

THIAGO BELCHIOR DE OLIVEIRA

ENVOLVIMENTO DOS PPAR γ NAS AÇÕES METABÓLICAS
DOS ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2016

THIAGO BELCHIOR DE OLIVEIRA

ENVOLVIMENTO DOS PPAR γ NAS AÇÕES METABÓLICAS
DOS ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof Dr William Tadeu Lara Festuccia

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Oliveira, Thiago Belchior de.

Envolvimento dos PPAR γ nas ações metabólicas dos ácidos graxos ω -3 / Thiago Belchior de Oliveira. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. William Tadeu Lara Festuccia.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Mecanismos fisiopatológicos envolvidos na resistência à insulina. Obesidade e diabetes tipo II.

Versão do título para o inglês: PPAR γ involvement in the metabolic actions of omega-3 fatty acids.

1. PPAR γ 2. Ácidos graxos n-3 3. Obesidade 4. Metabolismo de glicose 5. Inflamação 6. Oxidação de ácidos graxos I. Festuccia, Prof. Dr. William Tadeu Lara II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0157/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Thiago Belchior de Oliveira.

Título da Tese: Envolvimento dos PPAR γ nas ações metabólicas dos ácidos graxos ômega-3.

Orientador(a): Prof. Dr. William Tadeu Lara Festuccia.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.094/2015

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 098/2010/CEUA, datado de 29/10/2010, prorrogado até 29/09/2016, e por solicitação do Prof. Dr. **Willian Tadeu Lara Festuccia**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Thiago Belchior de Oliveira** ao Projeto de Pesquisa "*Controle da expressão gênica por receptores nucleares*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 17 de novembro de 2015.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador da CEUA-ICB/USP

À minha esposa Nájela e à nossa
pequena Sarinha, que mesmo
antes de ser gerada já estava
sendo amada.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus por me dar forças no cumprimento desse trabalho.

Ao meu orientador William, que talvez mesmo sem querer, desde as primeiras conversas me ensinou a como orientar um aluno. Obrigado chefe pela insistência no ensino de conceitos, pela paciência na correção dos artigos e pela amizade criada entre nós.

Aos amigos de laboratório que por muitas vezes me ajudaram. Obrigado Vivi, Ju, Patricia, Maynara, Alex, Fer e Rafael.

Aos professores, André Marette, Niels, Zeca, Marília e Maria Tereza. Abrindo as portas de seus laboratórios você possibilitaram a execução de muitas tarefas desse trabalho.

Pelo amor incondicional de meu pai Carlos Artur e minha mãe Angélica. Mesmo fisicamente distantes, seus ensinamentos estiveram sempre comigo, norteando minhas escolhas mesmo quando não opinavam, mas apenas escutavam os meus planos. Ao meu irmão Bruno, que tanto amo e à minha cunhada Gabi.

À você Nájela, minha esposa, que SEMPRE me encorajou a seguir com a carreira científica. Com você não evoluí apenas pessoalmente. Sua maneira de lidar com as pessoas e explicar de maneira simples o que parecia ser inexplicável, me mostra todo dia como devo ser ao ensinar alguém. Meu amor, muito obrigado por gerar nosso sonho, nosso bebê.

Aos amigos Raphael e Ricardo pela amizade criada entre nós. “Minha casa será sempre sua!”

Ao funcionário José Roberto Mendonça (Bob) que nunca mediu esforços para me ajudar com os animais.

Agradeço aos camundongos utilizados nesse trabalho que involuntariamente “doaram” suas vidas, mas desejo muito que não tenha sido em vão.

À Fapesp pela concessão da bolsa (Processo Fapesp 2011/14172-2) e à CAPES e Fapesp pelos financiamentos à pesquisa.

RESUMO

OLIVEIRA, T. B. **Envolvimento dos PPAR γ nas ações metabólicas dos ácidos graxos ω -3.** 2016. 94 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O consumo excessivo de ácidos graxos saturados, monoinsaturados, trans e n-6 somado ao baixo consumo de ácidos graxos n-3 estão associados à obesidade, inflamação e resistência insulínica. Muitos benefícios dos n-3 estão relacionados à suas ações anti-inflamatórias em leucócitos infiltrados no tecido adiposo. Os n-3 são ligantes fracos dos receptores nucleares PPAR γ , podendo assim exercer suas ações metabólicas e anti-inflamatórias via ativação deste receptor. PPAR γ são amplamente expressos no tecido adiposo e em menor quantidade em leucócitos e hepatócitos. No presente trabalho, nós investigamos se o aumento da disponibilidade de n-3 geneticamente ou por dieta, via ativação de PPAR γ , protege camundongos do desenvolvimento da obesidade, intolerância a glicose e inflamação do tecido adiposo. Para isto, camundongos *fat-1* (modificados para a produção endógena de n-3) alimentados com dieta hiperlipídica (DH) por 8 semanas foram avaliados para o peso corporal, adiposidade, homeostase glicídica e lipídica, expressão proteica de adipócitos e recrutamento e alteração do fenótipo de macrófagos residentes no tecido adiposo. Camundongos *fat-1* foram protegidos do ganho de peso e adiposidade, efeitos que podem ser atribuídos ao maior gasto energético destes animais. Camundongos *fat-1* também apresentaram melhor tolerância à glicose, menor inflamação do tecido adiposo, aumento da captação e incorporação de glicose em glicogênio induzida pela insulina no músculo esquelético, além da redução da infiltração de macrófagos, com consequente diminuição de NF κ B fosforilado e aumento de PPAR γ no tecido adiposo. Para investigar o envolvimento de PPAR γ nas ações dos n-3 acima descritas, camundongos CTL e *fat-1* foram tratados com GW9662, um antagonista deste receptor nuclear. Dentre as diversas ações benéficas dos n-3 acima reportadas, apenas a proteção contra a intolerância à glicose associada à obesidade parece ser dependente da ativação de PPAR γ . Com o objetivo de aprofundar o estudo da participação de PPAR γ nas ações dos n-3, camundongos com deleção de PPAR γ exclusivamente em células mielóides foram alimentados com dieta rica em n-3 denominada de DHN3 e avaliados para peso corporal, homeostase da glicose e inflamação do tecido adiposo. A deleção de PPAR γ em células mielóides não interferiu com as ações do n-3 nos processos acima mencionados excluindo o provável envolvimento de PPAR γ de células mielóides nestas ações. Posteriormente, realizamos experimento similar, utilizando camundongos com deleção de PPAR γ exclusivamente em hepatócitos. Apesar de não interferir com as ações do n-3 no peso corporal e homeostase da glicose, a deleção de PPAR γ em hepatócitos aboliu o aumento na oxidação hepática de ácidos graxos e expressão dos fatores de transcrição PPAR γ 2 e PPAR α , do cofator PGC1 α , das proteínas mitocondriais carnitina palmitoil transferase 1A (CPT1A), succinato desidrogenase B (SDHB) e citocromo C1 (CYC1), proteína peroxissomal acil CoA oxidase (ACOX1), fator de biogênese peroxissomal A (PEX11A) e B (PEX11B). Em conclusão, nossos dados sugerem que os ácidos graxos n-3 possuem efeitos benéficos e protetores contra o desenvolvimento da obesidade, inflamação e intolerância a glicose induzidas por DH, sendo que dentre estes, tanto a melhora de tolerância à glicose quanto o aumento da oxidação hepática de ácidos graxos parecem ser mediados por PPAR γ .

Palavras-chave: PPAR γ . Ácidos graxos n-3. Obesidade. Metabolismo de glicose. Inflamação do tecido adiposo. Oxidação de ácidos graxos.

ABSTRACT

OLIVEIRA, T. B. **PPAR γ involvement in the metabolic actions of ω -3 fatty acids.** 2016. 94 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Excessive intake of saturated, monounsaturated, trans and n-6 fatty acids along with a low intake of n-3 fatty acids are associated with the development of obesity, inflammation, and insulin resistance. N-3 fatty acids have multiple health benefits mediated, at least in part, by their anti-inflammatory actions upon adipose tissue resident leukocytes. Mechanistically, n-3 fatty acids are thought to convey many of their beneficial effects through the activation of peroxisome-proliferator-activated γ (PPAR γ), a nuclear receptor expressed at high levels in adipocytes and low levels in leukocytes and hepatocytes. Herein, we investigated whether increasing body n-3 fatty acids levels either genetically or by a n-3 enriched diet protects mice from diet-induced obesity, glucose intolerance and adipose tissue inflammation through PPAR γ activation. For this, *fat-1* mice (genetically modified to produce n-3 endogenously) were fed for 8 weeks with high-fat diet and evaluated for body weight, glucose homeostasis and adipose tissue inflammation. *Fat-1* mice were protected from diet-induced obesity, glucose intolerance and adipose tissue inflammation as evidenced by reduced body weight gain, increased energy expenditure, improved glucose tolerance and skeletal muscle insulin-stimulated glucose uptake and incorporation into glycogen, and reduced adipose tissue macrophage infiltration and phosphoNF κ B protein content. Noteworthy, those phenotypes featured by *fat-1* mice were associated with an increase in adipose tissue PPAR γ protein content suggesting a likely involvement of this nuclear receptor in the beneficial actions of n-3 fatty acids. To test this hypothesis, *fat-1* mice fed with a high-fat diet were treated with the PPAR γ antagonist GW9662 and evaluated for body weight, glucose homeostasis and adipose tissue inflammation. Among the beneficial actions of n-3 fatty acids above described, only the protection from high-fat diet induced glucose intolerance was abolished by pharmacological PPAR γ inhibition with GW9662. To better investigate PPAR γ involvement in n-3 beneficial actions, mice with genetic deletion of PPAR γ specifically in myeloid cells were fed with a high-fat diet rich in n-3 fatty acids (DHN3) and evaluated for body weight gain, glucose homeostasis and adipose tissue inflammation. PPAR γ deficiency in myeloid cells did not affect any of n-3 beneficial actions towards body weight, glucose homeostasis and adipose tissue inflammation, excluding a likely involvement of myeloid cells PPAR γ in these n-3 actions. A similar protocol was also performed in mice with PPAR γ deficiency exclusively in hepatocytes. In spite of the absence of changes in body weight and glucose homeostasis PPAR γ deletion in hepatocytes completely abolished the increase in liver fatty acid oxidation and hepatic gene expression of the nuclear receptors PPAR γ 2 and PPAR α , the cofactor PGC1 α , the mitochondrial proteins CPT1A, SDHB, CYC1 and the peroxisomal proteins ACOX1, PEX11A e PEX11B induced by n-3. In conclusion, our findings indicate that enhancing body levels of n-3 fatty acids markedly attenuate diet-induced obesity, glucose intolerance and adipose tissue inflammation. Among those n-3 actions, only the improvement on glucose homeostasis and hepatic fatty acid oxidation seems to be mediated by PPAR γ .

Keywords: PPAR γ . N-3 fatty acids. Obesity. Glucose metabolism. Adipose tissue inflammation. Fatty acid oxidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análise em soro das razões n-6/n-3 e AA/n-3 e dos metabólitos de DHA.....	37
Figura 2. Ganho de peso, ingestão calórica e eficiência energética de camundongos CTL e <i>fat-1</i> tratados com dieta normo (DN) ou hiperlipídica (DH) por 8 semanas.....	38
Figura 3. Consumo de oxigênio, Quociente respiratório (RER) e atividade locomotora de camundongos CTL e <i>fat-1</i> tratados com dieta hiperlipídica por 8 semanas.....	39
Figura 4. Peso dos tecidos adiposos e diâmetro de adipócitos de camundongos CTL e <i>fat-1</i> tratados com dieta normo (DN) ou hiperlipídica (DH) por 8 semanas.....	40
Figura 5. Curva glicêmica, área sob a curva e insulina plasmática de camundongos CTL e <i>fat-1</i> tratados com dieta normo (DN) ou hiperlipídica (DH).....	41
Figura 6. Captação muscular de glicose e incorporação de glicose em glicogênio de camundongos CTL e <i>fat-1</i> tratados com dieta normo (DN) ou hiperlipídica (DH) por 8 semanas.....	42
Figura 7. Análise do perfil leucocitário infiltrado no tecido adiposo epididimal de camundongos CTL e <i>fat-1</i> tratados com dieta normo (DN) ou hiperlipídica (DH) por 8 semanas.....	44
Figura 8. Análise da expressão proteica de fosfo-NFκB, NFκB, PPARγ2, PPARγ1 e β-actina em tecido adiposo epididimal de camundongos CTL e <i>fat-1</i> tratados com dieta normo (DN) ou hiperlipídica (DH) por 8 semanas.....	45
Figura 9. Análise da razão n-6/n-3, AA/n-3 e dos metabólitos séricos de DHA de camundongos CTL e <i>fat-1</i> tratados com dieta normolipídica, hiperlipídica ou hiperlipídica adicionado de GW9662 (0,1% p/p) (DH + GW9662) por 8 semanas.....	46
Figura 10. Ganho de peso, ingestão calórica e eficiência energética de camundongos CTL e <i>fat-1</i> tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica adicionado de GW9662 (0,1% p/p) (DH + GW9662) por 8 semanas.....	47
Figura 11. Peso dos tecidos adiposos de camundongos CTL e <i>fat-1</i> tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica adicionado de GW9662 (0,1% p/p) (DH + GW9662) por 8 semanas.....	47
Figura 12. Fotografias representativas dos adipócitos e diâmetro dos adipócitos de camundongos CTL e <i>fat-1</i> tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica adicionado de GW9662 (0,1% p/p) (DH + GW9662) por 8 semanas.....	48
Figura 13. Curva glicêmica, área sob a curva, glicemia de jejum e insulinemia de jejum realizadas na 6ª semana de protocolo em camundongos CTL e <i>fat-1</i> tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica adicionado de GW9662 (0,1% p/p) (DH + GW9662) por 8 semanas.....	49
Figura 14. Análise do perfil leucocitário infiltrado no tecido adiposo epididimal de camundongos CTL e <i>fat-1</i> tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica adicionado de GW9662 (0,1% p/p) (DH + GW9662) por 8 semanas.....	50
Figura 15. Gel de agarose para genotipagem da enzima CRE expressão gênica relativa de PPARγ2 e expressão protéica de PPARγ2 e PPARγ1 em macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongos <i>Lyz^M-PPARγ^{WT}</i> e <i>Lyz^M-PPARγ^{KO}</i>	50

Figura 16. Ganho de peso, ingestão calórica e eficiência energética de camundongos Lyz^M -PPAR γ^{WT} e Lyz^M -PPAR γ^{KO} tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica rica em n-3 (DHN3) por 8 semanas.....	51
Figura 17. Peso dos tecidos adiposos e fígado de camundongos Lyz^M -PPAR γ^{WT} e Lyz^M -PPAR γ^{KO} tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica rica em n-3 (DHN3) por 8 semanas.....	52
Figura 18. Curva glicêmica e área sob a curva realizadas de camundongos Lyz^M -PPAR γ^{WT} e Lyz^M -PPAR γ^{KO} tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica rica em n-3 (DHN3) por 8 semanas.....	52
Figura 19. Análise do perfil leucocitário infiltrado no tecido adiposo epididimal de camundongos Lyz^M -PPAR γ^{WT} e Lyz^M -PPAR γ^{KO} tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica rica em n-3 (DHN3) por 8 semanas.....	53
Figura 20. Gel de agarose para genotipagem da enzima CRE recombinase, expressão gênica relativa de PPAR $\gamma 2$, ganho de peso, ingestão calórica e eficiência energética de camundongos Alb^H -PPAR γ^{WT} e Alb^H -PPAR γ^{KO} tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica rica em n-3 (DHN3) por 8 semanas.....	54
Figura 21. Peso dos tecidos adiposos e fígado de camundongos Lyz^M -PPAR γ^{WT} e Lyz^M -PPAR γ^{KO} tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica rica em n-3 (DHN3) por 8 semanas.....	55
Figura 22. Curva glicêmica, área sob a curva e glicemia de jejum em camundongos Alb^H -PPAR γ^{WT} e Alb^H -PPAR γ^{KO} tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica rica em n-3 (DHN3) por 8 semanas.....	55
Figura 23. Níveis séricos de triacilglicerol, colesterol total, AST e ALT de camundongos Alb^H -PPAR γ^{WT} e Alb^H -PPAR γ^{KO} tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica rica em n-3 (DHN3) por 8 semanas.....	56
Figura 24. Oxidação de palmitato (A), atividade da enzima citrato sintase (B), figura representativa da expressão protéica de TFAM, e GAPDH (C) e quantificação da razão de expressão proteica TFAM/GAPDH (D) em fígado de camundongos Alb^H -PPAR γ^{WT} e Alb^H -PPAR γ^{KO} tratados com dieta hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica rica em n-3 (DHN3) por 8 semanas. Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 4 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05).....	57
Figura 25. Expressão gênica relativa de proteínas marcadoras do metabolismo oxidativo mitocondrial e peroxissomal em fígado de camundongos Alb^H -PPAR γ^{WT} e Alb^H -PPAR γ^{KO} tratados com dieta hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica rica em n-3 (DHN3) por 8 semanas.....	58
Figura 1A. Cromatograma representativo dos ácidos graxos da dieta normolipídica (DN).....	82
Figura 2A. Cromatograma representativo dos ácidos graxos da dieta hiperlipídica (DH).....	82
Figura 3A. Cromatograma representativo dos ácidos graxos da dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos n-3 (DHN3).....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição das dietas controle e hiperlipídica.....	25
Tabela 2 - Sequências dos primers utilizados no PCR quantitativo.....	32
Tabela 3. Composição de ácidos graxos (mg/g) das dietas utilizadas no presente trabalho.....	36
Tabela 1A. Precisão Intra e inter-dias (coeficientes de variação) e acurácia de 12 isômeros HDHA.....	80
Tabela 2A. Recuperação dos isômeros HDHA em PBS.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	ácido araquidônico
ACOX1	acil CoA oxidase 1
Akt	proteína quinase b
Alb ^H -PPAR γ ^{KO}	camundongos com ausência de PPAR γ em hepatócitos
AP2	adipocyte protein 2
B2M	microglobulina β 2
BCA	ácido bicinchonínico
BSA	albumina bovina sérica
cDNA	DNA complementar
COX2	cicloxigenase-2
CPT1A	carnitina palmitoil transferase 1 A
CYC1	citocromo C1
DH	dieta hiperlipídica
DHA	ácido docosahexanóico
DHN3	dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos n-3
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DN	dieta normolipídica
DNTP	deoxinucleotídeos
EPA	ácido eicosapentaenoico
FAT/CD36	<i>fatty acid transporter</i>
<i>FAT-1</i>	camundongos que expressam enzima <i>fat-1</i> dessaturase
FCblock	<i>Fc receptor blocking</i>
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GPR120	receptor acoplado à proteína G (120)
GTT	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose
GW9662	2-Cloro-5-nitro-N-fenil-benzamida
HDHA	derivados do ácido docosahexaenóico
HNF4A	fator nuclear 4 de hepatócitos
IL10	interleucina 10
IL-13	interleucina 13
IL1A	interleucina 1A

IL1B	interleucina 1 β
IL-4	interleucina 4
IL-6	interleucina 6
INOS	óxido nítrico sintase induzível
IRS-1	substrato do receptor de insulina
L929	fibroblastos L929
LA	ácido linoleico
LPS	lipopolissacarídeo
LXR	receptor alfa hepático
Lyz ^M -PPAR γ ^{KO}	camundongos com ausência de PPAR γ em células mielóides
M1	macrófagos de fenótipo M1
M2	macrófagos de fenótipo M2
MCP-1	proteína quimioatraente de macrófagos 1
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
NAFLD	doença hepática gordurosa não-alcoolica
NDUFB5	NADH desidrogenase (ubiquinona) 1 β subcomplexo 5
NF κ B	fator nuclear κ B
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDK	piruvato desidrogenase quinase
PEX11B	fator de biogênese peroxissomal 11
PGC1A	<i>proliferator-activated receptor gamma coactivator</i>
PI3K	fosfoinositol 3-quinase
PIP3	fosfatidilinositol 3, 4, 5 - trifosfato
PPAR	receptor ativados da proliferação peroxissomal
PPRE	elemento de resposta de proliferação peroxissomal
PVDF	polivinilideno
SCD1	estearoil CoA dessaturase 1
SDHB	Succinate desidrogenase [ubiquinona]
SFB	soro fetal bovino
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
TAG	triacilgliceróis
TFAM	fator de transcrição mitocondrial

TLR4	receptor tipo <i>Toll</i> 4
TNF	fator de necrose tumoral
TZD	tiazolidinedionas
UCP	proteína mitocondrial desacopladora

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	Objetivos específicos.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1	Animais.....	24
3.2	Genotipagem.....	25
3.3	Cromatografia gasosa.....	26
3.4	Determinação de HDHA por CLAE-MS/MS.....	26
3.5	Calorimetria indireta.....	27
3.6	Teste de tolerância à glicose (GTT) e área sob a curva.....	27
3.7	Peso dos animais, consumo alimentar e eficiência energética.....	27
3.8	Eutanásia.....	28
3.9	Número e tamanho de adipócitos.....	28
3.10	Captação muscular de glicose e incorporação em glicogênio.....	28
3.11	Oxidação hepática de ácido palmítico e incorporação em triacilglicerol.....	29
3.12	Células imunes residentes no tecido adiposo.....	29
3.13	Marcação celular para análise em citometria de fluxo.....	30
3.14	Imunofenotipagem.....	30
3.15	Produção de meio de cultura rico em GM-CSF (células L929).....	31
3.16	Macrófagos derivados da medula óssea e polarização.....	31
3.17	Análise da expressão gênica por PCR.....	31
3.18	PCR quantitativo.....	32
3.19	Western blotting.....	32
3.20	Medidas séricas.....	33
3.21	Atividade da enzima citrato sintase.....	33
3.22	Análise estatística dos resultados.....	34
4	RESULTADOS.....	35
5	DISCUSSÃO.....	59
6	CONCLUSÃO.....	67
	REFERÊNCIAS.....	68
	APÊNDICE A – Tabelas e figuras suplementares.....	80
	APÊNDICE B – Artigo publicado.....	84

1 INTRODUÇÃO

Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que, no mundo, a obesidade atinge um em cada dez adultos. Apesar de dados recentes mostrarem que, entre 1980 e 2013 houve uma pequena diminuição do número de adultos obesos, a prevalência desta doença em crianças e adolescentes aumentou em 5% aproximadamente (NG et al., 2014). A obesidade, um problema mundial de saúde pública, é definida como o acúmulo excessivo de gordura corporal desencadeado por um desequilíbrio entre a ingestão alimentar e gasto energético. A obesidade e o sobrepeso são os principais fatores de risco para o desenvolvimento de diversas doenças como a síndrome metabólica, diabetes do tipo 2, dislipidemias, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (MUNRO; GARG, 2013).

