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

WALLACE RODRIGUES DE HOLANDA MIRANDA

Efeitos da suplementação do ácido alfa-linolênico no estresse do retículo endoplasmático em tecido adiposo subcutâneo abdominal de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2

Ribeirão Preto
2016

WALLACE RODRIGUES DE HOLANDA MIRANDA

Efeitos da suplementação do ácido alfa-linolênico no estresse do retículo endoplasmático em tecido adiposo subcutâneo abdominal de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2

Tese apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica.

Área de concentração: Clínica Médica

Orientadora: Profa Dra. Maria Cristina Foss-Freitas

Ribeirão Preto

2016

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.

Catalogação na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

De Holanda Miranda, Wallace Rodrigues

Efeitos da suplementação do ácido alfa-linolênico no estresse do retículo endoplasmático em tecido adiposo subcutâneo abdominal de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2, 2016.

86p. cm

Dissertação de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientadora: Foss-Freitas, Maria Cristina.

1. Ácido alfa-linolênico; 2. Estresse do retículo endoplasmático;
3. Tecido adiposo subcutâneo abdominal;
4. Diabetes mellitus tipo 2; 5. Adiponectina.

Wallace Rodrigues de Holanda Miranda

Efeitos da suplementação do ácido alfa-linolênico no estresse do retículo endoplasmático em tecido adiposo subcutâneo abdominal de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.

Tese apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Clínica Médica.

Área de Concentração: Clínica Médica.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 2016.

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À Lívia, minha amada, meiga, companheira de todos os momentos e para toda a vida.

A minha mãe, Suzana, pelo exemplo de determinação e por ser o alicerce dessa e de outras vitórias. Ao Maércio, pela sua torcida e vibração.

Ao meu pai, Pedro Bispo, pela orientação e por ter participado da minha formação ética e moral. À Ana, sempre alegre e participativa.

Aos irmãos, Wesley e Wenderson, presentes nos momentos de dificuldades e felicidades.

Aos irmãos, Ana Letícia e João Pedro, que estão iniciando no mundo dos estudos e ainda terão muitas vitórias.

AGRADECIMENTOS

Aos 20 pacientes voluntários, por terem se comprometido com o estudo, pela paciência e disponibilidade, sem eles o trabalho não seria possível.

A minha orientadora, professora doutora Maria Cristina, pelo estímulo à pesquisa, disponibilidade, presença, auxílio e por ter sido a guia inicial desse mundo da pesquisa.

À médica Patrícia Moreira, parceira do doutorado, sempre presente desde a época da residência, segunda orientadora desse trabalho.

Aos docentes da Divisão de Endocrinologia e Metabologia da FMRP-USP, Ayrton Moreira, Milton Foss, Margareth de Castro, Lea Maciel, Francisco José de Paula e Sonir Antonini, pelos conhecimentos transmitidos, incentivo à pesquisa e oportunidade de aprendizado.

À doutora Diane Rassi, pela ajuda com a biologia molecular.

À técnica do laboratório Maria Aparecida Nunes Ferreira, a Cici, por ajuda constante em todas as fases no laboratório.

À nutricionista doutoranda Rebeca Antunes Beraldo, pela ajuda com as medidas de antropometria.

Ao técnico do laboratório Sebastião, por armazenar o material colhido e dosagens laboratoriais.

Ao corpo de enfermagem da enfermaria de Clínica Médica/Endocrinologia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, pela ajuda na coleta dos pacientes.

RESUMO

DE HOLANDA MIRANDA, WR. **Efeitos da suplementação do ácido alfa-linolênico no estresse do retículo endoplasmático em tecido adiposo subcutâneo abdominal de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2**. 2016. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) está associado a um estado de inflamação crônica e ativação do estresse do retículo endoplasmático (ERE). Nesse contexto, são necessários estudos para encontrar alternativas que melhorem o quadro inflamatório, como os ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 (n-3 PUFA), um conhecido agente anti-inflamatório. Esse estudo teve por objetivo avaliar o efeito da suplementação do ácido alfa-linolênico (ALA, um n-3 PUFA) no estresse do retículo endoplasmático e no estado inflamatório no tecido adiposo subcutâneo abdominal (TASC) em pacientes com DM2. Foi conduzido um estudo duplo-cego, prospectivo, placebo-controlado. Vinte pacientes com DM2 foram randomizados para suplementação com 3g/dia de ALA ou placebo durante 60 dias. O tecido adiposo foi coletado através de punção aspirativa por agulha fina do abdome antes e após a suplementação e os genes e proteínas foram avaliados através de PCR em tempo real e western blot. Foi encontrada, após suplementação, uma redução da expressão gênica do *XBP1* (20%), *sXBP1* (70%) e aumento da expressão gênica do *GRP78* (150%), confirmado na expressão proteica. Além disso, foi encontrado aumento da expressão gênica da adiponectina (90%) e redução da expressão gênica do *IL-6* (80%) e *IRS-1* (60%), sem correlação com a expressão proteica, no tempo pós-suplementação com ALA. Portanto, foi demonstrado que o ALA pode modular o ERE através da via da IRE1/XBP, levando ao aumento das chaperonas (BIP/GRP78), além de um efeito adicional na expressão gênica da adiponectina, IL-6 e IRS-1, o que pode demonstrar um potencial terapêutico do ALA em pacientes com DM2.

Palavras-chave: ácido alfa-linolênico, estresse do retículo endoplasmático, tecido adiposo subcutâneo abdominal, diabetes mellitus tipo 2, adiponectina.

ABSTRACT

DE HOLANDA MIRANDA, WR. **Alpha-linolenic acid supplementation effect on endoplasmic reticulum stress in abdominal subcutaneous adipose tissue from type 2 diabetes mellitus patients**. 2016. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a state of chronic inflammation and activation of endoplasmic reticulum stress (ERS). In this context, studies are necessaries to find new possibilities to improve this inflammation such as the n-3 polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFA) acting as an anti-inflammatory agent. In this study, we aimed to evaluate the effect of n-3 PUFA alpha-linolenic acid (ALA, a n-3 PUFA) supplementation in T2DM patients on the molecular expression of ERS genes in abdominal subcutaneous adipose tissue (SAT). We performed a placebo-controlled study, in a double-blind design with 20 T2DM patients, receiving, randomly, 3g/day of ALA or placebo for 60 days. The adipose tissue was collected by fine-needle aspiration in abdomen before and after the supplementation and the genes and proteins were evaluated by real-time PCR and western blot. It was seen, after the supplementation, a reduction in XBP1 (20%), sXBP1 (70%) and an increase in Grp78 (150%) gene expression, likewise same results in protein concentration. Furthermore, it was observed an increase in adiponectina (90%) gene expression and reduction in IL-6 (80%) and IRS-1 (60%) gene expression, with no correlation to protein expression after supplementation of ALA. Therefore, we have provided evidence that ALA may modulate ERS by the IRE1/XBP pathway leading to an increase in chaperones (BIP/GRP78), additionally its effect on adiponectina, IL-6 and IRS-1 gene expression can demonstrate a therapeutic potential in T2DM.

Keywords: alpha-linolenic acid, endoplasmic reticulum stress, abdominal subcutaneous adipose tissue, type 2 diabetes mellitus, adiponectin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Molécula de adiponectina 19

Figura 2. Função das chaperonas 21

Figura 3. Estrutura molecular da BIP 21

Figura 4. Estresse do retículo endoplasmático 22

Figura 5. Vias de sinalização da UPR 23

Figura 6. Estrutura molecular do ALA 25

Figura 7. Metabolismo dos n-3 PUFA e n-6 PUFA 26

Figura 8. Exemplo da reação de amplificação dos genes *ATF-4* e *ADIPOQ*, com genes endógenos *18S* e *GADPH* 41

Figura 9. Exemplo da curva de Melting dos genes *ATF-4* e *ADIPOQ*, com genes endógenos *18S* e *GADPH* 41

Figura 10. Expressão gênica da adiponectina no tecido adiposo subcutâneo 51

Figura 11. Expressão gênica da *IL-6* no tecido adiposo subcutâneo abdominal 51

Figura 12. Expressão gênica da *XBP1* no tecido adiposo subcutâneo abdominal ... 52

Figura 13. Expressão gênica da *sXBP1* no tecido adiposo subcutâneo abdominal . 52

Figura 14. Expressão gênica da *EIF2AK3* no tecido adiposo subcutâneo abdominal 53

Figura 15. Expressão gênica da *ATF-4* no tecido adiposo subcutâneo abdominal .. 53

Figura 16. Expressão gênica da *ATF-6* no tecido adiposo subcutâneo abdominal .. 54

Figura 17. Expressão gênica da *GRP78* no tecido adiposo subcutâneo abdominal 54

Figura 18. Expressão gênica do *EDEM1* no tecido adiposo subcutâneo abdominal 55

Figura 19. Expressão gênica do *CHOP* no tecido adiposo subcutâneo abdominal..55

Figura 20. Expressão gênica do *IRS-1* no tecido adiposo subcutâneo abdominal...56

Figura 21. Western Blot do monômero da adiponectina no tecido adiposo subcutâneo abdominal 57

Figura 22. Western Blot da adiponectina de alto peso molecular (HMW) no tecido adiposo subcutâneo abdominal.....57

Figura 23. Western Blot da IL-6 no tecido adiposo subcutâneo abdominal.....58

Figura 24. Western Blot da XBP-1 no tecido adiposo subcutâneo abdominal.....58

Figura 25. Western Blot da IRE-1 no tecido adiposo subcutâneo abdominal.....59

Figura 26. Western Blot da BIP no tecido adiposo subcutâneo abdominal 59

Figura 27. Western Blot do IRS-1 no tecido adiposo subcutâneo abdominal.....60

Figura 28. Via de sinalização da UPR.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos iniciadores para qPCR.....42

Tabela 2. Anticorpos utilizados no western blot.....44

Tabela 3. Características clínico-laboratoriais dos indivíduos no início do estudo....47

Tabela 4. Avaliação da composição corporal antes e 60 dias após suplementação de placebo e ALA.....48

Tabela 5. Avaliação da sensibilidade à insulina e controle glicêmico antes e 60 dias após suplementação de placebo e ALA 49

Tabela 6. Avaliação do perfil lipídico antes e 60 dias após suplementação de placebo e ALA.....49

Tabela 7. Avaliação das citocinas séricas e proteína C reativa antes e 60 dias após suplementação de placebo e ALA.....50

LISTA DE ABREVIATURAS

ADIPOQ – Adiponectina

AGLs – Ácidos graxos livres

ALA – Ácido alfa-linolênico

ATF4 – *Activating trasncription factor-4*

ATF6 – *Activating trasncription factor-6*

BIP – *Immunoglobulin heavy-chain-binding protein*

cDNA – DNA complementar

CHOP – C/EBP *homologous protein*

CT – Colesterol total

DHA – Ácido docosaexaenoico

DM – Diabetes mellitus

DM2 – Diabetes mellitus tipo 2

EDEM – *ER degradation enhancing α-mannosidase-like protein*

eIF2α – *Eukaryotic translation initiation factor-2α subunit*

EIF2AK3 – *ER-resident PKR-like eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase3*

EPA – Ácido eicosapentaenoico

ERE – Estresse do retículo endoplasmático

ERAD – *Endoplasmic reticulum degradation associated*

GAPDH – *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GRP78 – *glucose-regulated protein* 78

GPR-120 – receptor ligado a proteína G-120

HbA1c – Hemoglobina glicada

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HOMA-IR – *Homeostasis model assessment insulin resistance index*

IDF – International Diabetes Federation

IKK – *Ikappa kinase*

IL-1 – Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IMC – Índice de massa corporal

IRE1 – *Inositol-requirin enzyme 1*

IRS-1 – Substrato do receptor de insulina 1

JNK – *c-jun N-terminal kinase*

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

n-3 PUFAs – ácidos graxos poli-insaturados ômega 3

n-6 PUFAs – ácidos graxos poli-insaturados ômega 6

NF-kB – *Factor nuclear kappa B*

PERK – *Protein kinase double-stranded RNA-dependent-like ER kinase*

PPAR – *Peroxisome proliferator-activated receptor*

PUFAs – ácidos graxos poli-insaturados

qPCR – *Quantitative polymerase chain reaction*

RE – Retículo endoplasmático

sXBP1 – *spliced X-box binding protein-1*

SREBP1c – *Sterol regulatory element binding protein 1c*

TASC – Tecido adiposo subcutâneo

TAV – Tecido adiposo visceral

TG – Triglicerídeos

TNF-α – *Tumor necrosis factor α* (Fator de necrose tumoral alfa)

TRAF2 – *TNFR-associated factor 2*

UPR – *Unfolded Protein Response*

XBP1 – *X-box binding protein 1*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
1.1 Diabetes mellitus 16
1.2 Tecido adiposo 17
1.3 Adiponectina 19
1.4 Estresse do retículo endoplasmático 20
1.5 Ácido alfa linolênico 24

2 OBJETIVOS 30
2.1 Geral 30
2.2 Específicos 30

3 MATERIAIS E MÉTODOS 32
3.1 Delineamento do estudo 32
3.2 Critérios de inclusão 32
3.3 Critérios de exclusão 32
3.4 Período e local do estudo 33
3.5 Escolha da dose de ala 33
3.6 Randomização 33
3.7 Adesão e reações adversas 34
3.8 Medidas antropométricas 34
3.8.1 Peso corporal 35
3.8.2 Estatura 35
3.8.3 Índice de massa corporal (IMC) 35
3.8.4 Circunferência abdominal 35
3.8.5 Avaliação da composição corporal 36
3.9 Parâmetros bioquímicos e hematológicos 36
3.9.1 Glicemia de jejum 36
3.9.2 Insulinemia de jejum 37
3.9.3 Perfil lipídico 37
3.9.4 Hemoglobina Glicada (HbA_{1c}) 37
3.9.5 Hemograma 37
3.9.6 Proteína C reativa 38
3.10 Citocinas séricas 38
3.11 Adiponectina sérica 38
3.12 *Homeostasis model assessment insulin resistance index* (HOMA-IR) 38
3.13 Punção da gordura abdominal subcutânea 39
3.14 Extração de RNA e qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) 39
3.14.1 Extração de RNA 39

3.14.2 Síntese de cDNA 40
3.14.3 qPCR 40
3.15 Extração proteica e western blot 43
3.15.1 Extração proteica 43
3.15.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida 43
3.15.3 Transferência 43
3.15.4 Incubação com anticorpos 44
3.16 Análise estatística 44

4 RESULTADOS 47
4.1 Adesão e tolerância 47
4.2 Características gerais durante a randomização 47
4.3 Avaliação da composição corporal 48
4.4 Avaliação da sensibilidade à insulina e controle glicêmico 48
4.5 Avaliação do perfil lipídico 49
4.6 Avaliação das citocinas séricas e proteína C reativa 50
4.7 Expressão do gene de adiponectina e IL-6 no tecido adiposo subcutâneo abdominal 50
4.8 Expressão dos genes do estresse do retículo endoplasmático no tecido adiposo subcutâneo abdominal 52
4.9 Expressão do gene IRS-1 no tecido adiposo subcutâneo abdominal 56
4.10 Expressão proteica da adiponectina no tecido adiposo subcutâneo abdominal 57
4.11 Expressão proteica da IL-6 no tecido adiposo subcutâneo abdominal 58
4.12 Expressão proteica do estresse do retículo endoplasmático no tecido adiposo subcutâneo abdominal 58
4.13 Expressão proteica do IRS-1 no tecido adiposo subcutâneo abdominal 60

5 DISCUSSÃO 62

6 CONCLUSÃO 70

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 72

ANEXOS E APÊNDICES 81
ANEXO A – Aprovação da Pesquisa e do Termo de Consetimento Livre e Esclarecido no Comite de Ética em Pesquisa 81
ANEXO B – Cadastro na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde 82
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 83
APÊNDICE B – Avaliação da Contaminação do RNA Total por DNA Através da Espectrofotometria* 86

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes mellitus

O Diabetes Mellitus (DM) caracteriza-se por hiperglicemias crônicas resultantes de defeitos na secreção ou na ação da insulina, ou ambas, e provoca distúrbio no metabolismo dos carboidratos, gordura e proteínas (International Diabetes Federation – IDF – Diabetes Atlas, 2015). É uma enfermidade crônica, complexa, que necessita de cuidados de saúde contínuos com estratégias multifatoriais para a redução do risco, além do controle glicêmico (American Diabetes Association - ADA, 2016).

O DM encontra-se em níveis alarmantes em todo o mundo. A cada ano, mais pessoas vivem com essa condição e, adicionalmente aos 415 milhões de adultos atualmente vivendo com DM (metade sem diagnóstico), existem 318 milhões de adultos com pré-diabetes, com alto risco de desenvolver diabetes no futuro (a projeção para 2040 é de 642 milhões de adultos vivendo com diabetes). O número de pessoas que morrem devido ao DM é cerca de 5 milhões no mundo, ultrapassando outras doenças crônicas como HIV/Aids (1,5 milhões), tuberculose (1,5 milhões) e malária (0,6 milhões). (IDF – Diabetes Atlas, 2015).

O Brasil possui aproximadamente 14,3 milhões de adultos com DM e ocupa a quarta posição no mundo em prevalência, sendo superado pela China (109,6 milhões), Índia (69,2 milhões) e Estados Unidos (29,3 milhões) (IDF – Diabetes Atlas, 2015). Em Ribeirão Preto, no interior do estado de São Paulo, a prevalência de intolerância à glicose e DM foi estimada, respectivamente, em 12,1% e 7,1%, nos adultos, em estudo realizado nos anos de 1996 e 1997 (TORQUATO, 2003). Em 2010 o projeto OBEDIARP, utilizando metodologia semelhante e comparável ao estudo de Torquato (2003), indicou um aumento na prevalência de DM para 15,02% entre os adultos de Ribeirão Preto (MORAES, 2010).

O DM tipo 2 (DM2) corresponde a cerca de 90% dos casos de diabetes e a maioria dos indivíduos (80-90%) apresenta, adicionalmente, outras patologias que caracterizam a síndrome metabólica. Descrita inicialmente por Reaven, em 1988, esta síndrome se caracteriza por níveis elevados de glicemia, obesidade central,

dislipidemia e hipertensão e está associada a uma redução da expectativa de vida dos pacientes com DM2 em 5 a 10 anos, em média, quando diagnosticados de 40 a 60 anos e aumento da mortalidade de 2 a 3 vezes maior, quando comparado com a população geral, tendo como principal causa de morte as doenças cardiovasculares (CAREY, 1997; CORNIER 2008; REAVEN, 1988).

As doenças cardiovasculares e as complicações microvasculares são responsáveis pela grande morbimortalidade no diabetes mellitus. Em todos esses pacientes, os fatores de risco cardiovasculares devem ser investigados, pelo menos, anualmente (dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica, tabagismo, história familiar de doença coronariana precoce e presença de albuminúria), além da investigação de neuropatia diabética (ADA, 2016). As doenças cardiovasculares correspondem à principal causa de morte em pacientes com DM2. Quanto às complicações microvasculares, a hiperglicemia crônica pode levar à retinopatia, nefropatia e neuropatia características do DM2 com elevada morbidade (IDF, 2015).

