1553.

Kontogianni, MD. Et al. Flaxseed oil does not affect inflammatory markers and lipid profile compared to olive oil, in young, healthy, normal weight adults *METABOLISM CLINICAL AND EXPERIMENTAL* 62 (2013) 686–693.

KOO, S.H., Satoh, H., Herzig, S., Lee, C.H., Hedrick, S., Kulkarni R, et al. PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR-alpha-dependent induction of TRB-3. *Nat Med* 2004; 10:530-534.

KRISHNAN, E.C.; TROST, L.; AARONS, S.; JEWELL, W.R. Study of function and maturation of monocytes in morbid obese individuals. *J. Surgery Research*; 33(2): 89-97, 1982.

KROMANN, N. and A. Green, Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta Med Scand*, 1980. 208(5): p. 401-6.

KUSHNER, R., Managing the obese patient after bariatric surgery: a case report of severe malnutrition and review of the literature. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2000. 24(2): p. 126-32.

LAKKA, T.A., et al., Sedentary lifestyle, poor cardiorespiratory fitness, and the metabolic syndrome. Med Sci Sports Exerc, 2003. 35(8): p. 1279-86.

LAMAS, O.; MARTINEZ, J.A.; MARTI, A. Energy restriction restores the impaired response in over-weight (cafeteria) rats. J. Nutr. Biochem; 15(7): 418-425, 2004.

LAMAS,O.; MARTINEZ,J.A.; MARTI,A. T helper lymphopenia decreases mitogenic response cafeteria diet-induced obese rats. Nutr. Research; 22: 496-507, 2002.

Larter, C. Z. and M. M. Yeh (2008). "Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right." J Gastroenterol Hepatol 23(11): 1635-48.

LAURO, D., Kido, Y., Castle, A.L., et al. Impaired glucose tolerance in mice with a targeted impairment of insulin action in muscle and adipose tissue. Nat Genet. 1998; 20: 294-298.

LIESE, A.D., E.J. Mayer-Davis, and S.M. Haffner, Development of the multiple metabolic syndrome: an epidemiologic perspective. Epidemiol Rev, 1998. 20(2): p. 157-72.

Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, et al. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. Science. 2007; 318(5852):944–949.

LUMENG, C.N., S.M. Deyoung, and A.R. Saltiel, Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. 292(1): p. E166-74.

MAGGARD, M.A., et al., Meta-analysis: surgical treatment of obesity. Ann Intern Med, 2005. 142(7): p. 547-59.

Margittai E. et al., Scurvy Leads to Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in the Liver of Guinea Pigs. J. Nutr. 135: 2530–2534, 2005.

MARTIN, C. A., ALMEIDA V. V., RUIZ,R., et al., Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. Revista de nutrição, 6, 761-770, 2006.

MICHAEL, M.D., Kulkarni, R.N., Postic, C., et al. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. Mol Cell. 2000; 6: 87-97.

MITTELMAN, S.D., Fu, Y.Y., Rebrin, K., et al. Indirect effect of insulin to suppress endogenous glucose production is dominant, even with hyperglucagonemia. J Clin Invest. 1997; 100: 3121-3130.

MONTEIRO, C.A.; CONDE, W.L.; POPKIN, B.M. The burden of disease from undernutrition and overnutrition in countries undergoing rapid nutrition transition: a view from Brazil. Am. J. Public Health; 94(3): 433-434, 2004.

MOULIN, C.M.; MARGUTI, I.; PERON, J.P.S.; et al., Impact of adiposity on immunological parameters. Arq. Bras. Endocrinol. Metab.; 53(2): 183-189, 2009.

Nascimento, André Ferreira do. INFLUÊNCIA DAS DIETAS PADRÃO E HIPERCALÓRICA SOBRE O COMPORTAMENTO CORPORAL E BIOQUÍMICO DE RATOS WISTAR. 2006

Negrato E. et al., Expression of heat shock protein 70 in the liver of extensively and intensively kept heavy pigs. Animal (2013), 7:8, pp 1362–1366.

OH, D.Y., Talukdar, S., et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. Cell. 2010; 142: 687-698.

OKA Y. et al., Heat-shock Pre-treatment Reduces Liver Injury and Aids Liver Recovery After Partial Hepatectomy in Mice. Anticancer Research July 2013 vol. 33 no. 7 2887-2894.