Os mecanismos pelos quais o excesso de peso está relacionado com a maior incidência destas doenças ainda não foram completamente elucidados, embora evidências indiquem que a inflamação crônica de baixa intensidade, um fenótipo frequentemente associado com a obesidade, possa ter um papel importante (CASAZZA et al., 2013). A primeira evidência suportando esta hipótese surgiu na década de 90 com a descoberta de que o tecido adiposo de animais induzidos obesos por dieta apresentava aumento da expressão e secreção da citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral α (TNF α) (HOTAMISLIGIL, 1999). Ainda neste mesmo estudo, foi demonstrado que os níveis circulantes desta citocina estavam positivamente relacionados com o desenvolvimento de resistência à insulina. Trabalhos posteriores evidenciaram que, além do TNF α , o tecido adiposo de indivíduos obesos secreta vários mediadores inflamatórios como a proteína C reativa, interleucina-6 (IL6), proteína quimioatraente de monócitos (MCP1), leptina, entre outras (BULLÓ et al., 2007; DESPRÉS, 2006; HOTAMISLIGIL, 1999; ROSEN; SPIEGELMAN, 2006).

O tecido adiposo é composto por diversos tipos celulares incluindo fibroblastos, pré-adipócitos, células endoteliais, imunitárias e nervosas, além dos adipócitos que são responsáveis pelo armazenamento de lipídios. Em condições de obesidade, o tecido adiposo é infiltrado por macrófagos que, através da secreção de mediadores inflamatórios, contribuem para elevar o *status* inflamatório tecidual e sistêmico (SHAH et al., 2008). A ativação dos leucócitos infiltrados no tecido adiposo pode se dar por mediadores lipídicos como os eicosanóides, e proteicos como as citocinas produzidas por outros tipos celulares e/ou tecidos e por componentes de bactérias como o LPS e ácidos graxos, que modularão a sinalização inflamatória para resposta Th1 ou Th2 (GYÖRGY, 2009; KANG et al., 2008). Em indivíduos saudáveis, ocorre no tecido adiposo principalmente a ativação de linfócitos T helper 2 que

através da secreção de IL-4 e IL-13 promovem a polarização alternativa de macrófagos para o fenótipo anti-inflamatório M2. Estes macrófagos atuam principalmente no controle da homeostase tecidual. Na presença de estímulo pró-inflamatório como na obesidade, entretanto, linfócitos T helper 1 promovem, através da secreção de IFN γ , a ativação clássica de macrófagos de um perfil clássico M0 para um perfil pró-inflamatório M1. O aumento da secreção de citocinas e mediadores lipídicos pró-inflamatórios por macrófagos M1 participam diretamente no desenvolvimento de diversas complicações associadas à obesidade como a resistência à insulina (BELCHIOR et al., 2015; LUMENG et al., 2007). Os mecanismos moleculares, entretanto, que desencadeiam a alteração de fenótipo dos macrófagos residentes no tecido adiposo ainda não foram elucidados.

Além do tecido adiposo, estudos recentes sugerem que diversos outros tecidos como o músculo e fígado são acometidos por processos inflamatórios locais na obesidade. No fígado, ou mais especificamente nos hepatócitos, a deposição excessiva de lipídeos desencadeia a doença hepática gordurosa não-alcoólica (Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD), considerada a principal complicação hepática encontrada na síndrome metabólica estando intrinsecamente associada ao desenvolvimento do diabetes tipo 2 (MACHADO; CORTEZ-PINTO, 2006) e a um processo inflamatório local (WILLEBRORDS et al., 2015). A NAFLD atinge entre 10 e 25% da população adulta mundial afetando em torno de 16% dos indivíduos saudáveis, 43 a 60% dos pacientes diabéticos e 91% dos pacientes obesos e/ou hiperlipidêmicos (THAN; NEWSOME, 2015).

Independentemente do tecido acometido, o desenvolvimento de inflamação crônica diminui consideravelmente a capacidade dos tecidos em atuarem normalmente na homeostasia metabólica especialmente em relação à responsividade a insulina. Em indivíduos saudáveis, a insulina exerce parte de suas ações biológicas através da ativação de uma via de sinalização intracelular que engloba a: 1) interação da insulina com seu receptor (receptor de insulina, IR) localizado na membrana plasmática; 2) mudança conformacional e autofosforilação do receptor em resíduos de tirosina; 3) recrutamento e fosforilação de IRS-1 (do inglês, *Insulin receptor substrate-1*) em resíduos de tirosina; 4) interação alostérica do IRS-1 fosforilado com a PI3K (do inglês, *Phosphoinositide 3-kinase*) promovendo sua ativação e assim um aumento do conteúdo intracelular de fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (PIP3); 5) recrutamento e ativação da enzima PDK (do inglês, *Phosphoinositide-dependent kinase*) e do complexo 2 da mTOR pelo PIP3; 6- recrutamento da Akt (também denominada *Protein Kinase B - PKB*) para a membrana e fosforilação em resíduos de treonina 308 e serina 473, respectivamente; e 6) ativação de diversas proteínas como a mTOR pela Akt (do inglês,

Mechanistic target of rapamycin) entre outras regulando assim diversos processos intracelulares como a transcrição gênica, a síntese de proteínas, o transporte de glicose, a síntese de glicogênio e lipídeos, a proliferação e sobrevivência celular.

Em animais em jejum, ou seja, na presença baixos níveis de insulina e altas concentrações dos hormônios contra-reguladores glucagon, hormônio de crescimento, catecolaminas e glicocorticóides, o fígado atua como o principal órgão responsável pela manutenção da glicemia através da elevada produção hepática de glicose. No período pós-prandial, entretanto, níveis circulantes elevados de insulina inibem a gliconeogênese e a glicogenólise reduzindo drasticamente a produção hepática de glicose, ao mesmo tempo em que promovem a maior utilização desta hexose para a síntese de glicogênio e lipídeos. Em indivíduos com resistência à insulina, não ocorre inibição eficaz da produção hepática de glicose por este hormônio resultando em hiperglicemia.

Apesar da associação entre inflamação de baixa intensidade e obesidade ser bem estabelecida, o fator (ou fatores) desencadeador que conecta estas duas condições ainda não foi identificado. Estudos sugerem que os ácidos graxos saturados oriundos principalmente da dieta atuam como possíveis indutores de inflamação e resistência à insulina associada à obesidade. O ácido palmítico, um ácido graxo saturado de 16 carbonos muito abundante na dieta ocidental, por exemplo, induz resistência à insulina através da ativação do receptor toll-like 4 (TLR4) em adipócitos, macrófagos, neurônios hipotalâmicos e músculos isolados (DOYON et al., 2006; MILANSKI et al., 2009; TSUKUMO et al., 2007). Além do palmítico, o ácido láurico, um ácido graxo saturado de 12 carbonos encontrado principalmente no óleo de côco, é um potente ativador de TLR4 em macrófagos promovendo o aumento da expressão dos marcadores inflamatórios cicloxigenase 2 (COX2), sintase do óxido nítrico induzível (iNOS) e a interleucina 1 α (IL1 α).

Evidências sugerem que, além dos ácidos graxos saturados, os lipopolissacarídeos (LPS), componentes da parede de bactérias gram-negativas encontradas principalmente no trato gastrointestinal, parecem estar envolvidos no desenvolvimento do processo inflamatório associado à obesidade. A ingestão de dieta rica em gordura é associada com um aumento na concentração plasmática de LPS (CANI et al., 2007), que interagem e ativam TLR4 e a sinalização intracelular inflamatória tanto de células do sistema imune (macrófagos e linfócitos) quanto de adipócitos e hepatócitos (LEE et al., 2001). A ativação de TLR4 é associada com uma cascata intracelular de reações enzimáticas que culmina com a ativação da proteína quinase de I κ B (IKK) e a fosforilação da proteína I κ B α promovendo sua dissociação do complexo p50-p65 e a ativação e translocação para o núcleo de NF κ B, um fator de

transcrição que controla positivamente a expressão de diversos mediadores inflamatórios como citocinas e interleucinas (TAKEDA et al., 2003). Interessantemente, deleção de TLR4 ou seu co-receptor CD14 protege camundongos dos efeitos deletérios de dieta rica em gordura na sensibilidade a insulina sugerindo um mecanismo comum de ação para LPS e ácidos graxos saturados (ADKINS; KELLEY, 2010; MILANSKI et al., 2009; TSUKUMO et al., 2007).

Além dos ácidos graxos saturados, a ingestão excessiva dos ácidos graxos trans também está associada ao desenvolvimento de processo inflamatório (CHANTAL et al., 2009; LOPEZ-GARCIA et al., 2005; MENAA et al., 2013), dislipidemia e aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (ASCHERIO et al., 1999; SUN et al., 2007). Os ácidos graxos trans são encontrados naturalmente em pequenas quantidades na carne e leite de ruminantes, bem como, em altas concentrações em produtos industrializados, sendo produzidos pela hidrogenação catalítica parcial de óleos vegetais garantindo aos alimentos propriedades organolépticas toleráveis ao consumo.

Contrariamente aos ácidos graxos saturados e trans que estão diretamente associados ao desenvolvimento da inflamação e resistência a insulina associadas à obesidade, os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 possuem ações anti-inflamatórias e protetoras contra a obesidade e resistência a insulina induzida por dieta. Ácidos graxos ômega-3 são ácidos carboxílicos que possuem várias duplas ligações ou insaturações em sua molécula sendo a primeira localizada no carbono 3 contado a partir da extremidade carboxila. Tanto os ácidos graxos ômega-3 quanto os ômega-6 são denominados essenciais já que são fundamentais ao desenvolvimento do sistema nervoso central, mas não são sintetizados endogenamente em mamíferos devido a ausência das enzimas delta 12 e 15 dessaturases que catalisam a inserção de uma dupla ligação na posições n-3 e n-6 da cadeia carbônica destas moléculas (BROUGHTON; WADE, 2002). Ácidos graxos n-6 obtidos da dieta são fundamentalmente compostos pelo ácido linoléico (LA; 18:2n-6). Este é metabolizado a ácido araquidônico (AA; 20:4n-6), um precursor de prostaglandinas e leucotrienos, mediadores inflamatórios lipídicos. Dentre os ácidos graxos n-3, os principais são os ácidos α -linolênico (ALA, 18:3n-3), eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) e docosaexaenoico (DHA, 22:6n-3) (CALDER, 2015).

Diversos estudos encontrados mostram que os ácidos graxos ômega-3 possuem propriedades cardioprotetoras prevenindo o surgimento da arteriosclerose, reduzindo a concentração plasmática de triacilgliceróis e a resposta inflamatória sistêmica (LALIA et al., 2015; LI et al., 2014). Níveis circulantes de ácidos graxos ômega-3 correlacionam-se negativamente com diversos marcadores pró-inflamatórios como a proteína C reativa, IL6 e

TNF α e positivamente com marcadores anti-inflamatórios como TGF β e IL10 (CALDER, 2015). Tratamento de células mononucleares humanas e adipócitos com ácidos graxos ômega-3, por exemplo, inibe a expressão de IL1 β , IL6 e TNF α (PRIEUR et al., 2011) e induz maior expressão de IL10 (TAI; DING, 2010), respectivamente, sugerindo uma ação direta destes ácidos graxos no controle da expressão gênica destes mediadores inflamatórios. Notavelmente, camundongos expressando *FAT-1*, uma dessaturase de ácidos graxos, naturalmente encontrada em *C elegans*, que converte ácidos graxos ômega-6 em ômega-3 (KANG et al., 2004), estão protegidos contra a resistência à insulina associada à obesidade, devido a uma melhora da capacidade de resolver processos inflamatórios (BELCHIOR et al., 2015; JANG et al., 2013; KELTON et al., 2013; WHITE et al., 2010b). Além de suas funções anti-inflamatórias, os ácidos graxos n-3 possuem efeitos metabólicos importantes promovendo a captação de glicose, o aumento da sensibilidade à insulina e o *clearance* de lipídios circulantes reduzindo assim a lipotoxicidade e o acúmulo ectópico de lipídios em tecidos como o fígado e músculo esquelético (BELCHIOR et al., 2015; HIRABARA et al., 2013; JACOMETO et al., 2014; ROMANATTO et al., 2013).

Apesar de alvo de intensa pesquisa, os mecanismos pelos quais os ácidos graxos n-3 exercem suas funções metabólicas e anti-inflamatórias ainda não foram completamente elucidados. Os ácidos graxos n-3 modulam a atividade de diversas vias de sinalização celulares, modificam o perfil de lipídios da membrana plasmática alterando suas propriedades, e ativam diversos fatores de transcrição como os receptores ativadores da proliferação peroxissomal (peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR) (DECKELBAUM et al., 2006; LI et al., 2008; WORGALL et al., 1998), receptor X hepático (liver X receptor, LXR), fator nuclear de hepatócito 4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α , HNF4 α) (JUMP et al., 2005), a proteína de ligação ao elemento regulado por esteróis (sterol regulatory element binding protein, SREBP) (JUMP et al., 2005). Mais recentemente, ácidos graxos n-3 foram demonstrados também ativar receptores de membrana acoplados a proteína G (GPR) como GPR120 (OH et al., 2010; OH et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

De especial interesse para o presente projeto é a interação e ativação dos PPARs por ácidos graxos n-3 que constituem ligantes fracos naturais destes receptores. Os PPARs controlam a transcrição de diversos genes através da heterodimerização obrigatória com o receptor do 9-cis-ácido retinóico (RXR) e a interação com sequências específicas na região promotora dos genes denominadas de elemento de resposta ao PPARs (Peroxisome Proliferator Response Element, PPRE). São membros desta subfamília os PPAR α , PPAR δ e PPAR γ , sendo que este último possui duas isoformas γ 1 e 2. Os três membros que compõem a

subfamília PPAR são expressos diferencialmente nos diversos tecidos corporais. No fígado, mais especificamente nos hepatócitos, os PPAR α têm a função de regular o metabolismo lipídico especialmente durante o jejum. Nesse estado a ativação de PPAR α estimula a captação e oxidação peroxissomal de ácidos graxos, β -oxidação mitocondrial, cetogênese além de controlar o metabolismo de lipoproteínas (LEFEBVRE et al., 2006; MARTIN et al., 2007; PETERS et al., 2000; SZALOWSKA et al., 2013). Já os PPAR δ são expressos ubiquamente em diversos tecidos corporais, regulando principalmente a oxidação de ácidos graxos (EVANS et al., 2004).

Os PPAR γ , por sua vez, são expressos principalmente no tecido adiposo branco e marrom e em menor quantidade nas células dendríticas, macrófagos, neurônios, células endoteliais, cardiomiócitos e hepatócitos. No tecido adiposo, os PPAR γ são essenciais para a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos e manutenção dos adipócitos maduros (IMAI et al., 2004; TONTONNOZ; SPIEGELMAN, 2008), além de controlarem a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de lipídios incluindo a captação, ativação, esterificação, lipólise, reciclagem e oxidação dos ácidos graxos (ANGHEL et al., 2007; FESTUCCIA et al., 2006; FESTUCCIA et al., 2009). Os PPAR γ controlam também a função endócrina do tecido adiposo inibindo a produção e secreção de diversas adipocinas como a leptina, TNF α e IL6 (CALDER, 2015; DE VOS et al., 1996; TONTONNOZ; SPIEGELMAN, 2008) e promovendo a secreção de adiponectina (BERG et al., 2002).

Em relação às células imunes dendríticas e macrófagos, a ativação de PPAR γ diminui a produção de mediadores pró-inflamatórios como IL6, IL12, IL1 α , COX2 e iNOS devido à diminuição da ativação de NF κ B (GRYGIEL-GÓRNIK, 2014; STRAUS; GLASS, 2007), além de regularem a maturação e a função de células dendríticas apresentadoras de antígeno que são intimamente relacionadas com a função dos macrófagos em camundongos e humanos.

O entendimento da atuação dos PPAR γ no metabolismo lipídico e nos processos inflamatórios tem sido facilitado pela constante evolução na descoberta de ligantes específicos e de alta afinidade. Vários ligantes sintéticos como as TZDs, fibratos e ácidos graxos foram descritos desde a descrição dos PPAR γ como reguladores do metabolismo de adipócitos. Entretanto, somente em 2001, Leesnitzer *et. al* descreveram a droga GW9662 como um potente antagonista seletivo de PPAR γ devido à sua ligação covalente irreversível com esse receptor e modificação do resíduo de cisteína em seu sítio ativo.

Dentre os agonistas de PPAR γ , as TZDs começaram a ser prescritas em 1996 para indivíduos insulino-resistentes. Até essa data, acreditava-se que somente os PPAR α tinham relevância no controle do metabolismo hepático de lipídeos. Em 1996, porém Vidal-Puig et

al. (1996) mostraram que camundongos obesos expressam PPAR γ 1 e 2 no fígado, sendo a isoforma 2 expressa em níveis 10 vezes menores que os encontrados no tecido adiposo. No ano seguinte, foi mostrado que 15% da expressão de PPAR γ em hepatócitos corresponde a isoforma PPAR γ 2 e a ativação desse fator de transcrição com a TZD troglitazona em camundongos aumentou no fígado os níveis de RNA mensageiro de PPAR γ e de alguns genes encontrados tipicamente em adipócitos como: FAT/CD36 e AP2, além de UCP2 (MEMON et al., 2000). Posteriormente, outros trabalhos mostraram a importância de PPAR γ no controle do metabolismo hepático de lipídeos em modelos de obesidade induzida geneticamente (*ob/ob*) ou por dieta hiperlipídica, respectivamente (MORÁN-SALVADOR et al., 2011).

Em conjunto, os dados acima descritos indicam uma importante participação dos PPAR γ no desenvolvimento da inflamação crônica de baixa intensidade associada com a obesidade e sugerem, devido a similaridade dos fenótipos encontrados após tratamento com ácidos graxos ômega-3 e ligantes farmacológicos de PPAR γ , uma possível participação dos PPAR γ nas ações destes ácidos graxos.

2 OBJETIVOS

Investigar os efeitos dos ácidos graxos n-3 no desenvolvimento da obesidade, resistência à insulina e inflamação do tecido adiposo e possível envolvimento do receptor nuclear PPAR γ como mediador destas ações.

2.1 Objetivos específicos

- Investigar os efeitos da inibição farmacológica de PPAR γ nas ações dos ácidos graxos n-3 no peso corporal, adiposidade, homeostase glicídica e lipídica, sinalização intracelular a insulina e citocinas e inflamação do tecido adiposo de camundongos transgênicos *fat-1*.

- Investigar o envolvimento de PPAR γ de células mielóides como mediador das ações dos ácidos graxos n-3 no peso corporal, adiposidade, homeostase glicídica e lipídica, sinalização intracelular a insulina e citocinas, e inflamação do tecido adiposo.

- Investigar o envolvimento de PPAR γ de hepatócitos como mediador das ações dos ácidos graxos n-3 no peso corporal, adiposidade, homeostase glicídica e lipídica, e metabolismo hepático de lipídeos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados nesse trabalho três linhagens de camundongos:

- Camundongos *fat-1*: Essa linhagem de camundongos foi produzida pela inserção do gene *fat-1* de *C. elegans* no genoma de camundongos C57BL/6. Nesse trabalho os animais que apresentavam essa enzima foram denominados *fat-1* e seus controles (camundongos irmãos com ausência da transgenia) foram chamados de CTL.
- Camundongos com deleção genética específica (sistema Cre-Lox) de PPAR γ em células mielóides. Para tanto, foram adquiridos da empresa JAX Mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) camundongos PPAR γ floxeado B6.129-*Pparg*^{*tm2Revj*} (PPAR γ lox) e camundongos com a enzima Cre recombinase controlada pelo promotor de lisozima B6.129P2-*Lyz2*^{*tm1(cre)lfo/J*} (Lyz Cre). Após duas rodadas de cruzamento foram selecionados camundongos homozigotos para PPAR γ floxeado e positivos para a enzima Cre recombinase (Lyz^M-PPAR γ ^{KO}) e camundongos homozigotos para PPAR γ floxeado e negativos para a enzima Cre recombinase (Lyz^M-PPAR γ ^{WT}).
- Camundongos com deleção genética específica de PPAR γ em hepatócitos. Para tanto, foram adquiridos da empresa JAX Mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) camundongos PPAR γ floxeado B6.129-*Pparg*^{*tm2Revj*} (PPAR γ lox) e camundongos com a enzima Cre recombinase controlada pelo promotor de albumina B6.Cg-Tg(Alb-cre)21Mgn/J. Após duas rodadas de cruzamento foram selecionados camundongos homozigotos para PPAR γ floxeado e positivos para a enzima Cre recombinase (Alb^H-PPAR γ ^{KO}) e camundongos homozigotos para PPAR γ floxeado e negativos para a enzima Cre recombinase (Alb^H-PPAR γ ^{WT}).

Os camundongos acima citados, a depender do experimento, foram tratados com 2 tipos de dieta, sendo elas: Dieta normolipídica (DN), com 10% do valor calórico vindos de gordura e dieta hiperlipídica (DH), 60% do valor calórico oriundos de gordura. A composição das três dietas está descrita na Tabela 1. Ambas as dietas, DN e DH foram produzidas tendo como fonte de lipídeos o óleo de soja e a banha suína. Para a produção da segunda dieta hiperlipídica utilizada, realizou-se a total substituição da banha de porco da DH pelo óleo de peixe, a essa dieta foi dado o nome de dieta hiperlipídica rica em n-3 (DHN3). Nos

experimentos com camundongos *fat-1*, à DH foi adicionado o antagonista de PPAR γ GW9662 (0,1% p/p) e independentemente do experimento, o período de tratamento dos camundongos foi de 8 semanas contadas após 1 semana de adaptação às dietas.

Tabela 1- Composição das dietas controle e hiperlipídica.

	Dieta normolipídica	Dieta Hiperlipídica
	g/kg dieta	
Caseína	190,9	258,4
Sacarose	89,5	88,9
Amido dextrinizado	162,7	161,5
Óleo de soja	23,9	32,3
Banha suína	19,1	316,6
Celulose	55	74,1
Mix de minerais	35,2	47,9
Mix de vitaminas	10	13,7
Bitartarato de colina	1,9	2,6
L-cistina	2,8	3,9
	Kcal (%)	
Carboidrato	70%	20%
Lipídeo	10%	60%
Proteína	20%	20%
Kcal/kg de dieta	3836	5231

3.2 Genotipagem

Camundongos tiveram aproximadamente 0,2 cm de sua cauda cortada após anestesia com isoflurano. A extração do DNA caudal foi realizado por digestão com NaOH (50 mM) por 12 minutos a 95 °C, seguido de neutralização com Tris-HCl (1M, pH 6,8) e centrifugação por 15 min à 13000 rpm. O sobrenadante desta solução foi utilizado para PCR com kit Platinum TAQ DNA polimerase (*Invitrogen*). Os primers utilizados para genotipagem dos camundongos foram e as amostras foram corridas em gel de agarose 1,5% para a separação dos produtos de PCR e comparadas ao padrão de peso molecular de 100 bp:

- *fat-1* (produto em 331 bp):

AGGATTGGGAAGCAATGCCA
TCGTACACCTCAGCGACATC.