Alguns fatores estão associados ao aumento da prevalência do DM2, um deles é o fator nutricional. Por exemplo, estudos de coorte levam a conclusão de que o consumo de longa data de carne vermelha, principalmente carne processada, pode resultar no aumento da mortalidade, doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, como câncer colorretal, e DM2 (RICHI, 2015). A perda de peso é fundamental no controle do DM2, no entanto, não está bem claro qual a intervenção dietética é a melhor opção para otimizar o controle glicêmico ou se a perda de peso, por si só, é a principal razão para a melhora no controle, independentemente da reeducação alimentar realizada (dieta do Mediterrâneo, veganismo ou com baixo índice glicêmico, por exemplo). A recomendação da ADA é a redução da ingestão total de energia para promover a perda ponderal como principal foco da reeducação alimentar (EMADIAN, 2015). Novas intervenções terapêuticas servem como base de estudo para um melhor controle do DM2.

1.2 Tecido adiposo

A patogênese do DM2 é complexa e possui a participação de fatores genéticos e ambientais. Dentre os fatores ambientais, o sedentarismo associado à excessiva ingestão calórica, com consequente ganho de peso, tem grande

importância. Foi também comprovada maior relação do DM2 com o aumento da circunferência abdominal do que o aumento do IMC – Índice de Massa Corporal (CAREY, 1997).

O tecido adiposo pode ser dividido em tecido adiposo branco e marrom. O tecido adiposo branco está localizado entre as vísceras (tecido adiposo visceral – TAV) e abaixo da pele (tecido adiposo subcutâneo – TASC) com respostas diferentes a fatores nutricionais, sinais hormonais e processo de envelhecimento. O tecido adiposo marrom, presente na área interescapular, principalmente em crianças, é rico em mitocôndrias, responsável por produção de energia e aumento de temperatura (função termogênica) (MUELLER, 2016).

No TAV, a resistência insulínica é caracterizada pela incapacidade deste hormônio suprimir a lipólise, resultando em níveis elevados de circulação de AGLs (ácidos graxos livres), como pode ser observado em indivíduos obesos e nos pacientes com DM2 (CAMPBELL, 1994; GROOP, 1991). Além disso, o TAV produz várias moléculas pró-inflamatórias, incluindo o TNF-α (*tumor necrosis factor α)*, IL-6 (interleucina 6), e proteína C reativa (VISSER, 1999; WEYER, 2002).

Essas moléculas pró-inflamatórias provocam a resistência sistêmica à insulina e contribuem com a patogênese de várias complicações metabólicas da obesidade, incluindo o DM2 e aterosclerose. A expressão do TNF-α está aumentada no TAV em modelos animais de obesidade e de diabetes, sendo evidenciado que esse aumento é tanto local como sistêmico (HOTAMISLIGIL, 1993; SATTAR, 2014). Estudos comprovam que o TAV está mais intimamente correlacionado às patologias associadas à obesidade do que à adiposidade total (ABATE, 1996; DIPIETRO, 1999; STOLK, 2003).

O TASC apresenta aumento da expressão da adiponectina e do IRS-1 – substrato do receptor da insulina 1, portanto, com positivos efeitos metabólicos, incluindo oxidação dos lipídeos, mobilização energética, aumento na sensibilidade à insulina e efeitos anti-inflamatórios. A ausência dessas funções nas lipodistrofias, por exemplo, é responsável pela elevada prevalência de diabetes, dislipidemias e hipertensão arterial (CASTRO, 2014; MA, 2015; MONTAGUE, 2000).

1.3 Adiponectina

A adiponectina (Figura 1), proteína de 244 aminoácidos, é uma citocina produzida principalmente pelos adipócitos, de peso 30KDa e codificada pelo gene *ADIPOQ*. Identificada em 1995, possui propriedades antiaterogênicas, anti-inflamatórias e reduz a resistência insulínica. Circula na corrente sanguínea na forma de trímeros, oligômeros e polímeros (HMW), em concentração de 5 a 30 µg/mL e sua expressão é regulada de forma relativamente aguda (4-6h) por meio de alimentação ou jejum (SCHERER, 2005).

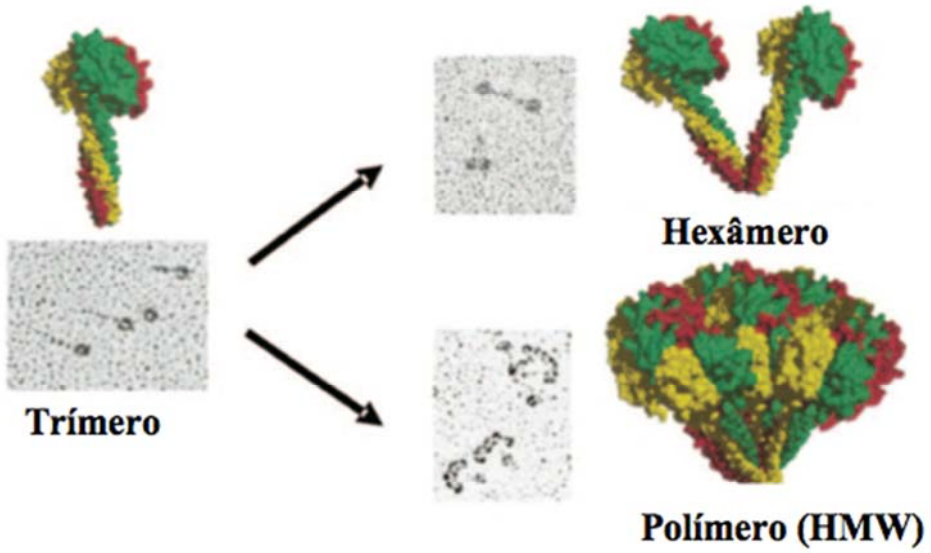

Figura 1. Molécula de adiponectina. Modificado de SCHERER, 2005.

A adiponectina está caracteristicamente reduzida em pacientes com aumento de obesidade visceral e estados de resistência insulínica, como esteatose hepática não-alcoólica. Além disso, adiponectina é considerada um marcador para resistência insulínica, DM2, síndrome metabólica e doença cardiovascular (TAN, 2015).

A adiponectina provoca inibição da IL-6 e foi observado que o polimorfismo nos genes *ADIPOQ* e *IL6* pode contribuir para o risco cardiometabólico em indivíduos obesos (DE OLIVEIRA, 2015). Além disso, quanto menor a concentração de adiponectina em pacientes DM2, maior a incidência de doenças cardiovasculares (WU, 2013).

Um estudo com homens obesos randomizados para atividade física (treino de resistência por 12 semanas, 3 sessões por semana, 20 a 40 minutos por sessão) e

grupo controle sem atividade física demonstrou aumento da concentração de adiponectina e testosterona séricas, sem mudança no peso corporal total, embora com diminuição significativa no percentual de gordura (MORADI, 2014).

Vários estudos sugerem que elevados níveis de adiponectina estão associados às complicações microvasculares em pacientes com DM2. Uma meta-análise avaliou a associação entre níveis de adiponectina e leptina e complicações microvasculares e encontrou associação de altos níveis de adiponectina com microalbuminúria, macroalbuminúria, neuropatia e retinopatia em pacientes com DM2, enquanto os altos níveis de leptina estavam associados apenas à microalbuminúria, macroalbuminúria e neuropatia, sem associação com retinopatia. (RODRIGUEZ, 2016)

Nosso grupo verificou que uma mutação no gene ADIPOQ (p.M40K) pode induzir diabetes, obesidade e síndrome metabólica. Quatorze indivíduos hipoadiponectinêmicos (< 3µg/mL) e 686 normo-adiponectinêmicos (23-25 anos de idade) foram seguidos desde o nascimento e a mutação p.M40K foi identificada em um indivíduo e três outros familiares, em que foi observada uma redução na adiponectina HMW e quadro clínico de DM2, obesidade e síndrome metabólica (BUENO, 2014).

1.4 Estresse do retículo endoplasmático

Nas últimas décadas, vem aumentando a importância do estresse do retículo endoplasmático na fisiopatologia da obesidade, DM2 e síndrome metabólica e outras doenças crônico-degenerativas, como Doença de Alzheimer e Parkinson (HOTAMISLIGIL, 2010; OZCAN, 2004).

O retículo endoplasmático (RE) é responsável pela síntese proteica, lipídica e armazenamento de cálcio. Quando a célula passa por um processo de estresse, como a inflamação crônica, ocorre a síntese de proteínas com defeito na conformação tridimensional (proteínas não enoveladas, *unfolded*, e mal enoveladas, *misfolded*), portanto, não podem exercer sua função. Nas células sem estresse, a proporção de proteínas malformadas é de 5% e são corrigidas, principalmente, pelas chaperonas (Figura 2) existentes no interior do RE, cuja principal função é neutralizar e corrigir as proteínas malformadas, evitando um estado de estresse do RE – ERE (ENGIN, 2010; LEE, 2014).

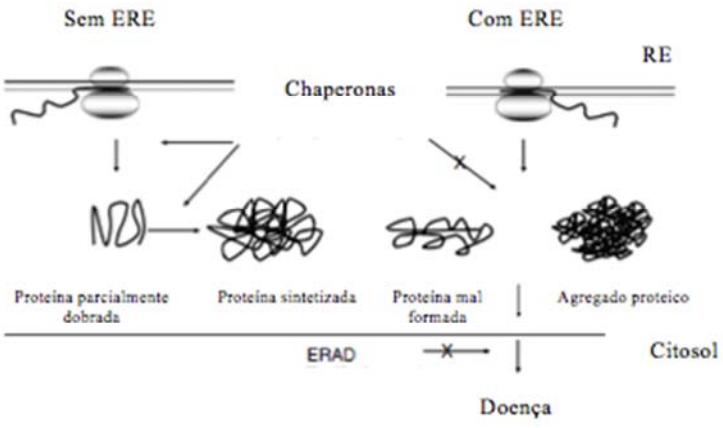

Figura 2. Função das chaperonas. Modificado de ENGIN, 2010.
RE: retículo endoplasmático. ERE: estresse do retículo endoplasmático. ERAD: *endoplasmic reticulum degradation associated*, degradação associada ao RE.

A principal chaperona presente no RE é a BIP (*immunoglobulin heavy-chain-binding protein* ou GRP78 – *glucose-regulated protein* 78), proteína de 70 KDa (Figura 3), considerada principal marcadora do ERE, atua ajudando o enovelamento e impedindo que as proteínas malformadas formem agregados que, além de inúteis, podem ser nocivos à célula (MAYER, 2005; NI, 2007).

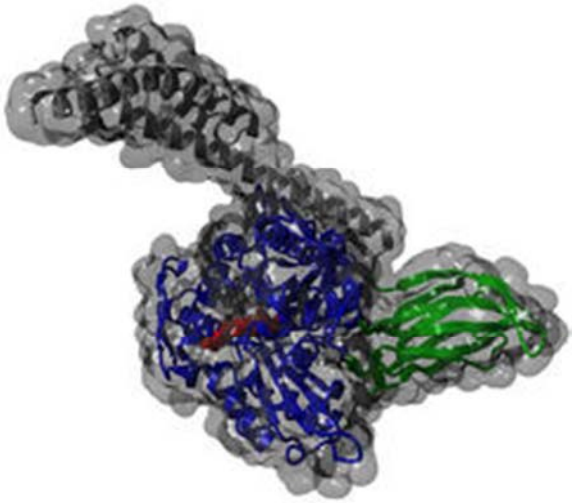

Figura 3. Estrutura molecular da BIP

No caso de insucesso na prevenção do ERE, ocorre ativação de vias intracelulares com o objetivo de levar a um aumento funcional do RE (aumento da síntese das chaperonas) e diminuição da síntese proteica, iniciando o que se conhece por UPR (*Unfolded Protein Response*, resposta às proteínas não-enoveladas), que corresponde a uma resposta ao ERE com objetivo de

reestabelecer a homeostase. A UPR intersecta com várias vias inflamatórias e sinalização de estresse, como as vias da IKK(*Ikappa kinase*) JNK (*c-jun N-terminal kinase*) e estresse oxidativo (PARK, 2010; SCHRÖDER, 2005).

O ERE (Figura 4) é sinalizado através de 3 vias intracelulares, iniciadas através da ativação ou auto-fosforilação de proteínas transmembrana que em situações de normalidade estão ligadas, em sua porção voltada para o interior do RE, a uma chaperona, BIP (Figura 4A). Essas proteínas transmembrana são: PERK (*protein kinase double-stranded RNA-dependent-like ER kinase*), IRE1 (*inositol-requirin enzyme 1*) e ATF6 (*activating trasncription factor-6*) e cada uma delas sinaliza uma via da UPR. Em condições de estresse, ocorre o acúmulo de proteínas malformadas no RE e a BIP é recrutada para correção dessas proteínas (Figura 4B, C), levando a dissociação da BIP das proteínas de membrana PERK, IRE1 e ATF6 (Figura 4D), iniciando a UPR (EIZIRIK, 2008; KALLEN, 2009; SCHRÖDER, 2005).

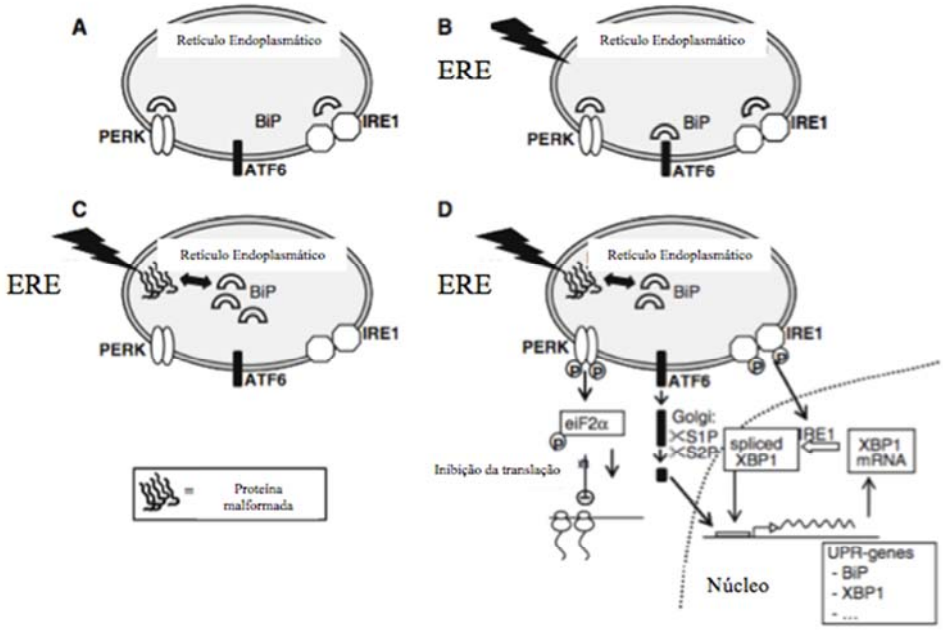

Figura 4. Estresse do retículo endoplasmático. Modificado de KALLEN, 2009. Explicação no texto

A PERK (Figura 5) é ativada após a dissociação da chaperona BIP, sofrendo dimerização e auto-fosforilação, age inibindo a síntese proteica global através da fosforilação do eIF2α (*eukaryotic translation initiation factor-2α subunit*) além de aumentar a tradução do RNAm do ATF4 (*Activating trasncription factor-4*), que estimulam a produção de chaperona e ERAD (*ER associated degradation* – maquinaria que degrada

proteínas malformadas) e enzimas que reduzem o estresse oxidativo. Alternativamente, se o ERE 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 (EIZIRIK, 2008; SCHRÖDER, 2005).

A IRE1 (Figura 5), uma endoribonuclease – RNase, também sofre dimerização e auto-fosforilação 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 (*ER degradation enhancing α-mannosidase-like protein*, proteína transmembrana do RE que degrada as proteínas mal enoveladas). O IRE1 provoca o recrutamento da proteína TRAF2 (*TNFR-associated factor 2*, fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral do tipo 2), podendo ativar as vias inflamatórias do JNK e IKK (EIZIRIK, 2008; HETZ, 2009; SCHRÖDER, 2005).

O ATF6 (Figura 5), após dissociação do BIP, sofre redução e é translocada para o complexo de Golgi e, após reação com proteases (S1P e S2P), resulta em um fator transcricional ativo (p50 ATF6), agindo no núcleo de maneira análoga ao ATF4 e XBP1, ativando fatores de transcrição de genes da UPR (BIP, XBP1) com objetivo de combater o estresse celular (EIZIRIK, 2008; SCHRÖDER, 2005).

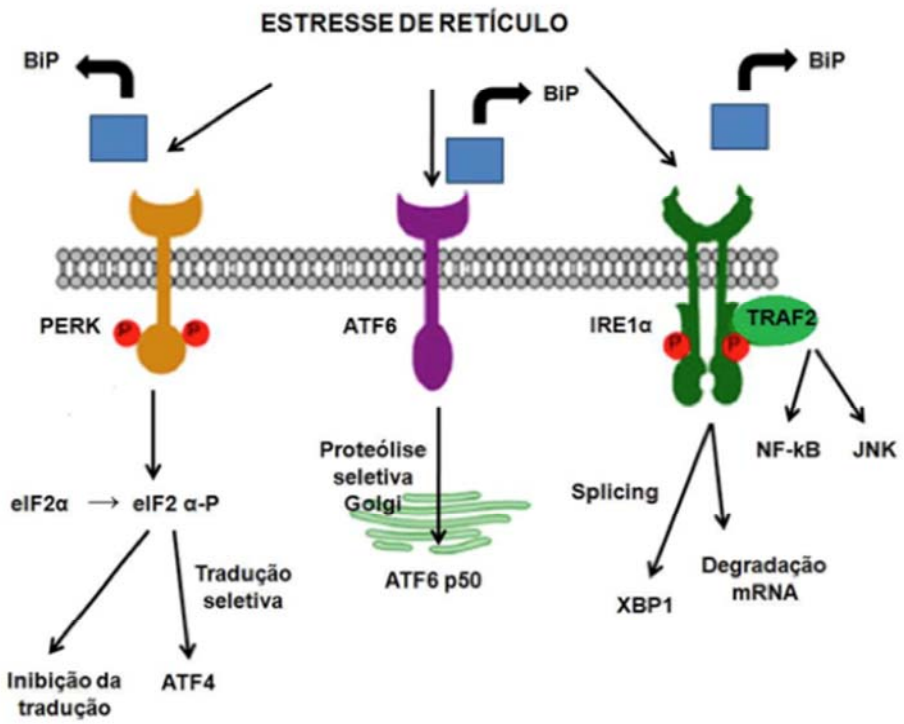

Figura 5. Vias de sinalização da UPR. Modificado de HETZ 2009. Explicação no texto.