OLIVER, E., et al. The role of inflammation and macrophage accumulation in the development of obesity-induced type 2 diabetes and the possible therapeutic effects of long-chain n-3/PUFA. Proceedings of the Nutrition Society. 2010; 69: 232-243.

OZCAN, U., et al., Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*, 2006. 313(5790): p. 1137-40.

OZCAN, U., et al., Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*, 2004. 306(5695): p. 457-61.

PALMBLAD, J.; HALLBERG, D.; ENGSTED, L. Polymorphonuclear (PMN) function after small intestinal shunt operation for morbid obesity. *Br. Journal Haematol.*; 44(1): 101-108, 1980.

PARK, S.W., et al. Sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2b is a major regulator of endoplasmic reticulum stress and glucose homeostasis in obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences –PNAS*. 2010; 107 (45): 19320-19325.

PERALDI, P., et al., Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J Biol Chem*, 1996. 271(22): p. 13018-22.

PEREIRA, F.A., et al., Impact of marked weight loss induced by bariatric surgery on bone mineral density and remodeling. *Braz J Med Biol Res*, 2007. 40(4): p. 509-17.

PEREIRA, L.O.; FRANCISCHI, R.P; LANCHETA JR., A. H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*; 47(2); 111-127, 2003.

PILON, M., et al., Sec61p serves multiple roles in secretory precursor binding and translocation into the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell*, 1998. 9(12).

Pompeia C, Lopes LR, Miyasaka CK, et al., Effect of fatty acids on leukocyte function. *Braz J Med Biol Res*. 2000;33:1255-68.

Poudyal H. et al. Effects of ALA, EPA and DHA in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012.

Poumes-Ballihaut C, Langelier B, Houlier F, et al. Comparative bioavailability of dietary alpha-linolenic and docosahexaenoic acids in the growing rat. *Lipids* 2001; 36: 793–800.

Ratnayake WM, Galli C. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. *Ann Nutr Metab* 2009;55: 8–43.

REAVEN, G.M., Bernstein, R., Davis, B., et al. Nonketotic diabetes mellitus: insulin deficiency or insulin resistance? *Am J Med*. 1976; 60: 80-88.

Ren L-P, Chan SMH, Zeng X-Y, Laybutt DR, Iseli TJ, et al. (2012) Differing Endoplasmic Reticulum Stress Response to Excess Lipogenesis versus Lipid Oversupply in Relation to Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. *PLoS ONE* 7(2): e30816. doi:10.1371/journal.pone.0030816

Riediger ND et al. 155 Low dietary n-6:n-3 ratio and cardiovascular risk. *European Journal of Nutrition* (2008) Vol. 47, Number 3

SAKKINEN, P.A., Wahl, P., Cushman, M., et al. Clustering of procoagulation, inflammation, and fibrinolysis variables with metabolic factors in insulin resistance syndrome. *Am J Epidemiol*. 2000; 152: 897-907.

SARTIPY, P. and D.J. Loskutoff, Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(12): p. 7265-70.

SCHRAER, C.D., et al., Low fasting insulin levels in Eskimos compared to American Indians: are Eskimos less insulin resistant? *Int J Circumpolar Health*, 1999. 58(4): p. 272-80.

SCHRÖDER, M., Kaufman, R.J., ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research*. 2005; 569: 29-63.

SHOELSON, S.E., J. Lee, and A.B. Goldfine, *Inflammation and insulin resistance*. *J Clin Invest*, 2006. 116(7): p. 1793-801.

SINDELAR, D.K., Balcom, J.H., Chu, C.A., et al. A comparison of the effects of selective increases in peripheral or portal insulin on hepatic glucose production in the conscious dog. *Diabetes*. 1996; 45: 1594-1605.

SJÖGREN, B., Koning, W.A., Holmgeen, H., Möllersöm, E.J., Betrag zur Kennynies der leberthymik (glycogen, phosphor und calcium in des kanin- chenleber). *Pflüger Arch Ges Physiol*. 1938;240:427-36.

SMITH, A.G.; SHERIDAN, P.A.; HARP, J.B.; BECK, M.A. Diet induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus. *J. Nutri.*; 137(5): 1236-1243, 2007.