- PPAR γ lox (selvagem com banda de 200 bp e mutante com banda em 230 bp):

TGTAATGGAAGGGCAAAGG
TGGCTTCCAGTGCATAAGTT

- Enzima CRE (controle interno com produto em 324 bp e mutante com banda em 225 bp):

CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC
ACGCGTTAATGGCTAATCGC
GGCGCTAAGGATGACTCTGG

3.3 Cromatografia gasosa

O soro de camundongos foi avaliado para os ácidos graxos presentes por reação de transesterificação para CG/FAME como previamente descrito (DEROGIS et al., 2012). A fração clorofórmio foi misturada com metanol (1,76 mL), ácido margárico 1 mg/mL (50 μ L), cloreto de acetila (100 μ L) e aquecido a 100 °C por 60 minutos. Após o resfriamento foi adicionado hexano (1,5 mL) e os tubos foram agitados vigorosamente e centrifugados a 1500 x g por 2 minutos a 4 °C. A fase orgânica superior foi coletada e evaporada sob vapor de nitrogênio líquido e o resíduo foi dissolvido em 40 μ L de hexano. 1 μ L das amostras foi injetado individualmente em um cromatógrafo a gás (Trace 1310 – Thermo Scientific) com detector de ionização em chama, usando uma coluna capilar (DB-FFAP, 15 m \times 0.1 mm id \times 0.1 μ m, Agilent Technologies). FAME foi identificado pela comparação direta com *FAME standard mix* (Supelco 37 Component FAME Mix; Sigma-Aldrich), individualmente os picos foram integrados e normalizados pelo padrão interno. A porcentagem de FAME individual foi calculada em relação à área total dos picos.

3.4 Determinação de HDHA por CLAE-MS/MS

A análise dos derivados de DHA (HDHA) foi realizada por CLAE-MS/MS como descrito em (DEROGIS et al., 2012) e detalhado nos Anexos. As amostras de soro (50 μ L) foram adicionadas de 450 μ L de PBS 10 mM pH 7,4 contendo BHT (100 μ M), deferoxamina

(100 uM) e ácido 5-hidroxitetraeicosanóico (HETE)-d8 (250 ng/mL). Foram feitas duas extrações com clorofórmio : acetato de etila (4:1) e centrifugadas. A fração clorofórmio da extração foi seca sob vapor de nitrogênio líquido e o resíduo re-suspenso em isopropanol (1 mL) e adicionado de NaOH (0,4 M, 1 mL) e mantido a 37 °C sob abrigo da luz. Após esse período as amostras foram neutralizadas com HCl (2M) e então extraídos duas vezes com hexano. Após agitação e centrifugação, a fase hexânica foi seca sob vapor de nitrogênio líquido e o resíduo re-suspenso em 50 uL de metanol contendo 12-HETE-d8 (250 ng/mL) e centrifugados a 2000 x g por 10 minutos a 4 °C. O volume de injeção foi de 5 uL. A análise das amostras foi realizada em CLAE Agilent 1200 (Santa Clara, CA, USA) acoplado a 4000-Qtrap mass spectrometry (AB SCIEX, Concord, CA,USA). Os fragmentos teóricos e relação m/z dos íons usados foram previamente descritos (DEROGIS et al., 2012).

3.5 Calorimetria indireta

Camundongos foram colocados em gaiolas metabólicas por dois dias consecutivos para adaptação. Em seguida, as medidas de consumo de oxigênio (VO_2), produção de gás carbônico (CO_2) e atividade motora espontânea foram realizadas durante 24 h pelo *Comprehensive Laboratory Monitoring System* (Columbus Instruments, OH, USA), um calorímetro de circuito aberto integrado, equipado com um sistema de monitoramento de atividade por feixes ópticos. O quociente respiratório (RER) foi calculado como a razão VO_2/CO_2 .

3.6 Teste de tolerância à glicose (GTT) e área sob a curva

Camundongos jejuados por 6 horas foram injetados intraperitonealmente com solução de glicose (1 g/kg). O sangue da cauda foi coletado e a glicemia foi determinada antes e 15, 30, 45, 60 e 90 minutos após a injeção de glicose com o auxílio de glicosímetro (OneTouch Johnson & Johnson). Foi calculada a área sob a curva (AUC) durante o teste tendo como baseline o valor da glicemia antes da administração de glicose.

3.7 Peso dos animais, consumo alimentar e eficiência energética

O peso corporal e o consumo alimentar dos animais foram medidos semanalmente em

balança semi-analítica. A eficiência energética foi calculada através do ganho de peso dividido pelo consumo alimentar multiplicado por 100.

3.8 Eutanásia

Após o período de protocolo experimental (8 semanas), os animais foram privados de alimento por 6 horas, e então eutanasiados. Foi coletado sangue, e posteriormente, foi realizada a laparotomia mediana para remoção dos tecidos adiposos inguinal, epididimal, retroperitoneal, marrom, fígado e baço. Os tecidos foram pesados e processados para as análises específicas ou congelados em nitrogênio líquido.

3.9 Número e tamanho de adipócitos

As medidas da quantidade e tamanho dos adipócitos foram realizada em células isoladas dos depósitos de gordura retroperitoneal e inguinal. Para isto, os tecidos adiposos foram cortados em pedaços pequenos ($\sim 0,5 \text{ cm}^2$) e incubados por 45 min sob agitação a 37°C em meio de cultura DMEM (Sigma-Aldrich, USA) suplementado com 4% albumina sérica bovina (BSA) e 1 mg/mL colagenase tipo I (Sigma-Aldrich, USA). Em seguida, a solução foi passada numa peneira plástica com malha fina para retenção de restos de tecido, os quais foram lavados três vezes com DMEM para obtenção da suspensão celular (RODBELL, 1964).

A determinação do número de células (N) foi calculada a partir da fórmula: $N = (\text{lipócrito} \times 10^7) / V$. O lipócrito se refere à porcentagem de adipócitos contidos na suspensão celular total e foi determinado a partir de aproximadamente 40 μl da suspensão celular, o qual foi colocado em capilar de vidro e centrifugado a 2000 rpm por 1 minuto. O V se refere ao volume médio dos adipócitos, o qual foi calculado a partir da fórmula: $V = \pi / 6 \times D^3 / 1000$, onde D é o diâmetro médio de 50 adipócitos (μm) (FINE; DIGIROLAMO, 1997). Para medir o diâmetro celular, foi utilizado um microscópio óptico com aumento de 40x acoplado à câmera digital 1.3 MP (Moticam 1000 – MOTIC[®]). O diâmetro foi então obtido pelo programa *Motic-Images Plus 2.0[®]*, admitindo-se que os adipócitos eram esféricos.

3.10 Captação muscular de glicose e incorporação em glicogênio

A captação e incorporação de glicose em glicogênio foi medida conforme previamente

descrito (MASSAO HIRABARA et al., 2003). O músculo sóleo foi isolado, preso a fios de arame de aço inoxidável e pré-incubados a 35°C por 30 min em tampão bicarbonato Krebs-Ringer (mmol/l): 118 NaCl, 4,8 KCl, 1,25 CaCl₂, 1,2 KH₂PO₄, 1,2 MgSO₄, 25 NaHCO₃, pH 7,4, contendo 5,6 mmol/l de glicose. Os músculos foram então transferidos para frascos contendo tampão bicarbonato Krebs-Ringer com 0,3 µCi/mL D-[U-¹⁴C]-glicose e 0,2 µCi/mL 2-deoxy-D-[2,6-³H]-glicose, na presença e ausência de insulina (0,7 ou 7 mmol/L), gaseificado e incubados por 1 h. Ao término da incubação, os músculos foram lavados e a captação de 2-deoxy-D-[2,6-³H]-glicose bem como a incorporação de glicose em glicogênio D-[U-¹⁴C]-glicose foram analisadas conforme descrito previamente (CRETIAZ et al., 1980).

3.11 Oxidação hepática de ácido palmítico e incorporação em triacilglicerol

A incorporação de ácido palmítico em triacilglicerol (TAG) bem como sua conversão em CO₂ (oxidação) foram estimadas em fragmentos de fígado (aproximadamente 100 mg) dividido em 10 pedaços, coletados após as 8 semanas do protocolo experimental. Os fragmentos de fígado foram incubados sob agitação em banho-maria 37°C por 2 horas com tampão Krebs-Ringer-Bicarbonato (pH 7,4) suplementado com 2% BSA, 100 µM ácido palmítico e 0,2 µCi/mL [U-¹⁴C] ácido palmítico (*New England Radiochemicals*). A reação foi interrompida com 100 µL de H₂SO₄ 5N e o CO₂ foi capturado durante 20 minutos em pedaço de papel filtro umedecido com etanol:feniletilamina (1:1), o qual foi posteriormente destinado para contagem de radioatividade. Os fragmentos de fígado foram lavados com PBS pH 7,4 e procedeu-se a extração lipídica pela adição de 1500 µL de clorofórmio metanol (2:1) e 300 µL de água seguido de agitação em vórtex por 30 segundos, e centrifugação à 3000 rpm por 5 minutos. A parte superior da solução foi coletada para quantificação de proteína enquanto que, da fase inferior, 1 mL foi transferido para tubo de cintilação, onde após secagem completa, foi adicionado 2 mL de líquido de cintilação e destinado para contagem de radioatividade.

3.12 Células imunes residentes no tecido adiposo

As células imunes residentes no tecido adiposo foram isoladas através de digestão do tecido adiposo epididimal com colagenase. Para isso, o tecido adiposo epididimal foi picado em pequenos fragmentos e incubados em 4 mL de tampão DMEM contendo HEPES 20 mM,

albumina bovina sérica (BSA) 4%, colagenase II (*Sigma Chemical, St. Louis, MO, Estados Unidos*) 1,0 mg/mL, pH 7,4 por cerca de 45 minutos a 37 °C em banho-maria com agitação orbital (150 rpm). Em seguida, as amostras foram filtradas em peneira plástica com malha fina (que retém restos teciduais e vasos não digeridos) e acrescida de 25 mL de tampão contendo sais de EARLE/HEPES 25 mM, BSA 1%, piruvato de sódio 1 mM, pH 7,45 e mantido a 37 °C. Os adipócitos que emergiram a superfície do tampão foram retirados e a fração estroma-vascular foi isolada por centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm. O pellet de células formado que contém leucócitos, células endoteliais, pré-adipócitos entre outras, foi re-suspenso em tampão de lise de hemácias, submetidos à centrifugação por 10 min a 1500 rpm, filtrados em filtro 70 µm, novamente re-suspenso em PBS contendo 2% de Soro Fetal Bovino (SFB) e destinado a marcação e análise por citometria de fluxo como descrito abaixo.

3.13 Marcação celular para análise em citometria de fluxo

Células da fração estroma-vascular ou macrófagos diferenciados *in vitro* foram transferidos para placa de 96 wells e centrifugados para a retirada do sobrenadante. Células foram re-suspensas em *Fc block*, incubadas por 10 minutos a 4 °C, e acrescidas dos (10 µl de solução 1:100) de anticorpos seguida de incubação por 30 min à 4 °C. Em seguida as amostras foram novamente lavadas com PBS 2% SFB, fixadas com tampão BD *Cytofix* e incubadas por 20 minutos à 4 °C. As células foram lavadas e as amostras avaliadas no citômetro de fluxo Canto II. O programa utilizado para aquisição de dados no BD canto II foi o Diva-Software™. Foram adquiridos 50000 eventos por amostra e para a análise foi usado o software FlowJo 10.0.7.

3.14 Imunofenotipagem

Foram considerados macrófagos as células que apresentaram dupla marcação para CD11b⁺ e F4/80⁺ na superfície. Dentro desta população de macrófagos, as células que expressavam CD206⁺ e CD11c⁻ ou CD86⁻ foram consideradas como de fenótipo M2 e as que expressavam CD11c⁺ e CD86⁺ e CD206⁻ como M1. Células que expressam CD4⁺, CD25⁺ e Foxp3⁺ foram consideradas como linfócitos Treg.

Os anticorpos utilizados foram F4/80-APC, CD11c-FITC, CD206-PE, CD4-FITC, CD25-APC (Becton Dickinson, USA). Foram usados também CD11b-PB, F4/80-PE, CD206-FITC e CD86-APC (Biolegend, USA).

3.15 Produção de meio de cultura rico em GM-CSF (células L929)

Para a obtenção do meio de células L929, 20 mL de meio DMEM 10% SFB foi adicionado a células L929 com 60% de confluência. Após 7 dias, este meio foi retirado, centrifugado, filtrado e armazenado para posterior uso.

3.16 Macrófagos derivados da medula óssea e polarização

Camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂ e limpos com álcool 70% em abundância. Tíbias e fêmures inteiros dos camundongos foram retirados e mergulhados em PBS. No fluxo laminar, os ossos foram mergulhados no etanol 70% por 4 minutos e transferidos para o PBS estéril em placas de petri. Com o material cirúrgico embebido no álcool, as extremidades dos ossos foram cortadas e com a ajuda de seringa e agulha, os ossos foram lavados internamente com PBS. Após centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos a 4 °C, as células foram re-suspensas em solução hipotônica para a lise das hemácias e centrifugadas novamente a 1500 rpm por 5 minutos a 4 °C. Em seguida, as células foram re-suspensas em meio completo (30% sobrenadante de cultura de célula L929, 15% SFB e 1% antibiótico penicilina/estreptomicina em DMEM HIGH). Toda solução celular foi filtrada e plaqueada 0,5 x 10⁶ células/poço em placas de 6 poços. No terceiro dia, o meio foi trocado após lavagem com PBS morno. Após 6 dias, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS morn e incubadas por 24 h com meio de diferenciação contendo LPS (50ng/mL) e IFN- γ (5ng/mL) para induzir polarização para macrófagos M1, e IL-4 (10ng/mL) e IL-13 (10ng/mL) para induzir diferenciação para macrófagos M2.

3.17 Análise da expressão gênica por PCR

Amostras de 50 mg de tecido adiposo epididimal foram homogeneizadas em homogeneizador UltraTurrax por 30 segundos com 0,5 mL de Trizol Reagent (*Invitrogen, Life Technologies, USA*). Na etapa de extração foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio seguido de agitação vigorosa em vórtex por 30 segundos, com posterior centrifugação a 13000 rpm por 15 minutos a 4 °C. A fase superior aquosa foi transferida para outro tubo e adicionada de 0,7 mL de álcool etílico 70 %. Essa mistura foi transferida para uma coluna de purificação de RNA seguindo o protocolo do fabricante (*RNAMinispin GE Healthcare*). O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*) a 260

nm. Para a análise da pureza do RNA, adotou-se o cálculo da razão entre as absorvâncias em 260 e 280 nm, aceitando-se valores entre 1,8 e 2.

Alíquotas de 12 µL de amostras contendo 1 µg de RNA total foram utilizadas para a síntese de cDNA. A esse volume, foi adicionado 1 µL de dNTP 10 mM e 1 µL de oligoDT 50 µM, seguido de incubação a 65 °C por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 6 µL da mistura contendo 5X *first strand buffer*, DTT 0,1 M e Superscript transcriptase reversa 200 U/µL na relação 4:1:1. Seguiu-se com a incubação a 50 °C por 1 hora, seguido de 70 °C por 15 minutos e 4 °C por 3 minutos. Ao término desse processo, 18 µL de cada amostra foram coletados e adicionados em 432 µL de água livre de RNase. Foram feitas 5 alíquotas de cada amostra que foram armazenadas à 80 °C.

3.18 PCR quantitativo

O PCR quantitativo foi realizado com 3 µL de cDNA, 2,74 µL de água, 3,93 µL de SYBR Green (*Sigma-Aldrich*) e 0,33 µL de primer a 5 µM. Essa mistura foi incubada em PCR RotorGene (*Qiagen*) por 40 ciclos. A análise da expressão gênica foi realizada por quantificação relativa pelo método de C_T comparativo. A expressão do gene alvo foi normalizada pelo controlador endógeno. Para cada gene alvo foram calculados os valores de ΔC_T . Em seguida foi calculado o conteúdo relativo de RNAm ($2^{-\Delta C_T}$). O valor obtido foi normalizado pelo gene de controle endógeno.

Os *primers* foram desenhados e utilizados para a determinação da expressão de RNAm estão descritos na Tabela 2. Como gene normalizador, foi utilizado B2M.

Tabela 2 - Sequências dos primers utilizados no PCR quantitativo.

Gene	Sense (5' - 3')	Antissense (3' - 5')
B2M	ACCGTCTACTGGGATCGAGA	TGCTATTTCTTTCTGCGTG CAT
PPAR γ 2	CGGGCTGAGAAGTCACGTT	TGTGTCAACCATGGTAATTTTCAGT
PPAR α	CAGCCTCAGCCAAGTTGAAG	CACAGAGCGCTAAGCTGTGA
PGC1 α	ACTCTGCATTTGGTTTTGCTGA	CCCAGCAACACAGCCTCTAA
CPT1A	GCTGATGACGGCTATGGTGT	CGGTGTGAGTCTGTCTCAGG
NDUFB5	GCATCCGATATCAAGATGGATCG	CTTTAACCGTAACTCAGCCTTTTCA
SDHB	CCCAGGAGGGCAAGCAA	GTACAGCCCGTCCAGCTTCT
CYC1	CAGCTACCCATGGTCTCATCGT	CACCTGCTTGTATACCTGGAAACC
ACOX1	GCCTGAGCTTCATGCCCTCA	ACCAGAGTTGGCCAGACTGC

PEX11A	CGGGACCGACTTTTCAGAGC	GTAATGGCGAGCCGCCACC
PEX11B	TAAGGAGGGAGCCAGGCTT	GCTTCAGCCCTGCCTAGGTA

3.19 Western blotting

O tecido adiposo retroperitoneal ou macrófagos diferenciados foram homogeneizados em tampão (50 mM Hepes-KOH pH 7,4, 40 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1,5 mM NaVO₄, 50 mM NaF, 10 mM NaPirofosfato, 10 mM Beta-glicerofosfato de sódio, 1% Triton 100X e inibidores de protease) e posteriormente centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min a 4°C. As proteínas do sobrenadante foram quantificadas pelo método do ácido bicinchonínico (BCA *Protein Assay*, *Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA*), e alíquotas contendo 30 µg de proteínas foram aquecidas a 95 °C por 5 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese em géis NuPAGE® Bis-Tris 4-12% (Invitrogen). A eletro transferência das proteínas do gel para a membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Após uma hora de bloqueio em leite livre de gordura a 5%, as membranas foram incubadas overnight com os anticorpos primários: NFκB total (#3987) e fosforilada p65 (S536; #3033s), PPARγ (#2443s), TFAM (#7495s), SCD1 (#2438s) (*Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA*) diluídos 1:1000 em leite 5% e GAPDH (#SC47724) (*Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA*) diluído 1:5000 em leite 5%. Após lavagem e incubação com anticorpo secundário (1:5000), as proteínas foram reveladas foi obtida por quimiluminescência utilizando um kit *ECL Western blotting Enhanced Chemiluminescence (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido)*. A luminescência gerada foi detectada por filme radiográfico.

3.20 Medidas séricas

A quantificação da insulina, leptina e adiponectina séricas foram determinadas por ELISA usando kits comerciais específicos para camundongo conforme recomendações do fabricante (Millipore, Billerica, MA, USA). Os níveis de ácidos graxos livres (WakoChemicals, Richmond, VA, USA), triacilgliceróis (TAG), colesterol e glicose foram determinados conforme orientações do fabricante (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

3.21 Atividade da enzima citrato sintase

Amostras de fígado (aproximadamente 100 mg) foram homogeneizadas em 500 µL de

tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,5). As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm (20817 g) a 4° C por 10 minutos e uma alíquota de 50 µL foi recolhida para dosagem de proteína. Preparar uma mistura de 400 µL de oxaloacetato 25 mM, 400 µL de 5', 5' - ditiobis (ácido 2-nitroenzóico) DTNB 10 mM, 400 µL de Acetil-CoA 5 mM, 20 µL Triton-X 100%, 18,8 mL tampão de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. O ensaio foi realizado em placa de 96 poços adicionando-se 2 µL de amostra e 198 µL da mistura reacional acima descrita. A redução do DTNB por citrato foi medida em espectrofotômetro em 412 nm, 30° C por 5 minutos (coeficiente de extinção do DTNB = $13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). A atividade da enzima foi expressa como mmol citrato/ minuto/ µg de proteína.

3.22 Análise estatística dos resultados

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Comparações entre os diferentes grupos experimentais foram realizadas por análise de variância (ANOVA) One-Way ou Two-Way, seguido do pós-teste de Tukey. Em alguns casos foi utilizado *teste t* de Student. O programa Prisma 5.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA) foi utilizado para realização das análises estatísticas. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

Como detalhado na Tabela 3, nos experimentos reportados nessa tese de doutorado foram utilizados três tipos diferentes de dieta: 1- dieta normolipídica (DN) que contém 10% de seu valor calórico oriundo de gordura; 2- dieta hiperlipídica (DH) que apresenta 60% de gordura oriunda de banha de porco; e 3- dieta DHN3 que apresenta 60% de gordura originada exclusivamente óleo de peixe. Na Tabela 2 apresentamos a composição de ácidos graxos das dietas utilizadas. Como pode ser observado, na DN há uma distribuição homogênea de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados n-6, enquanto na dieta DH há predominância (43%) de ácidos graxos mono-insaturados, seguido dos saturados (36%) e poli-insaturados n-6 (20%). Já a DHN3 é rica em ácidos graxos poli-insaturados n-3 (27%).

Tabela 3. Composição de ácidos graxos (mg/g) das dietas utilizadas no presente trabalho.

