UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Mariana Pinto Chaves

Efeitos da suplementação do ácido graxo alfa-linolênico (ALA) no metabolismo e no estresse do retículo endoplasmático em tecido adiposo visceral de obeso grau III

Ribeirão Preto

2017

MARIANA PINTO CHAVES

Efeitos da suplementação do ácido graxo alfa-linolênico (ALA) no metabolismo e no estresse do retículo endoplasmático em tecido adiposo visceral de obeso grau III

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Doutora em Clínica Médica

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Foss-Freitas

Ribeirão Preto

2017

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

Catálogo da Publicação

Preparada pela Biblioteca do Serviço e Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Mariana Pinto Chaves

Efeitos da suplementação do ácido graxo alfa-linolênico (ALA) no metabolismo e no estresse do retículo endoplasmático em tecido adiposo visceral de obesos grau III

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, São Paulo, 2017.

98p.: il.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Clínica Médica.

Orientadora: Maria Cristina Foss-Freitas. - Ribeirão Preto, 2017. 98p.

1. Ácido alfa-linolênico. 2. Estresse do retículo endoplasmático.
3. Tecido adiposo visceral. 4. Obesidade. 5. Leptina

CHAVES, Mariana Pinto

Efeitos da suplementação do ácido graxo alfa-linolênico (ALA) no metabolismo e no estresse do retículo endoplasmático em tecido adiposo visceral de obeso grau III

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Clínica Médica

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

SUPLENTES

Prof.(a) Dr.(a) _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Ana Maria, pela dedicação, ajuda e por não medir esforços para que eu alcance todos os meus objetivos.

Ao meu pai, Francisco Chaves e à minha irmã, Juliana Chaves, por sempre torcerem pela minha felicidade.

Às minhas mães de coração, Francisca e Neuza, pelo amor e dedicação.

À minha filha Gabriela, que dá todo sentido à vida e me estimula a buscar sempre o melhor.

AGRADECIMENTOS

A todos os pacientes que aceitaram participar da pesquisa, por terem se comprometido com o estudo, pela paciência e disponibilidade. Sem eles o trabalho não seria possível.

À minha orientadora, Prof. Dra. Maria Cristina, pelo estímulo à pesquisa, disponibilidade, presença e orientação.

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

Às técnicas de laboratório Livia Ambrosio e Giuliana Bertozi, pela ajuda com as cromatografias e com a dosagem de citocinas.

À nutricionista Natalia Bonissi, pela ajuda com a coleta da gordura visceral.

Ao biomédico Rafael Ferraz, pela ajuda na avaliação molecular.

A todos os integrantes do ambulatório de Cirurgia Bariátrica do HCRP – USP (Prof. Dr. Wilson Salgado Jr, Dra. Camila Scalassara, Psicóloga Helenice) por me permitirem fazer parte da rotina de atendimento, selecionar voluntários e coletar exames.

A farmacêutica Marlene, pela confecção das cápsulas.

Aos médicos Patrícia Moreira, Wallace Miranda e Prof. Dra Vivian Suen pelo apoio.

A todos os técnicos de laboratório que colaboraram com o armazenamento da gordura e amostras de sangue.

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.

RESUMO

CHAVES, Mariana Pinto. **Efeitos da suplementação do ácido graxo alfa-linolênico (ALA) no metabolismo e no estresse do retículo endoplasmático em tecido adiposo visceral de obeso grau III. 2017.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Atualmente, a obesidade é considerada uma epidemia mundial. Está associada a um estado de inflamação crônica e ativação do estresse do retículo endoplasmático (ERE), relacionados à patogênese de diversas doenças como diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares, câncer, hipertensão, dentre outras. Nesse contexto, são necessários estudos para encontrar alternativas que melhorem o processo inflamatório. Vários estudos em humanos e animais já demonstraram as propriedades anti-inflamatórias do ácido graxo ômega-3. O objetivo do nosso trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação do ácido alfa-linolênico (ALA) no metabolismo e no estresse do retículo endoplasmático em obesos grau III. Foi conduzido um estudo prospectivo, randomizado, placebo-controlado, duplo-cego. No total, 52 pacientes foram randomizados para a suplementação com 3g/dia de ALA ou placebo, sendo 27 indivíduos do grupo ômega-3/ALA e 25 do grupo controle. Foi avaliado perfil lipídico, glicídico e inflamatório antes e após suplementação. O tecido adiposo visceral (TAV) foi coletado durante cirurgia bariátrica após suplementação. O perfil de ácidos graxos incorporados no TAV foi avaliado por cromatografia gasosa. Os genes foram avaliados através de PCR em tempo real. Não houve alteração nos níveis séricos de IL-6 ($p=0,2201$), TNF- α ($0,7703$) e PCR ($p=0,57$) após suplementação com ômega-3/ALA, porém observamos diminuição nos níveis séricos de Leptina ($p=0,0154$) e IP-10 ($p=0,0410$), citocinas inflamatórias, e aumento na IL-4 ($p=0,0211$), citocina anti-inflamatória. Foi observado incorporação significativa do ALA ($p=0,0002$), EPA ($p<0,0001$) e DHA ($p=0,0005$) no TAV. Avaliação molecular evidenciou um aumento da expressão gênica do XBP1 ($p=0,0013$), sXBP1 ($p<0,0001$), EIF2- α ($p=0,0063$) e da chaperona CCT4 ($p=0,0001$) e diminuição na expressão gênica da leptina ($p=0,0410$). Podemos concluir que o ALA pode modular o ERE através da via da IRE1/XBP, levando ao aumento das chaperonas (CCT4), o que pode demonstrar um potencial terapêutico do ALA em pacientes obesos.

Palavras-chave: ácido alfa-linolênico; estresse do retículo endoplasmático; tecido adiposo visceral; obesidade; leptina.

ABSTRACT

CHAVES, Mariana Pinto. **Alpha-linolenic acid supplementation effects on endoplasmic reticulum stress in visceral adipose tissue from morbid obese patients.** 2017. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Currently, obesity is considered a worldwide epidemic. It is associated with chronic inflammation and stress activation of the endoplasmic reticulum (ERE), related to the pathogenesis of various diseases such as type 2 diabetes mellitus, cardiovascular diseases, cancer, hypertension, among others. In this context, studies are needed to find alternatives that improve the inflammatory process. Several studies in humans and animals have already demonstrated the anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acid. The objective of our study was to evaluate the effects of alpha-linolenic acid (ALA) supplementation on the metabolism and stress of the endoplasmic reticulum in obese patients. A prospective, randomized, placebo-controlled, double-blind study was conducted. In total, 52 patients were randomized to supplementation with 3 g / day of ALA or placebo, 27 individuals from the omega-3 / ALA group and 25 from the control group. Lipid, glycidic and inflammatory profile were evaluated before and after supplementation. Visceral adipose tissue (TAV) was collected during bariatric surgery after supplementation. The fatty acid profile incorporated in the TAV was evaluated by gas chromatography. Genes were evaluated by real-time PCR. There was no change in serum levels of IL-6 ($p = 0.2201$), TNF- α (0.7703) and CRP ($p = 0.57$) after supplementation with ALA, but we observed a decrease in serum Leptin levels ($P = 0.0154$) and IP-10 ($p = 0.0410$), inflammatory cytokines, and increase in IL-4 ($p = 0.0211$), anti-inflammatory cytokine. Significant incorporation of ALA ($p = 0.0002$), EPA ($p < 0.0001$) and DHA ($p = 0.0005$) into the TAV was observed. Molecular evaluation showed an increase in the gene expression of XBP1 ($p = 0.0013$), sXBP1 ($p < 0.0001$), EIF2- α ($p = 0.0063$), GADD34 ($p = 0.0117$) and CCT4 chaperone ($p = 0.0001$), decrease in the gene expression of leptin ($p = 0.0410$) and ATF-6 ($p = 0.0305$) and a tendency to decrease the gene expression of CHOP. We can conclude that ALA can modulate ERE through the IRE1 / XBP, PERK and ATF-6 pathways, leading to increased chaperones (CCT4), which may demonstrate a therapeutic potential of ALA in obese patients.

Keywords: alpha-linolenic acid; endoplasmic reticulum stress; visceral adipose tissue; obesity; leptin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ambiente imune na obesidade (Johnson et al., 2012).....	20
Figura 2.	Efeitos metabólicos das adipocinas no balanço energético (Galic, 2010)	21
Figura 3.	RE e inflamação/Vias da UPR (Adaptado de Hotamisligil, 2010)	26
Figura 4.	Estrutura molecular dos ácidos graxos ômega 3, 6 e 9	27
Figura 5.	Vias de conversão dos ácidos graxos n-3 (ALA) e n-6 (AL) e seus produtos finais	29
Figura 6.	Recomendações de consumo de ômega-3	32
Figura 7.	Evolução do consumo de gorduras saturadas e insaturadas	33
Figura 8.	Vias de conversão dos ácidos graxos ômega 3 e 6, codificadas pelas FADS	34
Figura 9.	Diferença entre as dosagens sérica de Leptina (A), IL-4 (B), IP-10 (C), TNF- α (D), IL-6 (E) e PCR (F), comparado entre D1 (início do tratamento) e D2 (após tratamento)	52
Figura 10.	Incorporação dos ácidos graxos em tecido adiposo visceral de obesos grau III após suplementação com ALA.....	54
Figura 11.	Expressão dos genes do estresse do retículo endoplasmático e adipocinas no tecido adiposo visceral após suplementação com ALA	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características gerais dos indivíduos no início do estudo	49
Tabela 2.	Avaliação do Peso e IMC antes e após suplementação de placebo e ALA	49
Tabela 3.	Avaliação do controle glicêmico e perfil lipídico antes e após suplementação de placebo e ALA	50
Tabela 4.	Média, mediana e erro padrão das citocinas séricas e PCR antes e após suplementação com ALA em cada grupo (placebo e ALA), seguido do p- valor	51
Tabela 5.	Média, mediana e desvio padrão da incorporação de ALA, EPA, DHA, ômega-6 e AA após suplementação com ALA em cada grupo (Controle e ALA), seguido do p-valor	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Ácido Aracdônico

AGCC: Ácidos Graxos de Cadeia Curta

AGMI: Ácidos Graxos Monoinsaturados

AGPI: Ácidos Graxos Poli-Insaturados

AGPI-CL: Ácidos Graxos Poli-Insaturados de Cadeia Longa

AGPI-CML: Ácidos Graxos Poli-Insaturados de Cadeia Muito Longa

AGS: Ácidos Graxos Saturados

AL: Ácido Linoléico

ALA: Ácido α -linolênico

ATF4: Activating trasncription factor-4

ATF-6: Activating Transcription Factor

BIP: Immunoglobulin heavy-chain-binding protein

CANX: Calnexina

CALR: Calreticulina

CCT4: Chaperonin Containing t-complex Polypeptide

cDNA: DNA complementar

CHOP: C/EBP homologous protein

CT: Colesterol total

DGLA: Ácido Di-homo-gama-linoleico

DHA: Ácido Docosahexanóico

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

DMO: Densitometria Óssea

EDEM: ER degradation enhancing α -mannosidase-like protein

EIF2 α : Eukaryotic Translation Initiation Factor-2 α Subunit

EPA: Ácido Eicosapentanóico

ERAD: Estress Reticulum associated degradation

ERE: Estresse do Retículo Endoplasmático

FADs: Fatty Acid Dessaturases

GADD34: growth arrest and DNA damage-inducible protein,

GLA: Ácido Gama-linoleico

GRP78: glucose-regulated protein 78

HDL: High density lipoprotein

HSP: Heat shock protein

IKK: Ikappa kinase

IL: Interleucinas

IRS-1: Substrato 1 dos Receptores de Insulina

IMC: Índice de Massa Corpórea

INF- γ : Interferon- gama

IRE-1: Inositol Requiring ER-to-nucleus Signal Kinase

IRS-1: Substrato do receptor de insulina 1

ISSFAL: Sociedade Internacional de Estudo de Ácidos Graxos e Lipídeos

JNK: *c-jun* N-terminal kinase

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LTs: Leucotrienos

MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1

N-3 PUFA: Ácidos Graxos Poli-insaturados Ômega-3

N-6 PUFA: Ácidos Graxos Poli-insaturados Ômega-6

NF- κ B: Factor nuclear kappa B RNA-dependent-like ER kinase

PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1

PERK: Protein kinase double-stranded

PCR: proteína C reativa

PGs: Prostaglandinas

PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor

RE: Retículo Endoplasmático

TAM: Tecido Adiposo Marrom

TASC: Tecido Adiposo Subcutâneo

TAV: Tecido Adiposo Visceral

TNF- α : Tumor Necrosis Factor

TRAF2: TNFR-associated factor 2

TXs: Tromboxanos

UPR: Unfolded Protein Respon~~s~~e

VCAM1: Molécula de Adesão da Célula Vascular

WHO: World Health Organization

XBP1: X-box Binding Protein 1

XBP1s: Spliced X-box Binding Protein 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Obesidade	16
1.2 Tecido adiposo.....	17
1.2.1 O Tecido adiposo como órgão secretor	17
1.3 Obesidade X Inflamação	20
1.4 Leptina	23
1.5 Retículo Endoplasmático	24
1.6 Ácidos Graxos	27
1.6.1 Visão geral	27
1.6.2 Metabolismo dos ácidos graxos.....	28
1.6.3 Ácidos Graxos e inflamação	29
1.6.4 Fontes de ácidos graxos essenciais	31
1.6.5 Recomendações de consumo	31
1.6.6 Aspectos históricos: balanço dos ácidos graxos n-3 e n-6	33
1.7 Ácido alfa-linolênico (ALA)	34
1.7.1 ALA e Obesidade	35
 2 OBJETIVOS	 38
2.1 Objetivo Geral	38
2.2 Objetivos específicos	38
 3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	 40
3.1 Delineamento, período e local do estudo.....	40
3.2 Critérios de inclusão e exclusão	40
3.3 Escolha da dose de ALA	40
3.4 Confeção das cápsulas	41
3.5 Randomização	41
3.6 Adesão e reações adversas.....	42
3.7 Avaliação antropométrica.....	42
3.8 Exames laboratoriais.....	42
3.9 Gordura visceral	43
3.10 Extração de RNA.....	44
3.11 Síntese de cDNA	44

3.12 Avaliação molecular por Array	44
3.13 PCR em Tempo Real	45
3.14 Avaliação do perfil de ácidos graxos em gordura visceral por cromatografia gasosa	45
3.15 Análise estatística	46
4 RESULTADOS	48
4.1 Adesão e tolerância.....	48
4.2 Características gerais	48
4.3 Avaliação antropométrica.....	49
4.4 Avaliação do controle glicêmico e perfil lipídico	50
4.5 Avaliação das citocinas séricas e proteína C reativa (PCR).....	51
4.6 Avaliação da incorporação do ALA em gordura visceral	53
4.7 Avaliação molecular em tecido adiposo visceral	55
5 DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÕES.....	69
BIBLIOGRAFIA	72
ANEXOS	92
Anexo 1: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)	92
Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	93
Anexo 3: PCR array dos genes relacionados ao ERE	95
Anexo 4: Sequência de <i>primers</i> (qPCR)	96
Anexo 5: Lista de genes submetidos ao PCR <i>Array</i>	97

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

A obesidade é uma doença crônica, caracterizada pelo excesso de gordura corporal, com determinantes genéticos e ambientais, a qual pode resultar em prejuízos significativos à saúde (SPIEGELMAN, 2001). A obesidade é diagnosticada, segundo orientação da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1997) - pelo Índice de Massa Corporal (IMC), obtido através do cálculo da relação entre peso corpóreo (kg) e estatura (m^2) dos indivíduos. O IMC, além de classificar o indivíduo com relação ao peso, também é um indicador de risco para a saúde e tem relação com várias complicações metabólicas. Considera-se excesso de peso o indivíduo com IMC igual ou maior que 25 kg/m^2 e obesidade com IMC igual ou maior que 30 kg/m^2 .

No mundo, aproximadamente 2 bilhões de adultos são classificados como sobrepeso (IMC entre 25 e 30 kg/m^2) e 600 milhões como obesos (NG, 2014). No Brasil, segundo os dados divulgados pela Vigitel em 2016, o excesso de peso cresceu 26,3% em dez anos passando de 42,6% em 2006 para 53,8% em 2016, enquanto a obesidade aumentou 60%, passando de 11,8% para 18,9% no mesmo período. Dados do IBGE de 2015 mostram que 82 milhões de pessoas apresentaram o IMC igual ou maior do que 25 (sobrepeso ou obesidade). Há uma prevalência maior de excesso de peso no sexo feminino (58,2%) do que no sexo masculino (55,6%). Atualmente, a obesidade é o maior problema alimentar da população brasileira e os dados anunciados traduzem a urgência de se pensar em políticas públicas adequadas à prevenção e ao tratamento do sobrepeso e obesidade (MONTEIRO, 2004). Essa mudança dos indicadores nutricionais reflete o aumento à exposição de alimentos processados, sedentarismo, urbanização e falta de políticas efetivas na prevenção do excesso de peso (SWINBURN, 2011).

O aumento na falha dos tratamentos dietéticos e farmacológicos, principalmente a longo prazo, tem aumentado a prevalência de obesos grau III ($\text{IMC} \geq 40 \text{ kg/m}^2$), e tem levado a uma crescente demanda para a cirurgia bariátrica. A cirurgia bariátrica é considerada atualmente a ferramenta mais eficaz no tratamento e controle da obesidade grau III (KUSHNER, 2000; MAGGARD, 2005). A obesidade está associada a diversas doenças crônicas como resistência insulínica, diabetes mellitus tipo 2, esteatose hepática não alcoólica, doenças cardiovasculares e câncer (CALLE, 2003).

1.2 Tecido adiposo

O tecido adiposo é considerado o maior órgão endócrino. É constituído principalmente de adipócitos, mas também contém tecido conectivo, nervoso e células imunológicas. Os adipócitos estocam energia na forma de gordura. O tecido adiposo pode ser dividido em branco e marrom, apesar de algumas evidências sugerirem a presença de tecido adiposo bege e rosa (HASSAN, 2012; GEST, 2007). 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 (TAM), presente na área interescapular, principalmente em crianças, é rico em mitocôndrias, responsável por produção de energia e aumento de temperatura (função termogênica) (ELATTAR, 2015). Em modelos animais, altos níveis de tecido adiposo marrom conferem proteção contra a obesidade. Ratos com baixos níveis de TAM são mais suscetíveis à obesidade induzida por dieta (MUELLER, 2016).

O aumento do TAV está relacionado a várias condições patológicas, incluindo diminuição do metabolismo da glicose e dos lipídeos, resistência insulínica, predisposição a infarto do miocárdio e hipertensão (RITCHIE, 2007; FOX 2007), aumento da predisposição a câncer de cólon (OH, 2008), mama (SCHAPIRA, 1994) e próstata (VON HAFE, 2004), além de estar associado a um tempo maior de internação hospitalar, aumento no risco de complicações infecciosas e não infecciosas e aumento na mortalidade hospitalar (TSUJINAKA, 2008). Estudos comprovam que o TAV está mais intimamente correlacionado às patologias associadas à obesidade do que à adiposidade total (ABATE, 1996).

1.2.1 O Tecido adiposo como órgão secretor

Ultimamente, o tecido adiposo é considerado um importante órgão secretor, pois produz e secreta vários fatores peptídicos ou não peptídicos, que influenciam não apenas a função adipocitária (autócrina e parácrina), mas também afetam várias vias metabólicas por meio da circulação sanguínea. Os ácidos graxos são a maior parte dessa secreção, os quais são liberados em períodos de balanço energético desfavorável, como no jejum. Demais moléculas incluem as prostaglandinas, colesterol, hormônios esteróides e retinol. Os adipócitos também secretam várias citocinas e proteínas de fase aguda que, direta ou indiretamente, elevam a produção e circulação de fatores relacionados com a inflamação (TRAYHURN, 2007).

De acordo com Trayhurn e Wood (2004), adipocina é um termo universal adotado para descrever a proteína que é secretada e sintetizada pelo tecido adiposo. As adipocinas possuem estrutura proteica e função fisiológica bastante variadas. Elas incluem citocinas clássicas, fatores de crescimento e proteínas envolvidas na regulação da pressão arterial, homeostase vascular, metabolismo lipídico, glicídico e angiogênese.

Como órgão endócrino, o TAV produz diversos hormônios e moléculas bioativas, incluindo as adipocinas como leptina, adiponectina, TNF- α (tumor necrosis factor α), IL-6 (interleucina 6), IL-8 (interleucina 8), IL-1(interleucina-1) MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) e PCR (proteína C reativa) (RITCHIE, 2007). Adiponectina e leptina são as adipocinas mais abundantes sintetizadas pelo tecido adiposo (WEISBERG, 2003).

A primeira proteína identificada foi a lipase lipoproteica, seguida pela adipisina (meados da década de 1980). Entretanto, o grande avanço do entendimento do tecido adiposo como órgão secretor se deu em 1994 com a descoberta da leptina (ZHANG, 1994), a qual será descrita em tópico próprio.

A adiponectina circulante se correlaciona inversamente à quantidade de tecido adiposo visceral (PINTHUS, 2008). Também conhecida como proteína complementar relacionada com adipócito (Acrp 30) é o mais abundante fator produzido exclusivamente pelo tecido adiposo de humanos e está envolvida na regulação do balanço energético, desenvolvendo um papel anorexígeno e anti-inflamatório. Apresenta propriedades antiangiogênicas, aumenta a sensibilidade à insulina e inibe inflamação vascular (BERG, 2002; PAJVANI, 2003). Baixas concentrações de adiponectina estão relacionadas a elevação da glicose plasmática, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensão, doenças cardiovasculares e alguns tumores malignos (RITCHIE, 2007; PINTHUS, 2008). Os receptores da adiponectina (AdipoR1 e AdipoR2) são encontrados no músculo esquelético, fígado, cérebro (YAMAUCHI, 2003), células β -pancreáticas (KHARROUBI, 2003), macrófagos e lesões ateroscleróticas (CHINETTI, 2004). Alguns estudos apontam que a atividade anti-inflamatória da adiponectina pode ser influenciada por outras citocinas pró-inflamatórias, principalmente o TNF- α , IL-6 e a proteína C reativa. A forma de alto peso molecular da adiponectina pode induzir a síntese de IL-6, citocina pró-inflamatória, mas a isoforma de baixo peso molecular a inibe e potencializa a produção de citocinas anti-inflamatória. A adiponectina também reduz a expressão de TNF- α em macrófagos e a proliferação de células musculares lisas, além de diminuir a expressão da molécula de adesão da célula vascular (VCAM1) (NEUMEIER, 2006; OUCHI, 2003). Alguns estudos mostraram que baixas concentrações da adiponectina estão associadas à

ocorrência de diversos tipos de câncer e altas concentrações à inibição do crescimento de tumores (GOKTAS, 2005; BRAKENHIELM, 2004; ISHIKAWA, 2005).