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

Nas análises de camundongos e em cultura celular, a expressão do XBP1 parece proteger as células hepáticas tanto do ERE, como da resistência insulínica, associado à resolução da UPR, enquanto que modelos deficientes do XBP1 apresentaram altos níveis de resistência insulínica e ERE (PARK, 2010).

Estudos com humanos foram conduzidos através da comparação do ERE em pacientes com obesidade grau III submetidos à cirurgia bariátrica, com análise do tecido adiposo subcutâneo e tecido hepático coletados no momento da cirurgia, e após 1 ano, através de punção abdominal subcutânea e biópsia hepática, sendo observada uma redução significativa do ERE, além de redução da inflamação (GREGOR, 2009). Outros estudos demonstraram um aumento significativo dos marcadores do ERE no tecido adiposo subcutâneo de humanos obesos quando comparados com humanos não-obesos (BODEN, 2008; SHARMA, 2008).

Atualmente, diversos estudos vêm sendo realizados através da análise do tecido abdominal subcutâneo, seja por coleta durante o intra-operatório, seja por coleta através de punção aspirativa em região justa-lateral à região umbilical sob anestesia local. Esta última tem ganhado mais destaque devido à simplicidade da técnica, maior comodidade ao paciente e pelo fato de poder utilizar pacientes que não sejam submetidos ao procedimento cirúrgico, já que o próprio motivo da cirurgia poderia influenciar na análise dos resultados (KLIMCAKOVA, 2006; LONN, 2010; MUTCH, 2009).

1.5 Ácido alfa linolênico

Diante deste contexto de estado inflamatório crônico, resistência insulínica e ERE presente no DM2, tem crescido a importância de substâncias que atuam

melhorando o estado de estresse dessas vias. Dentre essas substâncias, destacam-se os n-3 PUFAs, ácidos graxos poli-insaturados ômega 3, em que a dupla ligação está no terceiro carbono a partir da extremidade oposta à carboxila. São insaturados por terem mais de uma ligação dupla entre os átomos de carbono e, em relação ao tamanho, são considerados de cadeia longa os que têm mais de 18 átomos de carbono (HARRIS, 1997).

Os mais conhecidos e prevalentes na natureza possuem origem vegetal, ácido alfa-linolênico – ALA (Figura 6) e origem animal, ácidos eicosapentaenoico – EPA – e docosaexaenoico – DHA. O ALA é um n-3 PUFA com 18 carbonos (18:3n-3) encontrado principalmente na linhaça, chia, soja e nozes. O ALA é precursor dos n-3 PUFA EPA (20:5n-3) e DHA (22:6n-3), cuja principal fonte são os peixes marinhos de águas profundas (MOZAFFARIAN, 2006).

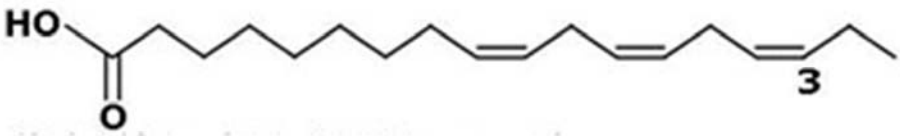

Figura 6. Estrutura molecular do ALA.

Os ácido graxos são importantes para diversas funções e, nos humanos, os n-3 PUFAs, cujo principal representante é o ALA, e os n-6 PUFAs, cujo principal representante é o ácido linoleico (18:2n-6), competem pelo mesmo sítio na membrana celular (Figura 7). Esses ácidos são importantes componentes da membrana celular animal e vegetal, necessários para a manutenção das funções cerebrais, transmissão do impulsos nervoso, transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, síntese da hemoglobina e divisão celular. Portanto, quanto maior a ingestão de n-3 PUFA, maior a proporção desse ácido nas membranas quando comparado com o n-6 PUFA (HARBIGE, 2003; OLIVER, 2010).

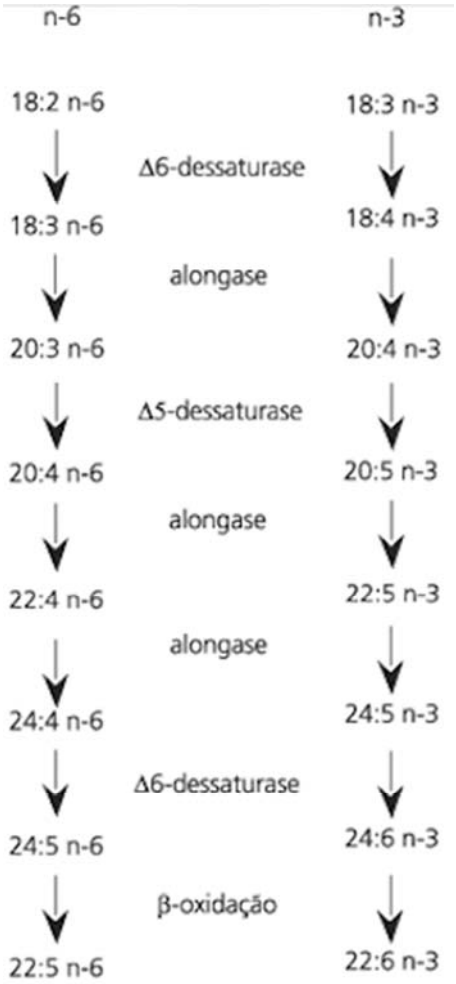

Figura 7. Metabolismo dos n-3 PUFA e n-6 PUFA. Adaptado de MARTIN, 2006. Explicação no texto

O ácido linoleico (18:2 n-6) é encontrado principalmente em carne bovina, além de aves, ovos, leite, queijo, iogurte e óleo de girassol. Os n-6 PUFA são metabolizados em ácido araquidônico e podem, através da ação das ciclo-oxigenases e lipo-oxigenases, ativar vias pró-inflamatórias (prostraglandinas, tramboxanos 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, IL-1 e IL-6) pelos macrófagos (YOG, 2010).

O balanço da ingestão de n-3 PUFA e n-6 PUFA é fundamental para a homeostase e desenvolvimento celular. De maneira geral, existe uma tendência de convergência da razão entre os ácidos graxos PUFA n-6 e n-3 para a relação 4:1 a 5:1, porém as razões 2:1 a 3:1 têm sido recomendadas por alguns autores (MARTIN, 2006).

Úteis em casos de hipertrigliceridemia, os n-3 PUFA 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 n-3 PUFA existe uma baixa prevalência de intolerância a glicose e resistência insulínica. Estudos de intervenção em seres humanos têm demonstrado efeito anti-inflamatório dos n-3 PUFA em pacientes portadores de condições inflamatórias crônicas, como artrite reumatoide, asma, Doença de Crohn e psoríase (BRESLOW, 2006; HAMAZAKI, 2003).

Os n-3 PUFA modulam a expressão gênica de diversos sistemas através da regulação de fatores transcricionais, tais como, PPAR (*Peroxisome proliferator-activated receptor*), fator hepático X e proteína ligante do elemento regulador do esterol 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 hidroximetilgutarial-CoA sintetase e também foi demonstrada a inibição de genes inflamatórios (genes que regulam TNFα, IL-1, IL-8, IL-6, ciclooxigenase-2, molécula de adesão vascular-1, oxido nítrico sintetase, metaloproteinases da matriz e proteínas de fase aguda). Os n-3 PUFA podem agir também através da inibição direta da regulação do NF-kB (*factor nuclear kappa 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 entre macrófagos, tecido adiposo e os efeitos dos n-3 PUFA, ainda necessitam de mais estudos (OH, 2010).

Ou seja, os n-3 PUFA 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, 2011; FLACHS, 2009; TODORIC, 2006).

Nosso grupo mostrou que a suplementação de ALA (3g/dia) por 2 meses, em pacientes com DM2, aumentou os níveis séricos de adiponectina e melhorou a sensibilidade à insulina, observada através do clamp euglicêmico hiperinsulinêmico, mostrando um possível efeito benéfico desse n-3 PUFA no DM2 (GOMES, 2015).

Apesar de existirem vários estudos avaliando a ação do n-3 PUFA no DM2, existem poucos estudos avaliando a suplementação do ALA em pacientes com DM2 e nenhum avaliando essa ação no estresse do retículo endoplasmático do tecido adiposo subcutâneo nesses pacientes.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar os efeitos da suplementação de ALA, em indivíduos diabéticos tipo 2, no estresse do retículo endoplasmático em tecido adiposo subcutâneo abdominal

2.2 Específicos

Em indivíduos diabéticos tipo 2 suplementados ou não com ALA, teve-se como objetivos específicos, avaliar:

1) A expressão da adiponectina no tecido adiposo subcutâneo abdominal;
2) A resistência à insulina em tecido adiposo subcutâneo abdominal;
3) Os processos inflamatórios subclínicos;
4) O controle do metabolismo lipídico;
5) O controle do metabolismo glicídico e da sensibilidade à insulina.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Foi realizado um estudo prospectivo, randomizado, duplo-cego, placebo-controlado. Os voluntários foram selecionados do ambulatório de diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HC-FMRP-USP (13091/2011, ANEXO A) e cadastrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde (CAAE 0300.0.004.000-11, ANEXO B). Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, APÊNDICE A).

Obteve-se financiamento das seguintes agências de fomento à pesquisa:

1) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – processo 471777/2011-0);
2) Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo 2011/09640-7);
3) Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA).

3.2 Critérios de inclusão

Foram selecionados pacientes com diabetes mellitus tipo 2 do sexo masculino ou feminino (não grávidas), com idade entre 20 e 65 anos, com IMC entre 20 e 35 kg/m2, glicemia de jejum entre 100 e 300 mg/dL, hemoglobina glicada menor que 10%. Os indivíduos foram pareados por sexo, idade e IMC.

3.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos indivíduos que usavam insulina, com complicações crônicas do diabetes mellitus em estágios avançados (retinopatia proliferativa, insuficiência

renal crônica, neuropatia autonômica e história de infarto agudo do miocárdio ou acidente vascular encefálico há menos de 6 meses), hepatopatias crônicas ou agudas, neoplasias e uso de anticoagulante sistêmico ou imunossupressores.

3.4 Período e local do estudo

A coleta foi realizada no período de julho de 2012 a outubro de 2013. Foi realizada revisão de prontuários dos pacientes do ambulatório de diabetes do HC-FMRP-USP para identificação dos possíveis voluntários para o estudo. Posteriormente os pacientes foram convidados pelo pesquisador responsável na consulta médica de rotina, explicando de forma mais detalhada como seria a pesquisa e o motivo desta. Ao aceitar o convite, as datas para a primeira e segunda coletas eram agendadas com cada voluntário. Foi utilizada uma sala apropriada na enfermaria de clínica médica do HC-FMRP-USP para as seguintes avaliações: preenchimento dos dados sobre a doença de base, avaliação antropométrica, coleta de sangue para as dosagens laboratoriais gerais, realização da coleta do tecido adiposo subcutâneo abdominal e fornecimento das cápsulas de placebo ou ALA.

3.5 Escolha da dose de ala

A ingestão recomendada de ALA para evitar desfechos cardiovasculares é de 1,1 a 2,2g por dia. Embora existam poucos dados referentes ao limite toxicológico do ALA, geralmente não têm sido reportados efeitos adversos (KIM, 2014). A dose de 3g/dia de ALA foi escolhida por ser a dose usualmente utilizada para tratar hipertrigliceridemia.

3.6 Randomização

As cápsulas foram confeccionadas na cor branca contendo 500 mg de placebo (amido) ou 500 mg de óleo de linhaça liofilizado (50% de ALA) pela equipe

da farmácia industrial do HC-FMRP-USP. As cápsulas foram divididas em frascos de 180 cápsulas, os quais foram numerados com as letras A, B, C e D (placebo ou ALA) e no final do estudo foi descoberta a composição de cada frasco: A e D continham ALA, e B e C, placebo. Os voluntários foram pareados 4 a 4 por sexo, idade e IMC, e após isso foi sorteado para receber um dos 4 frascos. Foi denominado de D0 o dia da primeira avaliação e realização dos procedimentos, e D60 o dia da segunda avaliação. No tempo D0, cada voluntário recebeu 2 frascos, num total de 360 cápsulas, juntamente com uma prescrição médica com orientação de tomar 6 cápsulas por dia, em 2 ou 3 tomadas, durante 60 dias. Foram incluídos 20 participantes, sendo que no final do estudo, após conhecer qual cápsula cada um recebeu, cada grupo ficou com 10 integrantes.

Também foi orientado que os voluntários não fizessem mudanças significativas na quantidade e qualidade da dieta, bem como na atividade física durante o período de intervenção. Após uma semana e um mês de inclusão no estudo, foram feitos contatos por telefone com cada um dos participantes para verificar a aderência e possíveis efeitos colaterais. Um telefone de contato do pesquisador foi deixado por escrito para qualquer eventualidade.

3.7 Adesão e reações adversas

A adesão foi estimada pela relação das cápsulas restantes e o total de cápsulas fornecidas no início do estudo.

Todos os voluntários foram orientados a entrar em contato caso percebessem algum sinal ou sintoma adverso.

3.8 Medidas antropométricas

Foram feitas medidas antropométricas nos tempos D0 e D60 do estudo.

3.8.1 Peso corporal

O peso corporal foi medido com o indivíduo com roupas leves e sem acessórios (relógio, sapatos, carteira, cinto), com a bexiga vazia, em balança digital (Filizola®) do tipo plataforma, previamente calibrada, e com precisão de 0,1kg. O resultado foi anotado em quilogramas e com uma casa decimal após a vírgula.

3.8.2 Estatura

A estatura foi medida em estadiômetro de parede com precisão de 0,5cm, com o indivíduo descalço e em pé, com braços estendidos ao longo do corpo e calcanhares unidos, tocando a haste vertical e posicionados no centro do equipamento. O resultado foi anotado em centímetros.

3.8.3 Índice de massa corporal (IMC)

O IMC foi obtido pela divisão do peso, em quilogramas, pela estatura, em metros, ao quadrado. O resultado foi anotado com kg/m^2.

3.8.4 Circunferência abdominal

Com o paciente em pé, a circunferência abdominal foi medida passando a fita métrica a meia distância entre o rebordo inferior da última costela e a crista ilíaca bilateralmente. O resultado foi anotado em centímetros e uma casa decimal após a vírgula.

3.8.5 Avaliação da composição corporal

A composição corporal foi estimada por bioimpedância elétrica com o aparelho Biodynamics BIA310® (Seattle, EUA), na manhã da coleta, após jejum mínimo de 12 horas. Os indivíduos foram orientados a não ingerir bebida alcoólica e a não praticar exercícios físicos no dia anterior à coleta.

Após a retirada de todos os adornos, o paciente vestiu um avental e ficou na posição de decúbito dorsal. A pele da mão e do pé direitos foi higienizada com álcool a 70% e aguardada a secagem para iniciar a avaliação.

Os eletrodos distais (eletrodos de corrente) foram fixados na superfície anterior do pé, na parte distal do segundo metatarso, e na área posterior da mão, na parte distal do terceiro metacarpo. Os eletrodos proximais (eletrodos de leitura) foram posicionados nas proeminências distais e posteriores do radio e da ulna direitos, e outro eletrodo entre o maléolo da tíbia e fíbula direitas, na superfície anterior.

Posteriormente, foi aplicada uma corrente de 50kHz e determinados os valores de resistência e reatância em Ohm. À partir deste teste, foram estimadas a massa magra (MM) e a massa gordurosa (MG) em quilogramas, e a porcentagem de gordura (% gordura).

3.9 Parâmetros bioquímicos e hematológicos

Foram coletadas amostras de sangue nos tempos D0 e D60 do estudo, logo após a realização da bioimpedância elétrica. O material foi encaminhado imediatamente para o Laboratório Central e Laboratório de Diabetes e Metabolismo do HC-FMRP-USP para análise.

3.9.1 Glicemia de jejum

As amostras foram colhidas em tubos BD Vacutainer® com fluoreto de sódio (Na_2 EDTA 3mg/6mg). A análise foi feita pelo método enzimático (hexoquinase) por fotometria ultravioleta de ponto final, utilizando o aparelho Cobas Mira Plus. O resultado foi dado em mg/dL.

3.9.2 Insulinemia de jejum

As amostras foram colhidas em tubos BD Vacutainer® SST™ II *Advance*, centrifugadas, separadas em alíquotas e congeladas a -70°C para posterior dosagem. A análise foi feita por radioimunoensaio (Coat-a-Count insulin, Siemens Healthcare Diagnostics, Los Angeles, Califórnia, EUA). O resultado foi dado em µU/mL.

3.9.3 Perfil lipídico

Foram colhidas amostras de sangue em tubos BD Vacutainer® SST™ II *Advance* para dosagem de colesterol total (CT), HDL-colesterol (HDL) e triglicerídeos (TG). A análise foi feita por método espectrofotométrico no aparelho COBAS INTEGRA 400 (Roche Diagnostics®). Os valores de LDL-colesterol (LDL) foram calculados segundo a fórmula proposta por Friedwald (1972), exceto quando os valores de TG foram maiores ou iguais a 400 mg/dL. Fórmula de Friedwald: LDL = CT = (TG/5 + HDL).

3.9.4 Hemoglobina Glicada (HbA_{1c})

Foram colhidas amostras de sangue em tubos BD Vacutainer® K2 EDTA. A dosagem foi feita pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

3.9.5 Hemograma

Foram colhidas amostras de sangue em tubos BD Vacutainer® K2 EDTA. A dosagem das diversas séries foi feita pelo método de contagem global automatizada.

3.9.6 Proteína C reativa

Foram colhidas amostras de sangue em tubos BD Vacutainer® SST™ II *Advance,* e as dosagens feitas por turbidiometria. Os valores ficaram expressos em mg/L, sendo os valores normais abaixo de 0,5mg/L.

3.10 Citocinas séricas

As amostras foram colhidas em tubos BD Vacutainer® SST™ II *Advance*, centrifugadas, separadas em alíquotas e congeladas a -70°C para posterior dosagem. A análise das citocinas interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e *tumor necrosis factor* (TNF-α) foi feita por ELISA usando *kit* Multiplex (Merck Millipore, Texas, EUA).

3.11 Adiponectina sérica

As amostras foram colhidas em tubos BD Vacutainer® SST™ II *Advance*, centrifugadas, separadas em alíquotas e congeladas a -70°C para posterior dosagem. A análise da adiponectina total foi feita pela técnica de ELISA (Merck Millipore, Texas, USA).

3.12 *Homeostasis model assessment insulin resistance index* (HOMA-IR)

A sensibilidade à insulina foi estimada pelo método indireto HOMA-IR, o qual tem mostrado boas correlações quando comparado com o *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico (STERN, 2005). Foi utilizada a seguinte fórmula para o cálculo do HOMA-IR:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Glicemia de Jejum (mmol/L) x Insulina Basal (µU/mL)}}{22{,}5}$$

Definiu-se, como ponto de corte para resistência à insulina, valores de HOMA-IR maiores que 2,71. (GELONEZE 2000, 2009).