South T, Holmes NM, Martire SI, Westbrook RF, Morris MJ (2014) Rats Eat a Cafeteria-Style Diet to Excess but Eat Smaller Amounts and Less Frequently when Tested with Chow. *PLoS ONE* 9(4): e93506. doi:10.1371/journal.pone.0093506

Souza-Mello V, Et Al. Tratamento Farmacológico Reverte Remodelamento Ultraestrutural Pancreático Adverso E Resistência À Insulina Em Camundongos C57bl/6 Alimentados Com Dieta Hiperlipídica *Revista Contexto & Saúde Ijuí Editora Unijuí* V. 10 N. 19 Jul./Dez. 2010 P. 81-86

Standby ME. Fish oils in nutrition. New York: Van Nostrand Reinhold;1990. p.313-3.

STEINBROOK, R., Surgery for severe obesity. *N Engl J Med*, 2004. 350(11): p. 1075-9.

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 phospholipid. *Diabetes*, 1991. 40(2): p. 280-9.

TAOUI, M., et al., N-3 polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002. 282(3): p. E664-71.

TODORIC, J., et al. Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia*. 2006; 49: 2109-2119.

TODORIC, J., et al., Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia*, 2006. 49(9): p. 2109-19.

TSUTSUMI, A., et al. Caloric restriction decreases ER stress in liver and adipose tissue in ob/ob mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011; 404: 339-344.

Vieira VJ et al. Effects of Diet and Exercise on Metabolic Disturbances in High Fat Diet-Fed Mice Cytokine. 2009 June ; 46(3): 339–345. doi:10.1016/j.cyto.2009.03.006.

VILARRASA, N., et al., Effect of weight loss induced by gastric bypass on proinflammatory interleukin-18, soluble tumour necrosis factor-alpha receptors, C-reactive protein and adiponectin in morbidly obese patients. Clin Endocrinol (Oxf), 2007. 67(5): p. 679-86.

Wang Q et al., Differential effect of weight loss with low-fat diet or high-fat diet restriction on inflammation in the liver and adipose tissue of mice with diet-induced obesity. Atherosclerosis 219 (2011) 100–108.

Wang Y, Beydoun MA. The Obesity Epidemic in the United States- Gender, Age, Socioeconomic, Racial/Ethnic, and Geographic Characteristics: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis. Epidemiol Rev. 2007; (1): 6-28. PMid:17510091.

Wasinski F et al. Exercise and Caloric Restriction Alter the Immune System of Mice Submitted to a High-Fat Diet. Mediators of Inflammation. Volume 2013.

WEBER, D.J.; RUTALA, W.A.; SAMSA, G.P.; et al., Obesity as a predictor of poor response to hepatitis B plasma vaccine. JAMA; 254(22): 3187-3189, 1985.

WEISBERG, S.P., et al., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest, 2003. 112(12): p. 1796-808.

White, PAS et al. Model of high-fat diet-induced obesity associated to insulin resistance and glucose intolerance. Arq Bras Endocrinol Metab vol.57 no.5 São Paulo July 2013

WHO. World Health Organization. Global database on Body Mass Index. BMI classification. 2007.

XIE N et al., α -Linolenic Acid Intake Attenuates Myocardial Ischemia/ Reperfusion Injury through Anti-inflammatory and Anti-oxidative Stress Effects in Diabetic But Not Normal Rats. Archives of Medical Research Volume 42, Issue 3, April 2011, Pages 171–181.

XU, H., et al., Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J Clin Invest, 2003. 112(12): p. 1821-30.

YOG, R., et al. n-3 Polyunsaturated fatty acids suppress mitochondrial translocation to the immunologic synapse and modulate calcium signaling in T cells. *J Immunol.* 2010; 184: 5865-5873.

Zhang et al. α -Linolenic acid prevents endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of stearic acid lipotoxicity on primary rat hepatocytes. *Lipids in Health and Disease* 2011, 10:81.

Zhang et al. Effect of α -linolenic acid on endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of palmitic acid lipotoxicity in primary rat hepatocytes. *Lipids in Health and Disease* 2011, 10:122.

ZHANG, K. and R.J. Kaufman, The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology*, 2006. 66(2 Suppl 1): p. S102-9.

ZHANG, X., et al., Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*, 2008. 135(1): p. 61-73.

Zhao G, Etherton TD, Martin KR, et al. Dietary α -linolenic acid inhibits proinflammatory cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in hypercholesterolemic subjects. *Am J Clin Nutr* 2007;85:385e391.