O TNF- α é uma citocina produzida principalmente por macrófagos. Seus receptores estão presentes no tecido adiposo, fígado e outros tecidos metabólicos (TNRF-1 e TNRF-2) (CAWTHORN, 2008). Possui propriedades pró-inflamatórias e estão envolvidas na resistência sistêmica à insulina e contribuem com a patogênese de várias complicações metabólicas da obesidade, incluindo o DM2 e aterosclerose. O TNF- α é um potente regulador interno do tecido adiposo, atuando de forma autócrina e parácrina. Influencia vários processos intracelulares, incluindo a apoptose. A expressão do TNF- α está aumentada no TAV em modelos animais de obesidade e de diabetes, devido à infiltração de macrófagos M1 no tecido adiposo (ARSLAN, 2010). Alguns estudos mostram que esse aumento é tanto local como sistêmico (HOTAMISLIGIL, 1993), porém outros sugerem que o TNF- α produzido pelo tecido adiposo não é secretado na circulação sistêmica (atuação autoparácrina), apesar de relações entre TNF- α circulante e índices de obesidade terem sido bastante reportadas (BULLO, 2003). Entretanto, diversos estudos demonstraram que a redução de peso e a redução de gordura visceral, especificamente, podem aumentar os níveis de adipocinas anti-inflamatórias, como Adiponectina e IL-10, e reduzir os níveis de adipocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , resistina e IL-6 (GALIC, 2010; BRADLEY, 2008).

A Interleucina-6 (IL-6) é uma adipocina que exerce efeito pró-inflamatório. É produzida no músculo, tecido adiposo, ilhotas pancreáticas, células endoteliais e do sistema imunológico. Sua secreção encontra-se aumentada em indivíduos obesos e está relacionada à patogênese de várias doenças inflamatórias, obesidade e resistência à insulina. Estimula a liberação de ácidos graxos livres (AGL) bem como a produção hepática da PCR, entre outras proteínas de fase aguda, moléculas de adesão, quimiocinas, proteínas antiapoptóticas e citocinas pró-inflamatórias (FANTUZZI, 2007; TANAKA, 2014). Estudos sugerem que seu aumento provoque uma supressão da leptina e redução da expressão IRS-1 (receptor de insulina) e GLUT-4 no fígado e músculo (HERMSDORFF, 2004).

As interleucinas da família IL-1, as quais incluem IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra, são citocinas pró-inflamatórias, estimulando o fator de transcrição NF κ B, recrutando neutrófilos e macrófagos para o sítio de inflamação (RIDER, 2011).

A Figura 1 mostra que no adipócito em indivíduos eutróficos predominam células T regulatórias, linfócitos Th2, macrófagos M2 e eosinófilos, os quais secretam adipocinas anti-inflamatórias, agindo para a sensibilidade à insulina. Com o progresso da obesidade, o adipócito sofre hipertrofia e hiperplasia, aumentando a produção de adipocinas pró-

inflamatórias como a leptina, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e o MCP-1. Este último é responsável por recrutar monócitos que são polarizados em macrófagos M1 (pró-inflamatórios). O aumento do adipócito diminui adiponectina, promove infiltração de células Th1, CD4, CD8, células NK, neutrófilos e basófilos, criando um ambiente inflamatório.

Figura 1. Ambiente imune na obesidade (JOHNSON et al., 2012)

1.3 Obesidade X Inflamação

A obesidade é um estado de inflamação crônica e subagudo, denominado de metainflamação (CAREY, 2011), relacionado à hipertrofia dos adipócitos, com consequente infiltração e ativação de macrófagos no tecido adiposo. Existem evidências de ativação do sistema imune associada à obesidade em diversos órgãos e tecidos como fígado, músculo, hipotálamo e pâncreas, porém é melhor compreendida no tecido adiposo. Sabe-se hoje que o tecido adiposo possui, além da capacidade de regulação do armazenamento e da distribuição de gordura, comunicação com o sistema nervoso central e o trato gastrointestinal, desempenhando importante papel na resposta inflamatória em condições tanto autócrinas quanto parácrinas ou endócrinas (HEBER, 2010; GREGOR, 2011).

A hipertrofia dos adipócitos, especialmente os viscerais, está relacionada à resistência à insulina e aumento da ação das catecolaminas. Isso se deve ao aumento da expressão de beta-adrenoreceptores (β -3) e à diminuição da expressão de α -2-adrenoreceptores, aumentando o fluxo dos ácidos graxos não esterificados para o fígado, via sistema porta,

culminando em maior produção de glicose hepática, redução da degradação de Apolipoproteína B e aumento da produção de triacilgliceróis, demonstrando o envolvimento do tecido adiposo com a fisiopatologia da síndrome metabólica (DESPRES, 2006). A hipertrofia dos adipócitos induz à infiltração de macrófagos e ao aumento da inflamação com produção aumentada de adipocinas pró-inflamatórias, como $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6. Isso é acompanhado por um aumento da liberação de ácidos graxos livres e desregulação da secreção de leptina, Adiponectina, resistina e proteína ligante de retinol (RBP4), agravando a inflamação no tecido adiposo. A desregulação dessas adipocinas pode levar ao aumento na ingestão alimentar e à redução do gasto energético através de ações no hipotálamo (GALIC, 2010). A figura 2 exemplifica o mecanismo descrito acima.

Figura 2. Efeitos metabólicos das adipocinas no balanço energético (GALIC, 2010)

Acredita-se que a inflamação seja uma consequência da obesidade. Das (2001) sugeriu que a obesidade é o resultado de uma doença inflamatória. Nesse contexto, questiona-se a

origem dos marcadores inflamatórios em pacientes obesos. A primeira opção é aquela que reflete a produção e liberação a partir de órgãos que não o adiposo, principalmente o fígado, como a proteína C reativa, a qual é uma proteína de fase aguda, liberada primariamente pelo fígado, em resposta a um estado inflamatório, observado na obesidade. A segunda explicação é que o TAB secreta fatores que estimulam a produção de marcadores inflamatórios pelo fígado e outros órgãos (YUDKIN, 1999). A terceira possibilidade é que os próprios adipócitos são uma fonte imediata de alguns, ou muitos, desses marcadores inflamatórios. Assim, o aumento do nível circulante desses marcadores inflamatórios reflete uma produção aumentada da massa adiposa branca. Existe também a possibilidade de haver uma combinação dessas três situações.

Nos últimos anos, o conhecimento do complexo processo envolvido na fisiopatologia da resistência insulínica induzida pelo ganho de peso ou obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e síndrome metabólica evoluiu rapidamente. Essas doenças, cujas prevalências continuam aumentando apesar de já terem atingido proporções epidêmicas, parecem estar ligadas a um processo inflamatório crônico (HOTAMISLIGIL, 1993). O tecido adiposo é o sitio primário dessa inflamação. Alterações na gordura visceral tem maior associação com resistência insulínica do que as alterações da gordura subcutânea (SHOELSON, 2006). Vias inflamatórias, como *c-jun* N-terminal kinase (JNK) e fator nuclear κ B (NF κ B) estão estimuladas no tecido adiposo obeso, aumentando a concentração de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6 e MCP-1 (SARTIPY, 2003).

Pesquisas recentes mostram que os níveis plasmáticos de IL-6, TNF – α e IL-18 e outros marcadores inflamatórios tornam-se aumentados em indivíduos obesos. A perda de peso induzida por dieta, exercícios físicos regulares (LEHR, 2012) ou intervenções cirúrgicas, como a cirurgia bariátrica (ESPOSITO, 2002; BORGES, 2007), têm papel na melhora do quadro inflamatório relacionado à obesidade.

Existem evidências de ativação do sistema imunológico associado à obesidade em diversos órgãos como fígado e músculo, mas é melhor compreendida no tecido adiposo. A hiperativação crônica do sistema imunológico é o fator predisponente a doenças metabólicas relacionadas à obesidade (JOHNSON, 2012). O sistema imune é composto pela imunidade inata e pela imunidade adaptativa, ambas relacionadas à obesidade (SELL, 2012). No sistema imunológico inato, os macrófagos são as células mais abundantes do tecido adiposo, sendo mais numerosos em indivíduos com excesso de peso e dieta rica em lipídeos (WEISBERG, 2003). Os mastócitos (mediadores da reação alérgica), neutrófilos e células dendríticas também estão aumentados em obesos (SUN, 2007; TALUKDAR, 2012). Os eosinófilos,

produtores de IL-4, citocina a qual medeia a resposta anti-helmíntica, parecem estar diminuídos na obesidade (WU, 2011). No sistema imune adaptativo, a obesidade aumenta a proliferação de linfócitos T e B no tecido adiposo, porém reduz algumas linhagens envolvidas na supressão da inflamação (DUFFAUT, 2009). Os linfócitos T helper do tipo Th1 produzem citocinas inflamatórias, principalmente IL-2, IFN- γ e linfotóxina. Os linfócitos do tipo Th2 produzem principalmente as interleucinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, citocinas com potencial anti-inflamatório. Os linfócitos Th17 produzem a IL-17, uma citocina pró-inflamatória, envolvida nas doenças alérgicas e asma.

1.4 Leptina

A leptina (do grego *leptos*= magro) é uma proteína de 16kDa, codificada pelo gene obeso (*ob*), secretada principalmente pelos adipócitos. O nível sérico de leptina se correlaciona diretamente com a massa de tecido adiposo (MAFFEI, 1995). O principal papel da leptina é o controle do apetite e, conseqüentemente, do peso, atuando em células neuronais do hipotálamo. A ação da leptina no sistema nervoso central (hipotálamo), em mamíferos, promove a redução da ingestão alimentar e o aumento do gasto energético, além de regular a função neuroendócrina e o metabolismo da glicose e de gorduras. Ela é sintetizada também na glândula mamária, músculo esquelético, epitélio gástrico e trofoblasto placentário (FRAUDMANN, 1998). Também participa da regulação da imunidade, inflamação e hematopoiese. Em obesidade induzida por dieta, a expressão do gene da leptina e sua concentração sérica estão elevadas, sem que se observe efeitos regulatórios no peso corporal, indicando resistência à leptina (GAUTRON, 2011; BJØRBAEK, 2009). Os mecanismos moleculares por trás da expressão anormal da leptina em obesos não estão totalmente esclarecidos.

A pesquisa com leptina iniciou-se nos anos 50 com ratos geneticamente obesos (*ob/ob*), que, devido a uma mutação no gene da leptina (*ob/ob mice*) ou no seu receptor (*db/db mice*), exibiam uma síndrome composta de obesidade mórbida, hiperfagia, hiperinsulinemia, resistência à insulina, diabetes, infertilidade e intolerância ao frio.

O papel da leptina na regulação do sistema imunológico e na resposta inflamatória foi melhor esclarecido desde 1994, quando seu gene foi clonado (ZHANG e col., 1994). A leptina é considerada uma adipocina pró-inflamatória, uma vez que protege os linfócitos T contra a apoptose, regulando a ativação e proliferação de células T, levando-os preferencialmente à diferenciação em linfócitos Th1, modulando a produção de citocinas

(FAROOQI, 2002). Além disso, pode atrair macrófagos ao tecido adiposo, por induzir a produção de MCP-1 (FANTUZZI, 2005). As vias ativadas pela leptina em células imune são Janus-kinase, phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase. Um estudo constatou que a produção de citocinas a partir dos linfócitos T é suprimida em crianças deficientes de leptina e restaurada após a administração da mesma (FAROOQI, 2002).

A maioria dos estudos in vivo dos efeitos da leptina na modulação da resposta imune foram realizados em ratos obesos (ob/ob) deficientes de leptina. No geral, a deficiência de leptina é associada à redução da inflamação em modelos de doença autoimune, porém também ao aumento na suscetibilidade a infecções bacterianas e virais (BUSSO, 2002) e à toxicidade a estímulos pró-inflamatórios, tais como endotoxinas e TNF- α (TAKAHASHI, 1999; FAGGIONI, 1999). De um modo geral, é consenso que a leptina exerce um papel principalmente pró-inflamatório, ao mesmo tempo que protege contra infecções.

1.5 Retículo Endoplasmático

A obesidade e particularmente o aumento do tecido adiposo visceral leva ao estresse de várias organelas vitais (GREGOR, 2007). O retículo endoplasmático (RE) é uma destas organelas que mostra disfunções significativas na obesidade e resistência insulínica. Em 2004, foi demonstrado que a obesidade leva ao estresse do RE no tecido adiposo, ativando vias inflamatórias como a JNK (OZCAN, 2004) e IKK/I κ B/NF κ B (ZHANG, 2008). O estresse do retículo endoplasmático (ERE) é uma condição adaptativa necessária ao funcionamento e sobrevivência do organismo, porém, ao mesmo tempo, destrutiva quando cronicamente ativado (HOTAMISLIGIL, 2010).

O RE participa da síntese biológica de proteínas e lipídios, assim como do armazenamento e secreção de Ca⁺, fazendo do RE importante na organogenesis, atividade transcricional, resposta ao estresse e apoptose (BERRIDGE, 2002). O RE nos adipócitos se adapta ao aumento nas demandas de síntese e secreção de proteínas, armazenamento de energia na forma de triglicérides, entre outras funções próprias desta célula. Porém sua principal função é o processamento de proteínas. As proteínas recém-formadas são transportadas ao RE pelo complexo Sec61, onde sofrerão o processo do enovelamento para adquirir a configuração tridimensional necessária para exercer sua função biológica (PILON, 1998; EIZIRIK, 2008). Quando a célula passa por um processo de estresse, como a inflamação crônica, ocorre o acúmulo de proteínas com defeito na conformação tridimensional (proteínas não enoveladas, unfolded, e mal enoveladas, misfolded), portanto, incapazes de exercer sua função biológica corretamente. Dessa forma, é ativada a UPR

(*Unfolded protein response* – resposta a proteínas mal-dobradas). Trata-se de um sistema de sensores em resposta ao acúmulo de proteínas mal-dobradas no RE (ENGIN, 2010). Essas vias de sinalização intracelular transmitem a informação sobre a qualidade das proteínas para o citosol e o núcleo. Quando ativada, leva à indução transcricional de genes responsivos à UPR, à atenuação da tradução global de proteínas e à ativação da via de degradação associada ao RE (ERAD - ER associated degradation – maquinaria que degrada proteínas malformadas) (LIU, 2003).

Em situações fisiológicas, a proporção de proteínas malformadas é de 5% e são corrigidas, principalmente, pelas chaperonas existentes no interior do RE, cuja principal função é neutralizar e corrigir as proteínas malformadas, evitando um estado de estresse do RE (ENGIN, 2010; RON, 2007).

A principal chaperona presente no RE é a BIP (immunoglobulin heavy-chainbinding protein ou GRP78 – glucose-regulated protein 78), uma proteína de 78KDa, pertencente à família HSP70, considerada principal marcadora do estresse do RE. Em condições normais, encontra-se ligada a três proteínas transmembrana: *inositol requiring ER-to-nucleus signal kinase* (IRE1), *activating transcription factor 6* (ATF-6) e *double-strained RNA-activated kinase* (PERK) (ZHANG, 2006). Quando ocorre um acúmulo de proteínas não processadas no interior do RE, a *chaperona* Bip é deslocada para o lumen da organela e estas proteínas IRE1, ATF e PERK, então desbloqueadas, se auto-fosforilam, levando à ativação de domínios responsáveis pela propagação da cascata de sinalização e desencadeando o processo de estresse do RE (OIKAWA, 2009; SHEN, 2002).

A PERK é ativada após a dissociação da chaperona BIP, sofrendo dimerização e auto-fosforilação (HARDING, 2000). Age inibindo a tradução proteica global através da fosforilação do eIF2- α (eukaryotic translation initiation factor-2 α subunit), porém é capaz de promover a tradução seletiva de vários RNA's mensageiros, dentre os quais o ATF4 (Activating transcription factor-4), que estimula a produção de chaperona, ERAD e enzimas que reduzem o estresse oxidativo (HARDING, 2003; MA, 2002). Alternativamente, se o estresse do RE 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, 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 EDEM é necessário ao ERAD, mecanismo que degrada proteínas mal dobradas.

Sua hiperexpressão acelera a liberação de proteínas do ciclo das chaperonas calnexina/calreticulina para a degradação. (CALFON, 2002; YOSHIDA, 2001). A Calnexina (CANX) e a Canreticulina (CARL) são partes de um sistema de chaperonas do RE que controlam a qualidade na síntese de glicoproteínas (Williams, 2006). 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; SCHRÖDER, 2005; HETZ, 2009). O ATF6, após dissociação do BIP, sofre redução e é translocada para o complexo de Golgi. Uma vez nessa organela, cliva-se proteoliticamente, dando origem a ATF6 α e ATF6 β , que são translocados para o núcleo, onde se ligam a elementos responsivos ao estresse do RE (YOSHIDA, 2001). Além disso, o ATF6 também reage 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). A figura 3 mostra as vias do estresse do retículo endoplasmático que levam à inflamação. Todas foram implicadas na resposta celular à inflamação.

O processo de UPR inicia uma série de mecanismos de adaptação, visando a proteção da homeostase celular, que inclui a diminuição na transferência de proteínas para o interior do RE, aumento na quantidade de chaperonas que irão neutralizar as proteínas não enoveladas, processá-las e aumentar seu retorno ao citoplasma onde serão degradadas em proteossomas. Em situações em que todos os mecanismos de adaptação acima são insuficientes, por exemplo, quando há um estresse contínuo do RE, ocorre apoptose celular (ZHANG, 2008; HOSOI, 2010).

Figura 3. RE e inflamação/Vias da UPR (Adaptado de Hotamisligil, 2010)

1.6 Ácidos Graxos

1.6.1 Visão geral

Nutrientes com ação farmacológica têm sido estudados como medida terapêutica no controle do processo inflamatório. Destacam-se os ácidos graxos poli-insaturados.

Os ácidos graxos (AG) são ácidos orgânicos formados por uma cadeia alifática (aberta) e um grupo carboxiterminal (COOH).

São classificados conforme a presença de duplas ligações (insaturações) entre as cadeias de carbono. São denominados Ácidos Graxos Saturados (AGS) na ausência de duplas ligações; Ácidos Graxos Monoinsaturados (AGMI) pela presença de uma insaturação; Ácidos Graxos Poli-Insaturados (AGPI) pela presença de duas ou mais insaturações. Quanto ao tamanho da cadeia carbônica, os PUFAs que possuem número de átomos de carbono $\geq$ a 16 são denominados Ácidos Graxos Poli-Insaturados de Cadeia Longa (AGPI-CL). Os AGPI com número de átomos de carbono $\geq$ a 20 são denominados Ácidos Graxos Poli-Insaturados de Cadeia Muito Longa (AGPI-CML) (MARTINS, 2006; INNIS, 2003). Os AGPI abrangem as famílias do ômega-3 (n-3 PUFA), ômega-6 (n-6 PUFA) e ômega-9 (n-9 PUFA), dependendo da posição da dupla ligação em relação ao grupo carboxiterminal (DAS, 2001).

Os componentes lipídicos, especialmente os ácidos graxos, estão presentes nas mais diversas formas de vida, desempenhando importantes funções na estrutura das membranas celulares e nos processos metabólicos. Os ácidos graxos das famílias n-6 e n-3 são obtidos por meio da dieta ou produzidos pelo organismo a partir dos ácidos linoléico (18:2n-6, AL, ômega 6) e alfa-linolênico (18:3n-3, ALA, ômega 3). Em humanos, os ácidos AL e ALA são necessários para manter sob condições normais, as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Esses ácidos graxos também participam da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular, sendo denominados essenciais por não serem sintetizados pelo organismo, sendo obtidos exclusivamente pela dieta (MARTINS, 2006; YODIM, 2000; YEHODA, 2002). A Figura 4 mostra a estrutura molecular dos ácidos graxos ômega 3, 6 e 9.

Figura 4. Estrutura molecular dos ácidos graxos ômega 3, 6 e 9

1.6.2 Metabolismo dos ácidos graxos

No seu metabolismo, os ácidos graxos ômega-6 e ômega-3 são convertidos em eicosanóides, que são envolvidos na modulação da intensidade e duração da resposta inflamatória (CALDER, 2006). O ácido linoléico (n-6 PUFA) é convertido em ácido gama-linoleico (n-6 GLA, 18:3) pela enzima dessaturase $\Delta 6$, que por sua vez é alongado para ácido di-homo-gama-linoleico (n-6 DGLA, 18:3), precursor da série 1 das prostaglandinas (PGs). O DGLA também dá origem ao ácido araquidônico (n-6 AA, 20:4) pela dessaturase $\Delta 5$, o qual é o precursor da série 2 das PGs, dos tromboxanos (TXs) e da série 4 dos leucotrienos (LTs) (CALDER, 2006; BAGGA, 2003). O ácido alfa-linolênico (ALA) por sua vez, dá origem ao ácido eicosapentanóico (EPA, 20: 5n-3) e ao ácido docosahexanóico (DHA, 22: 6n- 3). Primeiramente, o ALA é convertido em EPA pelas dessaturases $\Delta 5$ e $\Delta 6$, sendo essa alongado para DHA. O EPA forma os precursores da série 3 das PGs, Txs e da série 5 dos LTs. Essas reações ocorrem no retículo endoplasmático, predominantemente nas células hepáticas. O mecanismo molecular responsável pelo qual vários estímulos preferencialmente induzem a formação do ácido araquidônico (AA), EPA e/ou DHA ainda não estão esclarecidos.