Ácidos graxos	TIPOS DE DIETA		
	DN	DH	DHN3
C14:0	nd	4 ± 0,2	23 ± 0,6
C14:1	nd	nd	nd
C15:0	nd	nd	2 ± 0,1
C16:0	5 ± 0,1	73 ± 6	60 ± 1,6
C16:1	nd	6 ± 0,4	27 ± 0,8
C17:0	5 ± 0,5	6 ± 0,1	7 ± 0,3
C17:1	nd	nd	1 ± 0,04
C18:0	2 ± 0,05	37 ± 2,9	12 ± 0,3
C18:1	10 ± 0,23	128 ± 9,8	38 ± 1
C18:1n-7	1 ± 0,01	7 ± 0,5	9 ± 0,3
C18:2n-6	11 ± 0,3	65 ± 5	21 ± 1,5
C18:3n-3	1 ± 0,04	4 ± 0,3	4 ± 0,2
C20:0	nd	1 ± 0,5	1 ± 0,02
C20:1n-9	nd	3 ± 0,2	4 ± 0,1
C20:2n-6	nd	2 ± 0,2	1 ± 0,1
C20:3n-6	nd	nd	1 ± 0,01
C20:4n-6	nd	nd	3 ± 0,02
C20:5n-3	nd	nd	47 ± 2
C22:0	nd	nd	1 ± 0,1
C22:1n-9	nd	nd	29 ± 0,7
C22:6n-3	nd	nd	2 ± 0,05
C24:1	nd	nd	nd
Somatório Saturados	12,8 ± 0,2 (37%)	120,6 ± 9 (36%)	106,3 ± 3 (36%)
Somatório Mono-insaturados	10,7 ± 0,2 (30%)	143,4 ± 11 (43%)	82,1 ± 2 (28%)
Somatório Poli-insaturados n-6	10,8 ± 0,3 (30%)	66,7 ± 5,2 (20%)	25,3 ± 1 (9%)
Somatório Poli-insaturados n-3	1 ± 0,1 (3%)	3,8 ± 0,3 (1%)	80,6 ± 2,5 (27%)
SOMATÓRIO	35 ± 1	334 ± 25	294 ± 8

Estudos atuais sobre a ação anti-inflamatória dos ácidos graxos n-3 fazem menção não somente ao DHA e EPA, mas às razões n-6/n-3, AA/n-3 e também aos metabólitos do DHA, conhecidos como HDHA, precursores de resolvinas, protectinas e maresinas. Nesse sentido realizamos, em camundongos CTL e *fat-1* tratados por oito semanas com DN ou DH, a dosagem sérica dos parâmetros acima mencionados. Como ilustrado na Figura 1, a ingestão de DH por camundongos CTL aumentou as razões n-6/n-3 e AA/n-3. Camundongos *fat-1*, entretanto, apresentaram menores razões n-6/n-3 e AA/n-3 quando alimentados com dieta DN e proteção parcial quanto ao aumento nestas razões induzidos pela DH. Em relação aos derivados de DHA (HDHA), camundongos *fat-1* alimentados com DN possuem níveis circulantes elevados de 9-, 10-, 13-, 14-, 16- e 17- mas não 4-HDHA em comparação aos CTL, diferenças estas que foram abolidas após ingestão de DH.

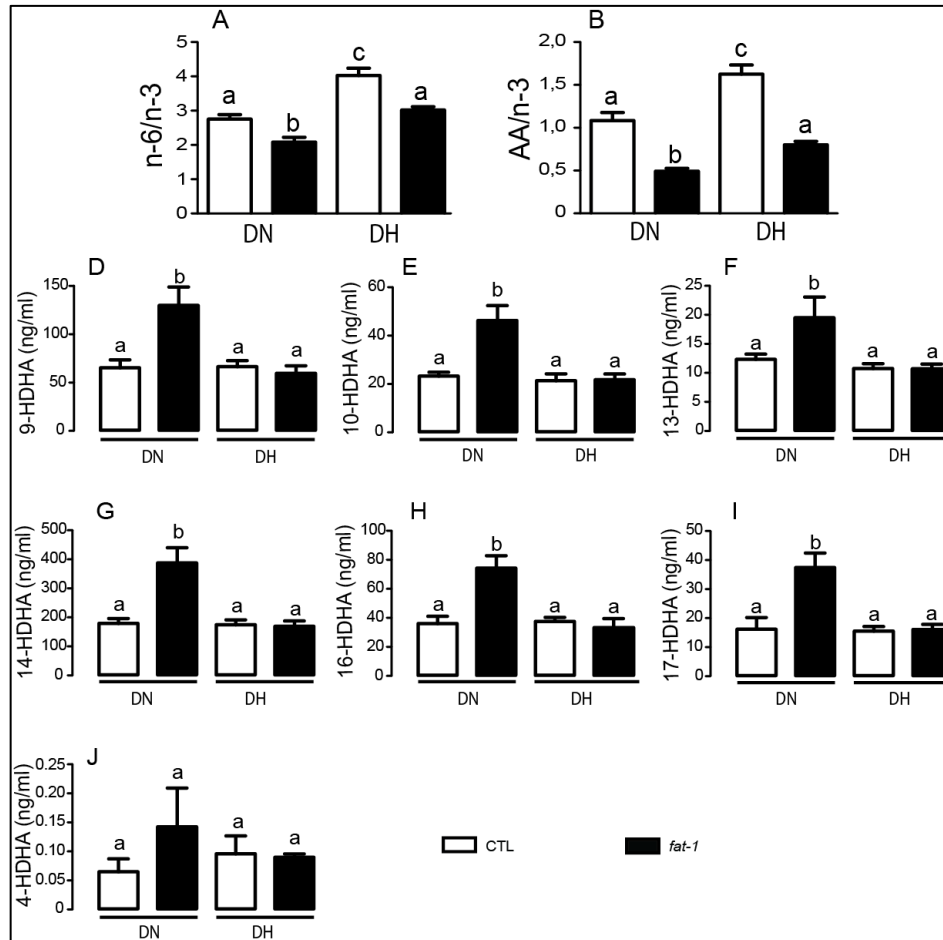


Figura 1. Análise em soro das razões n-6/n-3 (A) e AA/n-3 (B) e dos metabólitos de DHA: 9-HDHA (C), 10-HDHA (D), 13-HDHA (E), 14-HDHA (F), 16-HDHA (G), 17-HDHA (H) e 4-HDHA (I) de camundongos CTL e *fat-1* tratados com dieta normo (DN) ou hiperlipídica (DH) por 8 semanas. Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 4 a 5 camundongos/grupo). n-6 (C18:2; C20:2; C20:3 C20:4)/ n-3 (C18:3; C20:3; C20:5; C22:6). Ácido araquidônico (AA, C20:4 n-6)/ n-3 (C18:3; C20:3; C20:5; C22:6). Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05).

Na figura 2, observa-se que, apesar de ingestão calórica menor, a DH aumentou o peso corporal e a eficiência energética dos camundongos selvagens. Camundongos *fat-1*, contudo, foram parcialmente protegidos do aumento de ganho de peso induzido pela DH (Figura 2A) devido a uma menor eficiência energética (Figura 2C). Ainda, camundongos CTL e *fat-1* tratados com DN não diferem quanto ao ganho de peso, ingestão calórica e eficiência energética.

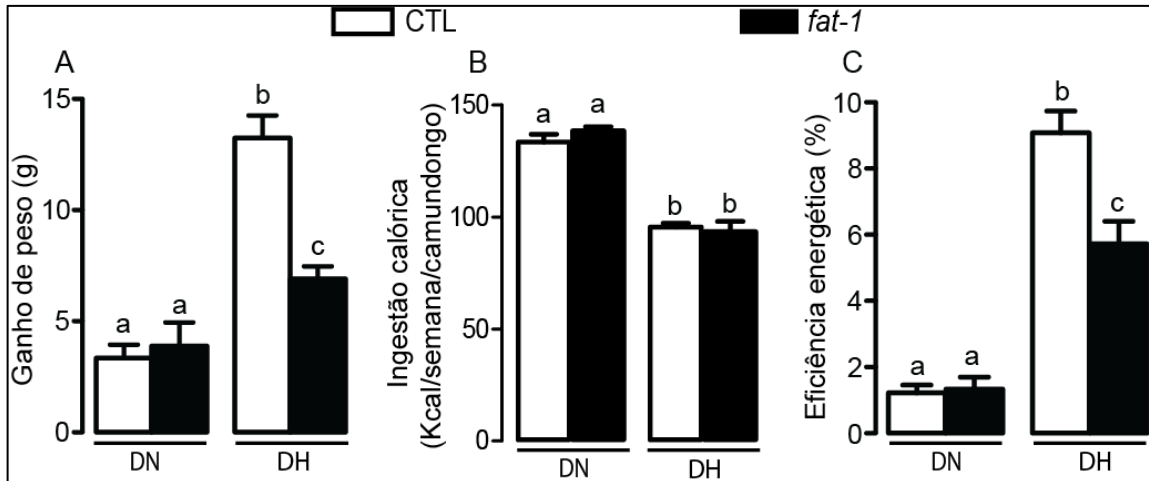


Figura 2. Ganho de peso (A), ingestão calórica (B) e eficiência energética (C) de camundongos CTL e *fat-1* tratados com dieta normo (DN) ou hiperlipídica (DH) por 8 semanas. Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 4 a 5 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Corroborando o menor ganho de peso e eficiência energética, camundongos *fat-1* tratados com DH apresentaram maior gasto energético como evidenciado pelo maior consumo de oxigênio (Figura 3A). O aumento do consumo de oxigênio em animais *fat-1* está em parte associado a uma maior atividade locomotora noturna e quociente respiratório (Figura 3B e C).

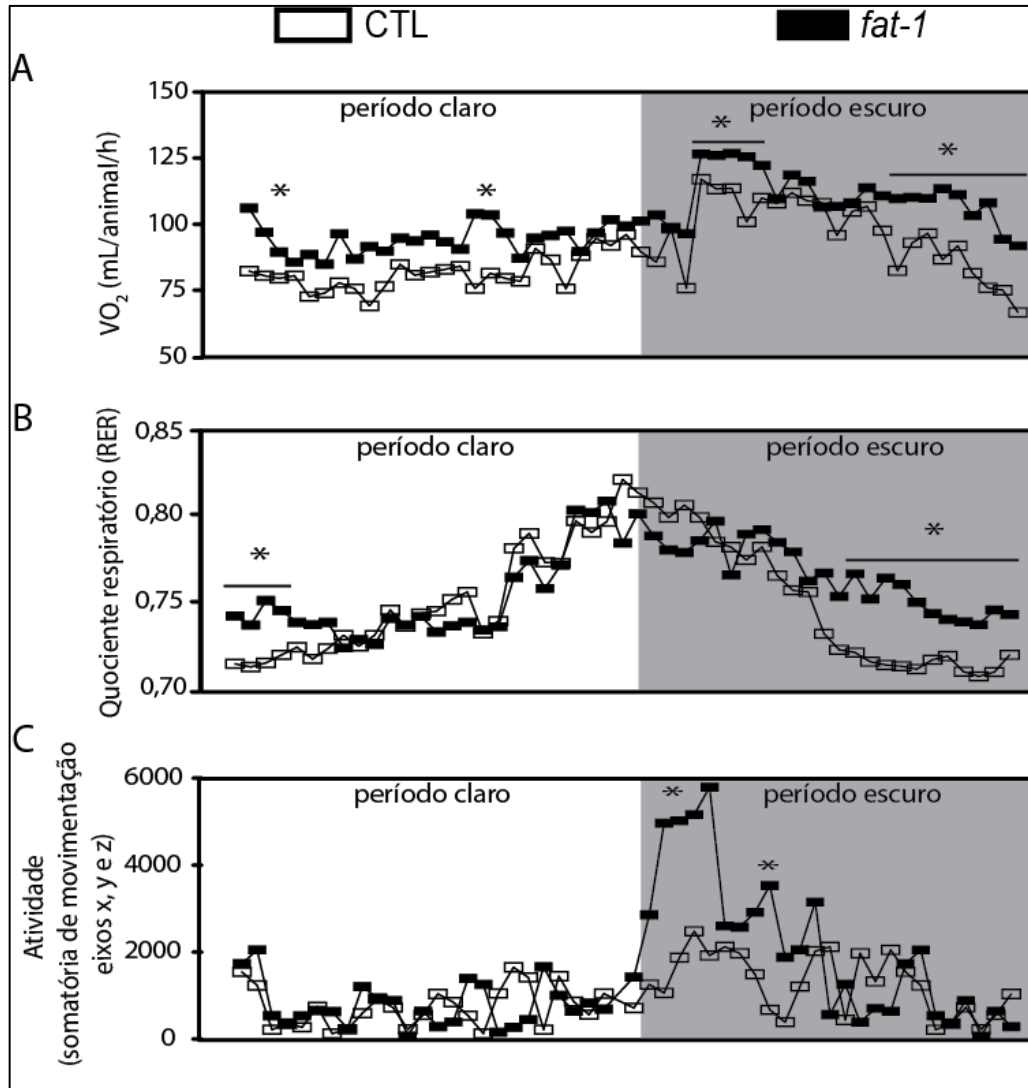


Figura 3. Consumo de oxigênio (A), Quociente respiratório (RER) (B) e atividade locomotora (C) de camundongos CTL e *fat-1* tratados com dieta hiperlipídica por 8 semanas. Dados estão apresentados como média (n= 4 camundongos/grupo). Diferenças estatísticas pontuais foram assinaladas com * ($p < 0,05$).

Ao término da 8ª semana de tratamento, a eutanásia foi realizada e os depósitos de tecido adiposo coletados. Como ilustrado na Figura 4, a ingestão de DH aumentou significativamente a massa dos tecidos adiposos viscerais epididimal (Figura 4A) e retroperitoneal (Figura 4B), do subcutâneo inguinal (Figura 4C) e do tecido adiposo marrom (Figura 4D). Entretanto os camundongos *fat-1* tratados com DH não desenvolveram o aumento de massa adiposa observado nos camundongos CTL. Corroborando a adiposidade, a ingestão de DH aumentou o diâmetro dos adipócitos nos animais CTL, mas não nos *fat-1* (Figura 4F). Não houve, entretanto, alterações significativas no número de adipócitos dos depósitos de gordura entre os grupos (Figura 4E).

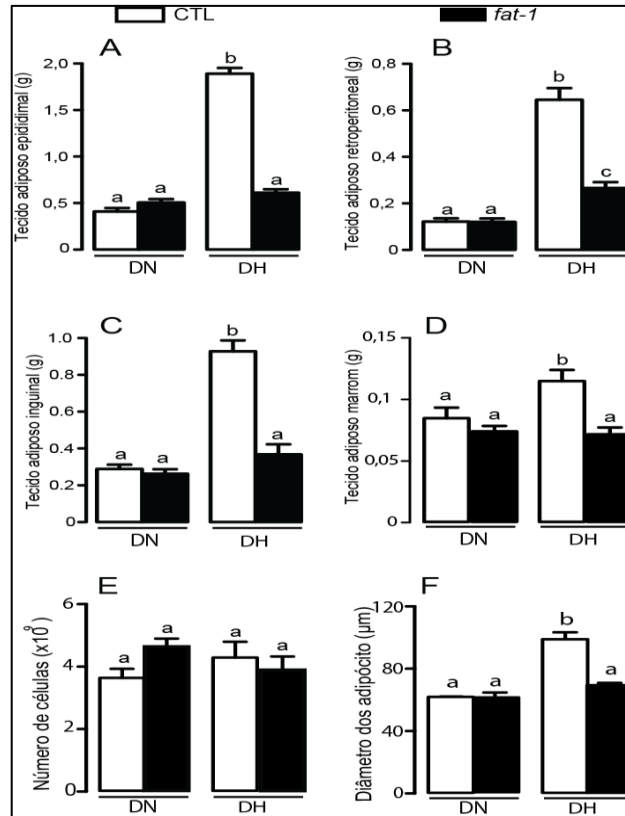


Figura 4. Peso dos tecidos adiposos epididimal (A), retroperitoneal (B), inguinal (C) e marrom (D), número de adipócitos (E) e diâmetro de adipócitos do tecido adiposo epididimal de camundongos CTL e *fat-1* tratados com dieta normo (DN) ou hiperlipídica (DH) por 8 semanas. Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 4 a 5 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05).

Sabidamente o aumento de peso devido à ingestão excessiva de gordura provoca um descontrole da homeostase da glicose. Como ferramenta para mensurar tal problema, realizamos o teste de tolerância à glicose nos animais CTL e *fat-1* alimentados com ambas as dietas, DN e DH. Como ilustrado na Figura 5A e B, a dieta hiperlipídica induziu intolerância a glicose nos animais CTL, mas não nos *fat-1*, como evidenciado pela curva de glicemia obtida durante teste e área sob a curva. Não foram observadas diferenças na tolerância à glicose entre camundongos CTL e *fat-1* tratados com DN e na insulinemia durante o GTT entre os grupos (Figura 5C).

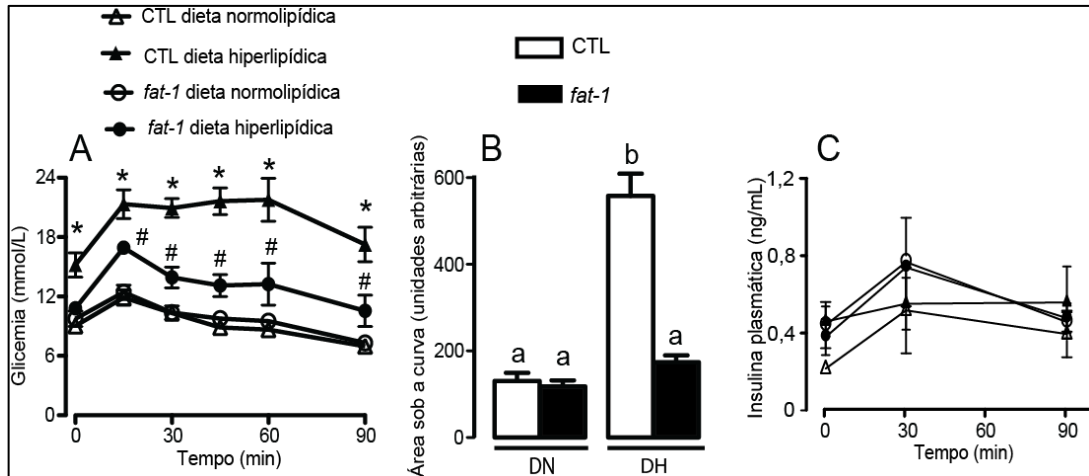


Figura 5. Curva glicêmica (A), área sob a curva (B) e insulina plasmática (C) realizadas na 6^a semana de protocolo em camundongos CTL e *fat-1* tratados com dieta normo (DN) ou hiperlipídica (DH). Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 4 a 5 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Como o músculo esquelético contribui significativamente para o clearance pós-prandial e homeostase da glicose, nós investigamos a participação deste tecido nas alterações de tolerância a glicose apresentada pelos diferentes grupos. Para isso, o músculo sóleo dos camundongos CTL e *fat-1* tratados com ambas as dietas DN e DH por 8 semanas foi isolado e avaliado para a captação de glicose *ex vivo*, bem como a incorporação da mesma em glicogênio. Como ilustrado na Figura 6A e B, em condições basais não há diferença de captação muscular de glicose entre os grupos. Após estímulo com insulina, entretanto, houve aumento de captação de glicose nos grupos tratados com DN e no grupo *fat-1* tratado com DH, efeito este que foi significativamente menor em animais CTL tratados com DH, que se mostraram resistentes à ação da insulina. Similar a captação, em condições basais não estimuladas, não houve diferenças na incorporação de glicose em glicogênio entre os grupos. O tratamento com insulina, entretanto, aumentou significativamente a incorporação de glicose em glicogênio em animais CTL e *fat-1* tratados com DN e *fat-1* tratado com DH, mas não nos animais CTL tratados com DH.

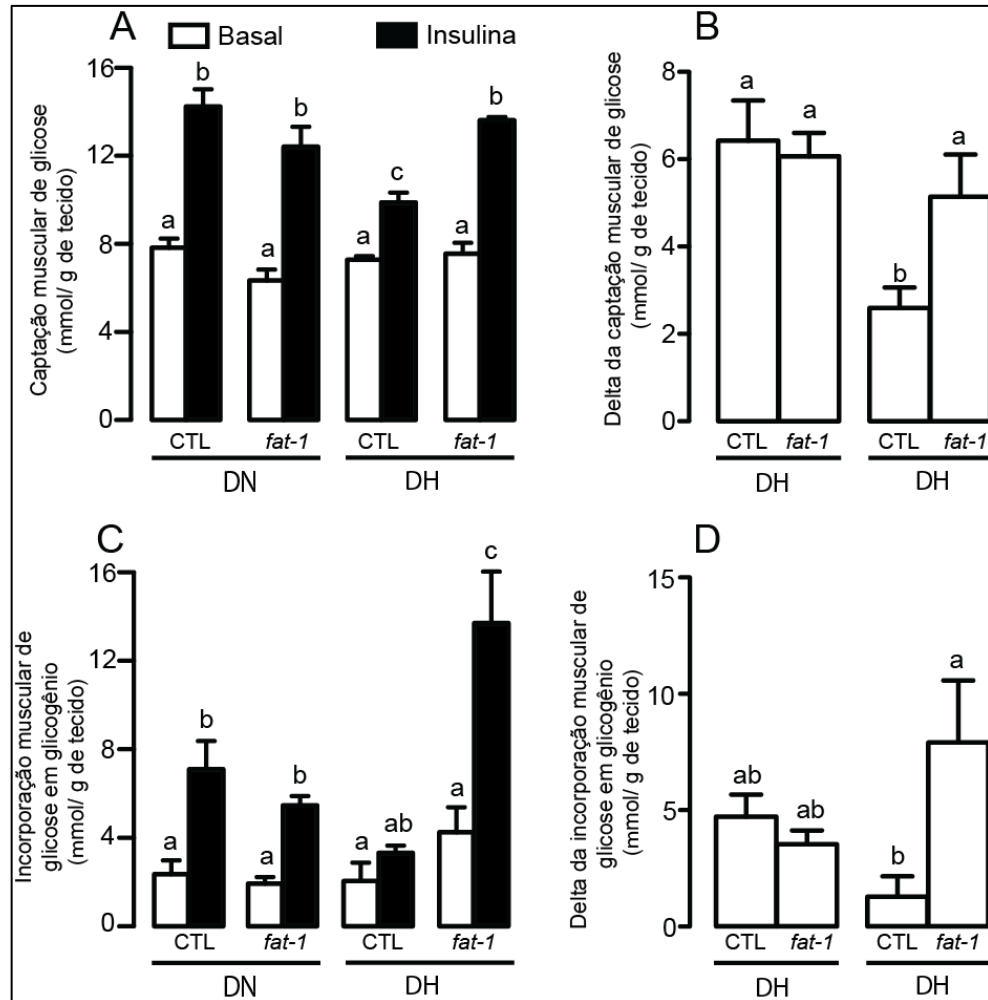


Figura 6. Captação muscular de glicose (A), delta da captação de glicose (B), incorporação muscular de glicose em glicogênio (C) delta da incorporação em glicogênio (D) de camundongos CTL e *fat-1* tratados com dieta normo (DN) ou hiperlipídica (DH) por 8 semanas. As análises foram realizadas em músculo sóleo isolado. Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 4 a 5 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Na Tabela 3, estão apresentados parâmetros plasmáticos e de composição corporal de camundongos CTL e *fat-1* após tratamento com DN e DH. Em camundongos CTL, a ingestão de DH aumentou o peso do fígado e os níveis circulantes em jejum de colesterol, glicose, insulina e leptina e diminuiu os níveis de adiponectina. Dentre estas ações da DH, camundongos *fat-1* foram protegidos totalmente do aumento do peso do fígado e da glicemia de jejum e parcialmente do aumento e da leptina circulante. Em nenhum dos parâmetros mostrados na tabela 3 houve diferença entre ambos os grupos tratados com DN.