3.13 Punção da gordura abdominal subcutânea

O tecido adiposo subcutâneo abdominal foi coletado por punção aspira sob anestesia local (lidocaína 2% com vasoconstrictor), depois de adequada antissepsia com clorexidina 2%. A região puncionada quadrangular (3 x 3 cm) localizada em quadrante ínfero-lateral abdominal (lateral à linha média e inferior à cicatriz umbilical) a 2 cm lateralmente da cicatriz umbilical. A punção foi realizada com agulha hipodérmica 16G (1,6 x 40 mm) introduzida acoplada a seringa de 20 mL, após a introdução foi realizado o vácuo na seringa para proceder com a punção e respeitando o mesmo local de entrada e introduzida novamente em direções tangenciais, com adequada coleta de tecido adiposo subcutâneo. Deste modo foi coletado cerca de 1-2 mL de tecido (1-2 g), imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -70°C até seu processamento (SHIDHAM, 2010).

3.14 Extração de RNA e qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*)

3.14.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído de 100 a 200 mg de tecido congelado da punção do tecido adiposo subcutâneo abdominal, pelo kit RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, EUA), de acordo com as instruções do kit. A quantidade e integridade (qualidade) do RNA foram verificados pelo espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare). O cálculo da razão entre a absorção em 260 e 280 nm serviu para estimar o grau de pureza do RNA total, sendo que ela esteve entre 1,5 e 2,2. (APÊNDICE B).

Além disso, a integridade do RNA total foi avaliada em gel de agarose 1,5%, 70V, 300 mA, 50 W durante 01:30h e visualizado em luz ultravioleta. Considerado livre de contaminação por DNA, o RNA foi novamente quantificado e utilizado para os experimentos.

3.14.2 Síntese de cDNA

Foi sintetizado cDNA (DNA complementar), utilizando de 200ng de RNA, transcrição reversa realizada com o iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, EUA), preparado para volume para 20 µL (sendo 4 µL de 5x *iScript reaction mix*, 1 µL de *iScript reverse transcriptase*, RNA *template* e *nuclease-free* H_2O para completar os 2 µL). Esta reação foi realizada no termociclador (Bio-Rad, C1000 Thermal Cycler) com a sequência das etapas de incubação a 25°C por 5 minutos para pareamento dos reagentes, extensão da primeira fita de cDNA a 42°C por 30 minutos e inativação da transcriptase reversa a 85°C por 5 minutos. Após, foi adicionado com 180 µL de H_2O, restando concentração final de 1 ng/µL de cDNA.

3.14.3 qPCR

O PCR quantitativo (qPCR, PCR em tempo real) foi realizado utilizando reagente SybrGreen do SsoFastTM EvaGreen® Supermix e reação realizada no termociclador CFX 96 Real-Time System (Bio-Rad, EUA) e software Bio-Rad CFX Manager 3.0 (Bio-Rad, EUA), após devida padronização e avaliação de eficiência de cada gene, em que foi decidida a concentração ideal de cada gene e sua temperatura ideal de amplificação, de acordo com orientação do fabricante.

Na reação de amplificação (Figura 8), foram utilizados 2 µL de cDNA, 10 µL do mix Evagreen, primer (iniciador) na concentração definida na padronização (do sentido senso e anti-senso) e H_2O para completar o volume total de 20 µL do poço de amplificação. Usaram-se as seguintes condições de tempo e temperatura: 30 segundos a 95°C, 39 ciclos a 95°C durante 5 segundos, T °C (em que T foi a temperatura utilizada que era indicada para cada gene após padronização e orientação do fabricante) durante 30 segundos, com detecção do sinal ao fim de cada ciclo e obtenção da curva de *melting* (curva de dissociação, útil para avaliar se o produto de amplificação é único, Figura 9) com aumento contínuo de 0,5°C a cada 5 segundos, adquirindo-se um sinal de fluorescência no final de cada aumento de temperatura. As reações foram realizadas em duplicata e em placas de 96 poços.

Para cada uma das reações, a água foi utilizada como controle negativo, além de outro controle negativo contendo todos os reagentes exceto o cDNA.

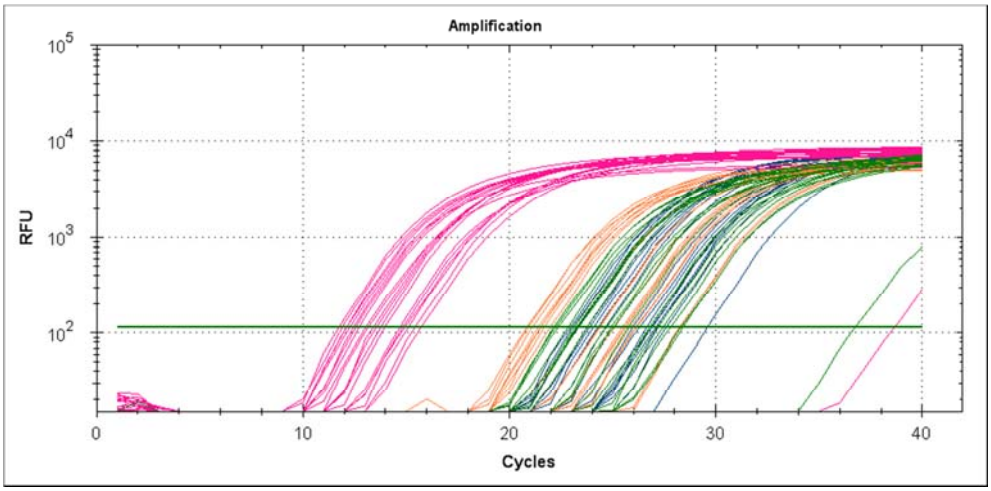

Figura 8. Exemplo da reação de amplificação dos genes *ATF-4* e *ADIPOQ*, com genes endógenos *18S* e *GAPDH*.

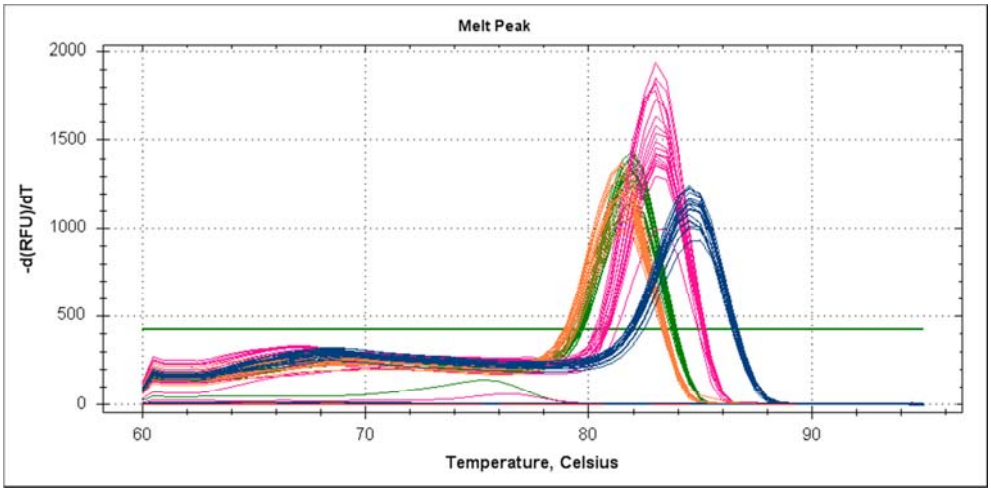

Figura 9. Exemplo da curva de Melting dos genes *ATF-4* e *ADIPOQ*, com genes endógenos *18S* e *GAPDH*.

Os genes 18S e GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) foram utilizados como genes de referência, controle endógeno (*housekeeping*), para a padronização dos valores. Os genes analisados nas amostras foram: *ADIPOQ* (Adiponectina), *GRP78* (*glucose-regulated protein 78*), *sXBP1* (*spliced X-box binding protein-1*), *XBP1* (*X-box binding protein-1*), *EIF2AK3* (*ER-resident PKR-like eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3*), *ATF-6* (*activated transcription factor 6*), *ATF-4* (*activated transcription factor 4*), *EDEM1* (*ER degradation enhancer*

mannosidase alpha-like 1), *CHOP* (*C/EBP homologous protein*), *IL-6* (interleucina-6) e *IRS-1* (*insulin receptor substrate 1*). Os iniciadores (*primers*) utilizados para cada gene estão especificados na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos iniciadores para qPCR.

Gene	Senso/ Anti-senso	Sequência
18S	senso	GTAACCCGTTGAACCCCATT
	anti-senso	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
GAPDH	senso	AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT
	anti-senso	CCCCACTTGATTTTGGAGGGA;
ADIPOQ	senso	ATGCCCAAAGAGGAGAGAGGAA
	anti-senso	TGGTCAGAAACAGGCACACAAC
Grp78	senso	CATCACGCCGTCCTATGTCG
	anti-senso	CGTCAAAGACCGTGTTCTCG
sXBP1	senso	GGTCTGCTGAGTCCGCAGCAGG
	anti-senso	GGGCTTCCTATATATGTGG
XBP1	senso	TGGCCGGGTCTGCTGAGTCCG
	anti-senso	ATCCATGGGAAGATGTTCTGG
EIF2AK3	senso	TGTCGCCAATGGGATAGTGACGAA
	anti-senso	AATCCGGCTCTCGTTTCCATGTCT
ATF 6	senso	ATGTCTCCCCTTTCCTTATATGGT
	anti-senso	AAGGCTTGGGCTGAATTGAA
ATF 4	senso	GGGTTCTCCAGCGACAAGGCTAAG
	anti-senso	AACAGGGCATCCAAGTCGAACTC
EDEM	senso	GCAATGAAGGAGAAGGAGAC
	anti-senso	CCATATGGCATAGTAGAAGGC
CHOP	senso	GGAGAACCAGGAAACGGAAAC
	anti-senso	TCTCCTTCATGCGCTGCTTT
IL 6	senso	AAATTCGGTACATCCTCGACGG
	anti-senso	GGAAGGTTCAGGTTGTTTTCTGC
IRS-1	senso	TGCTGGGGGTTTGGAGAATG
	anti-senso	GGCACTGTTTGAAGTCCTTGACC

3.15 Extração proteica e western blot

3.15.1 Extração proteica

A proteína total foi extraída utilizando-se o tampão RIPA, foi adicionado 700 µL de tampão RIPA a 200 mg de tecido adiposo, seguido de homogeneização por 30 segundos e incubado por 1h a 4°C. As amostras foram centrifugadas (14.000 rpm por 20 min a 4°C), o sobrenadante foi transferido a outro tubo e a concentração de proteína foi medida pelo Kit BCA (Pierce Rockford, IL, EUA). As amostras foram aliquotadas e preparadas para a concentração de 30 µg.

3.15.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Foi preparado gel de 12% utilizando SDS e poliacrilamida. Às amostras de proteínas foi adicionado 2x tampão corante seguido de aquecimento a 90°C por 10 minutos para que ocorresse a desnaturação e a seguir a colocação no gel. A eletroforese foi iniciada a 90V por 30 minutos e, então, por aproximadamente 2 horas a 110V, ou até que o marcador, ou *ladder*, atingisse em torno de 24kDa.

3.15.3 Transferência

As membranas de nitrocelulose foram tratadas com água destilada e aplicadas ao gel para que ocorresse a transferência das proteínas com a passagem de corrente elétrica através do Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad). Após este período, as membranas foram bloqueadas com solução TBS com 5% de leite desnatado por 1 hora em temperatura ambiente.

3.15.4 Incubação com anticorpos

A membrana foi incubada com o anticorpo primário durante, aproximadamente, 12h (*over-night*) seguida de três lavagens, 10 minutos cada, com tampão TBST. Em seguida, foi realizada a incubação durante 30 minutos com o anticorpo secundário marcado com HRP, seguido de três lavagens, 10 minutos cada, com TBST para a remoção dos anticorpos não ligados e, posteriormente, a detecção das sondas ligadas será feita por quimioluminescência com kit Immun-Star HRP Substrate (Bio-Rad, CA, EUA). A quantidade de proteína foi determinada pelo software *Image J*. A diluição e marca utilizadas dos anticorpos primários e secundários está demonstrada na tabela 2.

Tabela 2. Anticorpos utilizados no western blot

Anticorpo	Marca	Diluição
Adiponectina (coelho)	ABCAM	1:3.000
GAPDH (coelho)	Cell Signaling	1:500
BIP (coelho)	Cell Signaling	1:500
IRE1α (coelho)	Cell Signaling	1:500
IL-6 (coelho)	Santa Cruz	1:500
XBP1 (coelho)	Santa Cruz	1:500
IRS-1 (coelho)	Santa Cruz	1:500
Anticorpo secundário (anti-coelho)	Cell Signaling	1:10.000

3.16 Análise estatística

Para a análise estatística foi realizada através do programa SAS, versão 9.2 (SAS Institute, Cary, EUA) dos dados das dosagens séricas e antropométricas, utilizou-se o método da Análise de Variância (ANOVA) de medidas repetidas, modelo misto, para a análise dos dados. Adotou-se $p \leq 0,05$ como nível de

significância. Para a avaliação dos resultados de qPCR, foi inicialmente calculado o ΔCt e transformado em valores lineares pela fórmula $2^{-\Delta Ct}$, sendo posteriormente utilizado o teste *T de Student* pareado ou não para comparação inter e entre os grupos, adotando-se o mesmo nível de significância anteriormente descrito. Os dados são apresentado em *fold-change* +- EPM (erro padrão da média).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Adesão e tolerância

Todos os pacientes finalizaram o estudo. A adesão, estimada pela relação entre a quantidade de cápsulas consumidas pelo total de cápsulas fornecidas, foi superior a 95%.

As cápsulas foram bem toleradas. Não houve relato de sintomatologia gastrintestinal ou alergia durante o período do estudo.

4.2 Características gerais durante a randomização

Cada grupo foi composto por dez indivíduos. Os grupos foram similares quanto à proporção dos participantes (4 homens e 6 mulheres), idade, peso, IMC, circunferência abdominal, composição corporal, glicemia de jejum, HbA1c e HOMA-IR (Tabela 3).

Tabela 3. Características clínico-laboratoriais dos indivíduos no início do estudo[1].

	Placebo (n=10)	ALA (n=10)	P[2]
Sexo (masculino:feminino)	4:6	4:6	-
Idade (anos)	50,1 ± 5,8	47 ± 8,4	0,52
Tempo de diabetes (anos)	5,2 ± 3,08	6,0 ± 4,6	0,77
Peso (kg)	86,3 ± 9,5	76,9 ± 11,7	0,17
IMC (kg/m^2)	30,9 ± 2,59	29 ± 2,45	0,21
Circunferência abdominal (cm)	104,4 ± 6,5	98,75 ± 8,4	0,19
Massa magra (%)	66,15 ± 5,65	68,03 ± 4,96	0,61
Glicemia de jejum (mg/dL)	158,1 ± 30,2	180,3 ± 51,1	0,47
HbA1c (%)	7,55 ± 0,65	8,43 ± 1,14	0,24
HOMA-IR	5,78 ± 3,95	9,12 ± 5,7	0,35

[1]Valores em média ± desvio padrão da média;
[2]Teste *t de student*; P significativo < 0,05;
IMC, Índice de Massa Corporal; HbA1c, Hemoglobina glicada; HOMA-IR, Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance.

4.3 Avaliação da composição corporal

Na comparação de peso, massa magra, circunferência abdominal, circunferência de quadril e IMC não ocorreu diferença significativa intragrupos e intergrupos antes e após 60 dias de suplementação com placebo e ALA, analisados através do teste ANOVA (Tabela 4).

Tabela 4. Avaliação da composição corporal antes e 60 dias após suplementação de placebo e ALA[1].

	Placebo (n=10)			ALA (n=10)			P (efeito do tratamento)[3]
	D0	D60	P[2]	D0	D60	P[2]	
Peso (kg)	86,37±11,62	85,7±11,95	NS	76,8±15,01	76,4±15.56	NS	0,61
Massa Magra (%)	66,15±6,69	65,12±6,67	NS	68,3±5,97	67,27±3,66	NS	0,79
Circunferência Abdominal (cm)	99.1±11.3	98.65±11.3	NS	103,5±7,53	103,75±6,89	NS	0,78
Circunferência do Quadril (cm)	108,25±6,53	108,45±6,78	NS	100,85±8,2	100,6±8,23	NS	0,47
IMC (kg/m^2)	30,93±2,92	30,7±2,97	NS	28.98±3,23	28,79±3,47	NS	0,77

[1] Valores em média ± desvio padrão da média. Realizado ANOVA, P significativo < 0,05;
[2] Comparação entre D0 e D60 dentro de cada grupo;
[3] Comparação do efeito do tratamento entre os grupos;
IMC, índice de massa corporal. NS, não significativo.

4.4 Avaliação da sensibilidade à insulina e controle glicêmico

Na comparação da glicemia de jejum, insulinemia de jejum, hemoglobina glicada e HOMA-IR não ocorreu diferença significativa intragrupos e intergrupos antes e após 60 dias de suplementação com placebo e ALA, analisados através do teste ANOVA (Tabela 5).

Tabela 5. Avaliação da sensibilidade à insulina e controle glicêmico antes e 60 dias após suplementação de placebo e ALA[1].

	Placebo (n=10)			ALA (n=10)			P (efeito do tratamento)[3]
	D0	D60	P[2]	D0	D60	P[2]	
Glicemia de Jejum (mg/dL)	158.2±37,21	156,4±56,18	NS	180.3±68,79	177,0±65,14	NS	0,94
Insulinemia de Jejum (pmol/L)	15,98±15,97	13,8±12,76	NS	17,9±12,23	13,8±12,76	NS	0,84
HbA1c (%)	7,55±1,21	7,44±1,5	NS	8,2±1,28	8,24±1,39	NS	0,64
HOMA-IR	5,81±6,07	5,14±5,18	NS	8,48±7,53	7,06±11,52	NS	0,8

[1] Valores em média ± desvio padrão da média. Realizado ANOVA, P significativo < 0,05;
[2] Comparação entre D0 e D60 dentro de cada grupo;
[3] Comparação do efeito do tratamento entre os grupos;
HbA1c, Hemoglobina glicada. HOMA-IR, *homeostasis model assessment insulin resistance*. NS, não significativo.

4.5 Avaliação do perfil lipídico

Na comparação dos triglicerídes, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL e colesterol não-HDL não ocorreu diferença significativa intragrupos e intergrupos antes e após 60 dias de suplementação com placebo e ALA, analisados através do teste ANOVA (Tabela 6).

Tabela 6. Avaliação do perfil lipídico antes e 60 dias após suplementação de placebo e ALA[1].