O EPA e o DHA são substratos competitivos para as enzimas e produtos do metabolismo do ácido araquidônico. A diferença entre os eicosanóides derivados dos n-3 e n-6 PUFA é que a maioria dos mediadores formados a partir do seu metabolismo do n-3 são antiinflamatórios, ao passo que os derivados do ácido araquidônico são pró-inflamatórios (BAGGA, 2003). O balanço entre antagonistas poderia determinar o resultado final do processo de doença. A PGE2 produzida pelo ácido araquidônico induz febre, dor, vasodilatação e permeabilidade vascular, enquanto o leucotrieno B4 também produzido pelo ácido araquidônico é quimiotático para leucócitos e induz a liberação de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos e citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6 pelos macrófagos (TILLEY, 2000; CHINETTI, 2001).

Tem sido verificado que a atividade das enzimas D6 e D5 dessaturase é diminuída por fatores como tabagismo, consumo de álcool, diabetes, estresse, ingestão elevada de gorduras *trans*, e, principalmente, pelo envelhecimento (PERINI, 2010). O estresse envolve a liberação de hormônios como as catecolaminas e os glicorticóides, que inibem fortemente a D6 dessaturase. No diabetes, a baixa quantidade de insulina inibe a D6 e a D5 dessaturases, pela modulação do RNA mensageiro dessas enzimas (BRENNER, 2003; MILLS, 1994). As duas séries de ácidos graxos competem pelo mesmo sistema enzimático (elongases e dessaturases) que possuem preferência de atuação na série n-3, mas o alto nível de ingestão dos ácidos graxos n-6 interfere diretamente na capacidade de alongação e dessaturação das enzimas na série n-3. A figura 5 mostra as vias de conversão do AL e ALA e seus produtos finais.

Figura 5. Vias de conversão dos ácidos graxos n-3 (ALA) e n-6 (AL) em seus produtos finais. (CARRERO, 2005)

Os ácidos graxos n-3 e n-6, que têm funções metabólicas distintas e opostas. Os ácidos graxos poliinsaturados n-6 (n-6 PUFA) promovem a inflamação, ao passo que os ácidos graxos poliinsaturados n-3 (n-3 PUFA) a inibem (BROWNING, 2003).

Os n-3 PUFA, eicosapentanóico (EPA, 20: 5n-3) e o docosahexanoico (DHA, 22: 6n- 3) são absorvidos do trato gastrointestinal e assim como outros lipídios da alimentação são transportados ao fígado, principalmente como triglicerídeos nas partículas de quilomicrons. A partir do fígado EPA e DHA são liberados na circulação como triglicerídeos em partículas de lipoproteínas (como LDL - colesterol e HDL - colesterol) e como fosfolipídios. Quantidades menores circulam como ácidos graxos livres, ligados à albumina ou são incorporados nos fosfolípidos das membranas celulares, particularmente no coração e cérebro, e estocados no tecido adiposo como triglicerídeos. O consumo de óleo de peixe aumenta a concentração de EPA e DHA nos lipídios plasmáticos em alguns dias, sendo que a incorporação máxima ocorre em 2 semanas (MASSON, 2007). Além disso, a ingestão de peixe ou óleo de peixe faz com que o EPA e DHA substituam parcialmente o ácido graxo ômega-6 nas membranas celulares. Portanto, a composição de ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares depende da ingestão alimentar (OLIVER, 2010).

1.6.3 Ácidos Graxos e inflamação

Os ácidos graxos poliinsaturados modulam a expressão gênica em diferentes sistemas pela regulação de fatores de transcrição como PPAR e NFκB. Os PPARs são fatores de transcrição

nuclear ativados por lipídios, que reduzem a resposta inflamatória, possivelmente por estimular a quebra dos eicosanóides inflamatórios ou por inibição do NFκB (TILLEY, 2001). Os PPARs promovem também a expressão gênica da beta oxidação dos ácidos graxos. O PPAR-alfa participa no catabolismo e homeostase lipídica no fígado ao passo que o PPAR-gama parece ter um papel primário na diferenciação do adipócito. O NFκB é amplamente expresso no tecido adiposo e, quando ativado, age como fator de transcrição nuclear induzindo a transcrição de genes de proteínas pró inflamatórias como IL-6 e TNF-alfa. As interações entre esses fatores de transcrição nuclear e os ácidos graxos ainda permanecem obscuras. Uma possível explicação é que os ácidos graxos seriam ligantes para os PPARs que poderiam antagonizar a ativação do NFκB, resultando em menor resposta inflamatória. Os conhecimentos a respeito da regulação dietética dos receptores NFκB e PPARs ainda estão emergindo. Novak e colaboradores (NOVAK, 2003) e Sinha e colaboradores (SINHA, 2004) demonstraram que os n-3 PUFA podem inibir a atividade dos receptores NFκB nos macrófagos e células de músculo esquelético *in vitro*. Outro trabalho evidenciou que os mesmos ácidos graxos podem induzir a expressão dos receptores PPARs no tecido adiposo (CHAMBRIER, 2002). Essa capacidade dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias dos macrófagos, pode representar um potencial para reduzir a inflamação induzida pelos macrófagos do tecido adiposo, reduzindo a resistência insulínica.

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

Por outro lado, estudos epidemiológicos evidenciaram baixa prevalência de intolerância à glicose, DM2 e resistência insulínica em populações consumindo grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados n-3, como os esquimós da Groenlândia e os nativos do Alaska (KROMANN, 1980; ADLER, 1994; SCHRAER, 1999). Porém, os resultados são conflitantes. Alguns estudos em animais sugerem que os ácidos graxos de cadeia longa poliinsaturados n-3 podem afetar de forma diferente o músculo, tecido adiposo e o fígado no que diz respeito à resistência insulínica, o que explicaria os resultados conflitantes. Storlien e colaboradores (1991) mostraram que a substituição dos ácidos graxos saturados ou monoinsaturados na dieta hipergordurosa (60% da fonte energética) por ácidos graxos poliinsaturados n-3 por 3 semanas em ratos, preveniu a resistência insulínica induzida pela dieta no fígado e no músculo.

Em um modelo de síndrome metabólica induzida em ratos, observaram um aumento no peso corporal, pressão arterial sistólica, insulina sérica, lípides totais, triglicerídeos, colesterol, LDL, proteínas totais, albumina e fator de necrose tumoral alfa (AGUILERA, 2004). Após a suplementação com óleo de peixe, os ratos com síndrome metabólica tiveram redução na pressão arterial, insulina sérica, triglicérides e colesterol. No entanto, não observaram redução do fator de necrose tumoral alfa ou no acúmulo de gordura. Os resultados conflitantes podem ser explicados pela quantidade de EPA e DHA na dieta, a relação de ácidos graxos poliinsaturados n-6 e n-3, assim como a exata composição da dieta rica em gordura. Foi demonstrado que os n-3 PUFA podem reduzir a concentração sérica de triglicérides em 25 a 30% (HARRIS, 1997; BALK, 2006; WANG, 2004). No entanto, os mecanismos exatos ainda precisam ser elucidados. Foi demonstrado que eles também aumentam o HDL colesterol em 3%, aumentam a concentração de LDL colesterol em 5% e diminuem a proporção partículas de LDL colesterol de baixa densidade. O aumento no tamanho da partícula do LDL colesterol pode ser o responsável pelo aumento da concentração do LDL colesterol, e não representar um aumento do número de partículas de LDL colesterol circulante (FRIEDBERG, 1998; GRIFFIN, 2006)

Finalmente, vários estudos de intervenção clínica têm mostrado os efeitos antiinflamatórios do n-3 PUFA em patologias inflamatórias crônicas como artrite reumatóide (GEUSENS, 1994), asma (BROUGHTON, 1997), doença de Crohn (BELLUZZI, 1996) e psoríase (MAYSER, 1998) e, em todas as condições, o n-3 PUFA foi capaz de aliviar os sintomas da doença.

1.6.4 Fontes de ácidos graxos essenciais

O AL é encontrado principalmente em carne bovina, além de aves, ovos, leite, queijo, iogurte, pães, margarina, cereais e óleo de girassol, prímula e milho. O ALA está presente principalmente em nozes, sementes, óleo de linhaça e canola e vegetais de folhas verdes. O EPA e DHA têm como principal fonte os peixes marinhos (DAS, 2006). A maioria dos estudos avaliando o efeito do n-3 PUFA utilizou a administração de EPA e DHA.

1.6.5 Recomendações de consumo

Em relação às recomendações nutricionais de ingestão de ácidos graxos ômega 3, a Sociedade Internacional de Estudo de Ácidos Graxos e Lipídeos (ISSFAL) sugere a quantidade de 0,65g/día de DHA e 1 g/día de ácido α -linolénico (SIMOPOULOS, 1999). Em adultos, a

estimativa de consumo mínimo diário de ácido α -linolênico para prevenir deficiência é de aproximadamente 0.3 a 0.4g por dia. A recomendação de consumo de ALA é de 1,6g/dia para homens e 1,1g/dia para mulheres. O total recomendado de EPA + DHA é aproximadamente 0,25 a 2g/dia, o que corresponde a 2 refeições de peixe por semana (SMIT, 2004).

As novas recomendações da American heart Association (AHA) são: adultos devem consumir peixes 2 vezes por semana; para pacientes com doença coronariana é recomendado 1g por dia de EPA + DHA; para pacientes com hipertrigliceridemia recomenda-se a ingestão de 2 a 4g de EPA+DHA por dia a fim de diminuir 20-40% dos níveis de triglicérides (KRIS-ETHERTON, 2003; SISCOVICK, 2017). Um equilíbrio adequado na ingestão de n-6/n-3 parece ser fundamental para a efetividade das propriedades benéficas nas doenças inflamatórias e cardiovasculares, sendo uma razão em torno de 4-5:1 de n-6/n-3 foi associada a redução de mortalidade por essas doenças (KRAUSS, 2000). Razões 2:1 a 3:1 têm sido recomendadas por alguns autores por possibilitar uma maior conversão do ácido alfa-linolênico em DHA, que alcança o seu valor máximo em torno de 2,3:1 (MARTIN, 2006).

O consumo de DHA e EPA é de aproximadamente 0.1-0.2g ao dia em média na América do norte, enquanto que o consumo de ALA é de 1.4g ao dia (ANDERSON, 2009). Em países europeus, estima-se que a ingesta de ácidos graxos ômega-3 seja em torno de 0,1 a 0,5g/dia (SANDERS, 2000) e no Japão em torno de 2g/dia, devido ao consumo alto de peixes marinhos (KRIS-ETHERTON, 2000).

Organização	População Alvo	Recomendação
WHO	População adulta geral	LC-PUFA ω -3: 1-2% da energia ingerida /dia
FAO	0 – 6 meses	DHA: 0,1-0,18 % energia
	6 – 24 meses	DHA: 10-12 mg/kg peso corpóreo
	2 – 4 anos	EPA + DHA: 100-150 mg
	4 – 6 anos	EPA + DHA: 150-200 mg
	6 – 10 anos	EPA + DHA: 200 – 250 mg
	Grávidas / Lactantes	EPA + DHA – 300 mg (mínimo 200 mg/dia)
ISSFAL	População adulta geral para saúde cardiovascular	Mínimo 500 mg/dia de EPA + DHA
	Grávidas / Lactantes	DHA: 200 mg/dia
WAPM	Grávidas / Lactantes	200 mg/dia
	Bebês quando amamentação não é possível	0,2-0,5% do total da gordura ingerida

World Health Organization (WHO) = Organização Mundial de Saúde (OMS); Food and Agriculture Organization of the United States – (FAO) – Organização de Alimentos e Agricultura dos Estados Unidos. International Society for the Study of Fatty Acid and Lipids (ISSFAL) – Sociedade Internacional para Estudo dos Ácidos Graxos e Lipídios; World Association of Perinatal Medicine (WAPM) – Associação Mundial de Medicina Perinatal.

Figura 6. Recomendações de consumo de ômega-3

1.6.6 Aspectos históricos: balanço dos ácidos graxos n-3 e n-6

Avaliações de estudos na nutrição paleolítica e em populações dos dias modernos mostraram que nossos ancestrais consumiam muito menos ácidos graxos saturados do que nos dias de hoje. Além disso, a dieta continha pequena, mas quantidade semelhante de ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6, baseada em frutas, ovos, peixes e vegetais, sem nenhuma gordura trans (EATON, 1996).

Atualmente, a dieta ocidental é caracterizada por alto consumo de gorduras trans e ácidos graxos n-6, e pobre em n-3, resultando em uma relação n-6/n-3 em torno de 20-30:1. Óleos de linhaça e chia, contendo altos teores de ácido linolênico (n-3) podem contribuir para uma redução da relação, embora tenhamos o problema de baixa atividade das enzimas presentes no nosso organismo.

O aumento do consumo dos ácidos graxos n-6 nos últimos 100 anos (Figura 7) é devido ao desenvolvimento da tecnologia que marcou a modernização das indústrias de óleos vegetais e da agricultura moderna com ênfase nos alimentos à base de grãos para animais domésticos, cujos óleos são fontes de ácidos graxos n-6. Técnicas de aquicultura produzem peixes contendo menos ácidos graxos n-3 do que os peixes que crescem normalmente em oceanos, rios e lagos.

Figura 7. Evolução do consumo de gorduras saturadas e insaturadas (SIMOPOULOS, 2016)

1.7 Ácido alfa-linolênico (ALA)

O ALA é um ácido graxo essencial, ou seja, os humanos não são capazes de produzi-lo e deve ser adquirido pela dieta. O ALA é precursor do EPA e DHA, e neles convertidos em porcentagem variável de 5-10% para EPA e 2 a 5% para DHA (WIJENDRAN, 2004). Vários fatores podem influenciar nessa taxa de conversão como tabagismo, diabetes, estresse, envelhecimento, etilismo e consumo de gordura trans. Além desses fatores, tem-se observado que a ingestão insuficiente de energia, proteínas, zinco, magnésio, cobre e das vitaminas B₃, B₆ e C, influenciam nas rotas metabólicas de conversão do ALA (BRENNER, 1981). O sexo feminino apresenta uma maior taxa de conversão de ALA em EPA/DHA do que o sexo masculino, possivelmente devido aos efeitos do estrógeno, o qual aumenta a atividade enzimática dos processos de alongação e dessaturação (BURDGE, 2005).

Como explicado anteriormente, a conversão dos ácidos linolênico e alfa-linolênico nos ácidos graxos de cadeia longa são catalisados por duas dessaturases: delta-5-dessaturase e delta-6-dessaturase, codificadas pelos genes FADS1 e FADS2 (*Fatty Acid desaturase*) (MARQUARDT, 2000).

Figura 8. Vias de conversão dos ácidos graxos ômega 3 e 6, codificadas pelas FADS (BUCKLEY, 2017)

Estudos recentes mostram que os genes FADS foram submetidos a uma seleção natural ao longo dos anos na África, sul da Ásia, Groelândia e Europa. Ao se comparar dados atuais do sequenciamento genético com de 3 a 5.000 anos foram identificados possíveis alvos de seleção, em alelos diferentes em cada região. Entre europeus, por exemplo, os alelos

selecionados estão associados com uma diminuição no ácido linoleico e um aumento no ácido aracdônico e EPA, potencialmente devido a uma capacidade maior de metabolizar AGI-CL a partir do AGI-CC. Supõe-se que isso se deva a uma adaptação a uma dieta rica em ácidos graxos derivados de plantas, mas pobre em ácidos graxos derivados de peixes e mamíferos. A disseminação da agricultura, favoreceu o consumo de grãos e derivados de plantas, favorecendo alelos que aumentam essa taxa de conversão dos ácidos graxos. Esse é o efeito oposto ao observado em alelos selecionados em algumas regiões da Groelândia, onde na sua dieta tradicional são consumidos altos níveis de EPA e DHA, provenientes dos peixes marinhos e focas, com baixo consumo de ácido linoleico, diminuindo sua necessidade endógena de sintetizar esses ácidos graxos de cadeia longa. Portanto, as mutações na população da Groelândia parecem compensar a baixa ingesta do ácido linoleico e alfa-linolênico e aumento de EPA e DHA. Já no sul da Ásia a seleção positiva mostrou uma maior habilidade em sintetizar ácidos graxos de cadeia longa, possivelmente uma adaptação a uma dieta mais vegetariana (MATHIAS, 2011; FUMAGALLI, 2015; BUCKLEY, 2017). No Brasil, não temos esses dados. É possível que essas variações nos FADS possam ser úteis em guiar o desenvolvimento de dietas individualizadas no futuro.

1.7.1 ALA e Obesidade

O excesso no consumo de ácidos graxos n-6 PUFA, resultando em um aumento na relação n-6/n-3, pode contribuir para aumentar a patogênese da obesidade, por promover inflamação crônica. Porém, não está claro se a diminuição nessa relação poderá influenciar na perda de massa adiposa. Não existem muitos trabalhos na literatura mostrando se existe relação entre o consumo de ALA a longo prazo (> 3 meses) e a perda de peso. Até 12 semanas, o consumo de ALA não influenciou na diminuição do peso, segundo alguns estudos (FAINTUCH, 2007). Um estudo mostrou que a suplementação de ALA por 8 semanas em homens obesos não mostrou benefícios no peso ou marcadores inflamatórios (NELSON, 2007). Em um estudo com ratos, o consumo de ALA por 20 semanas não foi capaz de alterar o tamanho dos adipócitos, composição corporal ou total de massa adiposa (ENOS, 2014). Outro estudo mostrou que a suplementação com 2,7g/dia de ALA foi inversamente proporcional às medidas antropométricas (peso, IMC), porém não influenciou em marcadores inflamatórios (LUND, 2013).

Nosso grupo avaliou que a suplementação de ALA em diabéticos diminui sensibilidade à insulina e aumenta adiponectina sérica (GOMES, 2015), além de diminuir o

estresse do retículo endoplasmático em pacientes diabéticos, pela modulação da via XBP1, reduzindo sua expressão gênica e protéica (MIRANDA, no prelo). Não existem estudos avaliando o efeito da suplementação de ALA no estresse do retículo endoplasmático em obesos não diabéticos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar efeitos da suplementação do ácido alfa linolênico (ALA) no metabolismo e no estresse do retículo endoplasmático em obesos grau III.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da suplementação ácido alfa linolênico (ALA) nos seguintes processos:
 - Controle do metabolismo glicídico e lipídico;
 - Processo inflamatório sistêmico e em tecido adiposo visceral;
 - Ativação do estresse do retículo endoplasmático no tecido adiposo visceral.

- Avaliar o perfil de ácidos graxos incorporados tecido adiposo visceral.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento, período e local do estudo

Trata-se de um estudo prospectivo, randomizado, placebo-controlado, duplo-cego. Os pacientes foram selecionados do Ambulatório de Cirurgia Bariátrica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) entre janeiro de 2013 a março 2014. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HC-FMRP-USP em 10/04/2013, número 288.254 (Anexo 1). Os voluntários preencheram consentimento livre e esclarecido (TCLE) por escrito antes de participar de qualquer atividade relacionada ao projeto (Anexo 2). Para a realização deste estudo, tivemos o financiamento das seguintes instituições: FAPESP E FAEPA.

Durante o período do estudo, foram selecionados os indivíduos elegíveis para a pesquisa, através de entrevista, exame físico e análise dos exames laboratoriais. Ao aceitar o convite, os pacientes forneceram um número de telefone para contato. Semanalmente, os pacientes eram contactados para avaliar adesão e efeitos adversos. Os exames laboratoriais eram agendados antes e após o uso da medicação.

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Os pacientes selecionados estavam em avaliação pré-operatória de cirurgia bariátrica. Podiam ser do sexo masculino ou feminino, com idade entre 18 e 65 anos e com IMC acima de 40 kg/m². Foram excluídos indivíduos gestantes, hepatopatas crônicos ou agudos, diabéticos, portadores de neoplasias, em uso de anticoagulante sistêmico ou imunossupressores e níveis elevados de LDL plasmático (acima de 160 mg/dL). Também foram excluídos indivíduos que faziam uso de corticosteroides ou anti-inflamatórios não esteroidais e que já faziam uso regular de alguma forma de suplementação de ômega 3.

3.3 Escolha da dose de ALA

Não há consenso sobre a dose ideal anti-inflamatória (RANGEL-HUERTA, 2012; ZHAO, 2009; BROWNING, 2007).

A dose de 3g de ALA foi escolhida por ser a dose usualmente utilizada para tratar hipertrigliceridemia. Estudos clínicos mostram que a suplementação com 2 a 4 g de ômega-3 ao dia pode diminuir os níveis de triglicérides (TGL) em até 25% a 30%, aumentar discretamente os de HDL-colesterol (1% a 3%) e elevar os de LDL-colesterol em até 5% a 10% (HARRIS, 2006; FRIEDBERG, 1998; GRIFFIN, 2006). A capacidade de reduzir os níveis de TG depende da dose, com uma redução aproximada de 5% a 10% para cada 1 g de EPA/DHA consumido ao dia, e é maior nos indivíduos com níveis basais mais elevados de TG (HARRIS, 2006). Não existem evidências de que o uso de 3 gramas de ALA ao dia acarreta qualquer risco de vida ao paciente.

3.4 Confeção das cápsulas

A fonte de ALA foi o NANOMEGA 3- NPT (Henrifarma), em pó inodor que foi encapsulado por farmacêutico. Foi fornecida a quantidade de 3g de ALA por dia por paciente. As cápsulas foram preparadas pelo farmacêutico, único que sabia o conteúdo das mesmas. Os frascos contendo as cápsulas foram etiquetados em “A”, “B”, “C” e “D”, sendo dois desses contendo ácidos graxos poli-insaturados (A,D) e dois contendo placebo (B,C). As cápsulas foram divididas em frascos, contendo 180 unidades, os quais foram fornecidos aos pacientes. Apenas ao final do estudo, o farmacêutico responsável entregou um envelope contendo a descrição do conteúdo de cada cápsula.