Tabela 3. Parâmetros séricos e peso de tecidos de camundongos controle (CTL) e *fat-1* alimentados com dieta normolipídica ou hiperlipídica por 8 semanas.

	Dieta normolipídica (DN)		Dieta hiperlipídica (DH)	
	CTL	<i>fat-1</i>	CTL	<i>fat-1</i>
Fígado (mg)	950 ± 58 ^a	1118 ± 72 ^{ab}	1160 ± 52 ^b	968 ± 33 ^a
Triacilglicerol (mM)	0,61 ± 0,1 ^a	0,80 ± 0,1 ^a	0,61 ± 0,1 ^a	0,63 ± 0,1 ^a
Colesterol (mM)	3,22 ± 0,5 ^a	3,84 ± 0,3 ^{ab}	5,03 ± 0,3 ^b	3,74 ± 0,5 ^{ab}
Ácidos graxos livres (μM)	39 ± 1 ^a	37 ± 5 ^a	44 ± 3 ^a	38 ± 6 ^a
Glicose (mM)	7,93 ± 0,8 ^a	9,87 ± 0,7 ^a	12,3 ± 0,8 ^b	8,26 ± 0,3 ^a
Insulina (pM)	72,6 ± 31 ^a	58,8 ± 17 ^a	148 ± 35 ^b	150 ± 35 ^b
Leptina (ng/mL)	1,70 ± 1,1 ^a	1,44 ± 0,7 ^a	8,77 ± 1,7 ^b	3,16 ± 0,4 ^c
Adiponectina (μg/mL)	6,06 ± 2,2 ^a	6,10 ± 1,3 ^a	3,07 ± 0,8 ^b	2,90 ± 0,4 ^b

Os valores foram expressos como média ± erro padrão (n=5). Letras diferentes em sobrescrito indicam diferença estatística ($p \leq 0.05$).

Como a obesidade está associada ao desenvolvimento de processo inflamatório no tecido adiposo, nós investigamos posteriormente se, similarmente ao ganho de peso, camundongos *fat-1* estavam protegidos também da inflamação induzida pela DH. Como ilustrado na Figura 7, o tratamento de camundongos CTL com DH aumentou o conteúdo de macrófagos totais (células F4/80+) e macrófagos com fenótipo pró-inflamatório M1 (células F4/80+ e CD11c+), não alterou o conteúdo de macrófago M2 (células F4/80+ e CD206+) e reduziu o conteúdo de linfócitos T regulatórios (CD4+, CD25+ e FOXP3+) na fração estroma-vascular do tecido adiposo. Camundongos *fat-1* apresentaram menor conteúdo de macrófagos totais e com fenótipo M1, maior conteúdo de macrófagos M2 e linfócitos T regulatórios que CTL após ingestão de DN e foram protegidos totalmente do aumento do conteúdo de macrófagos totais (células F4/80+) e parcialmente do aumento de macrófagos com fenótipo M1 (células F4/80+ e CD11c+), mas não da redução de linfócitos T regulatórios induzidos pela DH (Figura 7C e D).

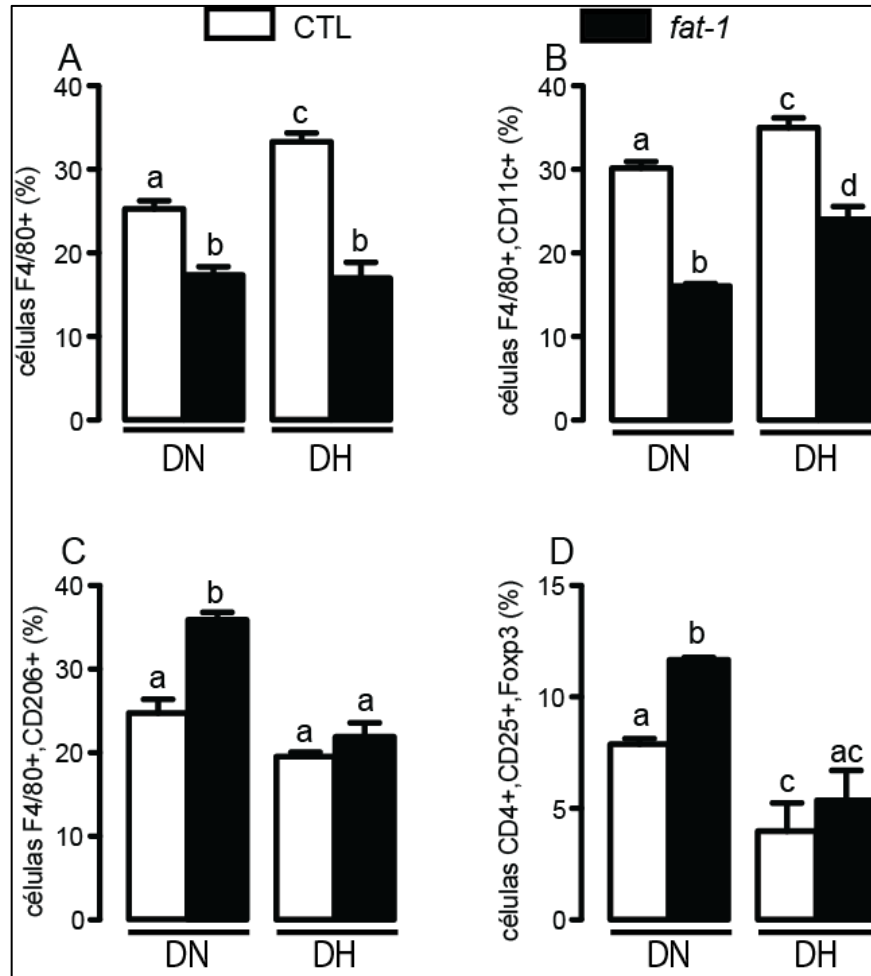


Figura 7. Análise do perfil leucocitário infiltrado no tecido adiposo epididimal. Macrófagos (F4/80+) (A), macrófagos de fenótipo M1 (células F4/80+ e CD11c+) (B), macrófagos de fenótipo M2 (células F4/80+ e CD206+) (C) e linfócitos T regulatórios (CD4+, CD25+, Foxp3+) (D) de camundongos CTL e *fat-1* tratados com dieta normo (DN) ou hiperlipídica (DH) por 8 semanas. Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 4 a 5 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Corroborando a análise de leucócitos da fração estroma vascular, a ingestão de DH induziu no tecido adiposo um aumento significativo no conteúdo do fator de transcrição NF κ B fosforilado (Figura 8A e B), efeito este que foi completamente abolido em camundongos *fat-1*. Além disso, verificamos também que camundongos *fat-1* apresentaram no tecido adiposo uma forte tendência ($p=0,011$ e $0,07$, respectivamente) de aumento do conteúdo de PPAR γ 1 e 2, um fator de transcrição que quando ativado exerce ações anti-inflamatórias. Não foi verificada diferenças estatísticas entre CTL e *fat-1* tratados com DN.

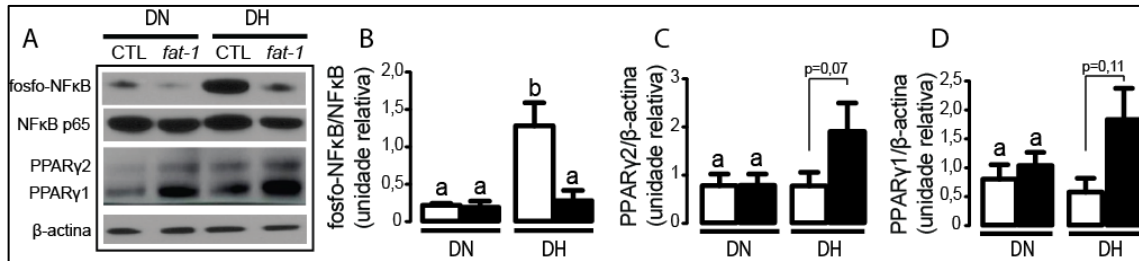


Figura 8. Análise da expressão proteica de tecido adiposo epididimal. Figura representativa da expressão proteica de fosfo-NFκB, NFκB, PPARγ2, PPARγ1 e β-actina (A), quantificação da razão fosfo-NFκB/NFκB (B), quantificação PPARγ2 (C) e quantificação de PPARγ1 de camundongos CTL e *fat-1* tratados com dieta normo (DN) ou hiperlipídica (DH) por 8 semanas. Dados estão apresentados como média ± SEM (n= 4 a 5 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05).

Devido à maior expressão de PPARγ, um fator de transcrição que pode ser ativado por ácidos graxos insaturados de cadeia longa como o n-3, foi proposta a hipótese que a proteção apresentada por camundongos *fat-1* contra a obesidade, intolerância à glicose e inflamação induzida pela ingestão de DH poderia ser em parte mediada pela ativação deste receptor pelos ácidos graxos n-3. Para testar esta hipótese, camundongos CTL e *fat-1* foram alimentados com DH contendo ou não um antagonista de PPARγ denominado GW9662. A inibição farmacológica de PPARγ não alterou as razões séricas de n-6/n3 e AA/n-3 (Figura 9A e B). Contudo, quando os metabólitos de DHA, precursores de protectinas, resolvinas e maresinas foram analisados, verificou-se que os níveis circulantes de 17-HDHA (Figura 9A) e 14-HDHA (Figura 9B) estavam diminuídos em camundongos *fat-1* tratados com DH+GW9662.

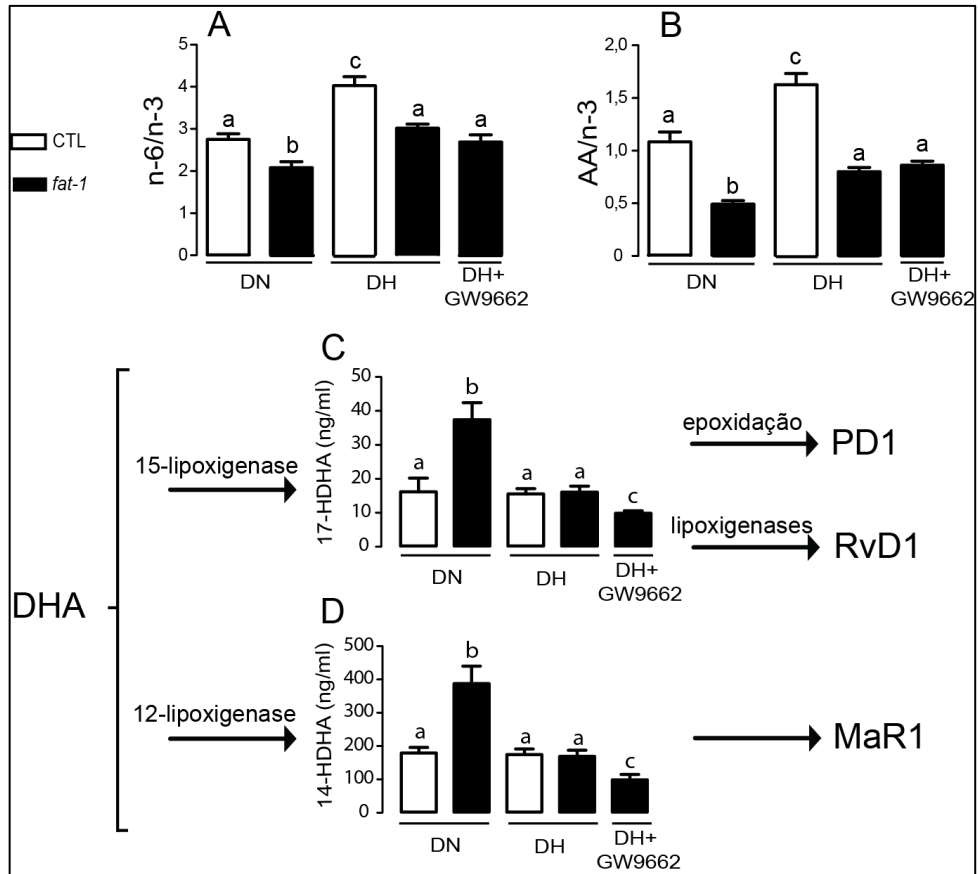


Figura 9. Análise da razão n-6/n-3, AA/n-3 e dos metabólitos séricos de DHA: 17-HDHA (A) e 14-HDHA (B) de camundongos CTL e *fat-1* tratados com dieta normolipídica, hiperlipídica ou hiperlipídica adicionado de GW9662 (0,1% p/p) (DH + GW9662) por 8 semanas. Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 4 a 5 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05).

O antagonismo farmacológico de PPAR γ diminuiu o ganho de peso e eficiência energética em camundongos CTL, mas não em *fat-1*, alimentados com dieta DH. A adição de GW9662 à DH não alterou a ingestão calórica (Figura 10).

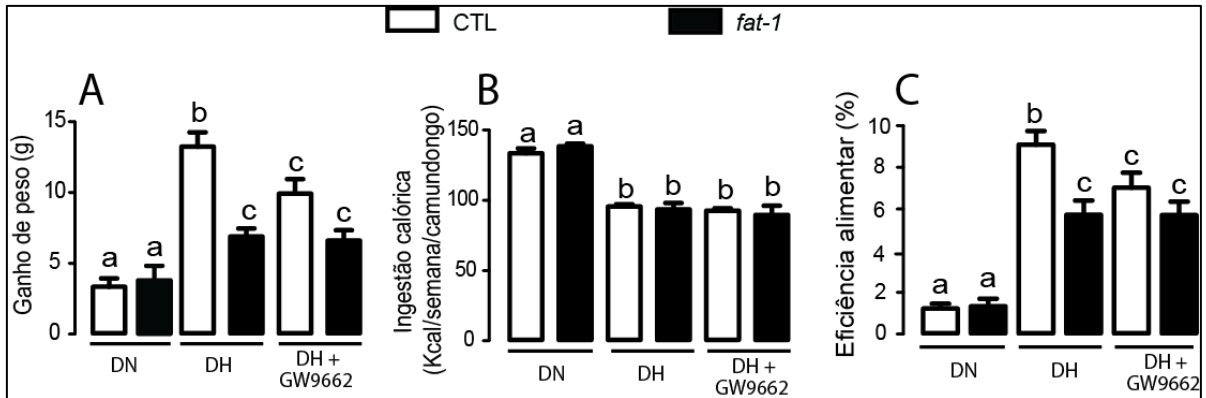


Figura 10. Ganho de peso (A), ingestão calórica (B) e eficiência energética (C) de camundongos CTL e *fat-1* tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica adicionado de GW9662 (0,1% p/p) (DH + GW9662) por 8 semanas. Os dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 4 a 5 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05).

Corroborando as alterações de peso corporal, a inibição farmacológica de PPAR γ reduziu a massa dos tecidos adiposos epididimal (Figura 11A), retroperitoneal (Figura 11B), inguinal (Figura 11C) e marrom (Figura 11D) em camundongos CTL, mas não em *fat-1*.

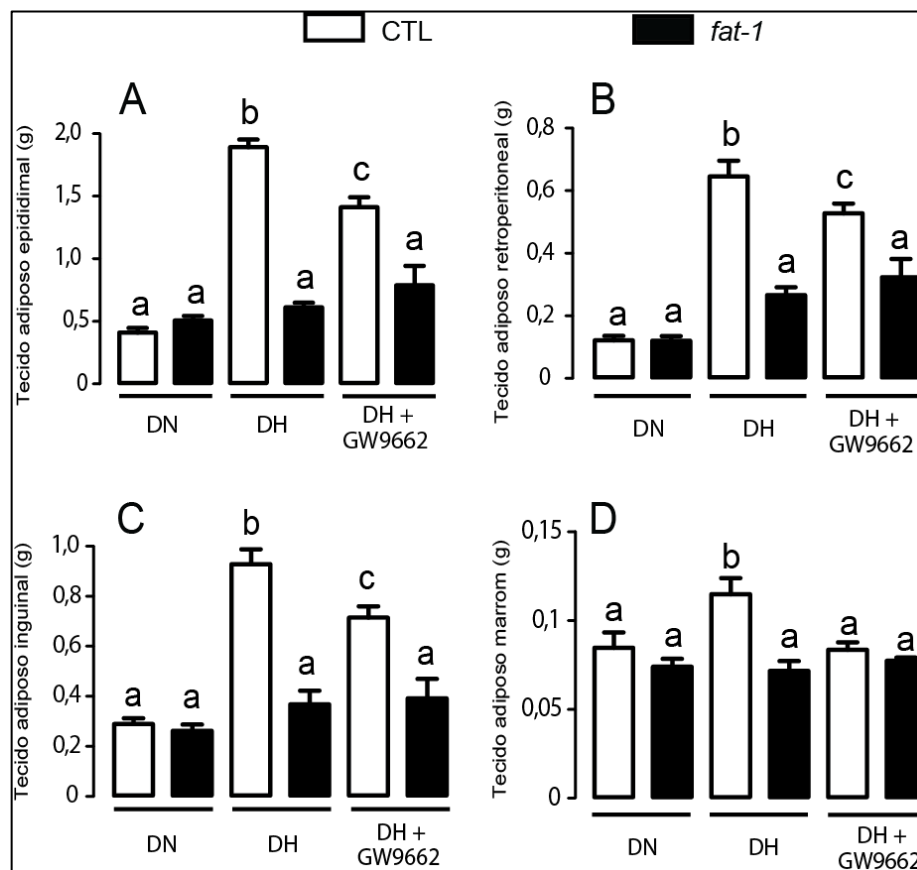


Figura 11. Peso dos tecidos adiposos epididimal (A), retroperitoneal (B), inguinal (C) e marrom (D) de camundongos CTL e *fat-1* tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica adicionado de GW9662 (0,1% p/p) (DH + GW9662) por 8 semanas. Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 4 a 5 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05).

Similarmente a massa de tecido adiposo, a inibição farmacológica de PPAR γ reduziu o diâmetro dos adipócitos epididimais em camundongos CTL, mas não *fat-1* (Figura 12A e B).

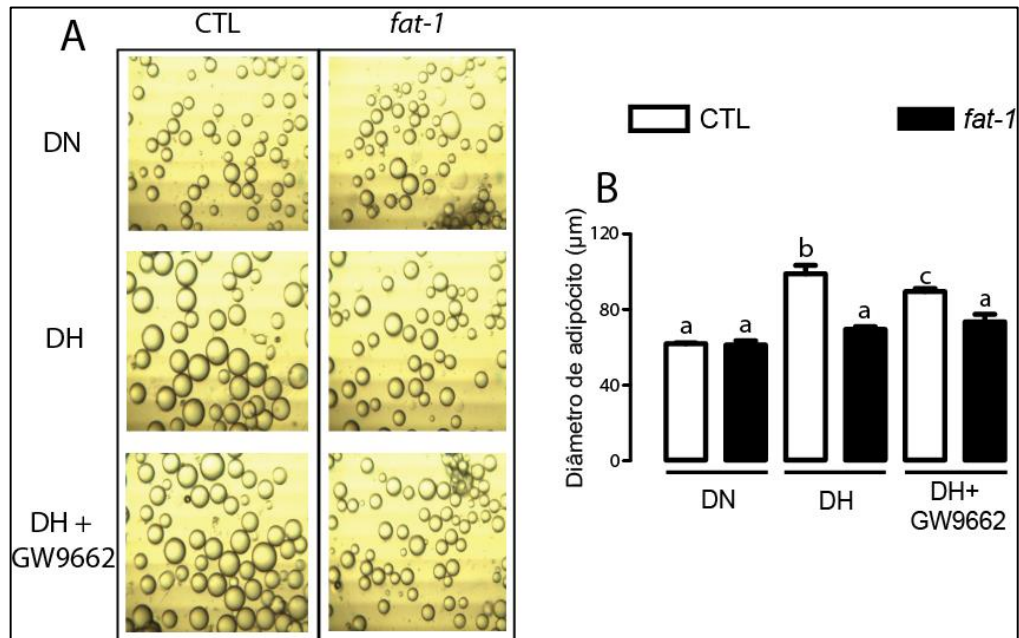


Figura 12. Fotografias representativas dos adipócitos (A) e diâmetro dos adipócitos (B) de camundongos CTL e *fat-1* tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica adicionado de GW9662 (0,1% p/p) (DH + GW9662) por 8 semanas. Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 4 a 5 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Em seguida, nós investigamos a possível participação de PPAR γ nas ações protetoras dos ácidos graxos n-3 contra a intolerância à glicose induzida pela DH. Como ilustrado na Figura 13A e B, a inibição farmacológica de PPAR γ aboliu a proteção apresentada por camundongos *fat-1* contra o desenvolvimento da intolerância à glicose induzida pela ingestão de DH. Isto pode ser evidenciado pela curva de glicemia e área sob a curva no teste de tolerância à glicose e níveis de glicemia de animais *fat-1* tratados com GW9662 similares a animais CTL alimentados com DH. Apesar de reduzir a tolerância à glicose e aumentar a glicemia de jejum, a inibição farmacológica de PPAR γ não induziu alterações significativas na insulinemia de animais *fat-1* (Figura 13D).