	Placebo (n=10)			ALA (n=10)			P (efeito do tratamento)[3]
	D0	D60	P[2]	D0	D60	P[2]	
Triglicérides (mg/dL)	155,4±57,01	157,3±66,68	NS	172,2±102,5	205,3±147,7	NS	0,45
Colesterol Total (mg/dL)	184,1±45,6	179,3±47,25	NS	170,3±44,25	178,8±50,91	NS	0,27
Colesterol HDL (mg/dL)	38,8±7,16	38,7±8,97	NS	40,1±8,33	40,1±9,24	NS	0,97
Colesterol LDL (mg/dL)	116,8±36,38	108,2±35,32	NS	88,1±22,69	96,44±38,01	NS	0,09
Colesterol VLDL (mg/dL)	31,08±11,4	31,46±13,34	NS	34,4±20,51	41,06±29,54	NS	0,45
Colesterol não-HDL (mg/dL)	145,3±40,21	140,6±42,7	NS	130,2±39,84	138,7±44,5	NS	0,20

[1] Valores em média ± desvio padrão da média. Realizado ANOVA, P significativo < 0,05;
[2] Comparação entre D0 e D60 dentro de cada grupo;
[3] Comparação do efeito do tratamento entre os grupos;
NS, não significativo.

4.6 Avaliação das citocinas séricas e proteína C reativa

Na comparação da adiponectina, houve diferença significativa tanto no grupo placebo (P = 0,01), como no grupo ALA (P = 0,01), antes e após 60 dias de suplementação com um aumento mais importante no grupo ALA quando comparado o efeito do tratamento (P = 0,04). Não houve diferença significativa na dosagem de IL-6, IL-1, TNF-α e Proteína C reativa entre os grupos antes e após 60 dias de suplementação com placebo e ALA (Tabela 7).

Tabela 7. Avaliação das citocinas séricas e proteína C reativa antes e 60 dias após suplementação de placebo e ALA[1].

	Placebo (n=10)			ALA (n=10)			P (efeito do tratamento)[3]
	D0	D60	P[2]	D0	D60	P[2]	
Adiponectina (µg/mL)	12,04±5,01	13,54±6,79	0,01*	10,61±6,53	15,01±11,68	0,01*	0,04*
IL-6 (pg/mL)	4,9±1,57	4,92±1,03	NS	18,19±37,61	21,22±42,27	NS	NS
IL-1 (pg/mL)	22,87±6,69	21,52±4,59	NS	21,99±9,16	27,05±15,9	NS	NS
TNF-α (pg/mL)	12,17±2,28	12,6±2,91	NS	13,48±5,82	26,75±34,96	NS	NS
Proteína C reativa (mg/L)	0,61±0,4	0,52±0,32	NS	0,73±0,63	0,59±0,52	NS	NS

[1] Valores em média ± desvio padrão da média. Realizado ANOVA, P significativo < 0,05 (*);
[2] Comparação entre D0 e D60 dentro de cada grupo;
[3] Comparação do efeito do tratamento entre os grupos;
IL-6, interleucina-6. IL-1, interleucina-1. TNF-α, fator de necrose tumoral alfa. Proteína C reativa, proteína C reativa. NS, não significativo.

4.7 Expressão do gene de adiponectina e IL-6 no tecido adiposo subcutâneo abdominal

A expressão gênica de adiponectina em tecido adiposo aumentou, aproximadamente, 90% após suplementação com ALA (Figura 10), com diferença

significativa (P=0,013). Não houve diferença significativa da expressão gênica do grupo placebo (P=0,48).

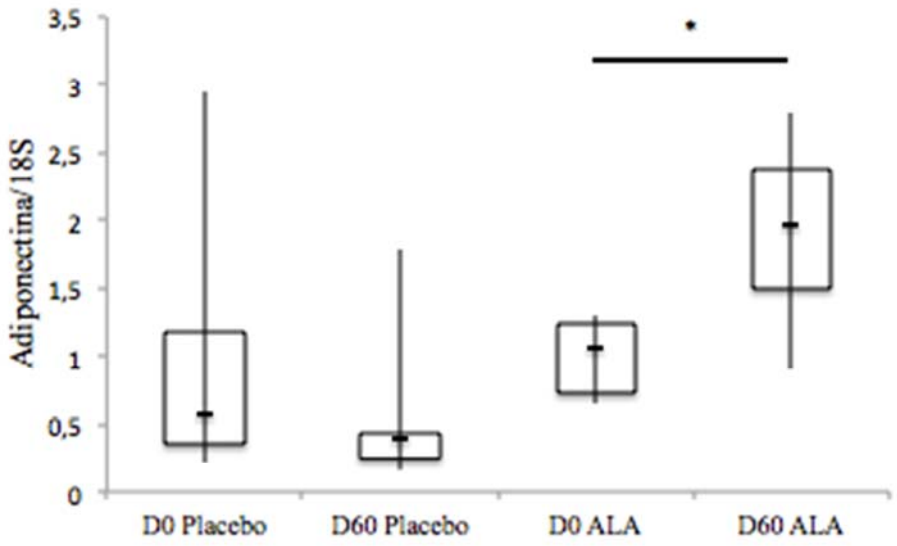

Figura 10. Expressão gênica da adiponectina no tecido adiposo subcutâneo abdominal. Análise do mRNA através do PCR em tempo real. Realizado *teste T de Student*, P significativo < 0,05 (*);

A expressão gênica da IL-6 em tecido adiposo reduziu, aproximadamente, 80% após suplementação com ALA (Figura 11), com diferença significativa (P=0,006). Não houve diferença significativa da expressão gênica do grupo placebo (P=0,87).

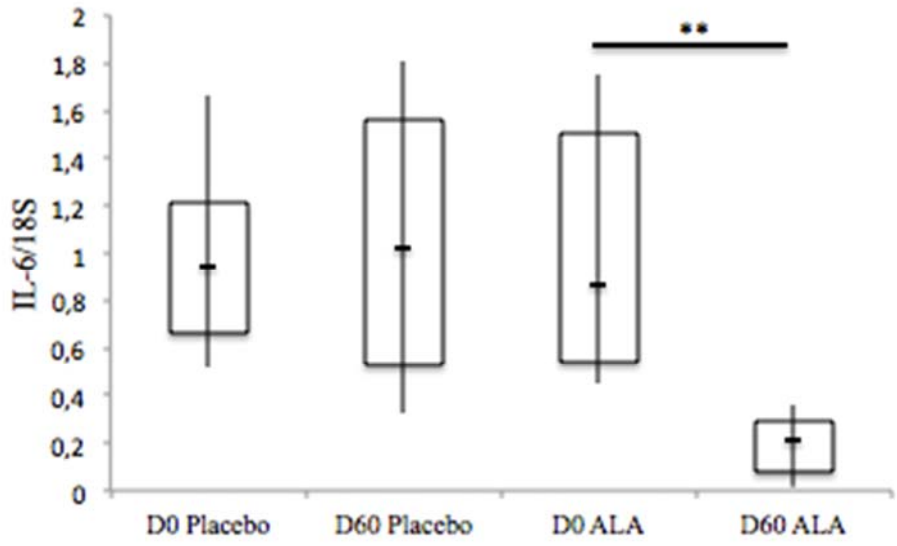

Figura 11. Expressão gênica da *IL-6* no tecido adiposo subcutâneo abdominal. Análise do mRNA através do PCR em tempo real. Realizado *teste T de Student*, P significativo < 0,05; (**) P < 0,01.

4.8 Expressão dos genes do estresse do retículo endoplasmático no tecido adiposo subcutâneo abdominal

A expressão do gene XBP1 reduziu, aproximadamente, 20% (P=0,04) após suplementação de ALA (Figura 12) sem diferença significativa no grupo placebo (P=0,34). Sua forma ativada, sXBP1 (Figura 13), reduziu, aproximadamente, 70% (P=0,01), sem diferença no grupo placebo (P=0,12). Sugerindo, portanto, uma modulação do estresse do retículo endoplasmático por essa via.

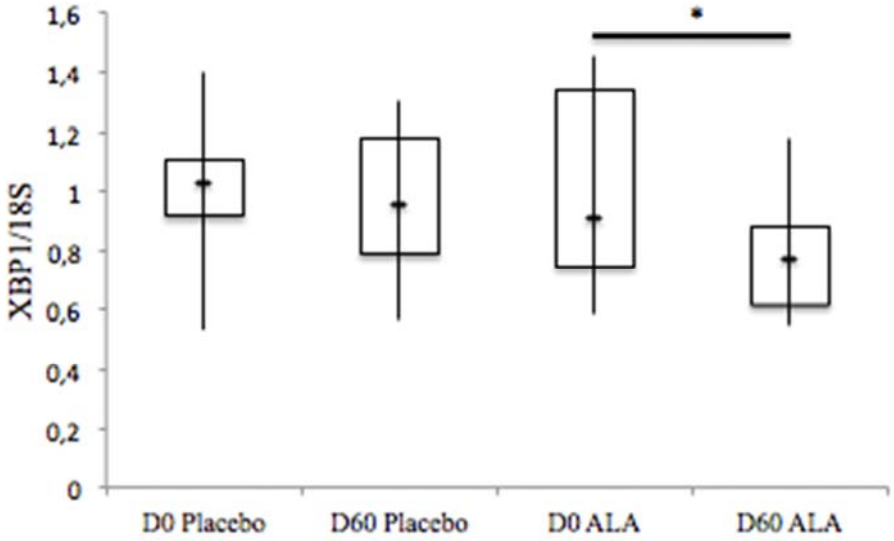

Figura 12. Expressão gênica da *XBP1* no tecido adiposo subcutâneo abdominal. Análise do mRNA através do PCR em tempo real. Realizado *teste T de Student*, P significativo < 0,05 (*);

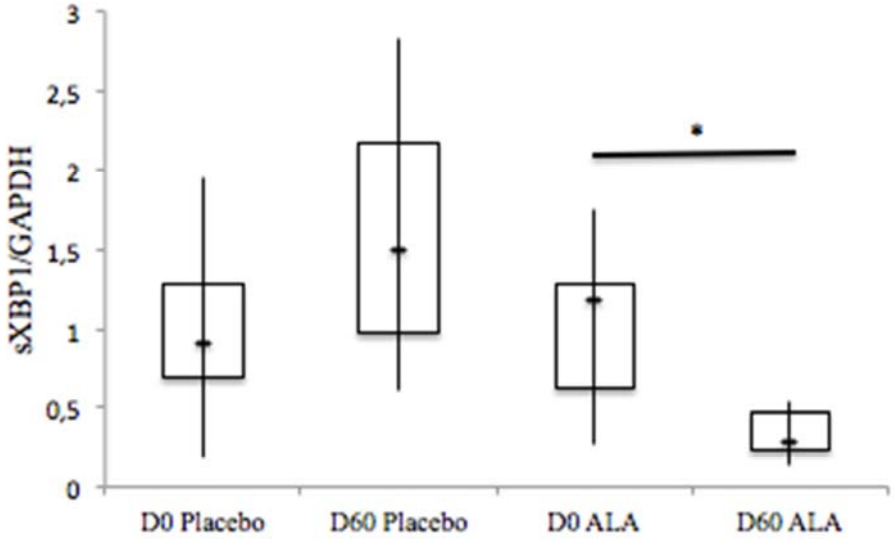

Figura 13. Expressão gênica da *sXBP1* no tecido adiposo subcutâneo abdominal. Análise do mRNA através do PCR em tempo real. Realizado *teste T de Student*, P significativo < 0,05 (*);

A análise do gene EIF2AK3 (Figura 14) não demonstrou diferença significativa nem no grupo placebo (P=0,32), nem no grupo ALA (P=0,64). Da mesma maneira, não foi observada diferença significativa na expressão gênica do ATF-4 (Figura 15) nem no grupo placebo (P=0,45), nem no grupo ALA (P=0,31). Sugerindo, portanto, que não ocorre modulação da via da PERK pelo ALA.

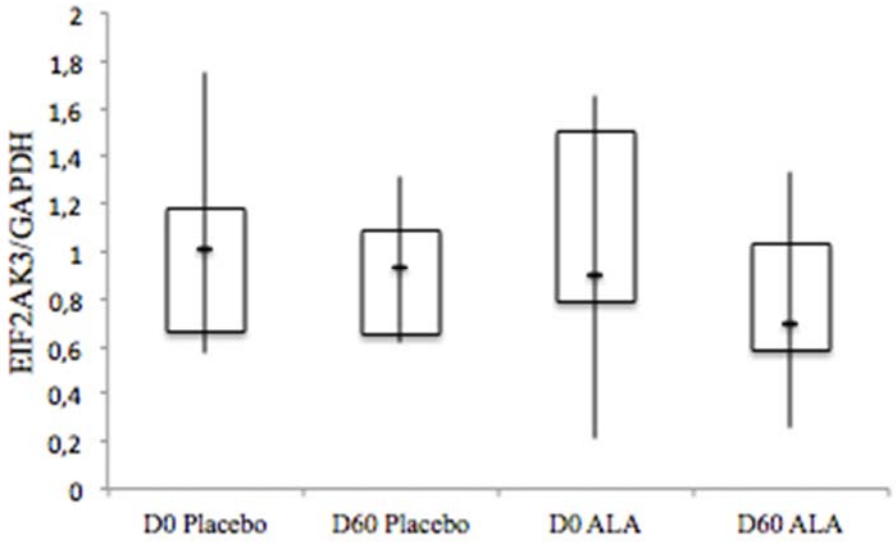

Figura 14. Expressão gênica da *EIF2AK3* no tecido adiposo subcutâneo abdominal. Análise do mRNA através do PCR em tempo real. Realizado *teste T de Student*, P significativo < 0,05;

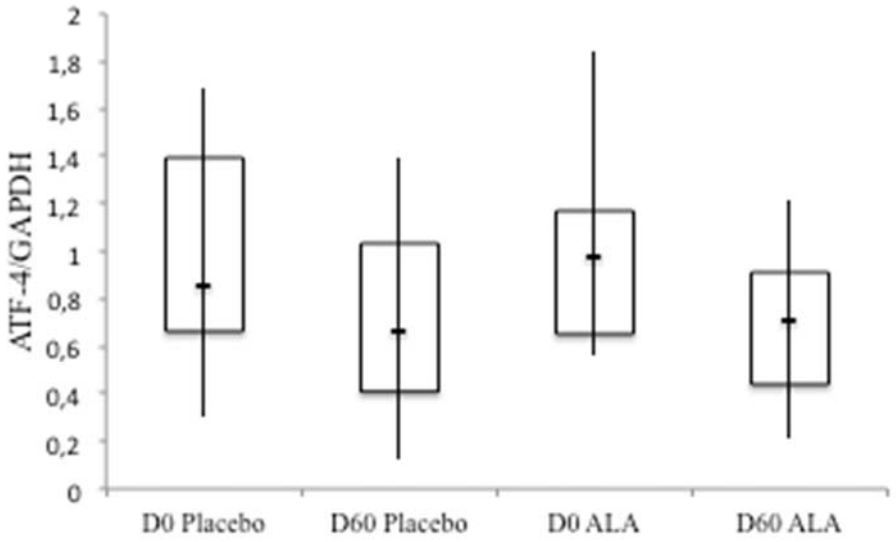

Figura 15. Expressão gênica da *ATF-4* no tecido adiposo subcutâneo abdominal. Análise do mRNA através do PCR em tempo real. Realizado *teste T de Student*, P significativo < 0,05;

Não ocorreu diferença significativa na expressão gênica do ATF-6 (figura 16), nem no grupo placebo (P=0,08), nem no grupo ALA (P=0,10).

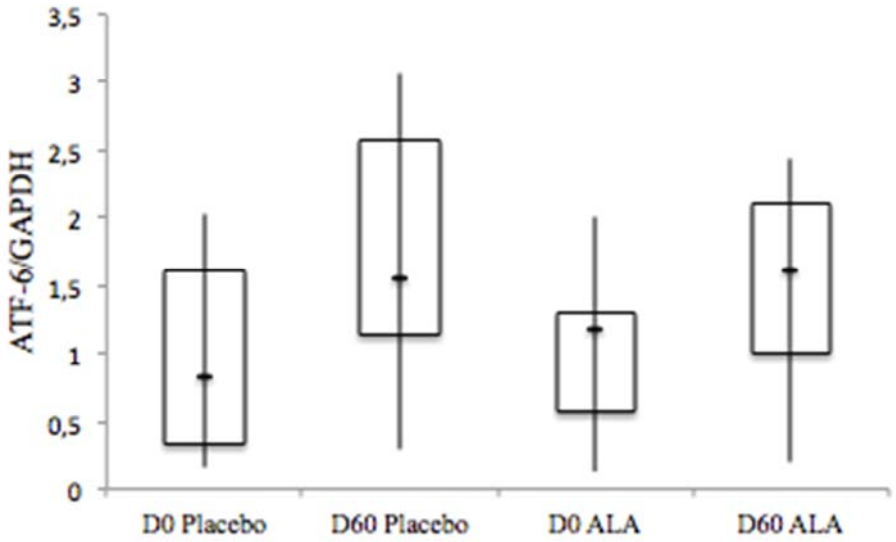

Figura 16. Expressão gênica da *ATF-6* no tecido adiposo subcutâneo abdominal. Análise do mRNA através do PCR em tempo real. Realizado *teste T de Student*, P significativo < 0,05;

A análise da expressão gênica do GRP78 (Figura 17) demonstrou um aumento significativo de, aproximadamente, 150% no grupo ALA (P=0,002), sem alteração significativa no grupo placebo (P=0,22).

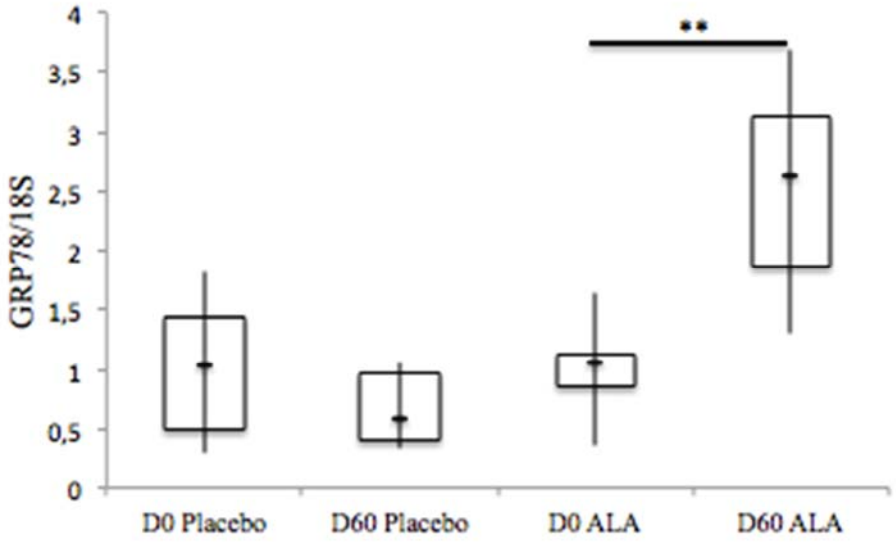

Figura 17. Expressão gênica da *GRP78* no tecido adiposo subcutâneo abdominal. Análise do mRNA através do PCR em tempo real. Realizado *teste T de Student*, P significativo < 0,05;

A análise do gene EDEM1 (Figura 18) não demonstrou diferença significativa nem no grupo placebo (P=0,41), nem no grupo ALA (P=0,26). Da mesma maneira, não foi observada diferença significativa na expressão gênica do CHOP (Figura 19) nem no grupo placebo (P=0,14), nem no grupo ALA (P=0,23).