3.5 Randomização

Os pacientes foram randomizados 1:1 para receber inicialmente placebo (amido) ou ALA. Foi realizado um sorteio para receber um dos 4 frascos. Os participantes do estudo foram orientados a não alterarem seus hábitos alimentares ou de atividade física durante a pesquisa. Cada voluntário recebeu 360 cápsulas, suficientes para 2 meses, período aproximado até a realização da cirurgia bariátrica. Foi denominado D1 o dia da primeira avaliação e D2 o dia da segunda avaliação. Semanalmente, eram realizados contatos telefônicos para avaliar adesão e possíveis efeitos colaterais. Dos 52 pacientes que fizeram uso da medicação, 27 foram do grupo ALA e 25 do grupo controle.

Os pacientes foram orientados a tomar a medicação em uma, duas ou três tomadas ao dia, conforme tolerância, durante ou após às refeições.

3.6 Adesão e reações adversas

A adesão foi estimada pela porcentagem de cápsulas tomadas do total de cápsulas prescritas. Foi solicitado a todos os participantes que entrassem em contato caso apresentassem qualquer sintoma diferente do habitual após início do uso das cápsulas.

3.7 Avaliação antropométrica

Os pacientes foram submetidos à mensuração do peso, altura, IMC e à coleta de sangue periférico antes e após suplementação (D1 e D2), sendo o D2 logo antes da cirurgia bariátrica. O peso corporal (Kg) foi aferido com a utilização de uma balança digital com graduação de 100 em 100 gramas. A altura foi determinada por estadiômetro, graduado em centímetro, estando os pacientes descalços, com pés unidos, posição ereta e olhando para frente. O IMC foi calculado através da divisão do valor do peso (Kg) pelo quadrado da altura (m^2).

3.8 Exames laboratoriais

Foram coletadas amostras de sangue periférico em D1 e D2 para dosagem de: glicemia de jejum, colesterol total, LDL, HDL, triglicérides, hemograma completo, uréia, creatinina, sódio, potássio, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), proteína C reativa, citocinas, adiponectina, leptina, insulina basal e hemoglobina glicada.

A coleta foi realizada pela manhã, com pelo menos 8h de jejum, por meio de punção da veia braquial através do sistema BD *Vacutainer*. De cada paciente, foram coletados em torno de 20ml de sangue periférico, distribuídos em 5 tubos. Destes, 2 tubos foram imediatamente centrifugados para separação do soro e congelados a -20° para posterior dosagem de citocinas, adiponectina e leptina. O restante foi encaminhado ao Laboratório Central do HC-FMRP para realização dos demais exames descritos.

Glicemia: Foi realizada no Laboratório de Endocrinologia e Metabologia do HC-FMRP-USP, pelo método enzimático (hexoquinase) por fotometria ultravioleta de ponto final, utilizando-se aparelho Cobas Mira Plus e Kits de glicose HK Liquiform. Valor de referência: 70 a 99mg/dl. As amostras foram colhidas em tubos BD Vacutainer® com fluoreto de sódio (Na₂ EDTA 3mg/6mg).

Perfil Lipídico: Para as dosagens de Colesterol Total (CT), HDL - colesterol (HDL-C) e Triglicerídeos (TG), foi utilizado o método automático espectrofotométrico no aparelho Integra 400 (Roche Diagnostics®), no Laboratório de Nutrição do HC-FMRP-USP. Os valores de referência adotados foram CT < 200mg/dL, TG < 150mg/dL e HDL > 35mg/dL. As amostras foram colhidas em tubos BD Vacutainer® SST™ II *Advance*.

Leptina: foi determinada pelo método de ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA), utilizando o *Human Leptin Elisa Kit* (Cat. EZHL-80SK, Millipore). O menor nível de leptina que pode ser detectado por este método é de 0,78ng/ml. Todas as amostras foram realizadas em duplicatas e analisadas em software próprio.

Adiponectina: foi determinada pelo método de ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA), utilizando o *Human Adiponectin Elisa Kit* (Cat. EZHADP-61K, Millipore). O menor nível de adiponectina que pode ser detectado por este método é de 1,5ng/ml. Todas as amostras foram realizadas em duplicatas e analisadas em software próprio.

Proteína C reativa: foi determinada pelo método turbidimétrico, no equipamento CT600I (Thermo Scientific). Valor de referência <0,5mg/dl.

Insulina: foi determinada pelo método quimioluminescência, no equipamento Liaison (Diasorin). Valor de referência: 1,9 a 23 µUI/ml. As amostras foram coletadas em tubos BD Vacutainer® SST™ II *Advace*.

Hemoglobina Glicada (HbA1c): As amostras foram colhidas em tubos BD Vacutainer® K2 EDTA. Foi determinada pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Valor de referência < 6%.

Hemograma: a dosagem das séries foi determinada pelo método de contagem global. As amostras foram colhidas em tubos BD Vacutainer® K2 EDTA.

Citocinas séricas: Foram determinadas utilizando Kit *Milliplex® MAP Kit Human Cytokine*, Millipore) e o equipamento *Luminex 200*. As amostras foram coletadas em tubos BD Vacutainer® SST™ II *Advace*. Os valores de referência foram fornecidos em pg/ml e os resultados analisados em software próprio.

3.9 Gordura visceral

Durante o procedimento cirúrgico (cirurgia bariátrica) dos voluntários, foram coletadas amostras de tecido adiposo visceral. A região padronizada para extração foi peri-gástrica, por maior facilidade de coleta durante a cirurgia. A gordura foi imediatamente embalada em papel alumínio e imersa em recipiente com nitrogênio líquido, sendo

transportada até freezer -70°C , onde permaneceu armazenada até o processamento para extração de mRNA. O procedimento da coleta de gordura no intra-operatório não acarreteu qualquer risco à vida do paciente, nem necessitou de qualquer incisão cirúrgica adicional. O procedimento foi realizado no decorrer do ato cirúrgico, sendo mínima quantidade de gordura retirada.

3.10 Extração de RNA

O RNA total foi extraído de 100 a 200 mg de tecido congelado da punção do tecido adiposo visceral, pelo kit RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, USA), 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 1,7 e 2,059. 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.

3.11 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado pelo iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, EUA). A reação foi conduzida da seguinte forma: utilizamos 1 μg de RNA total, 4 μL de 5x iScript reaction mix, 1 μL de iScript reverse transcriptase e nuclease-free H₂O para completar um volume final de 20 μL . Esta reação foi processada 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 H₂O, restando concentração final de 1 ng/ μL de cDNA.

3.12 Avaliação molecular por Array

Para a avaliação do estresse do retículo endoplasmático no tecido adiposo visceral utilizamos o Kit Human Unfolded Protein Response PCR Array-(Qiagen-USA). Realizamos a formulação de um mix, contendo 1350 μL de Syber Green + 102 μL de cDNA + 1248 μL de

H₂O RNase Free. Após a formulação do mix, adicionamos em cada poço 25 µL desse mix com uma pipeta multicanal. Em cada poço da placa de qPCR Array continha os pares de primers de cada gene de interesse hibridizados e liofilizados no fundo de cada poço. Após concluído esse passo programamos o aparelho CFX96 (Bio-Rad) nas seguintes temperaturas: 1 ciclo - 10 min - 95°C; 40 ciclo - 15 s - 95°C; 40 ciclo - 1 min - 60°C. Foram avaliados 90 genes, descritos no Anexo 3.

3.13 PCR em Tempo Real

Após a síntese do cDNA, quantificamos a expressão dos genes envolvidos no estresse de retículo pela técnica de qPCR empregando SsoFast EVAGREEN Kit (BIO-RAD). Utilizamos na reação 100 nM de cada par de primers, cerca de 25 ng de cDNA e 1x SsoFast EVAGREEN (BIO-RAD), para um volume final de reação de 10 µL. A expressão gênica foi avaliada em um Sistema de Detecção de Sequências Bio-Rad (CFX96) sob as seguintes condições: 50°C -2 min, 95°C -10 min, e 40 ciclos de 95°C -15s, 60°C -20s, e 72°C -30s. Utilizamos o GAPDH como endógeno para fazer os cálculos da expressão gênica.

Os seguintes genes foram submetidos ao qPCR: ATF-4, ATF-6, PERK, GADD34, CALR, GRP78/BIP, CANX, CCT4, CHOP, XBP1, sXBP1, Adiponectina, Leptina, EIF2α e EDEM1. Os respectivos primers encontram-se no Anexo 4.

3.14 Avaliação do perfil de ácidos graxos em gordura visceral por cromatografia gasosa

A determinação da composição de ácidos graxos teciduais foi realizada pelo método de transesterificação direta. As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás da marca Shimadzu modelo GC-2014, com injetor automático AOC-20i. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida SupelcowaxTM 10, 30m x 0,25mm x 0,25µm, e hélio como gás de arraste, com fluxo de 1,6ml/min. Para a determinação da porcentagem dos ácidos graxos presentes nas amostras, utilizou-se o padrão externo Supelco 37 Component FAME Mix.

Foi extraído aproximadamente 100mg de gordura visceral e colocado em um tubo de ensaio de 10ml junto de 1,5ml de clorofórmio: metanol (CHCl₃:MeOH) 2:1. A amostra foi homogeneizada com o macerador e o volume completado para 10ml com CHCl₃: MeOH 2:1, sendo filtrado após com papel de filtro fino, embebido na solução CHCl₃:MeOH 2:1. Foi adicionado 2 mL de solução salina (NaOH 0,9%) para cada 10 mL de filtrado, centrifugado a 3.500 rpm por 10 minutos, aspirado e desprezado a fase superior. Retirados 4ml da fase

remanescente e transferido para outro tubo de 10ml. Para a fase de metilação, foi evaporado o solvente em corrente de $N_{2(g)}$, acrescentados 3 mL de hexano e 1 mL de KOH/MeOH 0,5 mol/L. A mistura foi agitada em vortex por 1 minuto e centrifugada a 3.500 rpm por 5 minutos. A fase superior foi removida, transferida para outro tubo de 10ml, adicionado mais 3ml na fase remanescente, novamente agitado e centrifugado na mesma velocidade descrita acima. A camada superior foi novamente removida e a fase remanescente foi acrescentada à primeira fase extraída. O solvente foi evaporado até 0,5ml. Foi transferido aproximadamente 200uL para um inserto com pé de borracha (em vial apropriado) e injetado no cromatógrafo para a realização da leitura dos ácidos graxos.

3.15 Análise estatística

Para responder aos objetivos do estudo foram utilizadas, além de técnicas básicas de análise exploratória como média, mediana, desvio padrão, frequência absoluta e relativa, outras duas metodologias de análise estatística o teste de Mann-Withney e ANOVA. O teste de Mann-Withney foi utilizado comparar variáveis quanto aos grupos ALA e controle. Para a avaliação molecular foi utilizado o teste T-student. Todos os testes de hipóteses desenvolvidos nesse trabalho consideraram uma significância de 5%, ou seja, a hipótese nula foi rejeitada quando p-valor foi menor ou igual a 0,05 (destacados em vermelho ao longo das tabelas).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Adesão e tolerância

De uma forma geral, os pacientes que finalizaram o estudo fizeram uso correto da suplementação. A adesão, estimada pela porcentagem de cápsulas tomadas do total de cápsulas prescritas, foi maior que 95%. As reações mais citadas foram náuseas, empachamento, eructação, dispepsia, diarreia e constipação.

4.2 Características gerais

De um total de 124 pacientes elegíveis para o estudo, 81 aceitaram participar. Destes, 10 perderam seguimento do serviço (9 desistiram da cirurgia, 1 por mudança de cidade), 10 pacientes foram excluídos por má adesão e 9 pacientes referiram não tolerar efeitos colaterais da medicação. Desta forma, foram incluídos no estudo 52 pacientes.

Dos 52 pacientes que fizeram uso da medicação, 27 foram do grupo ALA e 25 do grupo controle. A maioria dos voluntários era do sexo feminino, sendo 25 no grupo ALA e 21 no grupo controle ($p=0,41$) e de etnia branca, sendo 14 no grupo ALA e 15 no grupo controle ($p=0,92$). A idade média foi de $36,5 \pm 10$ no grupo ALA e $33,5 \pm 10,4$ no grupo controle ($p=0,2$).

O tempo médio de uso da medicação durante o estudo foi de $69,37 (\pm 6,42)$ dias para o grupo ALA e de $68,2 (\pm 5,84)$ dias para o grupo controle, sem diferença estatística. Em relação a doenças associadas, as principais descritas foram pré-diabetes, hipertensão, hipotireoidismo, dislipidemia e algum tipo de transtorno depressivo. Dos pacientes com pré-diabetes do grupo placebo, seis apresentavam glicemia de jejum alterada e cinco eram intolerantes à glicose. Do grupo ALA, sete apresentavam glicemia de jejum alterada e quatro intolerância à glicose. Nenhum dos pacientes era diabético.

Tabela 1. Características gerais dos indivíduos no início do estudo

	Controle (N=25)	ALA (N=27)	p
Sexo feminino	21 (84%)	25 (92,6%)	0,41
Idade (anos)	33,5 ($\pm$ 10,4)	36,5 ($\pm$ 10)	0,2
Etnia branca	15 (60%)	14(51,9%)	0,92
Pré-diabetes	11 (44%)	12 (44,4%)	0,9743
Hipertensão	12 (48%)	15 (55%)	0,5859
Hipotireoidismo	6 (24%)	9 (33,3%)	0,4579
Dislipidemia	6 (24%)	6 (22,2%)	1,0000

Variáveis contínuas descritas por média ($\pm$ desvio padrão); Variáveis discretas descritas em número (porcentagem); Teste t de student para comparação da variável contínua; P-valor do teste de Qui-quadrado para independência; P significativo < 0,05.

4.3 Avaliação antropométrica

Na comparação de peso e IMC houve diferença significativa intragrupos, porém não houve significância intergrupos antes e após a suplementação com placebo e ALA, analisados através do teste ANOVA (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação do Peso e IMC antes e após suplementação de placebo e ALA¹

	Controle (N=25)			ALA (N=27)			
	D1	D2	p ²	D1	D2	p ²	p ³
Peso (Kg)	132,2 $\pm$ 17,8	122,9 $\pm$ 16,8	p<0,001	134,1 $\pm$ 17,5	125,2 $\pm$ 16	P<0,001	P=0,72
IMC (Kg/m²)	49,7 $\pm$ 5,2	46,2 $\pm$ 5	P<0,001	49,2 $\pm$ 4,6	45,9 $\pm$ 4,3	P<0,001	P=0,58

¹ Valores em média + desvio padrão da média. Realizado teste ANOVA.

² Comparação entre D1 (início do tratamento) e D2 (após tratamento) dentro de cada grupo.

³ Comparação do efeito do tratamento entre os grupos.

IMC, índice de massa corporal / P significativo < 0,05.

4.4 Avaliação do controle glicêmico e perfil lipídico

Na comparação de hemoglobina glicada, glicemia de jejum, insulinemia de jejum, colesterol total e HDL, houve diferença significativa intragrupos após suplementação com placebo e ALA, porém não houve significância estatística intergrupos analisados através do teste ANOVA (Tabela 3). Em relação ao LDL e aos triglicérides, não houve diferença significativa intragrupos e intergrupos.

Tabela 3. Avaliação do controle glicêmico e perfil lipídico antes e após suplementação de placebo e ALA¹

	Controle (N=25)			ALA (N=27)			
	D1	D2	p ²	D1	D2	p ²	p ³
Glicemia de jejum (mg/dL)	97,9 ± 15,4	93 ± 12,4	p < 0,001	96,8 ± 11,8	89,2 ± 12,2	p < 0,001	p = 0,41
Insulinemia de Jejum (pmol/L)	28,3 ± 18,0	21,2 ± 14,3	p = 0,002	30,1 ± 17,2	21,5 ± 11,3	p = 0,002	p = 0,76
HbA1c (%)	5,9 ± 1,0	5,6 ± 0,57	p<0,001	5,8 ± 0,53	5,58 ± 0,44	p<0,001	P=0,69
Triglicérides (mg/dL)	143,5 ± 80,6	150 ± 78,1	NS	168,5 ± 86	153 ± 63,3	NS	P=0,13
Colesterol Total (mg/dL)	195,8 ± 32,5	192,8 ± 40,2	P=0,03	191,4 ± 39,3	174,92 ± 32,1	P=0,03	P=0,13
Colesterol HDL (mg/dL)	41,9 ± 7,5	37,8 ± 9	P<0,001	41,2 ± 7,4	37,4 ± 9,9	P<0,001	P=0,86
Colesterol LDL (mg/dL)	127,5 ± 28	125,5 ± 27,3	NS	114,9 ± 24,9	107,3 ± 27	NS	P=0,42

¹ Valores em média + desvio padrão da média. Realizado ANOVA, P significativo < 0,05.

² Comparação entre D1 (início do tratamento) e D2 (após tratamento) dentro de cada grupo.

³ Comparação do efeito do tratamento entre os grupos.

IMC, índice de massa corporal. NS = não significativo.

4.5 Avaliação das citocinas séricas e proteína C reativa (PCR)

Para a análise das citocinas e PCR foi optado por utilizar o delta da diferença entre o início (D1) e o final da suplementação (D2) (Tabela 4). Observamos que os níveis séricos de Leptina ($p=0.0154$) e IP-10 ($p=0.0410$), citocinas inflamatórias, foram significativamente inferiores no grupo ALA em relação ao placebo. Os níveis séricos de IL-4, citocina considerada anti-inflamatória, apresentaram aumento significativo após suplementação com ALA ($p=0.0211$). Em relação a PCR, não houve diferença significativa intragrupos e intergrupos ($p=0,1314$). Foi utilizado teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Tabela 4. Média, mediana e erro padrão das citocinas séricas e PCR antes e após suplementação com ALA em cada grupo (placebo e ALA), seguido do p-valor

	ALA (N=27)			Controle (N=25)			P
	Diferença (D2-D1)						
	Média	Mediana	Erro padrão	Média	Mediana	Erro padrão	
Leptina	-3,276	-3,438	2,814	7,142	4,939	2,917	0.0154
Adiponectina	-378.9	-4.5	584,18	-309.06	-823.5	557,52	0.6367
IFN α	0.67	3.1	3,70	-0.47	1.65	15,88	0.7815
IFN γ	5.48	0	10,52	17.46	17.21	13,18	0.2093
IL 10	1.21	0.34	0,62	2.18	0.19	3,93	0.5891
IL 1RA	7.82	11.4	13,47	6.34	21.67	30,71	0.6197
IL 1 α	-14.35	3.12	20,02	-4.97	7.39	58,76	0.6197
IL 1 β	2.2	0.07	2,17	-0.59	0.03	1,02	0.8267
IL 2	0.37	0.07	0,36	-1.25	0.04	1,60	0.8266
IL 3	0	0.01	0,02	-0.12	-0.03	0,10	0.5396
IL 4	2.31	1.43	1,44	-6.09	-1.46	3,97	0.0211
IL 5	0.43	-0.09	0,72	-0.63	0.19	0,68	0.5992
IL 6	18.7	0.91	15,71	-3.71	-0.28	5,38	0.2201
IL 7	1.91	0.35	2,54	-1.47	1.94	7,26	0.9767
IL 8	512.93	8.7	430,45	100.08	8.9	84,99	1.0000
IP 10	-115.78	-33.81	77,97	303.49	112.09	191,56	0.0410
MCP 1	27.01	68.89	86,71	115.05	134.04	128,33	0.5495
MIP 1a	66.65	3.03	51,95	36.69	2.96	30,80	0.8609
MIP 1b	67.22	5.87	60,87	16.73	1.57	17,95	0.8839
TNF a	9.98	0.66	7,06	3.27	2.58	4,01	0.7703
TNF b	-0.02	0.29	2,91	-9.38	0	8,55	0.9070
PCR	-0,17	-0,39	0,68	-0,04	-0,01	0,97	0,1314

Teste não paramétrico de Mann-Whitney para diferença entre duas amostras (controle x ALA).

P significativo < 0,05.

Figura 9. Diferença entre as dosagens sérica de Leptina (A), IL-4 (B), IP-10 (C), TNF- α (D), IL-6 (E) e PCR (F), comparado entre D1 (início do tratamento) e D2 (após tratamento). Análise realizada através do Teste não paramétrico de *Mann-Whitney* placebo x ALA.

4.6 Avaliação da incorporação do ALA em gordura visceral

Foi feita a comparação das variáveis ALA, EPA, DHA, ÔMEGA-6 E AA em gordura visceral quanto aos grupos em estudo ALA e Controle via teste não paramétrico de Mann-Whitney (Tabela 5).

Observamos que houve maior incorporação dos ácidos graxos ômega 3 (ALA, EPA e DHA) em tecido adiposo visceral dos pacientes do grupo ALA em relação ao controle, com significância estatística. Não houve diferença estatística quanto a incorporação de ômega-6 e AA.

Tabela 5. Média, mediana e desvio padrão da incorporação de ALA, EPA, DHA, ômega-6 e AA após suplementação com ALA em cada grupo (Controle e ALA), seguido do p-valor

	ALA (N=14)			Controle (N=15)			<i>P</i>
	Média	Mediana	Desvio padrão	Média	Mediana	Desvio padrão	
ALA	0,98	0,94	0,11	0,79	0,77	0,14	0,0002
EPA	0,06	0,06	0,01	0,04	0,04	0,01	<0,0001
DHA	0,13	0,13	0,05	0,08	0,08	0,02	0,0005
Ômega-6	22,5	22,03	2,41	20,93	20,34	1,77	0,0648
AA	0,38	0,37	0,14	0,44	0,48	0,13	0,1224

Média, mediana e desvio padrão das variáveis ALA, EPA, DHA, ÔMEGA-6 E AA em cada grupo (placebo e omega3) seguido do p-valor do teste de Mann-Whitney. ALA: Ácido alfa-linolênico; EPA: Ácido Eicosapentanóico; DHA: Ácido Docosahexanóico; AA: Ácido Araquidônico.

A)

B)

C)

D)

E)

Figura 10. Incorporação dos ácidos graxos em tecido adiposo visceral de obesos grau III após suplementação com ALA. Análise realizada pelo Teste de *Mann Whitney*.