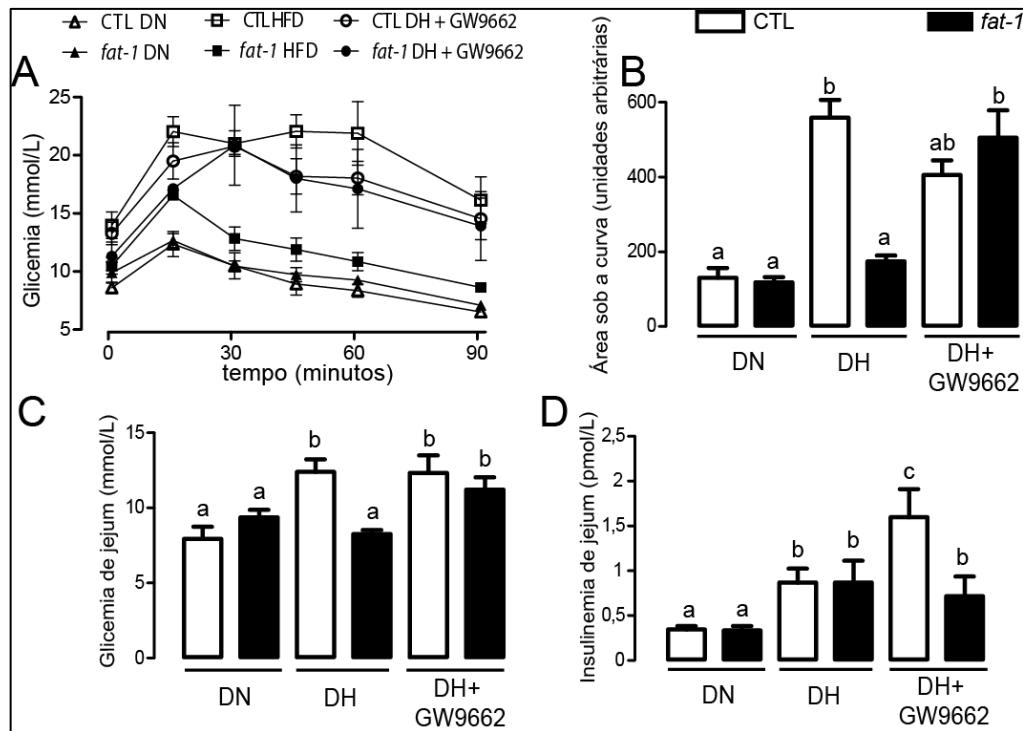


Figura 13. Curva glicêmica (A), área sob a curva (B), glicemia de jejum (C) e insulinemia de jejum (D) realizadas na 6ª semana de protocolo em camundongos CTL e *fat-1* tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica adicionado de GW9662 (0,1% p/p) (DH + GW9662) por 8 semanas. Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 4 a 5 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Finalmente, avaliamos se as ações protetoras dos n-3 sobre a infiltração leucocitária e inflamação do tecido adiposo induzido pela ingestão de DH foram mediadas por PPAR γ . O tratamento de camundongos *fat-1* com GW9662, apesar de não alterar a porcentagem de macrófagos totais (Figura 14A) e macrófagos M1 (Figura 14B), aumentou a porcentagem de macrófagos M2 (Figura 14C) na fração estroma-vascular do tecido adiposo. Já em animais CTL, o antagonismo de PPAR γ promoveu diminuição da porcentagem de macrófagos totais (Figura 14A) e macrófagos M1 (Figura 14B) e aumento de macrófagos M2 (Figura 14C).

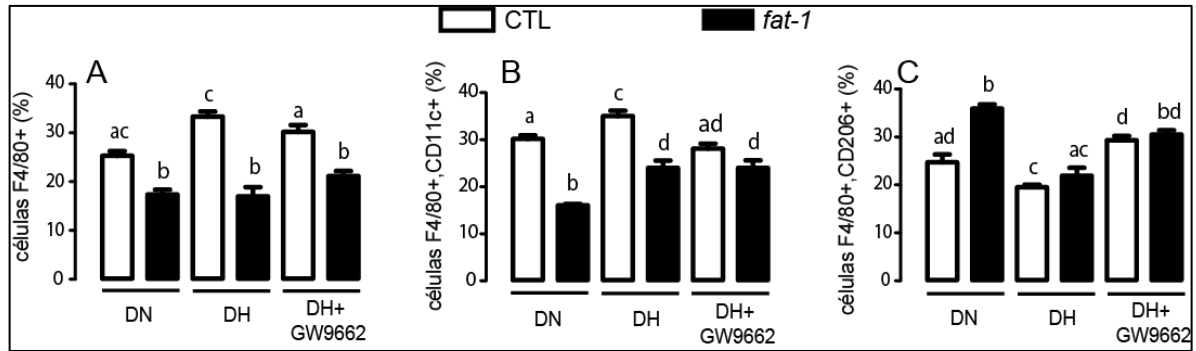


Figura 14. Análise do perfil leucocitário infiltrado no tecido adiposo epididimal. Macrófagos (F4/80+) (A), macrófagos de fenótipo M1 (células F4/80+ e CD11c+) (B) e macrófagos de fenótipo M2 (células F4/80+ e CD206+) (C) de camundongos CTL e *fat-1* tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica adicionado de GW9662 (0,1% p/p) (DH + GW9662) por 8 semanas. Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 4 a 5 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05).

Os dados obtidos com a inibição farmacológica de PPAR γ indicam que as ações benéficas dos n-3 de proteção contra o desenvolvimento da intolerância a glicose associada a obesidade envolvem a participação deste receptor nuclear. Com o objetivo de aprofundarmos nosso conhecimento dos mecanismos envolvidos nestas ações, nós realizamos diversos experimentos, onde camundongos geneticamente modificados que apresentam deleção de PPAR γ em células mielóides foram alimentados com dieta rica em n-3 denominada de DHN3. Como ilustrado na Figura 15, camundongos homocigotos para PPAR γ flox positivos para a enzima lisozima M-Cre recombinase denominados de Lyz^M -PPAR γ^{KO} apresentaram uma redução significativa de aproximadamente 75% nos níveis de mRNA e conteúdo proteico de PPAR γ em macrófagos derivados de medula óssea quando comparados aos animais homocigotos para PPAR γ flox negativos para a enzima lisozima M Cre recombinase denominados de Lyz^M -PPAR γ^{WT} .

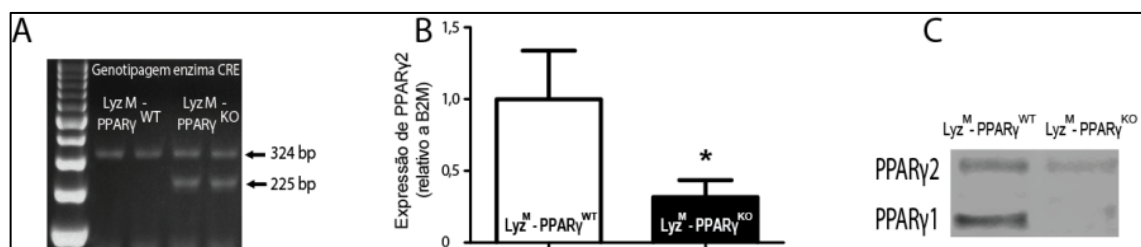


Figura 15. Gel de agarose para genotipagem da enzima CRE recombinase com DNA extraído da cauda (A), expressão gênica relativa de PPAR $\gamma 2$ (B) e expressão protéica de PPAR $\gamma 2$ e PPAR $\gamma 1$ (C) em macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongos Lyz^M -PPAR γ^{WT} e Lyz^M -PPAR γ^{KO} . No painel A, banda de 225 pares de base refere-se a enzima Cre recombinase, enquanto a banda de 324 pares de base ao controle positivo. Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 6 camundongos/grupo). *indica diferença estatística (p<0,05).

Como esperado, a ingestão de DH aumentou o ganho de peso e eficiência energética, efeitos estes que foram significativamente maiores em camundongos $Lyz^M-PPAR\gamma^{KO}$ que $Lyz^M-PPAR\gamma^{WT}$. Apesar de isocalórica em comparação a DH, a ingestão de DHN3 promoveu, independentemente do genótipo dos camundongos, ganho de peso corpóreo e eficiência energética significativamente menores que a dieta DH, mas similares ao encontrado com DN. Contudo a ingestão calórica nos grupos DH e DHN3 foi estatisticamente menor que a observada nos grupos DN (Figura 16).

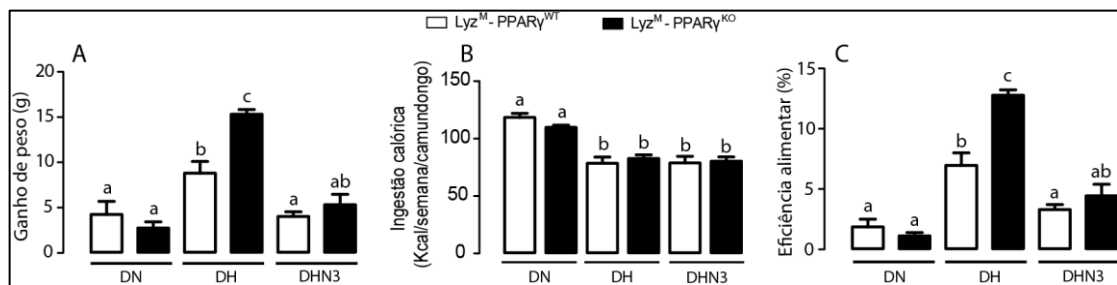


Figura 16. Ganho de peso (A), ingestão calórica (B) e eficiência energética (C) de camundongos $Lyz^M-PPAR\gamma^{WT}$ e $Lyz^M-PPAR\gamma^{KO}$ tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica rica em n-3 (DHN3) por 8 semanas. Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 4 a 5 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Corroborando o peso corpóreo, a ingestão de dieta DH induziu aumento na massa dos depósitos de tecido adiposo retroperitoneal, epididimal, inguinal e marrom, efeito este que foi significativamente maior em camundongos $Lyz^M-PPAR\gamma^{KO}$ que $Lyz^M-PPAR\gamma^{WT}$ (Figura 17 A-D). Contudo, a ingestão de DHN3, independentemente do genótipo dos camundongos, não produziu alteração significativa na massa adiposa em comparação a ingestão de DN. Como complemento ao entendimento das ações dos n-3 na diminuição da massa adiposa, pesou-se o fígado desses animais e foi possível notar que a DNH3, independentemente do genótipo dos camundongos, causou hipertrofia desse órgão (Figura 17E).

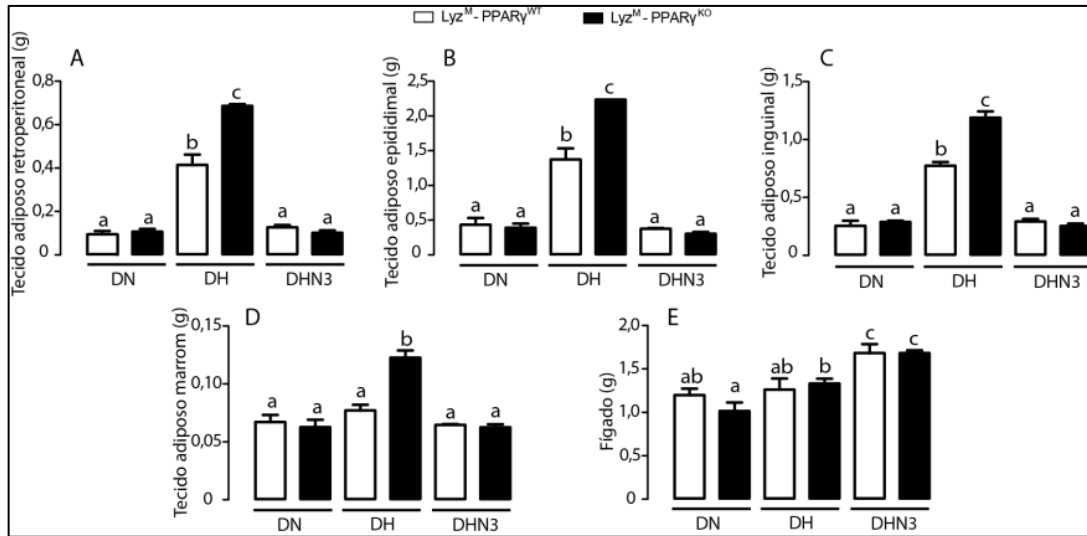


Figura 17. Peso dos tecidos adiposos retroperitoneal (A), epididimal (B), inguinal (C) e marrom (D) além do peso do fígado (E) de camundongos $Lyz^M-PPAR\gamma^{WT}$ e $Lyz^M-PPAR\gamma^{KO}$ tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica rica em n-3 (DHN3) por 8 semanas. Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 4 a 5 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Em relação à homeostase de glicose, como esperado, não houve diferença entre os grupos tratados com DN e a ingestão de DH promoveu intolerância à glicose independentemente do genótipo dos camundongos, porém esse efeito foi exacerbado em camundongos $Lyz^M-PPAR\gamma^{KO}$. Em contraste a DH, camundongos $Lyz^M-PPAR\gamma^{WT}$ e $Lyz^M-PPAR\gamma^{KO}$ alimentados com DHN3 não apresentaram alterações significativas na tolerância a glicose (Figura 18A e B), ou seja, aparentemente a deficiência de $PPAR\gamma$ de células mielóides não interfere com as ações benéficas n-3 no metabolismo de glicose.

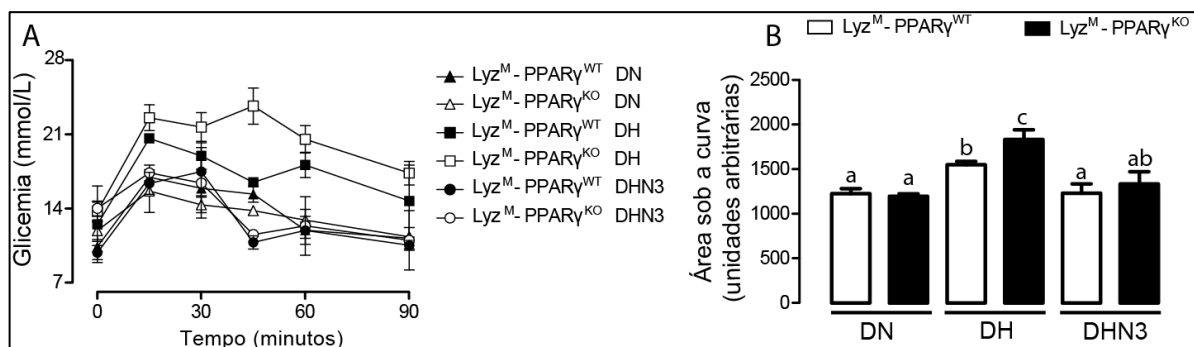


Figura 18. Curva glicêmica (A) e área sob a curva (B) realizadas na 6ª semana de protocolo de camundongos $Lyz^M-PPAR\gamma^{WT}$ e $Lyz^M-PPAR\gamma^{KO}$ tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica rica em n-3 (DHN3) por 8 semanas. Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 4 a 5 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

O infiltrado leucocitário em tecido adiposo epididimal foi analisado na Figura 19 podendo-se observar que não houve alteração da porcentagem de macrófagos M2 (células F4/80+, CD11b+, CD206+) (Figura 19B). Contudo a ingestão de DHN3 causou redução da porcentagem de macrófagos de fenótipo M1 (células F4/80+, CD11b+, CD86+) (Figura 19A).

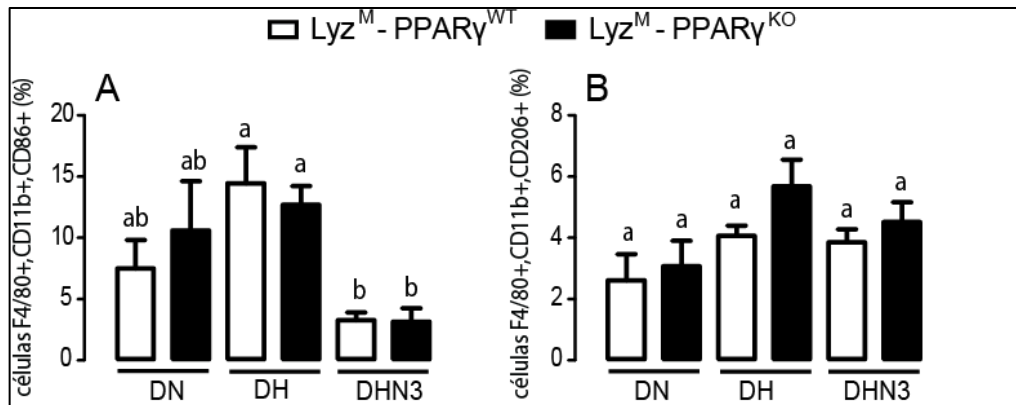


Figura 19. Análise do perfil leucocitário infiltrado no tecido adiposo epididimal. Macrófagos de fenótipo M1 (células F4/80+, CD11b+ e CD86c+) (A) e macrófagos de fenótipo M2 (células F4/80+, CD11b+ e CD206+) (B) de camundongos $Lyz^M-PPAR\gamma^{WT}$ e $Lyz^M-PPAR\gamma^{KO}$ tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica rica em n-3 (DHN3) por 8 semanas. Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 4 a 5 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05).

Além da deleção de $PPAR\gamma$ em células mielóides, nós investigamos também a possível participação de $PPAR\gamma$ de hepatócitos nas ações protetoras do n-3 contra o desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina. Para isto, camundongos com deficiência de $PPAR\gamma$ em hepatócitos ($PPAR\gamma$ flox homozigoto, albumina Cre positivos, $Alb^H-PPAR\gamma^{KO}$) e controles ($PPAR\gamma$ flox homozigoto, albumina Cre negativos $Alb^H-PPAR\gamma^{WT}$) (Figura 20A). Esses animais foram submetidos ao tratamento por oito semanas com DN, DH ou DHN3. Como esperado, os níveis de RNA mensageiro de $PPAR\gamma 2$ estão diminuídos nos camundongos $Alb^H-PPAR\gamma^{KO}$ (Figura 20B). A ingestão de DH induziu, independentemente do genótipo dos camundongos, um aumento no ganho de peso e eficiência energética em comparação aos camundongos alimentados com DN e DHN3. Não houve diferença de ganho de peso corpóreo e eficiência energética entre camundongos $Alb^H-PPAR\gamma^{WT}$ e $Alb^H-PPAR\gamma^{KO}$ alimentados com DN e DHN3 (Figura 20C e D). Apesar do consumo calórico dos animais dos grupos DH e DHN3 ter sido menor (Figura 20B).

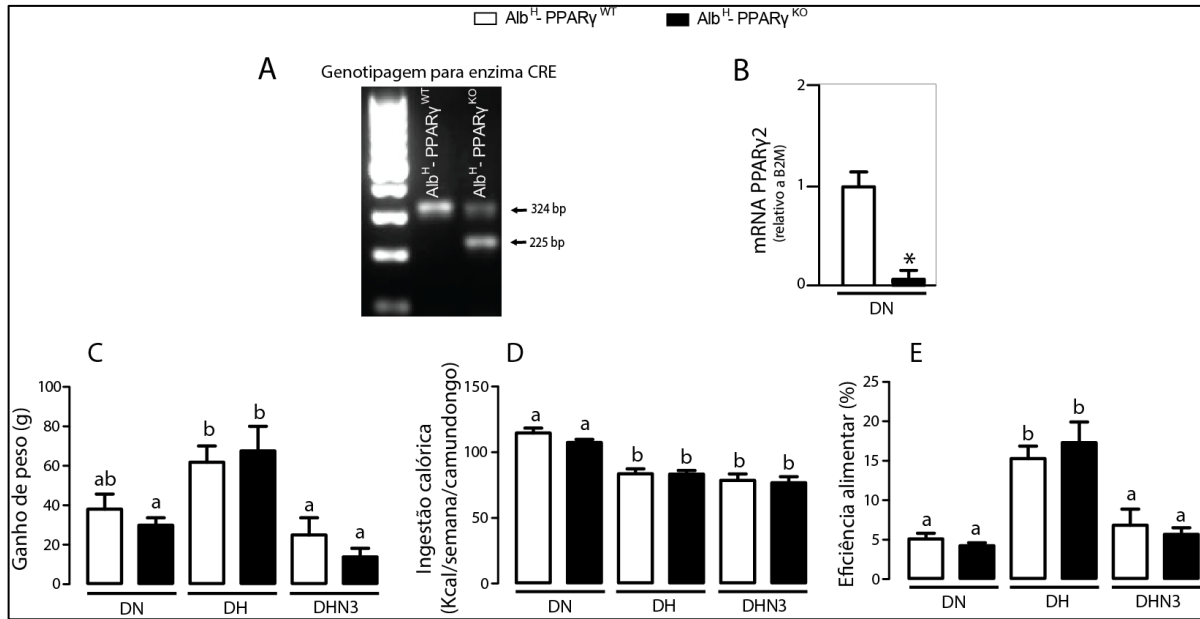


Figura 20. Gel de agarose para genotipagem da enzima CRE recombinase com DNA extraído da cauda (A), expressão gênica relativa de PPAR γ 2 (B), ganho de peso (A), ingestão calórica (B) e eficiência energética (C) de camundongos $Alb^H-PPAR\gamma^{WT}$ e $Alb^H-PPAR\gamma^{KO}$ tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica rica em n-3 (DHN3) por 8 semanas. No painel A, banda de 225 pares de base refere-se a enzima Cre recombinase, enquanto a banda de 324 pares de base ao controle positivo. Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 6 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05).

A ingestão de DH promoveu aumento dos depósitos de tecido adiposo epididimal, retroperitoneal e inguinal, efeito este que foi de maior magnitude em camundongos $Alb^H-PPAR\gamma^{KO}$ que $Alb^H-PPAR\gamma^{WT}$. Não houve diferenças de massa destes tecidos entre camundongos $Alb^H-PPAR\gamma^{WT}$ e $Alb^H-PPAR\gamma^{KO}$ alimentados com DN ou DHN3. Em contraste ao tecido adiposo, somente a ingestão de DHN3, independentemente do genótipo dos camundongos, promoveu um aumento do fígado (Figura 21).

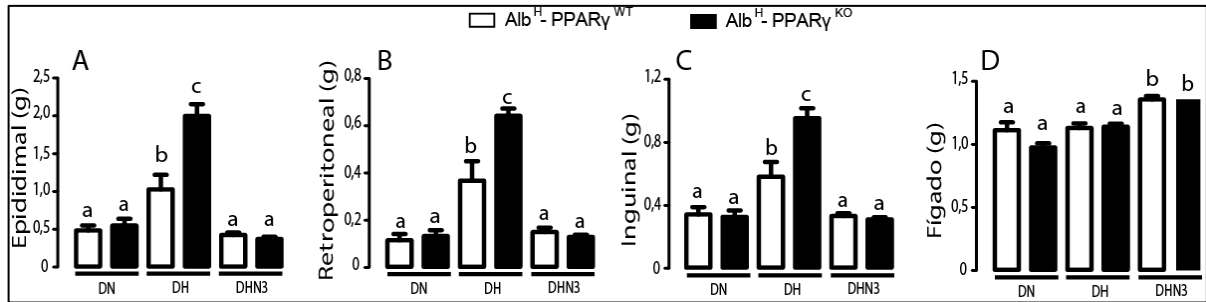


Figura 21. Peso dos tecidos adiposos retroperitoneal (A), epididimal (B), inguinal (C) além do peso do fígado (E) de camundongos Lyz^M -PPAR γ^{WT} e Lyz^M -PPAR γ^{KO} tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica rica em n-3 (DHN3) por 8 semanas. Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 4 a 5 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Como ilustrado na Figura 22, a deleção de PPAR γ em hepatócitos aumentou significativamente a glicemia de jejum e exacerbou a intolerância a glicose induzida pela ingestão de DH. Não houve diferenças de tolerância a glicose e glicemia de jejum entre camundongos Alb^H -PPAR γ^{WT} e Alb^H -PPAR γ^{KO} alimentados com DN ou DHN3.