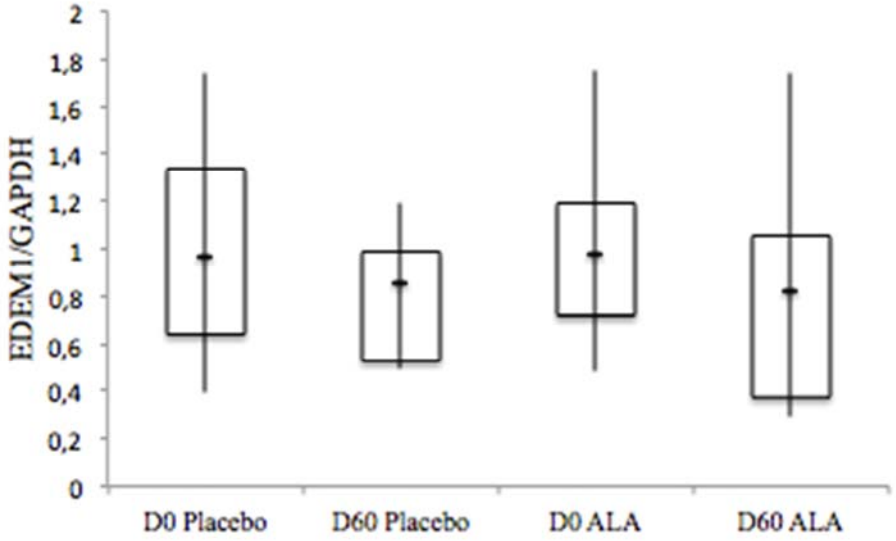

Figura 18. Expressão gênica do *EDEM1* no tecido adiposo subcutâneo abdominal. Análise do mRNA através do PCR em tempo real. Realizado *teste T de Student*, P significativo < 0,05;

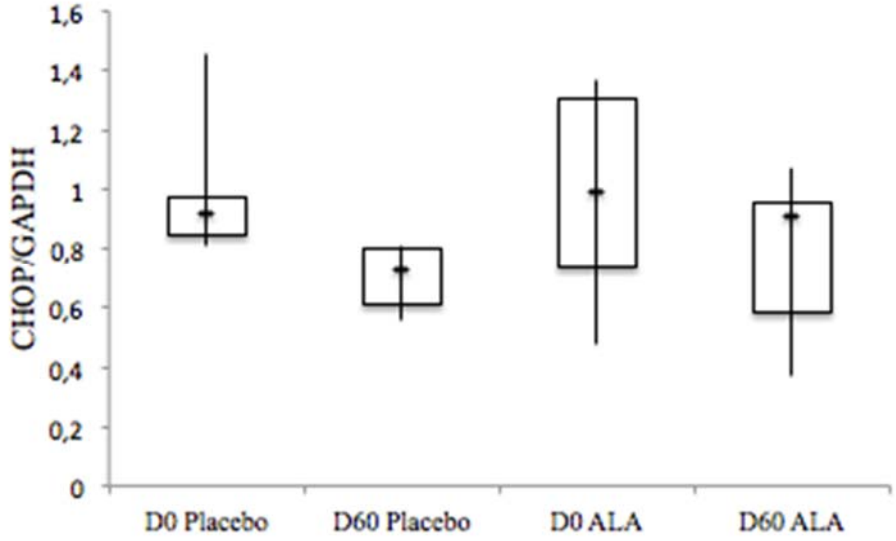

Figura 19. Expressão gênica do *CHOP* no tecido adiposo subcutâneo abdominal. Análise do mRNA através do PCR em tempo real. Realizado *teste T de Student*, P significativo < 0,05;

4.9 Expressão do gene IRS-1 no tecido adiposo subcutâneo abdominal

A análise do gene IRS-1 (Figura 20) demonstrou um redução de quase 60% no grupo ALA (P=0,02), sem diferença significativa no grupo placebo (P=0,15), o oposto do que é observado nos modelos de resistência insulínica.

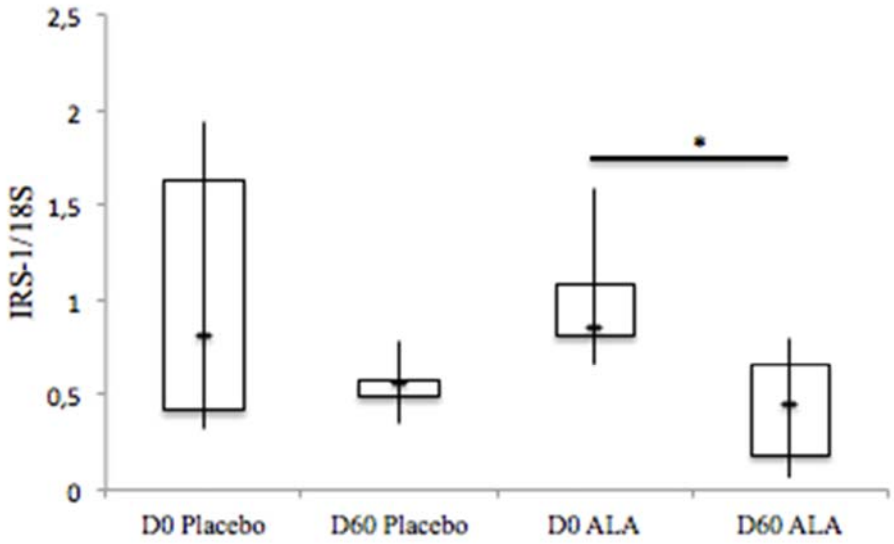

Figura 20. Expressão gênica do *IRS-1* no tecido adiposo subcutâneo abdominal. Análise do mRNA através do PCR em tempo real. Realizado *teste T de Student*, P significativo < 0,05 (*);

4.10 Expressão proteica da adiponectina no tecido adiposo subcutâneo abdominal

Não foi observada diferença significativa na expressão proteica da adiponectina, nem no monômero de adiponectina (Figura 21), P=0,80; nem na adiponectina de alto peso molecular (HMW, Figura 22), P=0,28, quando analisado o grupo após 60 dias de placebo e ALA.

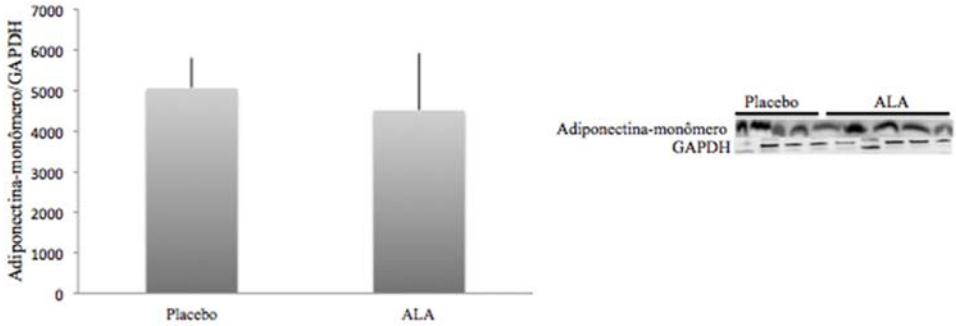

Figura 21. Western Blot do monômero da adiponectina no tecido adiposo subcutâneo abdominal. Gráfico da média da absorção pelo espectrofotômetro +- EPM (erro padrão médio). Realizado *teste T de Student*, P significativo < 0,05.

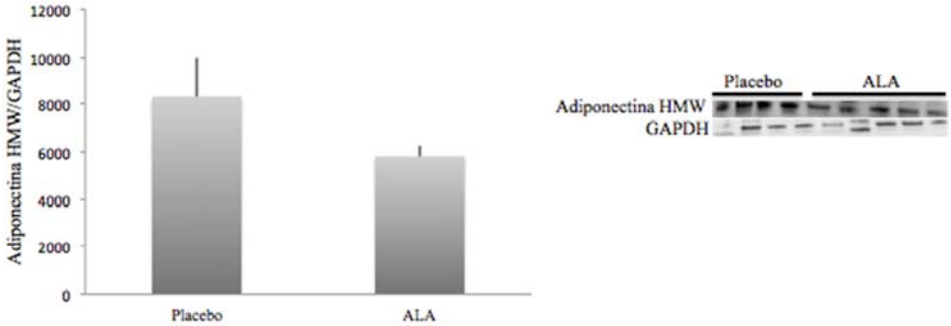

Figura 22. Western Blot da adiponectina de alto peso molecular (HMW) no tecido adiposo subcutâneo abdominal. Gráfico da média da absorção pelo espectrofotômetro +- EPM (erro padrão médio). Realizado *teste T de Student*, P significativo < 0,05.

4.11 Expressão proteica da IL-6 no tecido adiposo subcutâneo abdominal

Não ocorreu diferença significativa da expressão proteica da IL-6 (P=0,23) no tecido adiposo subcutâneo abdominal dos pacientes após suplementação com placebo de ALA (Figura 23).

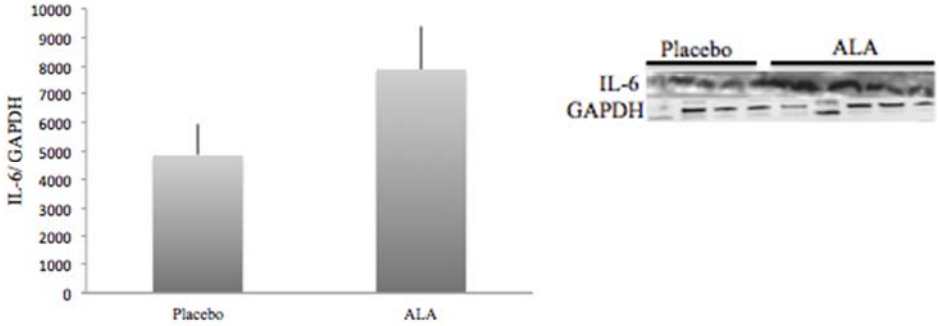

Figura 23. Western Blot da IL-6 no tecido adiposo subcutâneo abdominal. Resultado apresentado como média da absorção pelo espectrofotômetro +- erro padrão. Realizado *teste T de Student*, P significativo < 0,05.

4.12 Expressão proteica do estresse do retículo endoplasmático no tecido adiposo subcutâneo abdominal

Foi observada redução significativa da expressão proteica do XBP-1 (P=0,04) no tecido adiposo subcutâneo abdominal após 60 dias de suplementação com placebo e ALA (Figura 24).

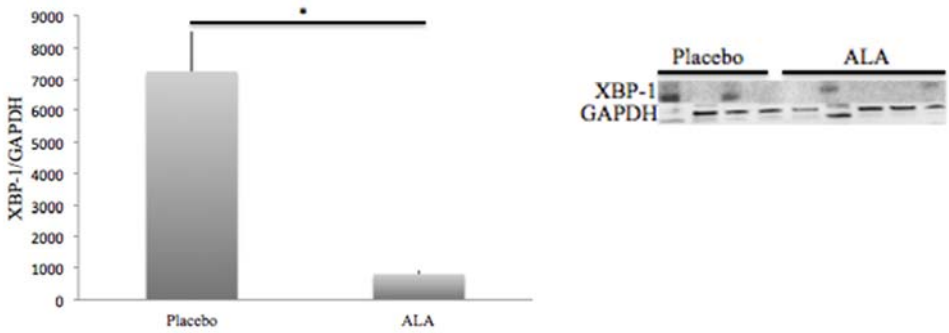

Figura 24. Western Blot da XBP-1 no tecido adiposo subcutâneo abdominal. Resultado apresentado como média da absorção pelo espectrofotômetro +- erro padrão. Realizado *teste T de Student*, P significativo < 0,05 (*).

Não ocorreu diferença significativa da expressão proteica da IRE-1 (P=0,16) no tecido adiposo subcutâneo abdominal dos pacientes após suplementação com placebo de ALA (Figura 25).

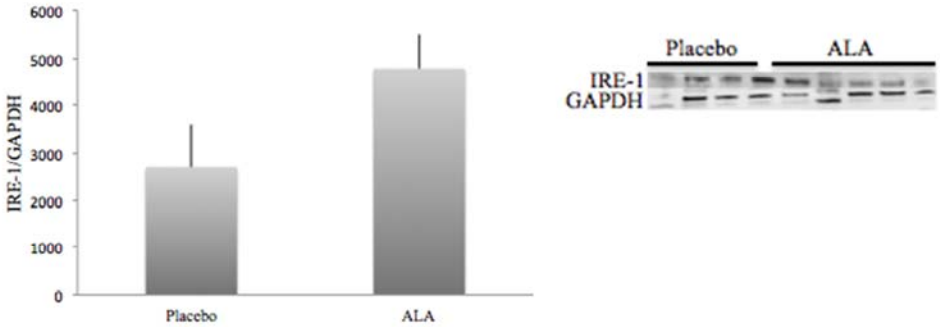

Figura 25. Western Blot da IRE-1 no tecido adiposo subcutâneo abdominal. Resultado apresentado como média da absorção pelo espectrofotômetro +- erro padrão. Realizado *teste T de Student*, P significativo < 0,05.

Foi observado aumento significativo da expressão proteica do BIP (P=0,02) no tecido adiposo subcutâneo abdominal após 60 dias de suplementação com placebo e ALA (Figura 26).

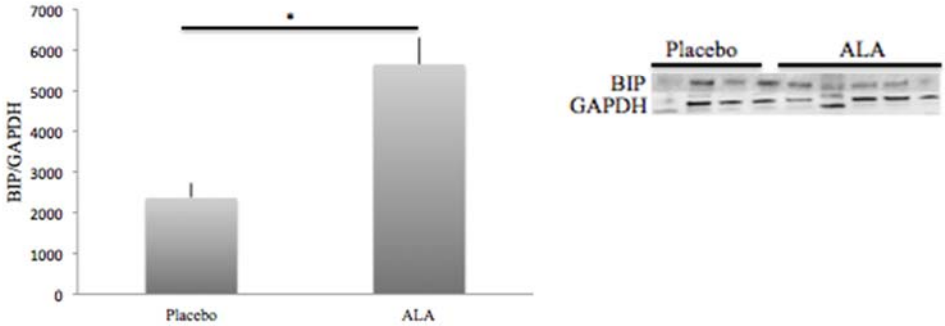

Figura 26. Western Blot da BIP no tecido adiposo subcutâneo abdominal. Resultado apresentado como média da absorção pelo espectrofotômetro +- erro padrão. Realizado *teste T de Student*, P significativo < 0,05 (*).

4.13 Expressão proteica do IRS-1 no tecido adiposo subcutâneo abdominal

Não ocorreu diferença significativa da expressão proteica da IRS-1 (P=0,22) no tecido adiposo subcutâneo abdominal dos pacientes após suplementação com placebo de ALA (Figura 27).

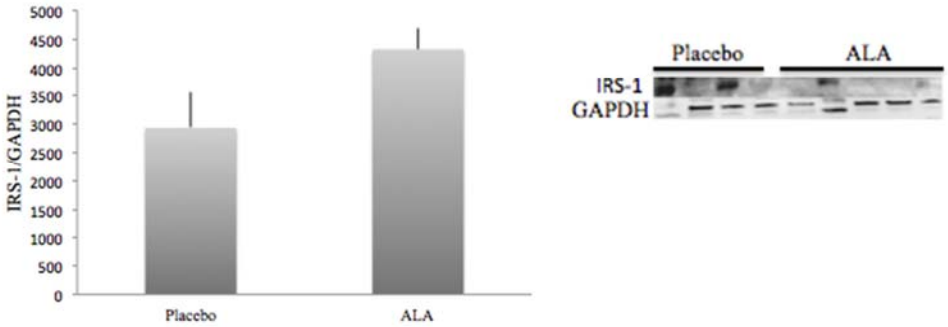

Figura 27. Western Blot do IRS-1 no tecido adiposo subcutâneo abdominal. Resultado apresentado como média da absorção pelo espectrofotômetro +- erro padrão. Realizado *teste T de Student*, P significativo < 0,05.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A capacidade da suplementação de n-3 PUFA em diminuir a inflamação tem sido demonstrada em diversos estudos em animais e humanos utilizando diversas doses e em diferentes situações. A dose recomendada para indivíduos saudáveis de n-3 PUFA é cerca de 250 mg/dia (EPA e DHA), podendo a chegar a 4g/dia em pacientes com hipertrigliceridemia elevada (> 500 mg/dL). A suplementação de 0,9 – 2 g/dia de n-3 PUFA não altera os marcadores de inflamação em pacientes saudáveis, porém a suplementação de 1,2 – 6g/dia pode reduzir o nível sérico de citocinas pró-inflamatórias e está associado à redução das células T, células espumosas e placas de aterosclerose, porém ainda não há consenso sobre a dose ideal anti-inflamatória dos n-3 PUFA (RANGEL-HUERTA, 2012).

Uma meta-análise comparou o potencial efeito dos n-3 PUFAs em reduzir o risco de DM2 e concluiu que a suplementação com EPA e DHA (ou ingestão de alimentos nesses n-3 PUFAs) não demonstrou risco reduzido de desenvolver DM2, enquanto que a suplementação com fontes vegetais ricas em ALA demonstrou reduzir o risco de desenvolver DM2, porém sem significância estatística (WU, 2012).

Nesse sentido, o real benefício dessa suplementação em patologias com estado inflamatório crônico (obesidade, diabetes mellitus, hipertensão arterial, síndrome metabólica, dentre outras) ainda está pouco esclarecido e não há estudos avaliando o efeito do ALA no estresse do retículo endoplasmático no tecido adiposo subcutâneo em pacientes com DM2.

ALA é um n-3 PUFA encontrado mais comumente nos vegetais, tais como linhaça, chia, noz e óleos vegetais, incluindo óleo de canola e soja. Enquanto isso, o EPA e DHA podem ser encontrados em peixes de águas profundas, salgadas e frias (salmão, anchova, arenque, sardinha e atum). No entanto, os peixes de cativeiros possuem reduzida quantidade desses n-3 PUFAs, devido à alimentação destes animais, que é pobre em n-3 PUFA, enquanto nos peixes nativos essa quantidade é elevada devido à sua alimentação rica em algas microscópicas com alto teor de n-3 PUFA. Portanto, para a realidade brasileira, o ALA é de mais fácil acesso, além de ter um custo menor, e ainda existe a parcela da população que evita comer peixe por razões diversas (MARTIN, 2006; RAJARAM, 2014).