4.7 Avaliação molecular em tecido adiposo visceral

Foi realizado PCR *array* dos genes relacionados ao estresse do retículo endoplasmático, listados na tabela 10 e um qPCR dos genes XBP1, sXBP1, CANX, GRP78, ATF-4, ATF-6, PERK, CHOP, CCT4, CALR, GADD34, EIF2 α , EDEM-1, AdipoQ e leptina. Em relação ao PCR *array*, a análise estatística foi realizada através do teste *t-student*. O único gene cuja expressão foi maior no grupo ALA com significância estatística foi o CCT4, a qual foi 55,86 vezes maior em relação ao controle ($p < 0,0001$).

A análise genética através do qPCR evidenciou maior expressão gênica do XBP1 ($p = 0,0442$), do sXBP1 ($p < 0,0001$), GADD34 ($p = 0,0117$), ATF-6 ($p = 0,0305$) e do EIF2 α ($p = 0,0063$) e diminuição na expressão do gene da leptina ($p = 0,0410$) no grupo ômega em relação ao controle após suplementação. A expressão gênica do CHOP ($p = 0,07$) apresentou uma tendência a diminuição no grupo ALA, porém não foi estatisticamente significativa. Os genes referentes ao CANX ($p = 0,093$) e Adiponectina ($p = 0,0442$) tiveram sua expressão diminuída no grupo ALA, com significância estatística.

Via de sinalização PERK/EIF2 α /ATF4/CHOP

Via de sinalização ATF6

$P=0,0305$

Via de sinalização IRE/XBP1/sXBP1

$p=0,0013$

$p=0,0003$

Expressão gênica das chaperonas CCT4, CANX, CALR, BIP/GRP78

$p<0,0001$

$p=0,0093$

$p=0,7211$

$p=0,2912$

Expressão gênica do EDEM-1 (ERAD)

$p=0,3659$

Expressão gênica da Leptina e Adiponectina

$p=0,0410$

$p=0,0442$

Figura 11. Expressão dos genes do estresse do retículo endoplasmático e adipocinas no tecido adiposo visceral após suplementação com ALA. Análise realizada através do teste *T-student*

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A obesidade é atualmente reconhecida como doença crônica, associada a um processo inflamatório subclínico, sendo este relacionado à patogênese de diversas doenças como Diabetes Mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares, câncer, hipertensão, entre outras.

Vários estudos em humanos e animais já demonstraram as propriedades anti-inflamatórias da suplementação alimentar com ácidos graxos ômega-3, em várias condições e doses diferentes, mostrando relação com a diminuição de marcadores inflamatórios como a PCR e adipocinas (SCHWAB, 2006), além de benefícios cardiovasculares (KRIS-ETHERTON, 2003). O ALA é um ácido graxo essencial encontrado principalmente em sementes tais como linhaça e chia e nos óleos vegetais, como soja e canola. Enquanto isso, o EPA e DHA podem ser encontrados em peixes de águas profundas, como salmão, anchova, sardinha e atum. A associação entre a ingestão de ALA e doenças é menos clara do que a ingestão de EPA e DHA, visto que foi menos estudada que os ácidos graxos ômega-3 de origem marinha (NARVERUD, 2016). Considerando a realidade brasileira, onde esses peixes são provenientes de cativeiro, portanto tendo alimentação pobre em ômega-3, a melhor fonte de ômega-3 seria o ALA, inclusive com menor custo (RAJARAM, 2014).

Atualmente, a dieta ocidental é caracterizada por alto consumo de gorduras trans e ácidos graxos n-6, e pobre em n-3, resultando em uma relação n-6/n-3 em torno de 20-30:1. O aumento da relação ômega 6:3 na dieta apresenta efeitos pró-trombóticos e pró-inflamatórios, o que contribui para a prevalência de obesidade, DM2 e aterosclerose (SIMOPOULOS, 2016). Óleos de linhaça e chia, contendo altos teores de ALA, podem contribuir para uma redução nesta relação. No Brasil, informações sobre a razão n-6/n-3 na dieta dos brasileiros são restritas e, os resultados de pesquisas existentes incluem a composição de ácidos graxos em alguns alimentos isolados (PERINI, 2010).

Em nosso estudo, não realizamos um recordatório alimentar padronizado a fim de estabelecer uma relação ômega-6/3 na dieta de nossos voluntários, mas nos baseamos nas informações de que o padrão alimentar de indivíduos obesos grau III apresenta grande ingestão de gordura saturada alterando a relação. Durante entrevista, nenhum dos voluntários consumia peixes ou outros animais marinhos mais que duas vezes ao mês e os que faziam consumo regular de fontes de ALA, como linhaça ou chia, foram excluídos do estudo. Certamente essa relação estava próxima das descritas em dietas ocidentais, pobre em peixes ou fontes de ALA (SIMOPOULOS, 2016).

Em uma ampla revisão na literatura, foi mostrado que em indivíduos saudáveis, a dose de 0,9 a 2g/dia de ômega-3 não alterou marcadores inflamatórios, porém na dose de 1,2 a 6g/dia foi observada diminuição dos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias, células T e placas de aterosclerose, principalmente em indivíduos com doenças cardiovasculares. Dessa maneira, não há consenso sobre a dose ideal anti-inflamatória (RANGEL-HUERTA, 2012; ZHAO, 2009; BROWNING, 2007).

No nosso estudo, não houve alteração nos níveis séricos de IL-6 ($p=0,2201$), TNF- α (0.7703) e PCR ($p=0,57$) após suplementação com ALA, porém observamos diminuição nos níveis séricos de Leptina ($p=0.0154$) e IP-10 ($p=0.0410$), citocinas inflamatórias, e aumento nos níveis séricos de IL-4 ($p=0,0211$), citocina anti-inflamatória. Em estudo prévio, foi observado que a suplementação com 11g de ALA por 8 semanas (NELSON, 2007) e 9,5g de ALA por 6 meses (KEW, 2003) não alterou marcadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β e IL-6) em obesos metabolicamente saudáveis. Kew e col. 2003 sugeriram que doses menores que 9,5g de ALA por dia (ou 1,7g de EPA + DHA) não interferem na produção de citocinas por monócitos ou linfócitos, havendo apenas incorporação em membranas celulares. Por outro lado, Fantuich e col. (2007) mostraram que a suplementação com 5g de ALA por 2 semanas em obesos grau III reduziu níveis séricos de PCR e leucócitos, porém não teve alteração em peso, composição corpórea, nos níveis séricos de leptina ou outros marcadores inflamatórios. Outro estudo demonstrou que a suplementação com 13,7g de ALA por 4 semanas diminuiu TNF- α e IL-1 β em indivíduos sobrepeso saudáveis (CAUGHEY, 1996).

No nosso estudo, os níveis de TNF- α , PCR, INF- γ , IL-1 e IL-6 não apresentaram diferença significativa intragrupos e intergrupos. Vale ressaltar que nossos voluntários perderam peso, uma vez que estavam em preparo para a cirurgia bariátrica, e mesmo assim não foi visto redução dos níveis séricos dessas citocinas. Provavelmente, isso ocorreu devido ao pouco tempo de suplementação, à rapidez com que esses indivíduos perderam peso e provavelmente à dose utilizada de 3g de ALA. Observamos também, durante revisão na literatura, que os estudos os quais demonstraram diminuição de marcadores inflamatórios foram realizados em pacientes com alguma condição inflamatória além da obesidade, como diabetes, dislipidemia e doenças auto-imunes. Além disso, a maioria das pesquisas utilizou o ômega-3 proveniente do óleo de peixe, fonte direta de EPA e DHA. Os estudos utilizando ALA em obesos grau III sem outras condições inflamatórias possuem resultados divergentes. No nosso estudo, as citocinas foram dosadas por um único kit de ELISA Multiplex, previamente validado, conferindo confiabilidade à comparação dos valores absolutos e realização concomitante da dosagem de múltiplas citocinas (ELSHAL, 2006).

Nossos resultados também não mostraram benefícios da suplementação do ALA em relação ao peso corporal. Estudo realizado em indivíduos obesos mostrou que a suplementação com 6g de ômega-3 por 12 semanas não apresentou efeitos no peso ou composição corporal (MUNRO, 2013). Estudos em animais revelam que a suplementação de ácidos graxos n-3 reduz a massa de tecido adiposo e previne obesidade, porém em humanos os efeitos no peso corporal são bem limitados (MADSEN, 2005; MADSEN, 2012; BENDER, 2014), apresentando resultados conflitantes, com efeitos positivos (COUET, 1997; FONTANI, 2005) e negativos (MUNRO, 2013), por diversos motivos como diversidade alimentar em diferentes populações, processo inflamatório pré-existente, variedade na suplementação e dose de ômega 3, doenças associadas e fatores genéticos que contribuem para a obesidade (SIMOPOULOS, 2016).

Nossos dados referentes à Leptina corroboram com os da literatura. Vários estudos em humanos e animais demonstram que a suplementação de ômega-3 em obesos diminui os níveis séricos de leptina (FLACHS, 2011) e reduz a sua expressão gênica nos mais diversos tecidos (SHEN, 2014; UKROPEC, 2003; WANG, 2002). Estudo em ratos obesos, mostrou que após suplementação com ômega-3 houve diminuição nos níveis séricos de leptina e de sua expressão gênica em tecido adiposo visceral (SHEN, 2014).

Não evidenciamos alteração nos níveis séricos da Adiponectina após suplementação com 3g de ALA e, ao contrário de nossas expectativas, a sua expressão gênica foi significativamente menor após suplementação. Alguns estudos em pacientes diabéticos, mostraram aumento da Adiponectina sérica, associado a aumento na sua expressão gênica e nenhum impacto na leptina, após suplementação com 3g de ALA (GOMES, 2015; MIRANDA, no prelo). Nosso grupo já havia demonstrado 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 (MIRANDA, no prelo). Outro estudo, também em pacientes diabéticos, não mostrou alterações na Adiponectina e Leptina após suplementação com 2g de EPA + DHA (STIRBAN, 2014). Em uma metanálise, foi observado que os efeitos da suplementação com ômega-3 nos níveis séricos de adiponectina pareciam ser mais potentes em indivíduos obesos e jovens ou com algum tipo de doença inflamatória tal como DM2 e doenças auto-imunes, sugerindo diferentes efeitos sobre a adiponectina em diferentes populações (WU, 2013). Em relação ao nosso trabalho, mais estudos serão necessários para compreender a diminuição na expressão gênica da adiponectina.

A Interleucina-4 é uma citocina produzida por linfócitos Th2 que regula a imunidade humoral. Foi previamente descrita como um inibidor da produção de citocinas pró-inflamatórias em cultura de monócitos em humanos, tais como TNF- α , IL-6, IL-1 e IP-10 (TE VELDE, 1990). Um estudo realizado em ratos induzidos a um quadro de sepse, os quais foram previamente suplementados com ômega -3, evidenciou maior produção de IL-4 e menor de IFN- γ , associado a maior produção de Imunoglobulina-A (IgA). Esse achado sugere que um efeito Th2 predominante durante um quadro de sepse modula de forma benéfica a produção de anticorpos (IgA), podendo conferir proteção contra patógenos (LIN, 2007). A IL-4 também medeia a resposta anti-helmíntica e encontra-se diminuída na obesidade (WU, 2011). Nossos dados mostraram aumento nos níveis séricos de IL-4 após suplementação com ALA, dessa maneira, podemos supor também que a suplementação de ALA nos nossos indivíduos possa conferir benefício adicional contra parasitas. Assim como TNF- α , PCR e IL-6 o níveis sérico de IP-10 está diretamente relacionados com o IMC e essa interleucina faz parte do rol de citocinas inflamatórias presentes no quadro de inflamação crônica da obesidade (KITAHARA, 2014; SEKIKAWA, 2017). O IP-10 é expresso em diversos órgãos e células, incluindo coração, vasos sanguíneos, monócitos e músculos. Está associada à patogênese da aterosclerose, por atrair linfócitos e monócitos ao local da lesão vascular. Um estudo realizado em obesos mostrou que a leptina aumenta a expressão e secreção do IP-10 em monócitos, por mecanismos ainda desconhecidos. Especula-se que esse fato possa contribuir com o aumento do risco cardiovascular associado ao estado de hiperleptinemia em pacientes obesos (MEIER, 2003). Nosso estudo, em concordância com o anterior, mostrou que após suplementação com ALA houve diminuição nos níveis séricos de leptina e IP-10.

Não encontramos alterações na glicemia, hemoglobina glicada, insulina basal, HOMA-IR, colesterol total, HDL, LDL ou triglicérides entre os grupos após suplementação com ALA. Os estudos também mostram resultados divergentes. Estudo com obesos não mostrou alteração no perfil lipídico, hemoglobina glicada, glicemia e insulina após suplementação com ômega 3 (ABDALI, 2015). A dose de 3g de ômega-3 foi escolhida por ser sabidamente uma dose efetiva para hipertrigliceridemia. Uma possível explicação seria de que a maioria dos nossos voluntários não era dislipidêmico ou com alterações na glicemia. Porém observamos que intragrupos, os indivíduos obtiveram melhora no CT, glicemia, hemoglobina glicada e insulina basal, possivelmente devido à perda de peso. A suplementação com ALA não conferiu nenhum benefício adicional nestes parâmetros.

O tecido adiposo é o principal compartimento de estoque de ácidos graxos, recebendo atenção especial nos últimos anos por seu papel no metabolismo (HODSON, 2008). Sua

composição de ácidos graxos consegue refletir a ingestão de ômega 6 e 3 a partir de fontes alimentícias, devido a sua baixa taxa de metabolização, sendo considerado padrão ouro (HODSON, 2008; BAYLIN, 2002). Nossos dados mostram que, após suplementação com ALA, houve incorporação significativa dos ácidos graxos ALA ($p=0,0002$), EPA ($p<0,0001$) e DHA ($p=0,0005$) em gordura visceral em relação ao controle. Podemos confirmar, dessa forma, que nossos voluntários utilizaram de forma correta a suplementação fornecida. Não houve alteração na composição do tecido adiposo em relação à incorporação do ômega-6 ($p=0,065$) e do AA ($p=0,122$) entre os grupos, após suplementação com ALA. Em um estudo europeu, foi observado que a composição de ácidos graxos em tecido adiposo visceral de obesos, em porcentagem sobre os ácidos graxos totais, consistia em aproximadamente 0.41% de ALA, 0,09% de EPA, 0.35% de DHA, 14.82% de ômega-6 e 0.42% de AA (GARAULET, 2006). Nossos dados no grupo controle mostram uma quantidade proporcionalmente maior de ALA (0,79%), porém menores de EPA (0,03%) e DHA (0,1%), além de uma alta proporção de ômega-6 (20,9%) e similar de AA (0,44%), corroborando com o fato de a nossa dieta ser pobre em ômega-3 proveniente de animais marinhos e rica em ácidos graxos ômega-6. Mesmo no grupo que fez a suplementação com o ALA, a proporção de EPA (0,05%) e DHA (0,13%), apesar de significativamente maior que o grupo controle, possivelmente apresenta menor proporção desses ácidos graxos do que em países europeus. Permanece o questionamento se a taxa de conversão do ALA em EPA e DHA é maior sob dieta mediterrânea ou o aumento da incorporação de EPA e DHA é devido ao maior consumo de peixes entre os europeus.

Quando o ALA é administrado por via oral, é absorvido pelo sistema linfático e, em seguida, pela circulação sanguínea, para assim ser distribuído principalmente no fígado e tecido adiposo (DOMENICHIELLO, 2015). Alguns estudos mostraram que o ALA possui boa biodisponibilidade e é bem absorvido pelo trato gastrointestinal (BURDGE, 2005). ALA é o principal ácido graxo ômega-3 e, no corpo, pode ser metabolizado em EPA e DHA. As reações ocorrem no retículo endoplasmático, predominantemente nas células hepáticas. A conversão do ALA em EPA e DHA é limitada. Um estudo com indivíduos 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 (PAWLOSKEY, 2001). Vários fatores podem influenciar negativamente essa conversão tais como tabagismo, etilismo, diabetes, estresse psicológico, ingestão de gordura trans e envelhecimento (MARTIN, 2006). A conversão de ALA em EPA e DHA também parece ser prejudicada quando a razão ômega-

6/ômega-3 na dieta encontra-se elevada. Um estudo mostrou que a maior taxa de formação de EPA e DHA em células hepáticas ocorria quando essa relação era próxima de 1:1 (HARNACK, 2009). Os níveis de ALA na dieta influenciam fortemente tanto a conversão de ALA em EPA e DHA, quanto sua subsequente incorporação em tecidos (BARCELÒ-COBLIJIN, 2005). Estudos com ratos mostraram que a inclusão de óleo de linhaça na dieta aumentou o teor de ALA, EPA e DHA no plasma e no fígado (MACDONALD-WICKS, 2004).

Estudos mostram que a taxa de conversão de ALA em EPA varia de 0,2% a 21% e em DHA de 0 a 9% (WILLIAMS, 2006). Em homens, a taxa de conversão de EPA em DHA é muito baixa ($< 0,1\%$), enquanto em mulheres ultrapassa os 9%, possivelmente devido à influência do estrógeno na enzima $\Delta 6$ -desaturase (WILLIAMS, 2006; ANDREW, 2006). No nosso estudo, não podemos calcular exatamente a taxa de conversão de ALA em EPA e DHA, visto que não utilizamos isótopos marcados, além do fato de que a composição de ácidos graxos pode refletir consumo de 9 meses passados (STRAWFORD, 2004).

Porém devido ao aumento da incorporação em gordura visceral do EPA e DHA de forma estatisticamente significativa após suplementação com ALA, podemos supor que em nosso grupo houve aumento na taxa de conversão.

Nossos dados mostram que a suplementação com 3g de ALA não alterou a incorporação de ácido araquidônico (AA) e do AL (ômega 6) em tecido adiposo visceral. O excesso de AL na dieta compete pela enzima $\Delta 6$ dessaturase, impedindo ou diminuindo a transformação do ALA em EPA e DHA, causando desequilíbrio entre os ácidos graxos no organismo (PERINI, 2010). Os ácidos graxos ômega-3 provenientes da dieta substituem parcialmente os ácidos graxos ômega-6, principalmente o AA nos tecidos, diminuindo a produção de eicosanoides inflamatórios, tais como prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina e tromboxanos (SURETTE, 2008). Talvez o pouco tempo de suplementação com ALA não possibilitou mudanças na diminuição da incorporação do AA em tecido adiposo visceral.

Como mencionamos, o tecido adiposo, em um contexto de obesidade, é caracterizado por uma inflamação crônica e outros possíveis insultos como hipóxia, estresse oxidativo, entre outros decorrentes da hipertrofia de adipócitos. O acúmulo de alterações resulta na disfunção de várias organelas citoplasmáticas, particularmente do retículo endoplasmático (RE) (WILLIAMS, 2006). O RE é a organela responsável pela síntese, enovelamento e transporte proteico, além de ser responsável pela correção das proteínas mal enoveladas. O estresse do RE é mensurado pela ativação da UPR, a qual é sinalizada pelos 3 principais sensores

transmembrana: PERK, IRE1 e ATF-6. Vários estudos apontam o envolvimento da UPR na fisiopatologia de doenças metabólicas (PARK, 2013; LEE, 2014). O XBP-1 (X-box binding protein 1), o qual pertence a via de sinalização do IRE1, é um importante componente da UPR e um fator de transcrição nuclear (WU, 2015). Vários estudos confirmaram que o XBP-1 é crucial para a sobrevivência celular sob condições de estresse (YOSHIDA, 2001; ROMERO-RAMIREZ, 2004). Em revisão bibliográfica, constatamos que o XBP1 exerce diferentes funções em diferentes tecidos. Nosso grupo mostrou que a suplementação de 3g/dia de ALA durante 60 dias em indivíduos diabéticos reduziu a expressão gênica do XBP1 em tecido adiposo subcutâneo, sem efeito na glicemia ou perfil lipídico (MIRANDA, no prelo). Os resultados do nosso trabalho mostram aumento da expressão gênica do XBP1/XBP1s em tecido adiposo visceral após suplementação com a mesma quantidade de ALA. Estudos mostraram que o XBP1 regula a diferenciação dos linfócitos B e sua deficiência resulta na diminuição na produção de imunoglobulinas (REIMOND, 2001) e foi necessário à síntese e secreção de IgM (TIROSH, 2005). Outros estudos sugerem que a via IRE1/XBP1 é fundamental para estimular as células B a secretarem anticorpos e assim, importante no processo de defesa contra parasitas (ARAGON, 2012). A via IRE1/XBP1 está fortemente associada ao equilíbrio do metabolismo glicídico e lipídico. Alguns trabalhos mostram que o XBP1 exerce efeito benéfico na glicemia através tanto da melhora da sensibilidade à insulina quanto estimulando sua produção. No entanto, o XBP1 também modula a transformação do excesso de glicose em lipídeos, o que pode contribuir para obesidade e DM2 (YANG, 2016).

Em um trabalho utilizando camundongos geneticamente obesos e obesos induzidos por dieta, foi constatado que o aumento do XBP1 reduziu a expressão de genes lipogênicos, diminuiu os triglicérides e a síntese de ácidos graxos hepáticos, melhorou a esteatose hepática e resistência insulínica hepática, mostrando ter um efeito anti-lipogênico no fígado (HERREMA, 2016). Um estudo utilizando cultura de células β de camundongos obesos, mostrou que a inibição da via IRE1/XBP1 diminuiu a expressão de genes adaptativos da UPR, diminuindo a viabilidade e induzindo à apoptose (YIECHAN, 2015). Outro estudo em ratos mostrou que a deleção do XBP1 em células β pancreáticas levava à hiperglicemia e intolerância à glicose (LEE, 2008). Um estudo realizado em camundongos obesos mostrou ativação exacerbada do IRE-1, com ativação da JNK nos tecidos adiposo e hepático. Da mesma forma, camundongos deficientes de XBP1 apresentaram aumento do estresse do RE resultando em piora no controle da glicemia (OZCAN, 2004). Li J et al (2011) mostraram que o XBP1 exerce feedback negativo sobre o IRE1 em condições de estresse de RE, suprimindo sua fosforilação e a produção de TNF- α induzida pela via IRE1/IKK/NF κ B na retina de

camundongos. Esses achados sugerem que otimizar a UPR pode ser uma estratégia terapêutica potencial para prevenir danos oculares em pacientes diabéticos (LI, 2010).