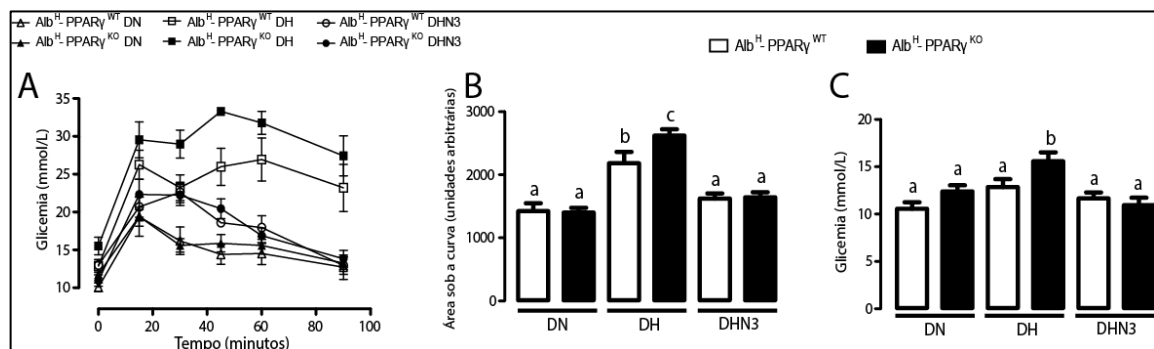


Figura 22. Curva glicêmica (A) e área sob a curva (B) e glicemia de jejum (C) realizadas na 6^a semana de protocolo em camundongos Alb^H -PPAR γ^{WT} e Alb^H -PPAR γ^{KO} tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica rica em n-3 (DHN3) por 8 semanas. Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 6 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Como pode ser visto na Figura 23A, independentemente do genótipo, não houve diferenças nos níveis circulantes de triacilglicerol em camundongos alimentados com DN e DH. Ingestão de DHN3, entretanto, reduziu significativamente a trigliceridemia em aproximadamente 50% em ambos Alb^H -PPAR γ^{WT} e Alb^H -PPAR γ^{KO} . Em contraste à trigliceridemia, a ingestão de DH elevou os níveis circulantes de colesterol total de maneira independente de PPAR γ . Não houve diferenças nos níveis circulantes de colesterol em camundongos alimentados com DN e DHN3.

A fim de mensurar o dano hepático ocasionado pela ingestão excessiva de lipídeos, foram quantificadas as transaminases AST e ALT. Na Figura 23C pode-se observar que não houve variação significativa nos níveis circulantes de AST. Em relação à ALT (Figura 23D), a deleção de PPAR γ independentemente da dieta causa diminuição dos níveis dessa enzima. Ademais, quando tratados com DHN3, camundongos Alb^H-PPAR γ ^{WT} também apresentam redução desses valores.

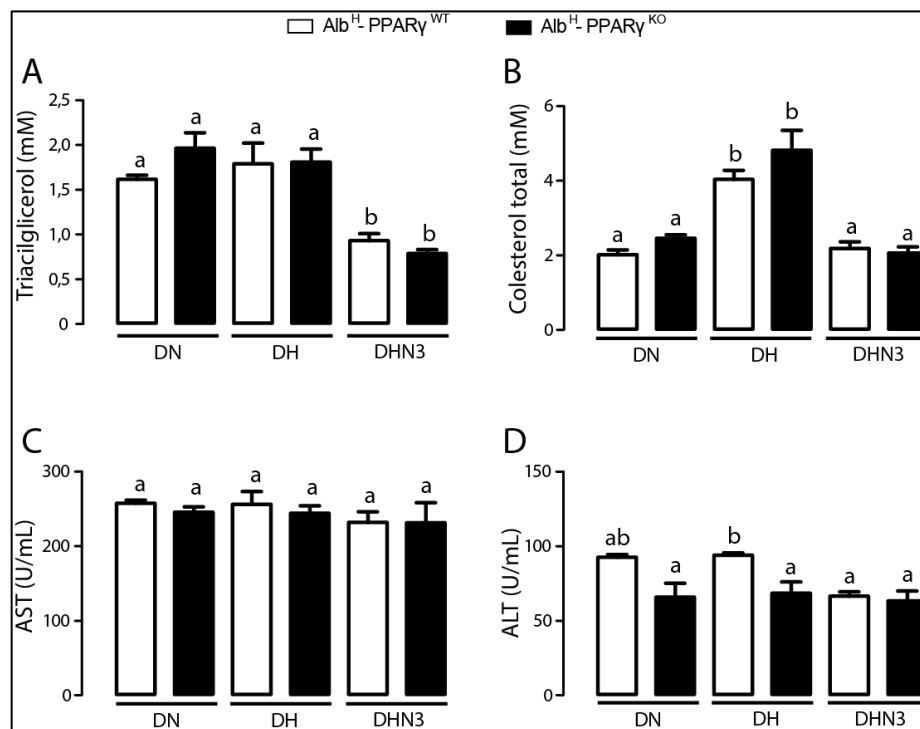


Figura 23. Níveis séricos de triacilglicerol (A), colesterol total (B), AST (C) e ALT (D) de camundongos Alb^H-PPAR γ ^{WT} e Alb^H-PPAR γ ^{KO} tratados com dieta normolipídica (DN), hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica rica em n-3 (DHN3) por 8 semanas. Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 6 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05).

Sabidamente em animais alimentados com dieta hiperlipídica há aumento da expressão de não somente PPAR α pelos hepatócitos, mas também de PPAR γ (MORÁN-SALVADOR et al., 2011; VIDAL-PUIG et al., 1996). É bem estabelecida a função do primeiro, contudo não se sabe exatamente o motivo pelo qual frente a uma sobrecarga de lipídeos, o fígado aumenta a expressão de PPAR γ . Ambicionando compreender a função desse receptor nuclear no metabolismo de lipídeos obtivemos os resultados expressos na Figura 24 A e B. Em 24A observa-se que que no fígado de animais tratados com DHN3, a oxidação do ácido palmítico é dependente de PPAR γ , sem contanto, haver diferença dentre os demais grupos. Baseando-se nesse resultado realizamos análise de atividade enzimática da enzima citrato sintase, expressão gênica e proteica somente nos grupos Alb^H-PPAR γ ^{WT} DH, Alb^H-PPAR γ ^{WT} DHN3

e Alb^H-PPAR γ ^{KO} DHN3. Sabe-se que a oxidação de ácidos graxos é totalmente dependente da atuação mitocondrial. Na Figura 24B, C e D é possível observar que a ingestão de DHN3 elevou a expressão do fator de transcrição mitocondrial (TFAM), uma proteína essencial à replicação do DNA mitocondrial. Contudo tanto o aumento da expressão dessa proteína quanto a atividade da enzima citrato sintase foi significativamente menor em camundongos Alb^H-PPAR γ ^{KO}.

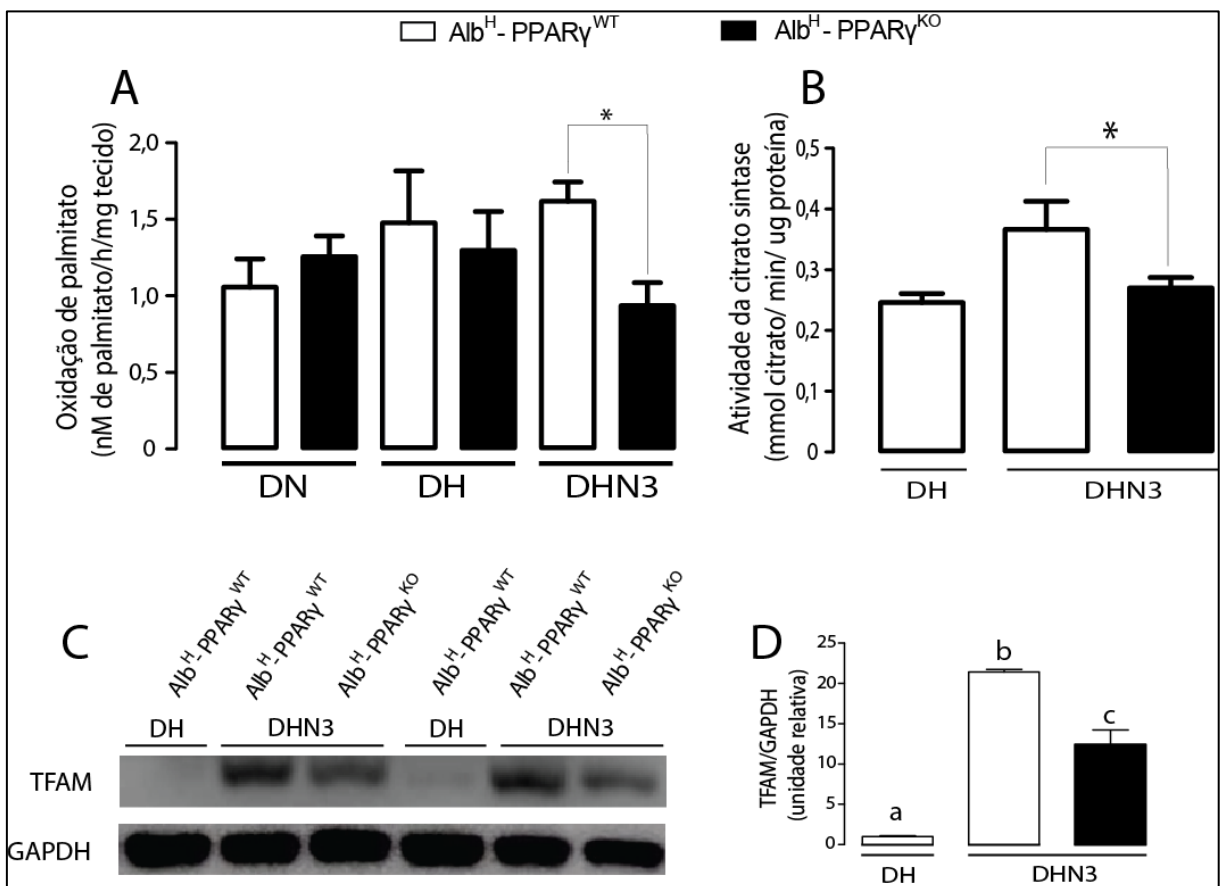


Figura 24. Oxidação de palmitato (A), atividade da enzima citrato sintase (B), figura representativa da expressão protéica de TFAM, e GAPDH (C) e quantificação da razão de expressão proteica TFAM/GAPDH (D) em fígado de camundongos Alb^H-PPAR γ ^{WT} e Alb^H-PPAR γ ^{KO} tratados com dieta hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica rica em n-3 (DHN3) por 8 semanas. Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 4 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05).

Evidenciada a participação de PPAR γ no aumento da expressão de TFAM induzida pela dieta DHN3, uma proteína indicadora de biogênese mitocondrial, foi realizado o estudo da expressão de mRNA para vários genes associados ao metabolismo oxidativo. Como ilustrado na Figura 25, a ingestão de DHN3 promoveu aumento significativo na expressão

hepática dos fatores de transcrição PPAR γ 2 e PPAR α , do cofator PGC1 α , das proteínas mitocondriais carnitina palmitoil transferase 1A (CPT1A), succinato desidrogenase B (SDHB) e citocromo C1 (CYC1) e peroxissomais acil CoA oxidase (ACOX1), fator de biogênese peroxissomal A (PEX11A) e B (PEX11B). A deficiência de PPAR γ em hepatócitos bloqueou completamente o aumento na expressão destes genes induzidos pela dieta DHN3.

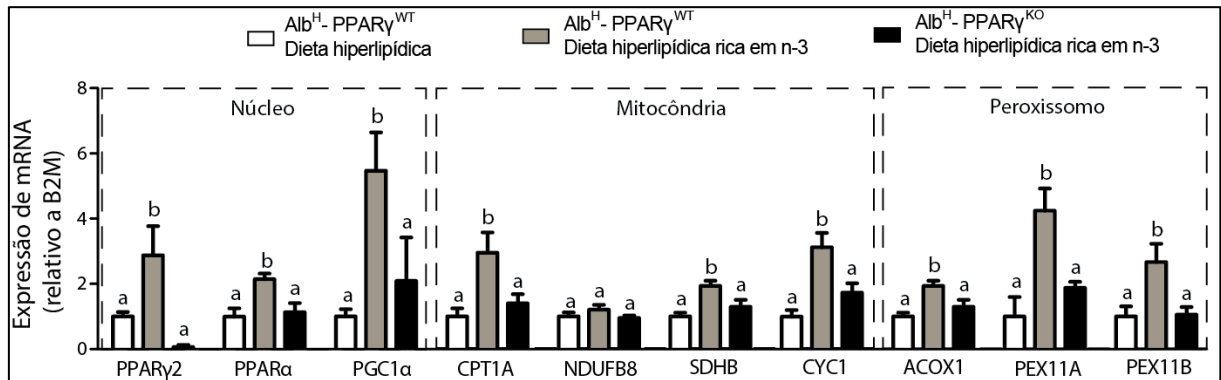


Figura 25. Expressão gênica relativa de proteínas marcadoras do metabolismo oxidativo mitocondrial e peroxissomal em fígado de camundongos Alb^H-PPAR γ ^{WT} e Alb^H-PPAR γ ^{KO} tratados com dieta hiperlipídica (DH) ou hiperlipídica rica em n-3 (DHN3) por 8 semanas. Dados estão apresentados como média \pm SEM (n= 4 camundongos/grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05).

4 DISCUSSÃO

Nesse trabalho de doutorado testou-se a hipótese de que níveis circulantes elevados de n-3 protegem camundongos das disfunções metabólicas associadas à obesidade. Nossos principais resultados indicam que a elevação de n-3, por conversão enzimática a partir de n-6 catalisada pela enzima *fat-1* dessaturase (camundongos *fat-1*) ou pela ingestão de dieta rica em n-3, protege contra o desenvolvimento da obesidade, intolerância à glicose, infiltração de leucócitos e inflamação no tecido adiposo induzidas pela ingestão de dieta DH. A análise do envolvimento de PPAR γ nestas ações benéficas de n-3 revelou a importante participação deste receptor nuclear no aumento da tolerância a glicose e oxidação hepática de ácido graxos, mas não nas ações anti-inflamatórias induzidas por n-3.

No presente trabalho, utilizamos três tipos diferentes de dietas com diferentes quantidades e/ou composições de ácidos graxos em suas formulações. Mais especificamente foi utilizada uma dieta controle normolipídica (DN) contendo 10% de seu valor calórico oriundo de lipídeos originados de banha de porco e óleo de soja. A análise da composição de ácidos graxos desta dieta por cromatografia gasosa revelou a presença de 36% de ácidos graxos saturados principalmente palmítico e esteárico, 30% de ácidos graxos mono-insaturados com predominância do ácido oleico, 30% de ácidos graxos poli-insaturados n-6 sendo em sua maior proporção constituído pelo ácido linoleico e cerca de 3% de ácido graxo poli-insaturado n-3 alfa-linolênico. Com o intuito de induzir obesidade em camundongos utilizamos dieta hiperlipídica (DH) que apresenta 60% de seu valor calórico advindo de lipídeos. Similarmente a DN, a DH teve como fonte de gordura a banha de porco e o óleo de soja sendo composta por 36% de ácidos graxos saturados com predominância dos ácidos palmítico e esteárico, 43% de mono-insaturados principalmente o ácido oleico, 20% de ácidos graxos poli-insaturados n-6 principalmente o ácido linoleico e 1% de ácido graxo poli-insaturado n-3 oriundo exclusivamente do alfa-linoleico.

Para a formulação da DHN3 utilizou-se como base a distribuição de macro e micronutrientes da DH. Contudo, foi feita a total substituição da banha de porco por óleo de peixe. Essa substituição garantiu à DHN3 um mesmo valor calórico por grama de dieta, no entanto com um perfil de ácidos graxos totalmente diferente daquele encontrado em DH. Em suma, a DHN3 continha 36% de ácidos graxos saturados com predominância de ácido palmítico, 28% de mono-insaturados predominando o ácido oleico, 9% de poli-insaturados n-6, especialmente o alfa-linoleico e 27% de poli-insaturados n-3, com predominância do ácido graxo eicosapentaenoico (EPA).

Explicitadas as particularidades das dietas utilizadas nesse trabalho, e com o objetivo de entender os mecanismos envolvidos nas ações benéficas dos ácidos graxos n-3, utilizamos o modelo animal de camundongo transgênico denominado de *fat-1*. Estes animais que foram produzidos em 2004 por (KANG et al., 2004), foram modificados geneticamente para expressar em todas as células do organismo a enzima dessaturase *fat-1* de *C. elegans* que catalisa a conversão de ácidos graxos n-6 em n-3. Com essa modificação genética os ácidos graxos n-3 deixam de ser essenciais aos camundongos *fat-1* devido à produção endógena dos mesmos a partir de n-6. Desde então, muitos trabalhos foram desenvolvidos com esses animais nas mais diferentes áreas das ciências biológicas. Há disponível para consulta na base de dados Pubmed cerca de 150 trabalhos com o termo “*fat-1* mice”, sendo 12 destes publicados no ano de 2015.

A fim de avaliar os efeitos metabólicos e anti-inflamatórios dos n-3, camundongos *fat-1* foram tratados com DH para a indução de obesidade, intolerância à glicose e inflamação crônica de baixa intensidade. A DH foi eficaz na indução de obesidade e suas complicações em camundongos selvagens, contudo os camundongos *fat-1* foram protegidos do aumento de peso corpóreo e adiposidade avaliada pela massa dos diversos depósitos de gordura. Apesar dos diversos estudos demonstrando que o enriquecimento da dieta ou a suplementação com n-3 reduz a obesidade e o ganho de peso induzido por DH, os mecanismos envolvidos em tais ações permanecem ainda desconhecidos (KABIR et al., 2007; MUNRO; GARG, 2013). Levando-se em conta que o peso corporal representa o equilíbrio entre a ingestão/absorção de macronutrientes e o gasto energético, nossos resultados indicam fortemente que camundongos *fat-1* estão protegidos da obesidade induzida por DH devido ao maior gasto energético. Neste sentido, camundongos *fat-1* tratados com DH apresentaram ingestão alimentar similar aos camundongos CTL alimentados DH, mas menor eficiência energética e maior consumo de oxigênio. Importante ressaltar que o maior gasto energético apresentado por camundongos *fat-1* pode ser atribuído em parte ao aumento na atividade locomotora espontânea. Entretanto em diversos momentos durante o ciclo claro-escuro não houve relação entre o aumento de consumo de oxigênio e atividade locomotora, indicando que outros processos podem estar envolvidos no aumento do gasto energético apresentado por estes camundongos. Corroborando estes achados, a administração do n-3 EPA atenuou a obesidade induzida por DH por aumentar o gasto energético de camundongos, um efeito atribuído ao aumento do ciclo fútil de re-esterificação de ácidos graxos, mas não da termogênese independente de tremor muscular via UCP-1 (JANOVSKÁ et al., 2013; SATO et al., 2010). Estudos adicionais

são necessários para investigar os mecanismos envolvidos no aumento da gasto energético apresentado por camundongos *fat-1*.

Importante mencionar que em contraste a estes resultados, um estudo prévio encontrou que camundongos *fat-1* tratados com dieta hiperlipídica não estão protegidos contra o desenvolvimento de obesidade induzido por dieta hiperlipídica (WHITE et al., 2010a). Entre as diversas possíveis causas responsáveis por esta discrepância, diferenças na composição de ácidos graxos das dietas hiperlipídicas, no genótipo e microbiota dos camundongos usados nestes estudos podem estar envolvidos. Enquanto no presente trabalho a fonte de gordura foi a banha de porco, no estudo anterior a dieta hiperlipídica teve como fonte lipídica a gordura vegetal. Sabidamente essa fonte de gordura é constituída por ácidos graxos trans que podem inibir dessaturases como a *fat-1* dessaturase, reduzindo assim a conversão de n-6 em n-3 em camundongos *fat-1* (IBRAHIM et al., 2005; SARAVANAN et al., 2005). Além disso, esta discrepância entre estudos foi recentemente atribuída a uma produção insuficiente de n-3 pelo uso de animais heterozigotos ao invés de homozigotos e assim expressão de apenas um alelo da enzima *fat-1* dessaturase (LI et al., 2014).

Em acordo com a redução de peso corpóreo e adiposidade, camundongos *fat-1* também foram protegidos das disfunções no metabolismo da glicose associadas à obesidade. Os camundongos *fat-1* DH apresentaram menor glicemia de jejum e área sob a curva durante o GTT, todavia tiveram insulinemia semelhante aos animais CTL DH durante o GTT indicando que, ao menos parte da melhora na tolerância e homeostase da glicose se deve a uma melhora na responsividade sistêmica à insulina. Corroborando esta hipótese, camundongos *fat-1* foram protegidos da resistência muscular à insulina induzida pela ingestão de DH como evidenciado pelas níveis normais de captação e incorporação de glicose em glicogênio estimulada pela insulina. Além disso, camundongos *fat-1* apresentaram preferência metabólica pela oxidação de carboidratos como fonte energética como evidenciado pelo maior RER (razão VCO_2/VO_2) comparado ao grupo CTL DH. Corroborando nossos achados, estudos prévios mostraram *in vitro* que o tratamento de células musculares com EPA aumenta a captação e oxidação de glicose estimulada por insulina (AAS et al., 2006). Além disso, a suplementação prolongada com óleo de peixe foi associada com a melhora sistêmica da sensibilidade à insulina em ratos e humanos (HIRABARA et al., 2013; KREBS et al., 2006; LAM et al., 2011).

Além da proteção contra a obesidade e intolerância à glicose induzidas pela DH e em conformidade com o já bem estabelecido conceito de que ácidos graxos n-3 apresentam importantes propriedades anti-inflamatórias (CALDER, 2015; FERRUCCI et al., 2006;

SIMOPOULOS, 2008; WHITE et al., 2010a), camundongos *fat-1* foram completamente protegidos da inflamação do tecido adiposo induzida pela DH, como evidenciado pela reduzido conteúdo de macrófagos M1 (F4/80+, CD11c+) infiltrados no tecido adiposo e pelos reduzidos níveis de expressão protéica do fator de transcrição pró-inflamatório NFκB fosforilado no tecido adiposo epididimal. Nossos resultados mostram que as propriedades anti-inflamatórias dos n-3 foram observadas mesmo em condições normais, ou seja, em camundongos *fat-1* tratados com DN. Nesses animais houve aumento da porcentagem de macrófagos com fenótipo M2 (F4/80+, CD206+) e linfócitos T regulatórios residentes no tecido adiposo. Vimos também que os metabólitos de DHA, precursores imediatos dos mediadores lipídicos pró-resolução de processos inflamatórios resolvinas, protectinas e maresinas aparecem aumentados em *fat-1*. Na mesma direção de nossos achados, estudos anteriores mostraram que a adição de ácidos graxos n-3 à dieta reduziu no tecido adiposo, a expressão de quimiocinas atraentes de monócitos e o recrutamento de macrófagos em indivíduos insulino-resistentes (SPENCER et al., 2013), assim como também diminuiu o conteúdo de células F4/80+ em camundongos db/db (TODORIC et al., 2006).