ALA é o principal n-3 PUFA e, no corpo, pode ser metabolizado em EPA e DHA. As reações ocorrem no retículo endoplasmático, predominantemente nas células hepáticas, mas a baixa taxa de conversão indica que a biossíntese de n-3 PUFA de cadeia longa proveniente de ALA é limitada. Um estudo com indivíduos saudáveis submetidos à suplementação de 1 g/dia de um isótopo de ALA marcado radioativamente mostrou uma conversão de apenas 0,2% do ALA em EPA, indicando que a biossíntese de EPA e DHA através do ALA é ineficiente em humanos saudáveis (PAWLOSKY, 2001). Além disso, vários fatores podem diminuir essa conversão como tabagismo, etilismo, diabetes, estresse, ingestão de gordura *trans* e, principalmente, o envelhecimento (MARTIN, 2006). Portanto, a conversão de ALA em DHA e EPA é pequena e está reduzida no indivíduo com DM2 e a suplementação de ALA nesses indivíduos demonstra o real efeito deste n-3 PUFA no organismo.

Nossos dados não mostraram alteração, após a suplementação de 3g/dia de ALA durante 60 dias, no metabolismo glicídico e na sensibilidade à insulina analisados através da glicemia de jejum, insulinemia de jejum, hemoglobina glicada e HOMA-IR. Os estudos mostram resultados ainda contraditórios nesse sentido. Foi observada, numa coorte japonesa (3383 indivíduos entre 35 e 66 anos), a relação entre elevada ingestão de n-3 PUFAs (estimado através de recordatório alimentar) em indivíduos saudáveis sem sobrepeso/obesidade e a resistência insulínica. A média de idade, IMC e ingestão média de n-3 PUFA foram respectivamente de 47,9 anos, 22,9 kg/m^2 e 1,9g/dia (ALA) e 0,77 g/dia (EPA + DHA). Foi verificado uma relação inversa entre a maior ingestão de ALA e resistência insulínica, avaliado pelo HOMA-IR, quando comparado o maior quartil (ingestão de ALA > 1% das calorias totais) com o menor quartil (ingestão de ALA < 0,7% das calorias totais), entretanto a ingestão de EPA + DHA não mostrou associação consistente com a resistência insulínica (MURAMATSU, 2010).

Estudo recente comparou o efeito da suplementação de ácido linoleico (um n-6 PUFA) e ALA em ratos Zucker obesos, inicialmente foi demonstrado que esses ratos obesos possuíam sensibilidade reduzida à insulina e acúmulo reduzido de n-3 PUFA e n-6 PUFA no tecido adiposo branco epididimal. Após a suplementação de ácido linoleico e ALA durante 12 semanas ocorreu melhora da sensibilidade à insulina, entretanto com efeito mais pronunciado do ALA, com maior acúmulo dos PUFAs na gordura epididimal, fígado e tecido muscular, com o acúmulo na gordura

epididimal mais importante que nos outros sítios. Não foi observado alteração no acúmulo de lipídeos reativos, sugerindo que a ação dos PUFAs ocorreu independente dos lipídeos reativos. (MATRAVADIA, 2016).

Nosso grupo demonstrou, em outro trabalho, uma redução da resistência insulínica em indivíduos com DM2, após suplementação de 3g/dia de ALA durante 60 dias, quando analisado através do clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico, que é o método padrão-ouro para análise de resistência insulínica, concluindo que a suplementação de ALA tem influência no metabolismo glicídico em humanos e que seria necessário um tempo maior para análise através dos demais parâmetros ou administração de dose maior de ALA (GOMES, 2015).

Em ensaio clínico controlado, duplo-cego e randomizado foi avaliado o efeito da linhaça 40g/dia, que é rica em ALA (aproximadamente 4g/dia), e controle com trigo na resistência insulínica, através do HOMA-IR, e metabolismo lipídico em pacientes com hipercolesterolemia. Foi observada uma redução de HOMA-IR em 23,7% após 10 semanas, porém sem alteração nos marcadores de inflamação (IL-6 e proteína C reativa) e sem alteração no colesterol LDL. Ainda foi observada uma redução significativa no colesterol HDL (16% em cinco semanas e 9% em 10 semanas de estudo) no subgrupo dos homens participantes desse estudo, (BLOEDON, 2008), enquanto o nosso estudo não demonstrou nenhuma alteração no metabolismo lipídico.

Em estudo randomizado, duplo-cego com 27 mulheres com DM2 sem hipertrigliceridemia comparando o efeito da suplementação de 3g/dia de óleo de peixe (1,8g de DHA e EPA) com placebo durante dois meses, não foi observado diferença significativa nos níveis do colesterol total ou colesterol LDL, porém com aumento significativo de colesterol HDL e redução significativa dos triglicerídeos. Não foi observada variação no metabolismo glicídico quando avaliados glicemia de jejum, insulina, hemoglobina glicada, HOMA-IR ou clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico (exames realizado num subgrupo de 5 pacientes). Ocorreu redução do percentual de massa gorda avaliada através da densitometria, sem variação da massa corporal total no grupo do n-3 PUFA. Quanto aos marcadores inflamatórios, não foi observada alteração na concentração sérica de IL-6, TNF-α, leptina, adiponectina entre os grupos e, também, não foi encontrada alteração na expressão gênica no tecido adiposo subcutâneo abdominal de leptina e adiponectina entre os grupos. Esse trabalho foi similar ao nosso quanto ao tempo de

suplementação, porém foi suplementado EPA e DHA e não apresentou diferença significativa na adiponectina e apresentou aumento do HDL e redução dos triglicerídeos (KABIR, 2007).

Nossos dados não mostraram alteração significativa no metabolismo lipídico, avaliado através do colesterol total, colesterol HDL, colesterol VLDL e colesterol não-HDL, possivelmente pelo fato dos pacientes não terem dislipidemia no início do estudo, ou pelo tempo de suplementação, já que a análise no metabolismo lipídico não era o objetivo principal desse trabalho. Além disso, não foi demonstrada diferença significativa na inflamação através da análise do IL-6, IL-1, TNF- e proteína C reativa após suplementação de ALA 3g/dia durante 60 dias, possivelmente devido, também, ao pequeno tempo de estudo, já que o objetivo principal do nosso trabalho não foi analisar os marcadores séricos de inflamação.

Com relação à adiponectina no tecido adiposo, um estudo com células 3T3-L1 (linhagem celular de camundongo, semelhante ao adipócito humano) sugeriu que o retículo endoplasmático é um importante sítio de armazenamento de adiponectina e que o tratamento com EPA e DHA pode aumentar a secreção da adiponectina. Em estados de ERE, a secreção pode ficar prejudicada, porém o tratamento com EPA e DHA, nessas situações de ERE, estimula a secreção da adiponectina (DECLERCQ, 2015).

Em outro estudo, foi avaliada a influência da suplementação de ALA (ração enriquecida com linhaça 10%) após 8 semanas em coelhos e foi comprovado o acúmulo de ALA no tecido adiposo visceral e aumento dos níveis séricos, porém sem alteração significativa na expressão gênica da adiponectina e aumento da expressão gênica da leptina, avaliado através do qPCR (MCCULLOUGH, 2011). Não encontramos estudos avaliando a expressão gênica da adiponectina no tecido adiposo subcutâneo (TASC) abdominal após suplementação com ALA. Nossos dados demonstraram que a suplementação de 3g/dia de ALA durante 60 dias em paciente com DM2 aumentou a expressão gênica da adiponectina em 90% no TASC abdominal, porém não foi encontrada diferença na expressão proteica, apesar de ter sido observado aumento sérico da adiponectina, demonstrando uma possível ação no metabolismo da adiponectina do TASC abdominal, talvez o ALA provoque um aumento da excreção da adiponectina, sem acúmulo no adipócito. Não foi o objetivo principal do nosso estudo e mais pesquisas são necessárias para melhor esclarecimento.

Em estudo randomizado, controlado, ensaio clínico realizado, 55 indivíduos obesos grau III não diabéticos em programação de cirurgia bariátrica foram selecionados para suplementação com 3,36g/dia de n-3 PUFA (EPA e DHA) ou placebo durante 8 semanas antes da cirurgia, momento no qual foram coletadas amostras de tecido adiposo subcutâneo e visceral. Os autores encontraram tendência à redução da expressão gênica de IL-6 e tendência ao aumento da expressão gênica de adiponectina em TASC abdominal, ambos sem diferença significativa, nos pacientes do grupo n-3 PUFA (ITARIU, 2012), similar ao que foi encontrado no nosso estudo, que demonstrou uma redução de quase 80% na expressão gênica de IL-6, provando um efeito metabólico benéfico do ALA, que pode estar associado ao aumento da expressão gênica da adiponectina.

O retículo endoplasmático é a organela celular responsável enovelamento e transporte proteico, além de ser responsável pela correção das proteínas mal-enoveladas, além de ser o principal reservatório de cálcio intracelular. A falência da capacidade adaptativa do RE resulta na ativação da UPR (Figura 28), que intersecta com várias vias de estresse e inflamação, e está associado à resistência insulínica, DM2, obesidade e síndrome metabólica (GREGOR, 2007; HOTAMISLIGIL, 2010).

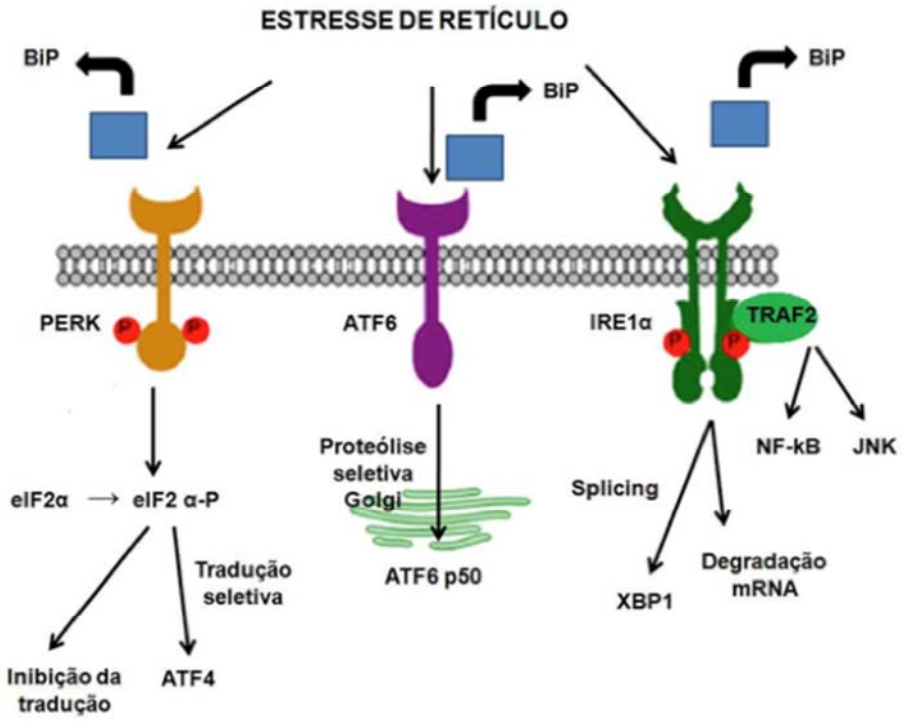

Figura 28. Via de sinalização da UPR. Modificado de HETZ 2009. Explicação no texto.

Como já apresentado nesse trabalho, o ALA possui efeitos anti-inflamatórios no tecido adiposo, com elevação da expressão gênica da adiponectina e redução da expressão gênica da IL-6, e este é o primeiro estudo que avalia a ação do ALA no ERE do tecido adiposo subcutâneo abdominal de indivíduos com DM2.

A via IRE1/XBP1 está fortemente associada ao equilíbrio do metabolismo glicídico e lipídico. Camundongos obesos (modelos de obesidade por dieta e de obesidade genética, *ob/ob*) mostraram elevada fosforilação do IRE1, com ativação da JNK no tecido adiposo e tecido hepático. Camundongos deficientes geneticamente do XBP1 apresentam aumento do ERE, hiperativação da JNK, resistência insulínica e inativação do IRS-1 (com aumento da fosforilação na serina), portanto resultando em piora do metabolismo glicídico (OZCAN, 2004).

A importância dessa via foi estudada no tecido hepático de camundongos e foi demonstrado que a deleção do gene *IRE1* em hepatócitos levou a ativação de fatores de transcrição pró-apoptóticos induzidos pelo ERE (CHOP, ATF3 e ATF4), além de grave esteatose hepática. Além disso, foi provado que o essa via do IRE1 é responsável pela proteção do fígado contra a esteatose produzida pelo Bortezomib (medicação indutora do ERE que é utilizada contra mieloma múltiplo e outros cânceres) (ZHANG, 2011).

Foi estudado o efeito da metformina nas células pancreáticas através da melhora do ERE, cultura de células pancreáticas de insulinoma de ratos foram induzidas à apoptose após tratamento com palmitato e observado ativação do ERE, outra linhagem dessas células foi tratada com metformina e observada redução do ERE, através da via IRE1/XBP1 e redução da expressão do IRS-1 (fosforilação da serina reduzida). Demonstrando efeito protetor da metformina nas células pancreáticas através da atenuação do estresse do retículo endoplasmático (SIMON-SZABO, 2014).

Portanto, em conformidade com nosso estudo, que demonstrou que a suplementação de 3g/dia de ALA durante 60 dias modulou a via XBP1, observado redução na expressão gênica (redução de 20% na expressão gênica da XBP1 e redução de 70% da expressão gênica do sXBP1, a forma ativa da XBP) e redução significativa de sua expressão proteica, comportamento contrário ao observado no estado inflamatório crônico e DM2 (EIZIRIK, 2008, SANO,2013). Não foi observada diferença significativa nas outras vias da UPR (PERK e ATF6), no entanto, foi notado aumento da expressão gênica da chaperona (aumento de 150% na

expressão da *GRP78*) e aumento significativo da expressão proteica da chaperona BIP, sinalizando efeito benéfico do ALA em aumentar os níveis de chaperonas o que, por sua vez, pode levar a uma redução do estresse do retículo endoplasmático, como foi observado na via XBP. Não observamos alteração na expressão proteica do IRS-1, porém identificamos uma redução significativa de 60% na sua expressão gênica, portanto indicando um efeito benéfico na suplementação do ALA no metabolismo glicídico, provavelmente associado à modulação da via da IRE1/XBP1 e aumento das chaperonas.

Foi comprovada a relação do estresse do retículo endoplasmático com o metabolismo da adiponectina em estudo celular de adipócitos humanos. Essas células foram submetidas ao ERE com tunicamicina (inibidor N-glicosilação) e tapsigargina (inibidor do cálcio ATPase do retículo endoplasmático), com subsequente aumento da expressão gênica e proteica do XBP1. Na análise da adiponectina foi observada a redução da expressão proteica do monômero da adiponectina e da adiponectina HMW, mostrando relação entre o ERE e a adiponectina (MONDAL, 2012). Esse resultado está de acordo com o encontrado em nosso estudo, que demonstrou atenuação do ERE e aumento da expressão gênica e sérica da adiponectina após a suplementação com ALA. Outros estudos são necessários para uma melhor compreensão desse mecanismo.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Podemos concluir que a suplementação de 3 gramas por dia de ácido alfa-linolênico durante 60 dias em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2:

Modulou o estresse do retículo endoplasmático do tecido adiposo subcutâneo abdominal, demonstrado pela diminuição da expressão gênica e proteica da via do XBP1 e aumento da expressão gênica e proteica da chaperona BIP;

Aumentou a expressão gênica da adiponectina no tecido adiposo subcutâneo abdominal, porém sem aumento de sua expressão proteica;

Diminuiu a resistência insulínica no tecido adiposo subcutâneo abdominal, comprovado pela diminuição da expressão gênica do IRS-1, porém sem alteração em sua expressão proteica;

Não interferiu nos processos inflamatórios subclínicos, sem alteração sérica do IL-1, IL6, TNF-α, porém com elevação sérica da concentração da adiponectina;

Não ocorreu alteração no controle do metabolismo lipídico;

Não ocorreu alteração do metabolismo glicídico e na sensibilidade à insulina avaliado pelo HOMA-IR, glicemia de jejum, hemoglobina glicada e insulinemia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE N, GARG A, PESHOCK RM, et al. **Relationship of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men with NIDDM**. Diabetes. 1996; 45: 1684-1693.

American Diabetes Association. **Standards of medical care in Diabetes – 2016**. Diabetes Care. 2016; 39(suppl 1): S1-S2. DOI: 10.2337/dc16-S001

BLOEDON LT, BALIKAI S, CHITTAMS J, *et al*. **Flaxseed and cardiovascular risk factor: results from a double blind, randomized, controlled clinical trial.** J Am Coll Nutr. 2008; 27 (1): 65 – 74.

BUENO AC, SUN K, MARTINS CS, et al. **A novel *ADIPOQ* mutation (p.M40K) impairs assembly of high-molecular-weight adiponectin and is associated with early-onset obesity and metabolic syndrome**. J Clin Endocrinol Metab. 2014; 99 (4): E683-E693.

BARZILAI N, SHE L, LIU BQ, et al. **Resistin and adiponectin expression in visceral fat reverses hepatic insulin resistance**. Diabetes. 1999; 48: 94-98.

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: 2438-2444.

BRESLOW JL. **n-3 Fatty acids and cardiovascular disease**. Am J Clin Nutr. 2006; 83: 1477-1482.

CAMPBELL PJ, CARLSON MG, NURJHAN N. **Fat metabolism in human obesity**. Am J Physiol. 1994; 266: E600-E605.

CAREY VJ, WALTERS EE, COLDITZ GA, *et al*. **Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women: the Nurses' Health Study**. Am J Epidemiol. 1997; 145: 614-619.

CASTRO AVB, KOLKA CM, KIM SP, et al. **Obesity, insulin resistance and comorbidities – Mechanisms of association.** Arq Bras Endocrinol Metabol. 2014; 58 (6): 600 – 609.

CORNIER MA, DABELEA D, HERNANDEZ RC, *et al*. **The metabolic syndrome**. Endocr Rev. 2008; 29: 777-822.

DE OLIVEIRA R, MORAES TI, CERDA A, *et al*. ***ADIPOQ* and IL6 variants are associated with a pro-inflammatory status in obeses with cardiometabolic dysfunction**. Diabetology & Metabolic Syndrome. 2015; 7: 34.

DECLERCQ V, D'EON B, MCLEOD RS. **Fatty acids increase adiponectin secretion through both classical and exosome pathways**. Biochim Biophys Acta. 2015; 1851 (9): 1123 – 1133.

DIPIETRO L, KAYZ LD, NADEL ER. **Excess abdominal adiposity remains correlated with altered lipid concentrations in healthy older women**. Int J Obes Relat Metab Disord. 1999; 23: 432-436.

EIZIRIK DL, CARDOZO AK, CNOP M. **The role for endoplasmic reticulum stress in Diabetes Mellitus.** Endocrine Reviews. 2008; 29 (1): 42-61.