Percebemos que o XBP-1 pode ter sua expressão gênica aumentada ou diminuída, a depender do tecido, podendo ter efeitos deletérios ou não. Alguns trabalhos mostram que a obesidade pode criar um estado de deficiência relativa de XBP1, pela baixa expressão gênica, prejudicando a UPR (WU, 2015). Mais estudos são necessários para elucidar melhor os efeitos paradoxais do XBP1.

Não foi observada no nosso trabalho diferença na expressão gênica da chaperona BIP (GRP78), no entanto, foi notado aumento da expressão gênica da chaperona CCT4, o qual foi cerca de 55 vezes maior no grupo que fez a suplementação com ALA. O CCT4 é uma chaperona responsável principalmente pelo dobramento correto de proteínas, como actina e tubulina, as quais exercem papel crucial nos neurônios (LUNDIN, 2010). O dobramento incorreto da actina pode levar à perda da integridade do citoesqueleto celular, causando defeitos no transporte axonal, apoptose celular e, conseqüentemente, doenças neurológicas (LEE, 2003). O DHA é parte integrante dos fosfolípidos de membranas neurais e têm impacto na estrutura e função cerebral, contribuindo para sua formação e também da retina (YURKO-MAURO, 2015). Vários estudos apontam que a suplementação com DHA, pode melhorar aspectos cognitivos em idosos com doença de Alzheimer e memória, ajudando a prevenir o declínio cognitivo (DACKS, 2013; SYDENHAM, 2012; LIN, 2012; ABUBAKARI, 2014). Estudos em animais apontam o papel direto do DHA na neurogênese, sinaptogênese e mielinização (JOFFRE, 2014). Nosso estudo revelou uma boa incorporação do DHA em tecido adiposo visceral após suplementação com ALA e aumento local da expressão gênica do CCT4. Não podemos estabelecer correlação entre essas duas variáveis. Além de não ser o objetivo do nosso trabalho, não podemos concluir que o aumento da expressão gênica do CCT4 no tecido adiposo visceral pode ser associado a benefícios neurológicos, ou mesmo se sua expressão também foi aumentada em outros tecidos. Não há estudos mostrando essa relação.

A fosforilação do eIF-2 α nas células de mamíferos é uma resposta bem caracterizada ao estresse do RE (BRUSH, 2003). Várias proteínas quinases, dentre as quais a PERK, ativam diferentes sinais para a fosforilação do eIF-2 α e assim inibir a tradução de proteínas, sendo parte essencial da UPR e a primeira via a ser ativada em resposta ao ERE (Harding, 1999). O GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein, 34) tem seus níveis aumentados após ativação da via eIF-2 α /PERK. A hiperexpressão do GADD34 mostrou atenuar a UPR, através de um mecanismo de feedback negativo sobre a eIF-2 α , facilitando a

recuperação celular (NOVOA, 2001). Nosso trabalho mostrou tanto aumento na expressão gênica do eIF-2 α ($p=0,0063$), quanto do GADD34 ($p=0,0117$), porém não houve diferença na expressão gênica da PERK nem do ATF-4. Estudo em modelos animais mostrou que o EPA depleta os estoques de cálcio intracelular, o que sabidamente induz à fosforilação do eIF2- α e, assim, auxiliando a inibir a tradução de proteínas durante o ERE (AKTAS, 2004; PALAKURTHI, 2000). Estudos em ratos deficientes de GADD34 se tornaram obesos, com resistência insulínica e esteatose hepática (NISHIO, 2015).

A UPR, sob estresse prolongado do RE, induz fatores transcricionais pró-apoptóticos, como o CHOP, via ATF-4. O aumento na sua expressão leva à apoptose celular. Estudos recentes mostram que a expressão gênica do CHOP é um dos principais fatores determinantes do estresse do RE (OKADA, 2002), regulando genes envolvidos tanto na sobrevivência quanto na morte celular (OYADOMARI, 2004). No nosso estudo, o grupo que realizou a suplementação com ALA apresentou uma tendência à diminuição na expressão gênica do CHOP, porém não foi estatisticamente significativa ($p=0,07$), provavelmente devido ao baixo número de voluntários que se submeteram à coleta de gordura visceral. Há indícios de que a suplementação prolongada do EPA, induz a ativação do ATF-4, que por sua vez, quando hiperexpresso, regula a expressão do CHOP. O seu efeito apoptótico pode contribuir para suas propriedades anti-cancerígenas em pacientes com suplementação prolongada de EPA (AKTAS, 2004).

A duração e a severidade do ERE são os fatores mais importantes para determinar a partir de qual ponto a UPR passa de um mecanismo de sobrevivência celular a um fator pró-apoptótico (VANDEWYNCKEL, 2013). Acreditamos que no nosso trabalho, a suplementação com ALA exerceu efeito benéfico no tecido adiposo visceral de pacientes obesos grau III, por aumentar a expressão gênica neste tecido do XBP1/sXBP1 e eIF2- α , diminuir a expressão gênica de ATF-6, restaurando assim a UPR.

Desde a descoberta do estresse do RE nos anos 80, é cada vez maior o conhecimento de como essa organela é capaz de funcionar como um sensor às demandas metabólicas e responder de forma eficiente. A importância da resposta ao estresse do RE para a saúde humana é bastante reconhecida, porém muitos estudos ainda são necessários para elucidar seus mecanismos e relacioná-los com doenças, a fim de que se possa desenvolver terapias alvo.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

O presente estudo concluiu que a suplementação com ALA em indivíduos obesos grau III:

- Não teve impacto em medidas antropométricas (Peso, IMC);
- Não teve impacto no perfil glicídico;
- Não teve impacto no perfil lipídico;
- Diminuiu os níveis séricos das adipocinas inflamatórias Leptina e IP-10 e aumentou os níveis séricos de IL-4, citocina anti-inflamatória;
- Não teve impacto nos níveis séricos de TNF- α , IL-6, IL-1, PCR e Adiponectina;
- Aumentou significativamente a incorporação de ALA, EPA e DHA em tecido adiposo visceral. Não teve impacto na incorporação de ácido araquidônico e ácido linoleico;
- Diminuiu a expressão gênica da leptina e adiponectina;
- Modulou o estresse do retículo endoplasmático do tecido adiposo visceral;
- Aumentou a expressão gênica do EIF2- α , GADD34 e houve uma tendência à diminuição do CHOP;
- Diminuiu a expressão gênica do ATF6;
- Diminuiu a expressão gênica da chaperona CANX;
- Aumentou a expressão gênica do XBP1 e sXBP1;
- Aumentou a expressão gênica da chaperona CCT4.

Como limitações do nosso trabalho, podemos citar a duração de 8 semanas de suplementação. Esse tempo foi possivelmente insuficiente para avaliarmos todos os potenciais benefícios do ALA. Apesar de, no nosso trabalho, a suplementação com ALA ter diminuído os níveis séricos de Leptina e IP-10, citocinas sabidamente inflamatórias, e aumentado níveis séricos de IL-4, citocina sabidamente anti-inflamatória, não podemos concluir sobre efeitos anti-inflamatórios de um modo geral. Podemos supor que uma dose maior do que 3g/dia de ALA ou um maior tempo de suplementação poderiam acarretar tais efeitos. Não realizamos recordatório alimentar para avaliar a relação ômega 6:3 ingerida. Os pacientes do nosso estudo estavam em avaliação pré-operatória para cirurgia bariátrica, portando houve perda de peso nos dois grupos, apesar de não ter diferença estatística.

De um modo geral, nosso estudo mostrou que o ALA, EPA e DHA foram incorporados de forma significativa no tecido adiposo visceral após suplementação com

3g/dia de ALA, o que melhorou processo inflamatório, modulou vias moleculares envolvidas no desenvolvimento da resistência insulínica e inflamação. Realizamos uma intervenção de curto prazo, porém capaz de modificar a expressão de genes do estresse do retículo endoplasmático em um tecido metabolicamente muito importante como o tecido adiposo visceral.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

ABATE N. Insulin resistance and obesity. The role of fat distribution pattern. *Diabetes Care*, 1996 Mar;19(3): 292-4.

ABDALI, D. How Effective Are Antioxidant Supplements in Obesity and Diabetes? *Princ Pract*, 2015; 24: 201–215.

ABDELMAGID, AS; MACKINNON, JL; SARAH, M; JANSSEN, SM; MA, DWL. Role of n-3 polyunsaturated fatty acids and exercise in breast cancer prevention: identifying common targets. *Nutr. Metab. Insights*, 2016, 9: 71–84.

ABUBAKARI, AR; NADERALI, MM; NADERALI, EK. Omega-3 fatty acid supplementation and cognitive function: are smaller dosages more beneficial? *Inter J Gen Med*, 2014; 7: 463–473.

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

AGUILERA, AA et al. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor-alpha in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *J Nutr Biochem*, 2004, 15(6): 350-7.

AKTAS, H., HALPERIN, J. Translational Regulation of Gene Expression by ω -3 Fatty Acids. *J. Nutr*, 2004, 134 (9): 2487-2491.

ALAARG, A; JORDAN, NA; VERHOEF, JJF; METSELAAR, JM; STORM, G; KOK, RJ. Docosahexaenoic acid liposomes for targeting chronic inflammatory diseases and cancer: an in vitro assessment. *Int. J. Nanomed*, 2016, 11: 5027–5040.

ANDERSON, BM; MA, DW. Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal? *Lipids Health Dis*, 2009, 8: 33.

ANDREW, P; DEFILIPPIS, MD; LAURENCE, S; SPERLING, MD; ATLANTA, GA. Understanding omega-3's. *Am. Heart J*, 2006, 151: 564–570.

ARAGON, T; BARRINGTON, RA; JACKOWSKI, S; MORI, K; BREWER, JW. The specialized unfolded protein response of B lymphocytes: ATF6 α -independent development of antibody-secreting B cells. *Mol Immunol*, 2012 Jul; 51(3-4): 347-55.

ARSLAN, N; ERDUR, B; AYDIN, A. Hormones and cytokines in childhood obesity. *Indian Pediatr*, 2010 Oct; 47(10): 829-39.

BAGGA, D. et al. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(4): 1751-6.

BALK, EM et al. Effects of omega-3 fatty acids on coronary restenosis, intima-media thickness, and exercise tolerance: a systematic review. *Atherosclerosis*, 2006, 184(2): 237-46.

BARCELÒ-COBLIJIN, G; COLLISON, LW; JOLLY, CA; MURPHY, EJ. Dietary α -linolenic acid increases brain but not heart and liver docosahexaenoic acid levels. *Lipids*, 2005; 40(8): 787-98.

BAYLIN, A; KABAGAMBE, EK; SILES, X. et al. Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *Am J Clin Nutr*, 2002; 76: 750–757.

BELLUZZI, A. et al. Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med*, 1996, 334(24): 1557-60.

BENDER, N; PORTMANN, M; HEG, Z; HOFMANN, K; ZWAHLEN, M; EGGER, M. Fish or n3-PUFA intake and body composition: a systematic review and meta-analysis. *Obes. Ver.*, 2014; 15: 657–65.

BERG, AH; COMBS, TP; SCHERE, PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 2002; 13: 84-91.

BERRIDGE, MJ. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium*, 2002, 32(5-6): 235-49.

BJØRBAEK, C. Central leptin receptor action and resistance in obesity. *J Investig Med*, 2009, 57: 789–794.

BORGES, RL et al. Impact of weight loss on adipocytokines, C-reactive protein and insulin sensitivity in hypertensive women with central obesity. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 2007, 89(6): 409-14.

BRADLEY RL; JEON, JY; LIU, FF; MARATOS-FLIER, E. Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008 Sep; 295(3): E586-94.

BRAKENHIELM, E; VEITONMÄKI, N; CAO, R; KIHARA, S; MATSUZAWA, Y; ZHIVOTOVSKY, B. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101: 2476-81.

BRENNER, RR. Nutritional and hormonal factors influencing desaturation of essential fatty acids. *Prog Lipid Res*, 1981; 20(1): 41-7.

BRENNER, RR. Hormonal modulation of delta 6 and delta 5 desaturases: case of diabetes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2003; 68(2): 151-62.

BROUGHTON, KS et al. Reduced asthma symptoms with n-3 fatty acid ingestion are related to 5-series leukotriene production. *Am J Clin Nutr*, 1997, 65(4): 1011-7.

BROWNING, LM. N-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation and obesity-related disease. *Proc Nutr Soc*, 2003, 62(2): 447-53.

BROWNING, LM; KREBS, JD; MOORE, CS et al. The impact of long chain n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on inflammation, insulin sensitivity and CVD risk in a group of overweight women with an inflammatory phenotype. *Diabetes Obes Metab*, 2007, 9: 70–80.

BRUSH, MH; WEISER, DC; SHENOLIKAR, S. Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein GADD34 Targets Protein Phosphatase 1 α to the Endoplasmic Reticulum and Promotes Dephosphorylation of the α Subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2. *Molecular and Cellular Biology*, 2003; 23(4): 1292-1303.

BUCKLEY, MT; RACIMO, F; ALLENTOFT, ME; JENSEN, MK; JONSSON, A; HUANG, H; HORMOZDIARI, F; SIKORA, M; MARNETTO, D; ESKIN, E; JØRGENSEN, ME; GRARUP, N; PEDERSEN, O; HANSEN, T; KRAFT, P; WILLERSLEV, E; NIELSEN, R. Selection in Europeans on Fatty Acid Desaturases Associated with Dietary Changes. *Mol Biol Evol*, 2017, msx103.

BULLO, M; GARCIA-LORDA, P; MEGIAS, I; SALAS-SALVADO, J. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obesity Res*, 2003; 11: 525-31.

BURDGE, GC; CALDER, PC. Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev*, 2005: 581-597.

BUSSO, N; SO, A; CHOBAS-PECLAT, V; MORARD, C; MARTINEZ-SORIA, E; TALABOT-AYER, D. Leptin signaling deficiency impairs humoral and cellular immune responses and attenuates experimental arthritis. *J Immunol*, 2002, 168: 875–882.

CALDER, P.C. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*, 2006, 83(6 Suppl): 1505-1519.

CALFON, M; ZENG, H; URANO, F; TILL, JH; HUBBARD, SR et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 2002, 415: 92-96.

CALLE, EE; RODRIGUEZ, C; WALKER-THURMOND, K; THUN, MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults. *N Engl J Med*, 2003 Apr; 24; 348(17): 1625-38.

LUMENG, CN; SALTIEL, AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*, 2011; 121(6): 2111-2117.

CARRERO, JJ; MARTÍN-BAUTISTA, E; BARÓ, L; FONOLLÁ, L; JIMÉNEZ, J; BOZA, JJ; LÓPEZ-HUERTAS, E. Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. *Nutr. Hosp*, 2005, vol. 20, nº1.

CAUGHEY, GE; MANTZIORIS, E; GIBSON, RA; CLELAND, LG; JAMES, MJ. The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr*, 1996; 63: 116-22.

CAWTHORN, WP; SETHI, JK. TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett*, 2008 Jan; vol. 582, nº 1: 117-31.

CHAMBRIER, C et al. Specific changes in n -6 fatty acid metabolism in patients with chronic intestinal failure. *Clin Nutr*, 2002, 21(1): 67-72.

CHINETTI; FRUCHART; STAELS. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res*, 2000, 49(10): 497-505.

CHINETTI, G; ZAWADSKI, C; FRUCHART, JC; STAELS, B. Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma and LXR. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004; 314: 151-8.

COUET, C; DELARUE, J; RITZ, P; ANTOINE, JM; LAMISSE, F. Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*, 1997; 21: 637-643.

DACKS, PA; SHINEMAN, DW; FILLIT, HM. Current evidence for the clinical use of long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids to prevent age-related cognitive decline and Alzheimer's disease. *J Nutr Health Aging*, 2013; 17: 240-251.

DAS, UN. Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition*, 2001; 17: 953-66.

DAS, UN; MOHAN, IK; RAJU, TR. Effect of corticosteroids and eicopentaenoic acid/docosaheptaenoic acid on pro-oxidant and anti-oxidant status and metabolism of essential fatty acids in patients with glomerular disorders. *Prostaglandins Leukot Essen Fatty Acids*, 2001; 65: 197-203.

DAS, UN. Essential fatty acids: a review. *Curr Pharm Biotechnol*, 2006, (7): 467-482.

DAS, UN. Obesity: Genes, brain, gut and environment. *Nutricion*, 26 (2010): 459-473.

DESPRES, JP; LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, 2006 Dec; 444(7121): 881-7.

DOMENICHIELLO, AF; KITSON, AP; BAZINET, RP. Is docosaheptaenoic acid synthesis from α -linolenic acid sufficient to supply the adult brain? *Progress in Lipid Research*, 59, 2015: 54-66.

DUFFAUT, C. et al. Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009 Jul, vol. 384, n° 4: 482-5.

EATON, SB; KONEER, MJ; SHOSTAK, M. Evolutionary perspective enhances understanding of human nutritional requirements. *J Nutr*, 1996; 126(6): 1732-40.

EIZIRIK; CARDOZO; CNOP. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev*, 2008, 29(1): 42-61.

ELATTAR, S; SATYANARAYANA, A. Can brown fat win the battle against white fat? *J. Cell Physiol*, 2015, 230: 2311-2317.

ELSHAL, MF; MCCOY, JP. Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods*, 2006 Apr; vol. 38, n° 4: 317-23.

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.

ENOS, RT; VELÁZQUEZ, KT; MCCLELLAN, JL; CRANFORD, TL; WALLA, MD; MURPHY, A. Reducing the Dietary Omega-6: Omega-3 Utilizing α Linolenic Acid; Not a Sufficient Therapy for Attenuating High-Fat-Diet-Induced Obesity Development Nor Related Detrimental Metabolic and Adipose Tissue Inflammatory Outcomes. *PLOS ONE*, April 2014, Vol. 9, Issue 4: e94897.

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

FAGGIONI, R; FANTUZZI, G; FULLER, J; DINARELLO, CA; FEINGOLD, KR; GRUNFELD, C. Leptin deficiency enhances sensitivity to endotoxin-induced lethality. *Am J Physiol*, 1999, 276: R136–R142.

FAINTUCH, J; HORIE, LM; BARBEIRO, HV; BARBEIRO, DF; SORIANO, FG; ISHIDA, FK; CECCONELLO, I. Systemic Inflammation in Morbidly Obese Subjects: Response to Oral Supplementation with Alpha-Linolenic Acid. *Obesity Surgery*, 2007; 17: 341-347.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 2005; 115(5): 911-9; quiz 20.

FANTUZZI, G; MAZZONE, T. Adipose Tissue and Atherosclerosis: Exploring the Connection. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 2007; 27: 996-1003.

FAROOQI, IS; MATARESE, G; LORD, GM; KEOGH, JM; LAWRENCE, E; AGWU, C. et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest*, 2002; 110(8): 1093-103.

FLACHS, P; RUHL, R; HENSLER, M; JANOVSKA, P; ZOUHAR, P. et al. Synergistic induction of lipid catabolism and anti-inflammatory lipids in white fat of dietary obese mice in response to calorie restriction and n-3 fatty acids. *Diabetologia*, 2011, 54: 2626–2638.

FONTANI, G; CORRADESCI, F; FELICI, A; ALFATTI, F; BUGARINI, R; FIASCHI, AI; CERRETANI, D; MONTORFANO, G; RIZZO, AM; BERRA, B. Blood profiles, body fat and mood state in healthy subjects on different diets supplemented with omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Eur. J. Clin. Investig*, 2005; 35: 499–507.

FOX, CS; MASSARO, JM; HOFFMANN, U; POU, KM; MAUROVICH-HORVAT, P; LIU, CY. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation*, 2007; 116: 39–48.

FRIEDBERG, CE. et al. Fish oil and glycemic control in diabetes. A meta-analysis. *Diabetes Care*, 1998, 21(4): 494-500.

FRIEDMANN, JM; HALAAS, JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 1998; 395(22): 763-70.

FUMAGALLI, M; MOLTKE, I; GRARUP, N; RACIMO, F; BJERREGAARD, P; JØRGENSEN, ME; KORNELIUSSEN, TS; GERBAULT, P; SKOTTE, L; LINNEBERG, A. et al. 2015. Greenlandic Inuit show genetic signatures of diet and climate adaptation. *Science*, 49: 1343–1347.

GALIC, S; OAKHILL, JS; STEINBERG, GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*, 2010 Mar; 316(2): 129-39.

GARAULET, M; HERNANDEZ-MORANTE, JJ; LUJAN, J; TEBAR, FJ; ZAMORA, S. Relationship between fat cell size and number and fatty acid composition in adipose tissue from different fat depots in overweight/obese humans. *International Journal of Obesity (Lond)*, 2006 Jun; 30(6): 899-905.

GAUTRON, L; ELMQUIST, JK. Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance. *J Clin Invest*, 2011, 121: 2087–2093.

GEST, S; TSENG, YH; KAHN, CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*, 2007, 131: 242–256.

GEUSENS, P. et al. Long-term effect of omega-3 fatty acid supplementation in active rheumatoid arthritis. A 12-month, double-blind, controlled study. *Arthritis Rheum*, 1994, 37(6): 824-9.

GOKTAS, S; YILMAZ, MI; CAGLAR, K; SONMEZ, A; KILIC, S; BEDIR, S. Prostate cancer and adiponectin. *Urology*, 2005, 27; 65: 1168-72.

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; HOTAMISLIGIL. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *Journal of Lipid Research*, 2007, Vol. 48.

GREGOR; HOTAMISLIGIL. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res*, 2007, 48(9): 1905-14.

GREGOR; HOTAMISLIGIL. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu Rev Immunol*, 2011; 29: 415-45.

GRIFFIN, MD. et al. Effects of altering the ratio of dietary n-6 to n-3 fatty acids on insulin sensitivity, lipoprotein size, and postprandial lipemia in men and postmenopausal women aged 45-70 y: the OPTILIP Study. *Am J Clin Nutr*, 2006, 84(6): 1290-8.

HARDING, HP; ZHANG, Y; BERTOLOTTI, A; ZENG, H; RON, D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell*, 2002; 5: 897–904.

HARDING, HP; ZHANG, Y; ZENG, H; NOVOA, I; LU, PD. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*, 2003; 11: 619–633.

HARNACK, K; ANDERSEN, G; SOMOZA, V. Quantitation of alpha-linolenic acid elongation to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid as affected by the ratio of n6/n3 fatty acids. *Nutr. Metab*, 2009, 6: 8.

HARRIS, WS. N-3 fatty acids and serum lipoproteins: animal studies. *Am J Clin Nutr*, 1997, 65(5 Suppl): 1611S-1616S.

HARRIS; BULCHANDANI. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? *Curr Opin Lipidol*, 2006, 17(4): 387-93.

HASSAN, M; LATIF, N; YACOUN, M. Adipose tissue: friend of foe? *Nat. Rev. Cardiology* 2012, 9: 689–702.

HEBER, D. An integrative view of obesity. *Am J Clin Nutr*, 2010 Jan; 91(1): 280S-3S.

HERMSDORFF, HHM; MONTEIRO, JBR. Gordura Visceral, Subcutânea ou Intramuscular: Onde Está o Problema? *Arq Bras Endocrinol Metab*, 2004; 48(6): 803-811.

HERREMA, H; ZHOU, Y; ZHANG, D; LEE, J; SALAZAR HERNANDEZ, MA; SHULMAN, GI; OZCAN, U. XBP1s Is an Anti-lipogenic Protein. *J Biol Chem*, 2016 Aug, 291(33): 17394-404.

HETZ, C; GLIMCHER, LH. Fine tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1 α interactome. *Mol Cell*, 2009; 35(5): 551-561.

HODSON, L; SKEAFF, C; FIELDING, B. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Prog Lipid Res*, 2008, 47: 348–380.

HOSOI; OZAWA. Endoplasmic reticulum stress in disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Clin Sci (Lond)*, 2010, 118(1): 19-29.

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

HOTAMISLIGIL, GS. Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *Cell*, 2010 March, 19; 140(6): 900–917.

INNIS, SH. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Pediatr*, 2003; 143 (4 Suppl): S1-8.

ISHIKAWA, M; KITAYAMA, J; KAZAMA, S; HIRAMATSU, T; HATANO, K; NAGAWA, H. Plasma adiponectin and gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 2005; 11: 466-72.

JOFFRE, C; NADJAR, A; LEBBADI, M; CALON, F; LAYE, S. N-3 LCPUFA improves cognition: the young, the old and the sick. *Prost Leuko Essent Fatty Acid*. 2014; 91: 1–20.

JOHNSON, AR; MILNER, JJ; MAKOWSKI, L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunol Rev*, 2012, vol. 249, n° 1: 218-38.

KATSOULIERIS, E., MABLEY J., SAMAI, M., GREEN, IC., CHATTERIEE, PK. α -Linolenic acid protects renal cells against palmitic acid lipotoxicity via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *European Journal of Pharmacology*, 2009, vol 623, 107-112

KEW, S; BANERJEE, T; MINIHANE, AM; FINNERGAN, YE; MUGGLI, R; ALBER, R. et al. Lack of effect of foods enriched with plant or marine-derived n-3 fatty acids on human immune function. *Am J Clin Nutr*, 2003; 77: 1287-95.

KHARROUBI, I; RASSCHAERT, J; EIZIRIK, DL; CNOP, M. Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 312: 1118-22.

KINSELLA, JE; LOKESH, BR; STONE, RA. Dietary n-3 PUFA and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr*, 1990, 52: 1–28.

KITAHARA, CM. et al. Body Mass Index, Physical Activity, and Serum Markers of Inflammation, Immunity, and Insulin Resistance. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research*, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology 23, 2014 (12): 2840–2849.

KRAUSS, RM; ECKEL, RH; HOWARD, B. et al. AHA dietary guidelines: revision 2000: a statement for healthcare professionals from nutrition vommittee of the American Heart Association. *Circulation*, 2000; 102: 2284-2299.

KRIS-ETHERTON, PM; TAYLOR, DS; YU-POTH, S. et al. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71: 179S-188S.

KRIS-ETHERTON, PM; HARRIS, WS; APPEL, LJ; AHA NUTRITION COMMITTEE. American Heart Association: Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: new recommendations from the American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23: 151-2.

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

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

LEE, AH; SCAPA, EF; COHEN, DE; GLIMCHER, LH. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science*, 2008 Jun; 13; 320(5882): 1492-6.

LEE, J; OZCAN, U. Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. *J Biol Chem*, 2014 Jan; 17; 289(3): 1203-11.

LEE, MJ; STEPHENSON, DA; GROVES, MJ; SWEENE, MG; DAVIS, MB; NA, SF; HOULDEN, H; SALIH, MAM; TIMMERMAN, V; JONGHE, P; GRUMBACH, MA; MARIA, ED; SCARAVILLI, F; WOOD, NW; REILLY, MM. Hereditary sensory neuropathy is caused by a mutation in the delta subunit of the cytosolic chaperonin-containing t-complex peptide-1 (Cct4) gene. *Human Molecular Genetics*, 2003, 12 (15): 1917-1925.

LEHR, S; HARTWIG, S; SELL, H. Adipokines: a treasure trove for the Discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics. Clin*, 2012 April, 6: 91-101.

LI, J; WANG, JJ; ZHANG, SX. Preconditioning with Endoplasmic Reticulum Stress Mitigates Retinal Endothelial Inflammation via Activation of X-box Binding Protein 1. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, vol. 286, n° 6.

LIN, MT; HSU, CS; YEH, SL; YEH, CL; CHANG, KJ; LEE, PH; CHEN, WJ. Effects of omega-3 fatty acids on leukocyte Th1/Th2 cytokine and integrin expression in rats with gut-derived sepsis. *Nutrition*, 2007 Feb; 23(2): 179-86.

LIN, PY; CHIU, CC; HUANG, SY; SU, KP. A meta-analytic review of polyunsaturated fatty acid compositions in dementia. *J Clin Psych*, 2012; 73: 1245-54.

LIU, SY; KAUFMAN, RJ. The unfolded protein response. *Cel, Science*, 2003, 116: 1861-1862.

LUND, AS; HASSELBALCH, AL; GAMBORG, M; SKOGSTRAND, K; HOUGAARD, D; HEITMANN, BL; KYVIK, O; SØRENSEN, T; JESS, T. N-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Body Fat and Inflammation. *Obes Facts*, 2013; 6: 369-379.

LUNDIN, VF; LEROUX, MR; STIRLING, PC. Quality control of cytoskeletal proteins and human disease. *Trends Biochem. Sci*, 2010, 35: 288–297.

MA, Y; BREWER, JW; DIEHL, JÁ; HENDERSHOT, LM. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol*, 2002, 318: 1351–1365.

MADSEN, L; KRISTIANSEN, K. Of mice and men: factors abrogating the antiobesity effect of omega-3 fatty acids. *Adipocyte*, 2012; 1: 173–6.

MADSEN, L; PETERSEN, RK; KRISTIANSEN, K. Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, 2005; 1740: 266–86.

MAFFEI, M; FEI, H; LEE, GH; DANI, LP; ZHANG. Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 6957–6960.

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

MARQUARDT, A; STOHR, H; WHITE, K; WEBER, BH. cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. *Genomics*, 2000, 66: 175-183.

MARTINS, CA; ALMEIDA, VV; RUIZ, MR; VISENTAINER, JEL; MATSHUSHITA, M; SOUZA, NE. et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev Nutr*, 2006; 19(6): 761-70.

MASSON, S. et al. Incorporation and washout of n-3 polyunsaturated fatty acids after diet supplementation in clinical studies. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2007, 8, Suppl 1: S4-10.

MATHIAS, RA; SERGEANT, S; RUCZINSKI, I; TORGERSON, DG; HUGENSCHMIDT, CE; KUBALA, M; VAIDYA, D; SUKTITIPAT, B; ZIEGLER, JT; IVESTER, P. et al. The impact of FADS genetic variants on ω6 polyunsaturated fatty acid metabolism in African Americans. *BMC Genet*, 2011, 12: 50–50.

MACDONALD-WICKS, LK; GARG, ML. Incorporation of n-3 fatty acid into plasma and liver lipids of rats: Importance of background dietary fat. *Lipids*, 2004; 39(6): 545-51.

MEIER, CA; CHICHEPORTICHE, R; DREYER, M; DAYER, JM. IP-10, but not RANTES, is upregulated by leptin in monocytic cells. *Cytokine*, 2003 Jan, vol. 21, Issue 1: 43-47.

MILLS, DE; HUANG, YS; NARCE, M; POISSON, JP. Psychosocial stress catecholamines, and essential fatty acids metabolism in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1994; 205(1): 56-61.

MIRANDA, WRH. 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.

MONTEIRO; CONDE; POPKIN. The burden of disease from undernutrition and overnutrition in countries undergoing rapid nutrition transition: a view from Brazil. *Am J Public Health*, 2004, 94(3): 433-4.

MUELLER, E. Browning and Graying: Novel Transcriptional Regulators of Brown and Beige Fat Tissues and Aging. *Frontiers in Endocrinology*, 2016; 7:19.

MUNRO, IA; GARG, ML. Dietary supplementation with long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and weight loss in obese adults. *Obes Res Clin Pract*, 2013; 7: e173–e181.

NARVERUD, I; MYHRSTAD, MCW; HERZIG, KH. et al. Lack of Effects of a Single High-Fat Meal Enriched with Vegetable n-3 or a Combination of Vegetable and Marine n-3 Fatty Acids on Intestinal Peptide Release and Adipokines in Healthy Female Subjects. *Frontiers in Nutrition*, 2016; 3: 38.

NELSON, TL; STEVENS, JR; HICKEY, MS. Inflammatory markers are not altered by an eight week dietary α -linolenic acid intervention in healthy abdominally obese adult males and females. *Cytokine*, 2007, 38: 101–106.

NEUMEIER, M; WEIGERT, J; SCHÄFFLER, A; WEHRWEIN, G; MÜLLER-LADNER, U; SCHÖLMERICH, J. et al. Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells. *J Leukoc Biol*, 2006; 79: 803-8.

NG, M; FLEMING, T; ROBINSON, M. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, 2014; 384 (9945): 766-781.

NISHIO, N; ISOBEL, KI. GADD34-deficient mice develop obesity, nonalcoholic fatty liver disease, hepatic carcinoma and insulin resistance. *Scientific RepoRts*, 2015; 5:13519

NOVAK, TE. et al. NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 284(1): L84-9.

NOVOA, I; ZENG, H; HARDING, HP; RON, D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α . *J Cell Biol*, 2001 May, 28; 153(5): 1011-22.

OH, TH; BYEON, JS; MYUNG, SJ; YANG, SK; CHOI, KS; CHUNG, JW. et al. Visceral obesity as a risk factor for colorectal neoplasm. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008; 23: 411-17.

OIKAWA, D; KIMATA, Y; KOHNO, K; IWAWAKI, T. Activation of mammalian IRE1 α upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins. *Exp. Cell Res*, 2009, 315: 2496-2504.

OKADA, T; YOSHIDA, H; AKAZAWA, R; NEGISHI, M; MORI, K. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem. J*, 2002, 366: 585-594.

OLIVER, E. 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. *Proc Nutr Soc*, 2010, 69(2): 232-43.

OUCHI, N; KIHARA, S; FUNAHASHI, T; MATSUZAWA, Y; WALSH, K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol*, 2003; 14: 561-6.

OZCAN, U. et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*, Oct 2004, vol. 306, n° 5695: 457-61.

OYADOMARI, S; MORI, M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death and Differentiation*, 2004, 11: 381-389.

PAJVANI, UB; DU, X; COMBS, TP; BERG, AH; RAJALA, MW; SCHULTHESS, T. et al. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem*, 2003; 278: 9073-85.

PALAKURTHI, S. S., FLUCKIGER, R., AKTAS, H., CHANGOLKAR, A. K., SHAHSAFAEI, A., HARNEIT, S., KILIC, E., HALPERIN, J. A. Inhibition of translation initiation mediates the anti-cancer effect of the n-3 polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic acid. *Cancer Res.*, 2000, 60:2919-2925

PARK, SW; OZCAN, U. Potential for therapeutic manipulation of the UPR in disease. *Semin Immunopathol*, 2013 May; 35(3): 351-73.

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

PERINI, JAL. et al. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. *Rev. Nutr, Campinas*, 2010, vol. 23, nº 6: 1075-1086.

PILON, M. et al. Sec61p serves multiple roles in secretory precursor binding and translocation into the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell*, 1998, 9(12): 3455-73.

PINTHUS, JH; KLEINMANN, N; TISDALE, B; CHATTERJEE, S; LU, JP; GILLIS, A. et al. Lower plasma adiponectin levels are associated with larger tumor size and metastasis in clear-cell carcinoma of the kidney. *Eur Urol*, 2008; 54: 866–73.

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; GIL, A. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids supplementation on inflammatory biomarkers: a systematic review of randomised clinical trials. *British Journal of Nutrition*, 2012, 107: S159–S170.

REIMOLD, AM; IWAKOSHI, NN; MANIS, J; VALLABHAJOSYULA, P; SZOMOLANYI-TSUDA, E; GRAVALLESE, EM; FRIEND, D; GRUSBY, MJ; ALT, F; GLIMCHER, LH. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature*, 2001 Jul, 19; 412(6844): 300-7.

RIDER, P. et al. IL-1 α and IL-1 β recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *J Immunol*, 2011, vol. 187, nº 9: 4835-43.

RITCHIE, AS; CONNELL, JM. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2007; 17: 319–26.

ROMERO-RAMIREZ, L; CAO, H; NELSON, D; HAMMOND, E; LEE, AH; YOSHIDA, H; MORI, K; GLIMCHER, LH; DENKO, NC; GIACCIA, AJ; LE, QT; KOONG, AC. XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer Res*, 2004 Sep, 64(17): 5943-7.

RON, D; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, Jul 2007, vol. 8, nº 7: 519-29.

SANDERS, TA. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe. *Am J Clin Nutr*, 2000; 71: 176S-180S.

SANGIOVANNI, JP; CHEW, EY. The role of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Progr Retin Eye Res*, 2005; 24(1): 87-138.

SARTIPY; LOSKUTOFF. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100(12): 7265-70.

SCHAPIRA, DV; CLARK, RA; WOLFF, PA; JARRETT, AR; KUMAR, NB; AZIZ, NM. Visceral obesity and breast cancer risk. *Cancer*, 1994; 74: 632-9.

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

SCHWAB, JM; SERHAN, CN. Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of inflammation. *Curr Opin Pharmacol*, 2006, 6: 414-420.

SEKIKAWA, A. et al. Circulating Levels of 8 Cytokines and Marine N-3 Fatty Acids and Indices of Obesity in Japanese, White, and Japanese American Middle-Aged Men. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2010; 30: 541-548.

SELL, H; HABICH, C; ECKEL, J. Adaptative immunity in obesity and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol*, Dec 2012, vol. 8, n° 12: 709-16. ISSN 1759-5037.

SHEN, J; CHEN, X; HENDERSHOT, L; PRYWES, R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Developmental Cell*, 2002, vol. 3, n° 1: 99-111.

SHEN, W; WANG, C; XIA, L; FAN, C; DONG, H; DECKELBAUM, RJ; QI, K. Epigenetic modification of the leptin promoter in diet-induced obese mice and the effects of N-3 polyunsaturated fatty acids. *Sci Rep*, 2014 Jun, 13; 4: 5282.

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

SHOELSON; LEE; GOLDFINE. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*, 2006 116 (7): 1793-801.

SIMOPOULOS, AP. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*, 2016 Mar, 2; 8(3): 128.

SIMOPOULOS, AP; LEAF, A; SALEM, NJr. Essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Am Nutr Metab*, 1999, 43: 127-130.

SINHA, S. et al. Fatty acid-induced insulin resistance in L6 myotubes is prevented by inhibition of activation and nuclear localization of nuclear factor kappa B. *J Biol Chem*, 2004, 279(40): 41294-301.

SISCOVICK et al. N-3 Polyunsaturated Fatty Acid (“Fish Oil”) Supplementation and the Prevention of Clinical Cardiovascular Disease: A Science Advisory From the American Heart Association. *Circulation*, 2017; 135: e867–e884.

SMIT, LA; MOZAFFARIAN, D; WILLETT, W. Review of fat and fatty acid requirements and criteria for developing dietary guidelines. *Ann. Nutr. Metab*, 2009, 55: 44–55.

SPIEGELMAN; FLIER. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*, 2001, 104(4): 531–43.

STIRBAN, A; NANDREAN, S; GÖTTING, C; STRATMANN, B; TSCHOEPE, D. Effects of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs) on Circulating Adiponectin and Leptin in Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus. *Horm Metab Res*, 2014; 46: 490–492.

STORLIEN, LH. et al. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes*, 1991, 40(2): 280–9.

STRAWFORD, A; ANTELO, F; CHRISTIANSEN, M; HELLERSTEIN, MK. Adipose tissue triglyceride turnover, *de novo* lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with $2H_2O$. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 286: E577–E588.

SUN, J. et al. Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines. *Nat Med*, Jun 2007, vol. 13, n° 6: 719–24.

SURETTE, ME. The science behind dietary omega-3 fatty acids. *Can Med Assoc J*, 2008; 178: 177–80.

SWANSON, D; BLOCK, R; MOUSA, SA. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. *Adv. Nutr*, 2012, 3: 1–7.

SWINBURN, BA; SACKS, G; HALL, KD. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet*, 2011, 378: 804–814.

SYDENHAM, E; DANGOUR, AD; LIM, WS. Omega 3 fatty acid for the prevention of cognitive decline and dementia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2012; 6: CD005379.

TAKAHASHI, N; WAELPUT, W; GUISEZ, Y. Leptin is an endogenous protective factor against the toxicity exerted by tumor necrosis factor. *J Exp Med*, 1999, 189: 207–212.

TALUKDAR, S. et al. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med*, Sep 2012, vol. 18, n° 9: 1407-12.

TANAKA, T; KISHIMOTO, T. The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunol Res*, Apr 2014, vol. 2, n° 4: 288-94.

TE VELDE, AA; HUIJBENS, RJ; HEIJE, K; DE VRIES, JE; FIGDOR, CG. Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes. *Blood*, 1990; 76: 1392-7.

TILLEY; COFFMAN; KOLLER. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest*, 2001, 108(1): 15-23.

TIROSH, B; IWAKOSHI, NN; GLIMCHER, LH; PLOEGH, HL. -1 specifically promotes IgM synthesis and secretion, but is dispensable for degradation of glycoproteins in primary B cells. *J Exp Med*, 2005 Aug, 15; 202(4): 505-16.

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

TRAYHURN, P. Adipocyte biology. *Obes. Rev*, 2007; 8(S1): 41-4.

TRAYHURN, P; WOOD, IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of White adipose tissue. *Br J Nutr*, 2004; 92: 347-55.

TSUJINAKA, S; KONISHI, F; KAWAMURA, YJ; SAITO, M; TAJIMA, N; TANAKA, O. et al. Visceral obesity predicts surgical outcomes after laparoscopic colectomy for sigmoid colon cancer. *Dis Colon Rectum*, 2008; 51: 1757-67.

UKROPEC, J; RESELAND, JE; GASPERIKOVA, D; DEMCAKOVA, E; MADSEN, L; BERGE, RK; RUSTAN, AC; KLIMES, I; DREVON, CA; SEBÖKOVA, E. The hypotriglyceridemic effect of dietary n-3 FA is associated with increased beta-oxidation and reduced leptin expression. *Lipids*, 2003, 38: 1023-1029.

VANDERWYNCKEL, YP., LAUKENS, D., GEERTS, A., BOGAERTS E., PARIDAENS, A., VERHELST, X., JANSSENS, S., HEINDRYCKX, F., VAN VLIERBERGHE, H. The paradox of the unfolded protein response in cancer. *Anticancer Res*. 2013, Nov; 33(11):4683-94.

VON HAFE, P; PINA, F; PÉREZ, A; TAVARES, M; BARROS, H. Visceral fat accumulation as a risk factor for prostate cancer. *Obes Res*, 2004; 12: 1930-5.

WANG, C. et al. Effects of omega-3 fatty acids on cardiovascular disease. *Evid Rep Technol Assess (Summ)*, 2004(94): 1-8.

WANG, H; STORLIEN, LH; HUANG, XF. Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and ARC leptin receptor, NPY, and AgRP mRNA expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 282: E1352-1359.

WEISBERG, SP; MCCANN, D; DESAI, M; ROSENBAUM, M; LEIBEL, RL; FERRANTE, AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 2003; 112: 1785-8.

WILLIAMS, CM; BURDGE, G. Long-chain n-3 PUFA: plant v. marine sources. *Proc Nutr Soc*, 2006 Feb; 65(1): 42-50.

WIJENDRAN; HAYES. Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Annu Rev Nutr*, 2004, 24: 597-615.

WILLIAMS, CM; BURDGE, G. Long-chain n-3 PUFA: plant versus marine sources. *Proc. Nutr. Soc*, 2006; 65: 42–50.

WU, D. et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science*, Apr 2011, vol. 332, n° 6026: 243-7.

WU; CAHILL; MOZAFFARIAN. Effect of Fish Oil on Circulating Adiponectin: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013; 98: 2451-2459.

WU, R; ZHANG, QH; LU, YJ; REN, K; YI, GH. Involvement of the IRE1 α -XBP1 Pathway and XBP1s-Dependent Transcriptional Reprogramming in Metabolic Diseases. *DNA Cell Biol*, 2015 Jan, 1; 34(1): 6–18.

YANG, J; WU, X; WU, X; ZHOU, D; LIN, T; DING, S; ZHANG, Y; XUE, J; ZHUGE, Q. The Multiple Roles of XBP1 in Regulation of Glucose and Lipid Metabolism. *Curr Protein Pept Sci*, 2016. 181(6): 630-635

YAMAUCHI, T; KAMON, J; WAKI, H; IMAI, Y; SHIMOZAWA, N; HIOKI, K. et al. Globular adiponectin protect ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem*, 2003; 278: 2461-8.