EMADIAN A, ANDREWS RC, ENGLAND CY, *et al*. **The effect of macronutrients on glycaemic control: a systematic review of dietary randomized controlled trials in overweight and obese adults with type 2 diabetes in which there was no difference in weight loss between treatment groups**. British Journal of Nutrition. 2015; 114, 1656-1666.

ENGIN F, HOTAMISLIGIL GS. **Restoring endoplasmic reticulum function by chemical chaperones: an emergin therapeutic approach for metabolic diseases.** Diabetes, Obesity and Metabolism. 2010; 12 (2): 108-115.

FIGUERAS M, OLIVAN M, BUSQUETS S, *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.

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

GABRIELY I, MA XH, YANG XM, *et al*. **Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process?** Diabetes. 2002; 51: 2951-2958.

GELONEZE B, RODOVALHO-GELONEZE S, PARISI C, *et al*. **Standardization of insulin tolerance test in Brazilian population**. Diabetes Res Clin Pract. 2000; 50(1): S102

GELONEZE B, VASQUES ACJ, STABE CFC, *et al*. **HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome – Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS)**. Arq Bras Endocrinol Metab 2009; 53(2):281-287.

GOMES PM, HOLANDA-MIRANDA WR, BERALDO RA, *et al*. **Supplementation of α-linolenic acid improves serum adiponectin levels and insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes**. Nutrition. 2015; 31, 853 – 857.

GREGOR MF, HOTAMISLIGIL G. **Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease**. Journal of Lipid Research. 2007; 48: 1905 – 1914

GREGOR MF, YANG L, FABBRINI E, *et al*. **Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss**. Diabetes. 2009; 58: 693-700.

GROOP LC, SALORANTA C, SHANK M *et al*. **The role of free fatty acid metabolism in pathogenesis of insulin resistance in obesity and noninsulin-dependent diabetes mellitus**. J Clin Endocrinol Metabol. 1991; 72: 96-107.

HAMAZAKI K, ITOMURA M, HUAN M, *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 essentiality and the balance between n-6 and n-3**. Lipids. 2003; 38 (4): 323-341.

HARRIS WS. **n-3 Fatty acids and serum lipoproteins: human studies**. Am J Clin Nutr. 1997; 65: 1645-1654.

HETZ C, GLIMCHER LH. **Fine tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1α interactome.** Mol Cell. 2009; 35(5): 551-561.

HOTAMISLIGIL GS, SHARGILL NS, SPIEGELMAN BM. **Adipose expression of tumor necrosis factor-alfa: direct role in obesity-linked insulin resistance**. Science. 1993; 259: 87-91.

HOTAMISLIGIL GS. **Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease.** Cell. 2010; 140 (6): 900-917.

International Diabetes Federation. **IDF Diabetes Atlas, 7 ed**. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2015.

ITARIU BK, ZEYDA M, HOCHBRUGGER EE, *et al*. **Long-chain n-3 PUFAs reduce adipose tissue and systemic inflammation in severely nondiabetic obese patients: a randomized controlled trial**. Am J Clin Nutr. 2012; 96 (5): 1137-1149.

KABIR M, SKURNIK G, NAOUR N, *et al*. **Treatment for 2 mo with n-3 polyunsaturated fatty acids reduces adiposity and some atherogenic factors but does not improve insulin sensitivity in women with type 2 diabetes: a randomized controlled study**. Am J Clin Nutr. 2007; 86: 1670 – 1679.

KALLEN CJH, GREEVENBROEK MMJ, STEHOUWER CDA, *et al*. **Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the development of diabetes: is there a role for adipose tissue and liver?** Apoptosis. 2009; 14: 1424-1434.

KIM KB, NAM YA, KIM HS, *et al*. **α-Linolenic acid: Nutraceutical, pharmacological and toxicological evaluation**. Food Chem Toxicol. 2014; 70C:163-178

KLIMCAKOVA E, POLAK J, MORO C, *et al*. **Dynamic strength training improves insulin sensitivity without altering plasma levels and gene expression of adipokines in subcutaneous adipose tissue in obese men**. J Clin Endocrinol Metab. 2006; 91 (12): 5107-5112.

LEE J, OZCAN U. **Unfolded protein response signaling and metabolic diseases.** Journal of Biological Chemistry. 2014; 289 (3): 1203-1211.

LONN M, MEHLIG K, BENGTSSON, *et al*. **Adipocyte size predicts incidence of type 2 diabetes in women**. FASEB J. 2010; 24 (1) 326-331.

MA X, LEE P, CHISHOLM DJ, JAMES DE. **Control of Adipocyte Differentiation in Different Fat Depots; Implications for Pathophysiology or Therapy**. Frontiers in Endocrinology. 2015;6:1. doi:10.3389/fendo.2015.00001.

MARTIN CA, ALMEIDA VV, RUIZ MC, *et al*. **Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos**. Rev. Nutr. Campinas. 2006; 19 (6): 761-770.

MATRAVADIA D, ZABIELSKI P, CHABOWSKI A, *et al*. **LA and ALA prevent glucose intolerance in obese male rats without reducing reactive lipid content, but cause tissue-specific changes in fatty acid composition**. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2016 (310); 7.

MAYER MP, BUKAU B. **Hsp 70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism.** Cell Mol Life Sci. 2005; 62: 670-684.

MCCULLOUGH RS, EDEL AL, BASSETT CM, *et al*. **The alpha linolenic acid content of flaxseed is associated with an induction of adipose leptin expression.** Lipids. 2011; 46(11): 1043 – 1052.

MONDAL AK, DAS SK, VARMA V, *et al*. **Effect of endoplasmic reticulum stress on inflammation and adiponectin regulation in human adipocytes.** Metab Syndr Rela Disord. 2012; 10 (4): 297 – 306.

MONTAGUE CT, O'RAHILLY S. **The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity**. Diabetes. 2000; 49: 883-888.

MORADI F. **Changes of serum adiponectin and testosterone concentrations following twelve weeks resistance training in obese young men**. Asian J Sports Med. 2015; 6(4): e23808.

MORAES SA, FREITAS ICM, GIMENO SGA, *et al*. **Prevalência de diabetes mellitus e identificação de fatores associados em adultos residentes em área urbana de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 2006: Projeto OBEDIARP**. Cad. Saúde Pública. 2010; 26(5): 929-941.

MOZAFFARIAN D, RIMM EB. **Fish Intake, Contaminants, and Human Health. Evaluation the risk and benefits**. JAMA. 2006; 296 (15): 1885-1899.

MURAMATSU T, YATSUYA H, TOYOSHIMA H, *et al*. **Higher dietary intake of alpha-linolenic acid is associated with lower insulin resistance in middle-aged Japanese**. Prev Med. 2010; 50 (5-6): 272 – 276.

MUTCH DM, TORDIMAN J, PELLOUX V, *et al*. **Needle and surgical biopsy techniques differentially affect adipose tissue gene expression profiles**. Am J Clin Nutr. 2009; 89 (1): 51-57.

NI M, LEE AS. **ER chaperones in mammalian development and human diseases**. FEBS Lett. 2007; 581 (19): 3641-3651.

OH DY, TALUKDAR S, BAE EJ, *et al*. **GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects**. Cell. 2010; 142: 687-698.

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

OZCAN U, CAO Q, YILMAZ E, et al. **Endoplasmic reticulum stress links obesity, Insulin action and type 2 diabetes**. Science. 2004; 306: 457-461.

PAWLOSKY RJ, HIBEBELN JR, NOVOTNY JA, *et al*. **Physiological comportment analysis of α-linolenic acid metabolism in adults humans**. Journal of Lipid Research. 2001; 42, 1257 – 1265.

PARK SW, ZHOU Y, LEE J, et al. **Sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+}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.

RAJARAM S. **Health benefits of plant-derived α-linolenic acid**. The American Journal of Clinical Nutrition. 2014; 100, Suppl: 443S-448S.

RANGEL-HUERTA OD, AGUILERA CM, MESA MD, *et al*. **Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids supplementation on inflammatory biomarkers: a systematic review of randomized clinical trials**. British Journal of Nutrition. 2012; 107: S159-S170

REAVEN GM. BANTING L. **Role of insulin resistance in human disease**. Diabetes. 1988; 37:1595-1607.

RICHI EV, BAUMER B, CONRAD B, *et al*. **Health risks associated with meat consumption: a review of epidemiological studies**. Int. J. Vitam. Nutr. Res. 2015, 85 (1-2): 70-78

RODRIGUEZ AJ, NUNES VS, MASTRONARDI CA, *et al*. **Association between circulation adipocytokine concentrations and microvascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of controlled cross-sectional studies**. Journal of diabetes and its complications. 2016, 30: 357-367.

SANO R, REED JC. **ER stress-induced cell death mechanisms.** Biochim Biophys Act. 2013; 1833 (12)

SATTAR N, GILL, JMR. **Type 2 diabetes as a disease of ectopic fat?** BMC Medicine. 2014, 12:123.

SIMON-SZABO L, KOKAS M, MANDL J, *et al*. **Metformina attenuates palmitate-induced endoplasmic reticulum stress, serine phosphorylation of irs-1 and apoptosis in rat insulinoma cells.** PLoS ONE. 2014; 9(6)

SCHERER PE. **Adipose tissue: from storage compartment to endocrine organ**. Diabetes. 2006; 55: 1537-1545.

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

SHARMA NJ, DAS SK, MONDAL AK, *et al*. **Endoplasmic reticulum stress markers are associated with obesity in nondiabetic subjects**. J Clin Endocrinol Metab. 2008; 93(11): 4532-4541

SHIDHAM V.B., HUNT B., JARADEH S.S., *et al*. **Performing and Processing FNA of Anterior Fat Pad for Amyloid**. JoVE. 2010; 44. http://www.jove.com/details.php?id=1747, doi: 10.3791/1747.

STERN SE, WILLIAMS K, FERRANNINI E, *et al*. **Identification of individuals with insulin resistance using routine clinical measurements**. Diabetes. 2005; 54:333-340.

STOLK RP, MEIJER R, MALI WP, *et al*. **Ultrasound measurements of intrabdominal fat estimate the metabolic syndrome better than do measurements of waist circumference**. Am J Clin Nutr. 2003; 77: 857-860.

TAN J, GIBSON, WT. **Leptin and adiponectin: examing their clinical significance in obesity**. UTMJ. 2015; 92 (2).

TODORIC J, LOFFLER M, HUBER 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.

TORQUATO MTCG, MONTENEGRO JÚNIOR RN, VIANA LAL, *et al*. **Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance en the urban population aged 30-69 years in Ribeirão Preto (São Paulo), Brazil.** São Paulo Med J. 2003; 121 (6): 224-30.

TSUTSUMI A, MOTOSHIMA H, KONDO T, *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.

VISSER M, BOUTER LM, MCQUILLAN GM, *et al*. **Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults**. JAMA. 1999; 282: 2131-2135.

WEYER C, YUDKIN JS, STEHOUWER CD et al. **Humoral markers of inflammation and endothelial dysfunction in relation to adiposity and in vivo insulin action in Pima Indians**. Atherosclerosis. 2002; 161: 233-242.

WU JHY, MICHA R, IMAMURA F, *et al*. **Omega-3 fatty acids and incident type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis.** BrJ Nutr. 2012; 107: S214 – 227.

WU Z, CHENG Y, AUNG LHH, LI B. **Association between Adiponectin Concentrations and Cardiovascular Disease in Diabetic Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis**. PLoS ONE. 2013; 8(11): e78485.

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

ZANG K, WANG S, MALHOTRA J, *et al*. **The unfolded protein response transducer IRE1α prevents ER stress-induced hepatic steatosis.** The EMBO Journal. 2011; 30 (7), 1357 – 1375.

ANEXOS E APÊNDICES

ANEXOS E APÊNDICES

ANEXO A – APROVAÇÃO DA PESQUISA E DO TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO NO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FMRP-USP
RIBEIRÃO PRETO

Ribeirão Preto, 07 de dezembro de 2011

Ofício nº 4513/2011
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **"AVALIAÇÃO DO TECIDO ADIPOSO SUBCUTÂNEO EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2 EM SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO GRAXO ÔMEGA-3",** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 338ª Reunião Ordinária realizada em 05/12/2011, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido,** de acordo com o Processo HCRP nº 13091/2011.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Atenciosamente.

DR.ª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
PROFª DRª MARIA CRISTINA FOSS DE FREITAS
WALLACE RODRIGUES DE HOLANDA MIRANDA (Pesquisador)
Depto. de Clínica Médica

Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO B – CADASTRO NA COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA (CONEP) DO MINISTÉRIO DA SAÚDE.

Andamento do projeto - CAAE - 0300.0.004.000-11

Título do Projeto de Pesquisa

AVALIAÇÃO DO TECIDO ADIPOSO SUBCUTÂNEO DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2 EM SUPLEMENTAÇÃO DE ÀCIDO GRAXO ÔMEGA-3

Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	19/10/2011 12:36:11	13/12/2011 11:01:11		

Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	06/10/2011 16:26:50	Folha de Rosto	FR469379	Pesquisador
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	19/10/2011 12:36:11	Folha de Rosto	0300.0.004.000-11	CEP
3 - Protocolo Aprovado no CEP	13/12/2011 11:01:11	Folha de Rosto	13091/2011	CEP

Voltar

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

DIVISÃO DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da pesquisa:
"Avaliação do tecido adiposo subcutâneo de pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 em suplementação de ácido graxo Ômega 3"

Pesquisadores responsáveis:
Wallace Rodrigues de Holanda Miranda e Maria Cristina Foss-Freitas

CONVITE PARA PARTICIPAR DA PESQUISA

O que se quer estudar?

O Diabetes Mellitus é uma doença crônica que pode levar a diversas complicações, como, por exemplo, doenças do coração e vasos sanguíneos da visão, dos rins e amputação de pés e pernas. Nosso trabalho tem por objetivo avaliar o Ômega 3, uma substância presente em alguns alimentos, como o peixe e sabe-se que reduz a inflamação em diversos tecidos. Nosso objetivo é estudar a ação dessa medicação no Diabetes Mellitus, principalmente no tecido adiposo subcutâneo, ou seja, a gordura que você tem abaixo da pele. Até o momento, não foi encontrado efeitos colaterais importantes com o uso dessa substância, mas pode ocorrer, raramente, enjoo, vômito e diarreia.

Como será realizado o estudo?

Você participará das etapas:

1) Coleta de sangue: será coletada 1 amostra de sangue de 5 mL, ou seja, aproximadamente 1 colher de chá. Você poderá sentir um desconforto no momento da retirada do sangue e pode formar uma mancha roxa no local (hematoma), mas o profissional que realizará esse procedimento é qualificado, experiente e seguirá todas as etapas de segurança, utilizando material totalmente descartável. Seu sangue será encaminhado para o laboratório do hospital para avaliação do Diabetes Mellitus.
2) Coleta de tecido adiposo subcutâneo: uma pequena quantidade (1 amostra de 2 gramas) do seu tecido adiposo será retirada por um profissional experiente, seguindo todas as normas de segurança e higiene, através de punção abdominal após anestesia local, evitando a dor durante o procedimento. Este procedimento é semelhante ao que é feito em tratamentos de estética (porém com uma retirada bem menor) e no

diagnóstico de algumas doenças e uma agulha será colocada logo abaixo da sua pele para a retirada da gordura do abdome. Pode formar uma mancha roxa no local (hematoma), no entanto a chance de formação é pequena devido à substância utilizada com o anestésico (vasoconstrictor). Esse material será encaminhado para o laboratório do hospital para estudo.

3) Após essas coletas, você começará a tomar, por boca e com água, cápsulas de ômega 3 (2, 3 ou 4 gramas) uma vez por dia, durante 2 meses. Essas cápsulas serão fornecidas gratuitamente.
4) Após 2 meses será marcado uma nova data para repetição das coletas.

O estudo trará algum custo para minha família?

Pela sua participação no estudo, você não irá receber ou fornecer qualquer valor em dinheiro. Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade.

Quem saberá dos resultados deste estudo?

Os seus dados durante o estudo são confidenciais de acordo com o Código de Ética. Você será identificado por números e as informações pessoais não serão liberadas sem a sua autorização por escrito. Você não será identificado pessoalmente em nenhuma publicação sobre o assunto.

Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento.

Quais os benefícios deste estudo?

Este estudo pode não trazer benefícios diretos a você, mas ele permitirá um maior entendimento do Diabetes Mellitus, uma doença que cresce no mundo inteiro, e de algumas alterações que ocorrem nela e podem trazer prejuízos ao indivíduo. Por outro lado, se o efeito do Ômega-3 for benéfico para o tratamento do diabetes, você poderá manter o uso do mesmo.

Problemas ou perguntas

Se você tiver alguma pergunta sobre este estudo ou no caso de qualquer problema relacionado à pesquisa entre em contato com Dr. Wallace Rodrigues de Holanda Miranda ou Dra. Maria Cristina Foss-Freitas pelos telefones: (16) 3602-2467/ 3602-2326/ 8149-5690.

Assinaturas

Se tiver lido o consentimento livre e esclarecido ou se ele tiver sido explicado para você e tiver entendido a informação e concorde voluntariamente em participar deste estudo, por favor, assine abaixo:

Nome do participante: _____

Nome da testemunha: _____

_____ _____

Assinatura do participante Assinatura da testemunha

Eu expliquei o propósito deste estudo ao voluntário e estou certo de que ele (ela) entendeu o motivo, os procedimentos, riscos e benefícios do estudo.

Nome do pesquisador: Wallace Rodrigues de Holanda Miranda

Assinatura do pesquisador _____ Data___/____/____

Em caso de dúvida em relação a esse documento, você pode entrar em contato com o Comitê Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, telefone: (16) 3602-2228.

APÊNDICE B – AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DO RNA TOTAL POR DNA ATRAVÉS DA ESPECTROFOTOMETRIA*

Amostra	ng/uL	260/280
1DO	80	1,648
1DO'	151	1,654
2DO	114	1,535
2DO'	137	1,81
3DO	20	1,976
3DO'	29	1,78
4DO	49	1,732
4DO'	14	1,717
5DO	69	1,821
5DO'	110	1,871
6DO	60	1,817
6DO'	36	1,745
7DO	37	1,979
7DO'	77	1,761
8DO	226	1,906
8DO'	221	1,968
9DO	56	1,892
9DO'	44	1,762
10DO	40	1,904
10DO'	51	1,841
11DO	23	2,036
11DO'	40	2,149
12DO	45	1,915
12DO'	42	1,963
13DO	66	1,875
13DO'	121	1,751
14DO	130	1,531
14DO'	115	1,586
15DO	142	1,568
15DO'	22	1,682
16DO	41	1,776
16DO'	110	1,484
17DO	34	1,686
17DO'	133	1,596
18DO	45	1,712
18DO'	58	1,694
19DO	139	1,584
19DO'	146	1,544
20DO	52	1,817
20DO'	134	1,551

* DO e DO' representam as amostras antes e após a intervenção, respectivamente.