YEHUDA, S; RABINOVITZ, S; CARASSO, RL; MOSTOFISKY, DI. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiol Aging*, 2002; 23(5): 843-53.

YIECHAN, J; LUZURIAGA, J; MAXWELL, EL; WETS, PK; BENSELLAM, M; LAYBUTT, R. The balance between adaptive and apoptotic unfolded protein responses regulates β -cell death under ER stress conditions through XBP1, CHOP and JNK. *Molecular and Cellular Endocrinology*, September 2015, vol. 413, 15: 189-201.

YOSHIDA, H; MATSUI, T; HOSOKAWA, N; KAUFMAN, RJ; NAGATA, K.; MORI, K. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev. Cell*, 2003, 4: 265–271. doi:10.1016/S1534-5807(03)00022-4.

YOSHIDA, H; MATSUI, T; YAMAMOTO, A; OKADA, T; MORI, K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 2001 Dec, 28; 107(7): 881-91.

YOSHIDA, H; OKADA, T. et al. Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 1239–1248.

YOUDIM, KA; MARTIN, A; JOSEPH, JA. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int J Dev Neurosci*, 2000; 18(4/5): 383-99.

YUDKIN, JS; STEHOUWER, CD; EMEIS, JJ; COPPACK, SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999; 19: 972-8.

YURKO-MAURO, K; ALEXANDER, DD; ELSWYK, MEV. Docosahexaenoic Acid and Adult Memory: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Plos One*, 2015; 10(3): e0120391.

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

ZHANG, X. et al. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*, Oct 2008, vol. 135, n° 1: 61-73.

ZHANG, Y; PROENCA, R; MAFFIE, M; BARONE, M; LEOPOLD, L; FRIEDMAN, JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 1994; 372: 425-32.

ZHAO, YT; SHAO, L; TENG, LL. et al. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid therapy on plasma inflammatory markers and N-terminal pro-brain natriuretic peptide in elderly patients with chronic heart failure. *J Int Med Res*, 2009, 37: 1831.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA
Título da Pesquisa: EFEITOS METABÓLICOS DO ÁCIDO GRAXO ÔMEGA 3 EM TECIDO ADIPOSO DE OBESOS GRAU II

Pesquisador: Mariana Pinto Chaves
Área Temática: Área 3 Fatores, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (Área I, II e III) ou não registrados no país (área IV) ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 2
CAMÉ: 12702413.0.000.5440
Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 288.254
Data do Parecer: 12/04/2013

Apresentação do Projeto:
 Trata-se de um ensaio clínico controlado por placebo, randomizado e duplo-cego que pretende investigar o efeito do n-3 PUFA na resistência insulínica e inflamação em sujeitos portadores de obesidade.

Objetivo da Pesquisa:
 Avaliar os efeitos da suplementação de n-3 PUFA/ALA em indivíduos obesos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
 De acordo com os pesquisadores, não existem evidências de que o uso de 3 gramas de Ômega 3/ALA ao dia acarreta qualquer risco à vida dos pacientes. Foram descritos poucos relatos de efeitos colaterais leves, como diarreia e náuseas, que não levaram à descontinuação da suplementação. Os pacientes serão orientados a tomar a medicação em uma, duas ou três tomadas ao dia, conforme tolerância, durante ou após as refeições.

* Esclarecer as razões de se elegir um tamanho amostral de 40 sujeitos. Descrever os critérios utilizados para a determinação deste número.
 Será realizado um estudo placebo controlado, duplo-cego, para prova de conceito, com 20 pacientes em cada grupo, totalizando 40 pacientes. Como será um estudo de prova de conceito, o número de 40 indivíduos foi estabelecido arbitrariamente, podendo, a partir dos resultados obtidos, ser expandido em novo projeto.

* Esclarecer quais são os "parâmetros de eficácia primária" descritos na "análise dos dados", para que seja possível avaliar se os métodos propostos são adequados (conforme Resolução CNS 196/96-III.3.a e e). É estanho propor uma ANCOVA quando apenas dois grupos são comparados. As medidas usuais de tamanho de efeito de tratamento podem ser úteis no presente estudo (redução absoluta de risco, razão de riscos, etc).

Análise dos dados: Os parâmetros de eficácia primária (resistência insulínica, níveis de citocinas e ativação do estresse de retículo endoplasmático em tecido adiposo) serão avaliados por métodos estatísticos paramétricos e não paramétricos, de acordo com a distribuição dos dados. O nível de significância adotado será de 0,05.

* O TCLE precisa ser reescrito com linguagem mais acessível aos sujeitos. Há muitas palavras e expressões que podem ser de difícil compreensão aos voluntários do estudo. São exemplos, "doença crônica multifatorial e epidêmica" e "inflamação crônica no tecido adiposo e hepático". De forma geral, o TCLE deve ser elaborado de acordo com Resolução CNS 196/96, Item IV, que inclui necessariamente os seguintes aspectos: - Título do projeto, identificação dos pesquisadores envolvidos e meios de contato (telefone e e-mail); - Deve ser elaborado em forma de convite à participação ao sujeito de pesquisa empregando-se uma linguagem acessível; Deve conter justificativa, objetivos e procedimentos que serão utilizados na pesquisa, assim como os desconfortos e riscos possíveis; Benefícios esperados; Forma de acompanhamento e assistência, assim como seus responsáveis; Garantia de esclarecimentos, antes e durante a pesquisa; Garantia de sigilo que assegure a privacidade dos sujeitos quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa; Liberdade do sujeito ao recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cidadão; Formas de ressarcimento das despesas decorrentes da participação na pesquisa (exemplo: transporte e

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
 Foram atendidos os itens solicitados no campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações" do parecer anterior.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALZOR
UF, SP: Município: RIBEIRÃO PRETO CEP: 14.040-900
Telefone: (16)302-2228 Fax: (16)302-1144 E-mail: cep@frcp.usp.br

Página 12 de 12

Continuação do Parecer 288.254

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
 os Termos de apresentação obrigatória foram apresentados adequadamente.

Recomendações:
 Foram apresentadas as seguintes respostas de acordo com os itens regulamentados no parecer anterior (no projeto de pesquisa anexado as modificações também encontram-se em vermelho)
 * Incluir no Projeto de Pesquisa uma análise crítica dos riscos e benefícios (conforme Resolução CNS 196/96-V). Identificar os riscos associados à pesquisa e diferenciá-los dos que os sujeitos estariam expostos pelos procedimentos assistenciais. Descrever todas as medidas necessárias para minimizar os riscos previstos, nas dimensões física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual (ver Resolução CNS 196/96, Item II.8).
 Não existem evidências de que o uso de 3 gramas de Ômega 3/ALA ao dia acarreta qualquer risco de vida ao paciente. Foram descritos poucos relatos de efeitos colaterais leves, como diarreia e náuseas, que não afetaram a alimentação). Formas de identificação diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa. Caso o estudo seja interrompido por motivos de segurança, anexar cópia de todos os dados, caso não se dispuser de todos, no livro do TCLE deve estar claro que o sujeito da pesquisa tem direito a identificação conforme as leis vigentes no país, caso ocorra dano decorrente da participação na pesquisa; Identificação do pesquisador, bem como campos para a data e assinatura; Campos para o nome, data e assinatura do sujeito da pesquisa no responsável legal; Configurar o TCLE de forma que os locais destinados as assinaturas do sujeito e do pesquisador fiquem parte do corpo do livro lembrando que a cada modificação no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em novo documento deve ser encaminhado para análise do CEP, contendo nova versão / data. Não deixar de incluir uma descrição do processo de obtenção do consentimento. Sendo o estudo duplo-cego, deixar claro no TCLE que o voluntário será submetido a um sorteio e poderá receber um tratamento com ácidos graxos poli-insaturados ou um tratamento com placebo, mas, para os propósitos da pesquisa, não saberá em que grupo está. Esclarecer o que representa ser tratado um placebo em termos de assistência de um tratamento, e se isto representa algum potencial prejuízo em seu acompanhamento no serviço de saúde.
 TCLE encontra-se em anexo.

TODAS ESSAS MODIFICAÇÕES FORAM REALIZADAS DIAS 10 DE ABRIL DE 2013, INCLUSIVE O TCLE 2ª versão, modificada em 10/04/2013.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
 O CEP analisou e aprovou o projeto de pesquisa versão modificada em 10/04/2013, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 2ª versão datada de 10/04/2013.

Sinopse do Parecer:
 Aprovado
Necessita Apreciação do CONEP:
 Não.
Considerações Finais e critério do CEP:
 Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

levaram à descontinuação da suplementação. Os pacientes serão orientados a tomar a medicação em uma, duas ou três tomadas ao dia, conforme tolerância, durante ou após as refeições.

* Descrever as estratégias de randomização, indicando como serão compostos dois grupos de igual tamanho, indicar como serão gerados os números aleatórios, se serão utilizados serviços on-line (do exemplo, <http://www.randomize.net/>, <http://www.sealedenvelope.com/>), se será escrito um código específico ou mesmo um software para isso. * Esclarecer o que será feito para que o estudo seja de fato duplo-cego (ou melhor, obscurecer as estratégias para garantir este fato, incluindo, quando possível, o uso de placebo, sendo dois desses contendo ácidos graxos poli-insaturados e dois contendo placebo. A randomização será feita antes de iniciar o tratamento randomizado. No momento em que se finalizar a coleta de dados, os pesquisadores terão conhecimento do conteúdo de cada amostra.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALZOR
UF, SP: Município: RIBEIRÃO PRETO CEP: 14.040-900
Telefone: (16)302-2228 Fax: (16)302-1144 E-mail: cep@frcp.usp.br

Página 12 de 12

RIBEIRÃO PRETO, 29 de Maio de 2013

Assinatura por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
 (Coordenadora)

Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA
DIVISÃO DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Dra Mariana Pinto Chaves; Dra Vivian Suen; Profª Dra Maria Cristina Foss-Freitas

TELEFONES DE CONTATO (Dra Mariana): (16) 81903333 /3602-2326/
E-mail: marianachaves80@yahoo.com.br

CONVITE PARA PARTICIPAR DA PESQUISA

Título da pesquisa: Efeitos da suplementação do ácido graxo alfa-linolênico (ALA) no estresse do retículo endoplasmático em tecido adiposo visceral de obeso grau III

A obesidade é uma doença que atinge atualmente cerca de 1,7 bilhões de pessoas ao redor do mundo. Atualmente a obesidade é o maior problema alimentar da população brasileira. Diversas correlações são encontradas quanto à obesidade e doenças crônicas como diabetes, doenças cardiovasculares e hipertensão arterial e, mais recentemente, doenças ósseas. A obesidade é acompanhada de uma inflamação crônica na gordura e no fígado.

Nosso trabalho tem por objetivo avaliar a medicação chamada “Ômega 3”. Essa substância é encontrada em certos alimentos como os peixes e grãos. É sabido que o “Ômega 3” tem capacidade de reduzir a inflamação presente em várias doenças. Nosso objetivo é saber se pessoas com obesidade apresentam melhora da inflamação presente na gordura e no sangue tomando essa medicação. Aparentemente não foi relatado até agora efeitos indesejados com o uso dessa medicação, mas pode ocorrer enjôo e diarreia.

Não existe risco de vida ao se tomar ômega 3.

Para nosso estudo, inicialmente será feita uma revisão de prontuários médicos para seleção dos participantes obesos, pré cirurgia bariátrica, que se enquadram na nossa pesquisa.

O(a) Senhor(a) é portador de obesidade e é seguido no ambulatório deste hospital, por isso está convidado a participar da pesquisa. Leia atentamente as explicações e, caso concorde participar, após discutir as dúvidas, os procedimentos relatados a seguir serão realizados. Se o(a) Senhor(a) concordar em participar do estudo, será realizada uma entrevista de 15 minutos para sabermos suas condições de vida e trabalho, bem como será feito um exame físico, com medidas de peso, altura, cintura e pressão do sangue. Depois, serão colhidas amostras de sangue (em torno de 20ml) para exames que avaliarão diabetes,

colesterol, função do fígado, função renal e inflamação no sangue. A partir de então, você começará a tomar, por boca e com água, 3 gramas de “Ômega 3”, divididos em uma, duas ou três vezes no dia (a combinar em consulta), durante os dois meses que antecederem a cirurgia bariátrica. Essas cápsulas serão fornecidas gratuitamente. Após os 2 meses, durante o procedimento cirúrgico, será colhido a mesma quantidade de sangue para avaliarmos os mesmos exames descrito acima e colhido uma pequena amostra de gordura visceral e subcutânea, para avaliarmos a inflamação.

Haverá um sorteio e o senhor(a) poderá receber um tratamento com Ômega 3 ou um tratamento com placebo, mas, nós médicos pesquisadores, não saberemos em que grupo o senhor(a) está. O tratamento com um placebo não mudará em nada o curso de seu tratamento e não oferece risco à saúde.

Garantimos que resultados dessas avaliações são confidenciais; cada pessoa será comunicada individualmente sobre os testes realizados.

As avaliações serão agendadas previamente. A participação é voluntária e o(a) Senhor(a) poderá desistir da sua participação em qualquer momento do estudo sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

Em caso de necessidade de vir ao hospital exclusivamente para participação da pesquisa, o paciente será ressarcido em dinheiro de qualquer despesa.

O paciente tem direito a indenização conforme as leis vigentes no país, caso ocorra dano decorrente de participação na pesquisa.

Por fim, a equipe responsável pelo trabalho estará à disposição dos participantes para esclarecer qualquer dúvida relacionada ao trabalho, antes ou após a assinatura do termo de consentimento.

Todos os participantes receberão um número de telefone para contato, principalmente quando estiver recebendo a medicação para atendimento de possíveis efeitos colaterais e de esclarecimento de dúvidas.

NOME DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL–

ASSINATURA DO PACIENTE: _____

Data: _____

TESTEMUNHA IMPARCIAL: _____

GRAU DE RELAÇÃO COM O PACIENTE: _____

Data: _____

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: MARIANA PINTO CHAVES

ASSINATURA: _____

Data: _____

TELEFONES DE CONTATO: (16) 8190-3333/3602-2326

Anexo 3: PCR array dos genes relacionados ao ERE

Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	AMFR	ATF4	ATF6	ATF6B	ATXN3	BAX	CALR	CANX	CCT4	CEBPD	CREB3	CREB3L3
	-4.79	-4.84	-1.90	-3.21	1.12	-1.80	1.12	1.31	55.86	1.16	1.12	1.12
B	DERL1	DNAJC10	DNAJC3	EDEM1	EIF2A	EIF2AK3	ERN1	ERN2	ERO1A	ERO1B	ERP44	FBXO6
	-2.12	-1.39	1.07	1.40	4.42	1.36	1.12	1.12	3.36	1.94	1.27	1.12
C	GANAB	GANC	HSPA1B	HSPA2	HSPA4	HSPA4L	HSPA5	HSPH1	HTRA2	HTRA4	INSIG2	MANF
	-1.46	1.04	-1.40	1.36	2.98	1.12	-1.07	1.67	1.11	1.12	-1.98	1.07
D	MAPK8	MAPK9	MBTPS1	MBTPS2	NPLOC4	NUCB1	OS9	PDIA3	PFDN5	PPIA	PPP1R15A	PRKCSH
	1.26	-1.09	-1.65	1.12	2.26	-1.41	-1.48	1.41	1.76	2.06	-3.12	-1.09
E	RNF5	RPN1	SCAP	SEC62	SEC63	SEL1L	VIMP	SERP1	SIL1	SREBF1	SYVN1	TCP1
	-1.18	1.06	-1.41	2.07	2.84	1.79	-1.19	1.83	1.04	1.12	-2.19	-1.60
F	TOR1A	UBE2G2	UBXN4	UFD1L	UGGT1	USP14	VCP	XBP1	ADM2	ASNS	BEX2	DDIT3
	1.17	1.08	1.16	1.66	2.85	2.15	-1.01	1.32	1.12	1.05	1.07	1.40
G	DNAJB9	GINS2	HERPUD1	INHBE	KCNMB3	MCM4	PCNA	RRM2	SLC17A2	TRIB3	TYMS	UHRF1
	1.48	1.25	2.51	1.12	3.52	1.12	-1.16	1.12	1.65	1.12	-1.11	1.12

Anexo 4: Sequência de *primers* (qPCR)

Gene	Senso/ Anti-senso	Sequência	Gene	Sequencia
18S	Senso	GTAACCCGTTGAACCCCAT	CANX	CCAAGGTTACTTACAAAGCTCCA
	Anti-senso	CCATCCAATCGGTAGTAGCG		GGCCCGAGACATCAACACA
GAPDH	Senso	AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT	CARL	CCTGCCGTCTACTTCAAGGAG
	Anti-senso	CCCCACTTGATTTTGGAGGGA;		GAACTTGCCGGAAGTGAAGAC
ADIPOQ	Senso	ATGCCCAAAGAGGAGAGAGGAA	CCT4	GTTCTGCTGAGTTAGCTGAGG
	Anti-senso	TGGTCAGAAACAGGCACACAAC		TTCAGTTAATCGTAGGGCCAAC
Grp78	Senso	CATCACGCCGTCCTATGTCG	LEPTINA	TGCCTTCCAGAAACGTGATCC
	Anti-senso	CGTCAAAGACCGTGTCTCG		CTCTGTGGAGTAGCCTGAAGC
sXBP1	Senso	GGTCTGCTGAGTCCGCAGCAGG	PERK	TGTCGCCAATGGGATAGTGACGAA
	Anti-senso	GGGCTTCCTATATATGTGG		AATCCGGCTCTCGTTTCCATGTCT
XBP1	Senso	TGGCCGGGTCTGCTGAGTCCG	CHOP	GGAGAACCAGGAAACGGAAC
	Anti-senso	ATCCATGGGAAGATGTTCTGG		TCTCCTTCATGCGCTGCTTT
EIF2AK3	Senso	TGTCGCCAATGGGATAGTGACGAA	EDEM-1	GCAATGAAGGAGAAGGAGAC
	Anti-senso	AATCCGGCTCTCGTTTCCATGTCT		CCATATGGCATAGTAGAAGGC
ATF 6	Senso	ATGTCTCCCCTTTCCTTATATGGT	ATF4	GGGTTCTCCAGCGACAAGGCTAAG
	Anti-senso	AAGGCTTGGGCTGAATTGAA		AACAGGGCATCCAAGTCGAAGTC
GADD34	Senso	CTAGGCTGCCCCCTCCGAC		
	Anti-senso	CTCGGAGAAGCGCACCTTTCTG		

Anexo 5: Lista de genes submetidos ao PCR Array

AMFR	Autocrine motility factor receptor
ATF4	Activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)
ATF6	Activating transcription factor 6
ATF6B	Activating transcription factor 6 beta
ATXN3	Ataxin 3
BAX	BCL2-associated X protein
CALR	Calreticulin
CANX	Calnexin
CCT4	Chaperonin containing TCP1, subunit 4 (delta)
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
CREB3	CAMP responsive element binding protein 3
CREB3L3	CAMP responsive element binding protein 3-like 3
DERL1	Der1-like domain family, member 1
DNAJC10	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 10
DNAJC3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3
EDEM1	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1
EIF2A	Eukaryotic translation initiation factor 2A, 65kDa
EIF2AK3	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3
ERN1	Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1
ERN2	Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 2
ERO1A	ERO1-like (S. cerevisiae)
ERO1B	ERO1-like beta (S. cerevisiae)
ERP44	Endoplasmic reticulum protein 44
FBXO6	F-box protein 6
GANAB	Glucosidase, alpha; neutral AB
GANC	Glucosidase, alpha; neutral C
HSPA1B	Heat shock 70kDa protein 1B
HSPA2	Heat shock 70kDa protein 2
HSPA4	Heat shock 70kDa protein 4
HSPA4L	Heat shock 70kDa protein 4-like
HSPA5	Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)
HSPH1	Heat shock 105kDa/110kDa protein 1
HTRA2	HtrA serine peptidase 2
HTRA4	HtrA serine peptidase 4
INSIG2	Insulin induced gene 2
MANF	Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor
MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8
MAPK9	Mitogen-activated protein kinase 9
MBTPS1	Membrane-bound transcription factor peptidase, site 1
MBTPS2	Membrane-bound transcription factor peptidase, site 2
NPLOC4	Nuclear protein localization 4 homolog (S. cerevisiae)
NUCB1	Nucleobindin 1
OS9	Osteosarcoma amplified 9, endoplasmic reticulum lectin
PDIA3	Protein disulfide isomerase family A, member 3
PFDN5	Prefoldin subunit 5
PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
PPP1R15A	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A
PRKCSH	Protein kinase C substrate 80K-H
RNF5	Ring finger protein 5
RPN1	Ribophorin I
SCAP	SREBF chaperone

SEC62	SEC62 homolog (S. cerevisiae)
SEC63	SEC63 homolog (S. cerevisiae)
SEL1L	Sel-1 suppressor of lin-12-like (C. elegans)
VIMP	Selenoprotein S
SERP1	Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1
SIL1	SIL1 homolog, endoplasmic reticulum chaperone (S. cerevisiae)
SREBF1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1
SYVN1	Synovial apoptosis inhibitor 1, synoviolin
TCP1	T-complex 1
TOR1A	Torsin family 1, member A (torsin A)
UBE2G2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2
UBXN4	UBX domain protein 4
UFD1L	Ubiquitin fusion degradation 1 like (yeast)
UGGT1	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 1
USP14	Ubiquitin specific peptidase 14 (tRNA-guanine transglycosylase)
VCP	Valosin containing protein
XBP1	X-box binding protein 1
ADM2	Adrenomedullin 2
ASNS	Asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)
BEX2	Brain expressed X-linked 2
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3
DNAJB9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9
GINS2	GINS complex subunit 2 (Psf2 homolog)
HERPUD1	Homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1
INHBE	inhibin, beta E
KCNMB3	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M beta member 3
MCM4	Minichromosome maintenance complex component 4
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
RRM2	Ribonucleotide reductase M2
SLC17A2	Solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 2
TRIB3	Tribbles homolog 3 (Drosophila)
TYMS	Thymidylate synthetase
UHRF1	Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1
ACTB	Actin, beta
B2M	Beta-2-microglobulin
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0