Apesar dos diversos trabalhos publicados relatando os efeitos benéficos da suplementação com óleo de peixe ou EPA e DHA reduzindo o acúmulo de lipídeos e a inflamação e melhorando o metabolismo de glicose, pouco se avançou no entendimento dos mecanismos envolvidos nessas ações. Sabe-se que ácidos graxos poli-insaturados n-3 podem servir como substrato energético (ZHANG et al., 2011), como precursores para a síntese dos mediadores lipídicos pró-resolução resolvinas e protectinas, podem ainda exercer seus efeitos por formarem fosfolipídeos de membrana celular, conferindo a essa, maior fluidez (CALDER, 2012), são capazes de ativar receptores acoplados a proteína G como GPR120 (OH et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2015) e outros, como os receptores nucleares PPARs modulando a transcrição de vários genes relacionados ao metabolismo energético e inflamação (KOPECKY et al., 2009).

A fim de ampliar o conhecimento em relação aos mecanismos pelos quais os n-3 protegem o organismo contra as disfunções metabólicas associadas à ingestão de DH, investigamos o envolvimento do receptor nuclear PPAR γ como mediador dessas ações baseando-se no fato de que todas as ações benéficas dos n-3 observadas nesse trabalho foram associadas a um significativo aumento do conteúdo proteico de PPAR γ no tecido adiposo epididimal de camundongos *fat-1* DH.

Sabe-se há algum tempo que os n-3 e seus metabólitos como o HDHA são ligantes naturais de PPAR γ . Soma-se a esse fato os resultados de outros estudos mostrando que a

elevação dos níveis de n-3 no organismo está associada ao aumento do conteúdo e atividade transcricional do receptor nuclear PPAR γ (GONZÁLEZ-PÉRIZ et al., 2006; NEUHOFER et al., 2013; WHITE et al., 2010a). Embasado nesses fatos e na semelhança de efeitos na restauração da homeostase glicêmica e inibição da inflamação do tecido adiposo entre a ativação farmacológica de PPAR γ pelas TZDs e os efeitos dos n-3 observados em nosso trabalho (ADKINS; KELLEY, 2010; KLIEWER et al., 1997; MORI et al., 2003; PASCUAL et al., 2005) reforçou-se a hipótese de que esse receptor nuclear pode ser um dos mediadores das ações metabólicas e anti-inflamatórias in vivo dos n-3. Para testar essa hipótese camundongos CTL e *fat-1* foram tratados com DH adicionada de GW9662, um antagonista farmacológico de PPAR γ amplamente usado em experimentos in vitro e in vivo para a elucidação de processos regulados por PPAR γ devido sua alta afinidade com esse receptor, superior inclusive a da rosiglitazona (LEESNITZER et al., 2002; LEYVRAZ et al., 2010; NAKANO et al., 2006). Em confirmação ao efeito *in vitro* desse fármaco sobre a inibição da diferenciação de adipócitos (JUNG et al., 2012; MORI et al., 2003), observou-se que em animais CTL o tratamento com GW9662 atenuou o aumento de peso corpóreo, adiposidade e diâmetro dos adipócitos induzidos por DH, sendo estes três fatores fortemente dependentes da atividade de PPAR γ . Contrariamente aos camundongos CTL, a administração de GW9662 à animais *fat-1* não afetou a proteção destes camundongos contra a obesidade induzida por DH, excluindo-se assim a participação de PPAR γ particularmente nesse efeito de n-3.

Dentre a ampla gama de efeitos benéficos dos ácidos graxos n-3 protegendo contra as disfunções metabólicas associadas à obesidade, a inibição farmacológica de PPAR γ aboliu apenas a melhora na tolerância à glicose nos animais *fat-1* DH. De fato, a inibição de PPAR γ não teve efeito sobre a redução de peso corpóreo e adiposidade e também não afetou a redução da inflamação do tecido adiposo dos camundongos *fat-1* tratados com DH indicando que n-3 exercem estas ações por mecanismos distintos de PPAR γ . Mecanicamente, o achado de que o comprometimento na tolerância a glicose em *fat-1* DH+GW9662 ocorreu na ausência de alterações de insulinemia indica um provável envolvimento na redução da responsividade periférica a insulina como a principal causa na disfunção do metabolismo de glicose.

Estabelecidas as ações dos n-3 mediadas por PPAR γ , e sabendo da importância da infiltração de leucócitos no tecido adiposo para a manutenção da homeostase metabólica, foi realizado o tratamento de camundongos com deleção genética específica de PPAR γ exclusivamente em células mielóides (Lyz^M-PPAR γ ^{KO}) com DHN3. Em um estudo anterior com esse modelo animal de deleção genética, foi mostrado que adipócitos quando cultivados

em co-cultura com macrófagos deficientes de PPAR γ apresentavam resistência à insulina e diminuição da captação de glicose (ODEGAARD et al., 2007). A deficiência no metabolismo de glicose em camundongos Lyz^M -PPAR γ^{KO} DH observada no presente trabalho comprovou os dados de desenvolvimento de resistência à insulina em tecido adiposo, fígado e músculo esquelético de animais com esse mesmo genótipo mostrada por ODEGAARD et al. (2007).

O aumento da disponibilidade de n-3 pela ingestão de DHN3 induziu um menor ganho de peso e inflamação do tecido adiposo (redução de macrófagos M1) quando comparado a camundongos alimentados com DH, efeitos estes que não dependeram da expressão de PPAR γ em células mielóides. Além disso, o tratamento com DHN3 foi igualmente efetivo na melhora da tolerância à glicose em camundongos deficientes de PPAR γ em células mielóides indicando o envolvimento desse receptor nuclear em outros tipos celulares diferentes de macrófagos, células dendríticas e neutrófilos como essencial à melhora da homeostase glicêmica induzida por n-3. Acredita-se que, talvez os n-3 e seus derivados exerçam ação anti-inflamatória por ativarem outros sensores de ácidos graxos como GPR120 (OH et al., 2010; OH et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015). Estes, sabidamente são altamente expressos em adipócitos maduros e macrófagos e podem ser os mediadores na atenuação da inflamação associada à obesidade e em parte pela melhora na restauração do metabolismo de glicose, pois a ativação de GPR120 por n-3 pode proporcionar mudanças da composição dos fosfolípidos de membrana (YORE et al., 2014) e estimular a utilização dos n-3 para a síntese de vários mediadores inflamatórios lipídicos como os HDHA, as resolvinas e protectinas que sabidamente inibem a translocação de NF κ B para o núcleo e auxiliam nos processos inflamatórios (CALDER, 2013; DALLI et al., 2012). Tomando esses fatos em consideração, nossos achados indicam que a ativação de PPAR γ não é fator preponderante para as ações anti-inflamatórias dos n-3, ou talvez, sua ação tenha sido mascarada pelos efeitos de outras vias dominantes.

Devido ao papel central do fígado na determinação da homeostase da glicose e lipídeos e buscando ainda, entender o envolvimento de PPAR γ nas ações metabólicas de n-3, camundongos com deleção de PPAR γ exclusivamente em hepatócitos (Alb^H -PPAR γ^{KO}) foram tratados com DH ou DHN3. Dentre os tipos de PPAR γ , a isoforma $\gamma 1$ é constitutivamente, porém pouco expressa em hepatócitos quando comparado a adipócitos, enquanto a isoforma $\gamma 2$ somente é expressa em hepatócitos frente a uma sobrecarga de lipídeos como por exemplo durante ingestão de dieta hiperlipídica (VIDAL-PUIG et al., 1996). Camundongos Alb^H -PPAR γ^{KO} tratados com DH apresentaram desarranjo na homeostase da glicose como evidenciado pela maior intolerância a glicose e aumento da glicemia de jejum em comparação

camundongos Alb^H-PPAR γ ^{WT}. Em associação ao desarranjo na homeostase da glicose, a deleção de PPAR γ em hepatócitos promoveu maior deposição de lipídeos no tecido adiposo após ingestão de DH, mas não afetou a homeostase de colesterol e triacilgliceróis. Os mecanismos pelos quais a deleção de PPAR γ em hepatócitos promove maior deposição de lipídeos no tecido adiposo, sem afetar o peso corporal precisam ser melhor investigados mecanisticamente. É importante ressaltar também, que não houve diferenças significativas nos níveis circulantes da transaminase AST indicando que as dietas utilizadas e a deleção de PPAR γ em hepatócitos não promove lesão hepática. Neste sentido, encontramos uma redução significativa nos níveis circulantes da transaminase ALT após deleção de PPAR γ em hepatócitos e ingestão de DHN3 indicando que estes tratamentos, na verdade, protegem o fígado de lesão.

Devido ao seu maior conteúdo hepático, o receptor nuclear PPAR α é considerado com um dos principais mediadores das ações dos ácidos graxos n-3 no fígado (KLEWER et al., 1997). Isto como pode ser confirmado pela inabilidade de camundongos deficientes em PPAR α de sobreviver à ingestão de dieta rica em n-3 como a DHN3 utilizada no presente trabalho (dados não mostrados). Estudos dos anos 80 já indicavam os ácidos graxos como indutores da proliferação de peroxissomos e da essencialidade dos peroxissomos na oxidação de ácidos graxos n-3 devido à sua maquinaria enzimática capaz de remover duplas ligações dos n-3 (YAMAZAKI et al., 1987), na diminuição da cadeia carbônica e consequente β -oxidação mitocondrial (VELDHOVEN, 2010; WANDERS; POLL-THE, 2015). Ainda, estudos em hepatócitos isolados mostram que o processo de oxidação de ácidos graxos poli-insaturados não apenas é iniciado nos peroxissomos, mas tem nessa organela o principal sítio de metabolização em detrimento à oxidação mitocondrial (YVES et al., 2006).

No presente trabalho, nós investigamos a hipótese, que além dos PPAR α , os receptores nucleares PPAR γ de hepatócitos são mediadores importantes das ações dos n-3 no metabolismo hepático. Apesar não encontrarmos diferenças na velocidade de incorporação de ácido palmítico em triacilglicerol, a deleção de PPAR γ em hepatócitos de animais alimentados com DHN3 reduziu significativamente a oxidação de ácido palmítico, um ácido graxo que é metabolizado principalmente pela β -oxidação mitocondrial. Interessantemente, camundongos alimentados com DHN3 apresentaram um aumento significativo no conteúdo do fator de transcrição TFAM e na expressão de diversos genes como PPAR γ 2, PPAR α e PGC1 α que regulam a biogênese mitocondrial, CPT1, SDHB, CYC1 envolvidos na oxidação de ácidos graxos e cadeia respiratória e ACOX1, PEX11A e PEX11B envolvidos na oxidação e biogênese peroxissomal. Todos estes fenótipos induzidos pela ingestão de DHN3 foram

completamente abolidos em camundongos com deleção de PPAR γ em hepatócitos, indicando que este fator de transcrição é um mediador importante das ações metabólicas dos n-3 no fígado.

Em conclusão, nossos dados indicam que os ácidos graxos n-3 possuem efeitos benéficos e protetores contra o desenvolvimento da obesidade, inflamação e intolerância a glicose induzidas por DH, sendo que dentre estes, tanto a melhora de tolerância à glicose quanto o aumento da oxidação hepática de ácidos graxos parecem ser mediados por PPAR γ . Estudos futuros são necessários, entretanto, para a compreensão dos mecanismos moleculares desencadeados pela ativação de PPAR γ por ácidos graxos n-3.

5 CONCLUSÃO

As conclusões desse trabalho foram:

1. O aumento da disponibilidade de n-3 geneticamente ou por dieta protege contra o desenvolvimento da obesidade, inflamação do tecido adiposo, intolerância à glicose e resistência à insulina induzidos pela ingestão de dieta hiperlipídica.
2. Os PPAR γ estão envolvidos nas ações protetoras dos n-3 contra o desenvolvimento da intolerância à glicose induzida pela ingestão de dieta hiperlipídica.
3. Ácidos graxos n-3 atenuam a inflamação do tecido adiposo induzida pela ingestão de dieta hiperlipídica independentemente de PPAR γ de células mielóides;
4. Ácidos graxos n-3 promovem um aumento da oxidação hepática de ácidos graxos via ativação de PPAR γ de hepatócitos.

REFERÊNCIAS*

- AAS, V.; ROKLING-ANDERSEN, M. H.; KASE, E. T.; THORESEN, G. H.; RUSTAN, A. C. Eicosapentaenoic acid (20:5 n-3) increases fatty acid and glucose uptake in cultured human skeletal muscle cells. **J. Lipid Res.**, v. 47, n. 2, p. 366-374, 2006.
- ADKINS, Y.; KELLEY, D. S. Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 9, p. 781-792, 2010.
- ANGHEL, S. I.; BEDU, E.; VIVIER, C. D.; DESCOMBES, P.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Adipose Tissue Integrity as a Prerequisite for Systemic Energy Balance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 41, p. 29946-29957, 2007.
- ASCHERIO, A.; KATAN, M. B.; ZOCK, P. L.; STAMPFER, M. J.; WILLETT, W. C. Trans fatty acids and coronary heart disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 25, p. 1994-1998, 1999.
- BELCHIOR, T.; PASCHOAL, V. A.; MAGDALON, J.; CHIMIN, P.; FARIAS, T. M.; CHAVES-FILHO, A. B.; GORJÃO, R.; ST-PIERRE, P.; MIYAMOTO, S.; KANG, J. X.; DESHAIES, Y.; MARETTE, A.; FESTUCCIA, W. Omega-3 fatty acids protect from diet-induced obesity, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation through PPAR γ -dependent and PPAR γ -independent actions. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 59, n. 5, p. 957-967, 2015.
- BERG, A. H.; COMBS, T. P.; SCHERER, P. E. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 13, n. 2, p. 84-89, 2002.
- BROUGHTON, K. S.; WADE, J. W. Total Fat and (n-3):(n-6) Fat Ratios Influence Eicosanoid Production in Mice. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 1, p. 88-94, 2002.
- BULLÓ, M.; CASAS-AGUSTENCH, P.; AMIGÓ-CORREIG, P.; ARANCETA, J.; SALAS-SALVADÓ, J. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. **Public Health Nutrition**, v. 10, n. 10A, p. 1164-1172, 2007.
- CALDER, P. C. Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids. **The Journal of Nutrition**, v. 142, n. 3, p. 592S-599S, 2012.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CALDER, P. C. n-3 fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 72, n. 3, p. 326-336, 2013.

CALDER, P. C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1851, n. 4, p. 469-484, 2015.

CANI, P. D.; AMAR, J.; IGLESIAS, M. A.; POGGI, M.; KNAUF, C. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, 2007.

CASAZZA, K.; FONTAINE, K. R.; ASTRUP, A.; BIRCH, L. L.; BROWN, A. W.; BOHAN BROWN, M. M.; DURANT, N.; DUTTON, G.; FOSTER, E. M.; HEYMSFIELD, S. B.; MCIVER, K.; MEHTA, T.; MENACHEMI, N.; NEWBY, P. K.; PATE, R.; ROLLS, B. J.; SEN, B.; SMITH, D. L.; THOMAS, D. M.; ALLISON, D. B. Myths, presumptions, and facts about obesity. **The New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 5, p. 446-454, 2013.

CHANTAL, M. C. B.; RICHELLE, S. M.; ANDREA, L. E.; THANE, G. M.; ELENA, D.; DAVID, P. B.; JOSE, A. A.; GRANT, N. P. trans-Fatty acids in the diet stimulate atherosclerosis. **Metabolism**, 2009.

CRETIAZ, M.; PRENTKI, M.; ZANINETTI, D.; JEANRENAUD, B. Insulin resistance in soleus muscle from obese Zucker rats. Involvement of several defective sites. **Biochem. J.**, v. 186, n. 2, p. 525-534, 1980.

DALLI, J.; COLAS, R. A.; SERHAN, C. N. Novel n-3 immunoresolvents: structures and actions. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1940, 2012.

DE VOS, P.; LEFEBVRE, A. M.; MILLER, S. G.; GUERRE-MILLO, M.; WONG, K.; SALADIN, R.; HAMANN, L. G.; STAELS, B.; BRIGGS, M. R.; AUWERX, J. Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 4, p. 1004-1009, 1996.

DECKELBAUM, R. J.; WORGALL, T. S.; SEO, T. n-3 fatty acids and gene expression. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 83, n. 6 Suppl, 2006.

DEROGIS, P. B.; FREITAS, F. P.; MARQUES, A. S.; CUNHA, D.; APPOLINÁRIO, P. P.; DE PAULA, F.; LOURENÇO, T. C.; MURGU, M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H.; MIYAMOTO, S. The development of a specific and sensitive LC-MS-based method for the detection and quantification of hydroperoxy- and hydroxydocosahexaenoic acids as a tool for lipidomic analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 2012.

DESPRÉS, J.-P. Abdominal obesity: the most prevalent cause of the metabolic syndrome and related cardiometabolic risk. **European Heart Journal Supplements**, v. 8, n. suppl B, p. B4-B12, 2006.

DOYON, C.; DENIS, R. G.; BARABOI, E.-D.; SAMSON, P.; LALONDE, J.; DESHAIES, Y.; RICHARD, D. Effects of Rimonabant (SR141716) on Fasting-Induced Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Neuronal Activation in Lean and Obese Zucker Rats. **Diabetes**, v. 55, n. 12, p. 3403-3410, 2006.

EVANS, R. M.; BARISH, G. D.; YONG-XU WANG, G. D. PPARs and the complex journey to obesity. **Nature Medicine**, v. 10, n. 4, p. 355-361, 2004.

FERRUCCI, L.; CHERUBINI, A.; BANDINELLI, S.; BARTALI, B.; CORSI, A.; LAURETANI, F.; MARTIN, A.; ANDRES-LACUEVA, C.; SENIN, U.; GURALNIK, J. M. Relationship of Plasma Polyunsaturated Fatty Acids to Circulating Inflammatory Markers. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 2, p. 439-446, 2006.

FESTUCCIA, W.; LAPLANTE, M.; BERTHIAUME, M.; GÉLINAS, Y.; DESHAIES, Y. PPAR γ agonism increases rat adipose tissue lipolysis, expression of glyceride lipases, and the response of lipolysis to hormonal control. **Diabetologia**, v. 49, n. 10, p. 2427-2436, 2006.

FESTUCCIA, W. T.; BLANCHARD, P. G.; TURCOTTE, V.; LAPLANTE, M.; SARIAHMETOGLU, M.; BRINDLEY, D. N.; DESHAIES, Y. Depot-specific effects of the PPAR γ agonist rosiglitazone on adipose tissue glucose uptake and metabolism. **J. Lipid Res.**, 2009.

FINE, J. B.; DIGIROLAMO, M. A simple method to predict cellular density in adipocyte metabolic incubations. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 21, n. 9, p. 764-768, 1997.

GONZÁLEZ-PÉRIZ, A.; PLANAGUMÀ, A.; GRONERT, K.; MIQUEL, R.; LÓPEZ-PARRA, M.; TITOS, E.; HORRILLO, R.; FERRÉ, N.; DEULOFEU, R.; ARROYO, V.; RODÉS, J.; CLÀRIA, J. Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 14, p. 2537-2539, 2006.

GRYGIEL-GÓRNIAK, B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications—a review. **Nutr. J.**, 2014.

GYÖRGY, B. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: The emerging view. **J. Hepatol.**, v. 51, n. 1, p. 212-223, 2009.

HIRABARA, S. M.; FOLADOR, A.; FIAMONCINI, J.; LAMBERTUCCI, R. H.; RODRIGUES JR, C. F.; ROCHA, M. S.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R. K.; MARTINS, A. R.; RODRIGUES, A. C.; CARPINELLI, A. R.; PITHON-CURI, T. C.; FERNANDES, L. C.; GORJÃO, R.; CURI, R. Fish oil supplementation for two generations increases insulin sensitivity in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 6, p. 1136-1145, 2013.

HOTAMISLIGIL, G. S. The role of TNF α and TNF receptors in obesity and insulin resistance. **Journal of Internal Medicine**, v. 245, n. 6, p. 621-625, 1999.

IBRAHIM, A.; NATRAJAN, S.; GHAFLOORUNISSA, R. Dietary trans-fatty acids alter adipocyte plasma membrane fatty acid composition and insulin sensitivity in rats. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 54, n. 2, p. 240-246, 2005.

IMAI, T.; TAKAKUWA, R.; MARCHAND, S.; DENTZ, E.; BORNERT, J.-M.; MESSADDEQ, N.; WENDLING, O.; MARK, M.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W.; CHAMBON, P.; METZGER, D. Peroxisome proliferator-activated receptor γ is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 13, p. 4543-4547, 2004.

JACOMETO, C. B.; SCHMITT, E.; PFEIFER, L. F.; SCHNEIDER, A.; BADO, F.; DA ROSA, F. T.; HALFEN, S.; DEL PINO, F. A.; LOOR, J. J.; CORRÊA, M. N.; DIONELLO, N. J. Linoleic and α -linolenic fatty acid consumption over three generations exert cumulative regulation of hepatic expression of genes related to lipid metabolism. **Genes & Nutrition**, v. 9, n. 4, p. 405, 2014.

JANG, H.-Y. Y.; LIM, K.; LEE, S.-M. M.; PARK, B.-H. H. Effects of n-3 PUFA on the CD4(+) type 2 helper T-cell-mediated immune responses in Fat-1 mice. **Mol. Nutr. Food Res.**, 2013.

JANOVSKÁ, P.; FLACHS, P.; KAZDOVÁ, L.; KOPECKÝ, J. Anti-obesity effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in mice fed high-fat diet is independent of cold-induced thermogenesis. **Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 62, n. 2, p. 153-161, 2013.

JUMP, D. B.; BOTOLIN, D.; WANG, Y.; XU, J.; CHRISTIAN, B.; DEMEURE, O. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 11, p. 2503-2506, 2005.

JUNG, U. J.; TORREJON, C.; CHANG, C. L.; HAMAI, H.; WORGALL, T. S.; DECKELBAUM, R. J. Fatty Acids Regulate Endothelial Lipase and Inflammatory Markers in Macrophages and in Mouse Aorta: A Role for PPAR γ . **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 2012.

KABIR, M.; SKURNIK, G.; NAOUR, N.; PECHTNER, V.; MEUGNIER, E.; ROME, S.; QUIGNARD-BOULANGÉ, A.; VIDAL, H.; SLAMA, G.; CLÉMENT, K.; GUERREMILLO, M.; RIZKALLA, S. W. Treatment for 2 mo with n-3 polyunsaturated fatty acids reduces adiposity and some atherogenic factors but does not improve insulin sensitivity in women with type 2 diabetes: a randomized controlled study. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 86, n. 6, p. 1670-1679, 2007.

KANG, J.; WANG, J.; WU, L.; KANG, Z. Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. **Nature**, v. 427, n. 6974, p. 504, 2004.

KANG, K.; REILLY, S. M.; KARABACAK, V.; GANGL, M. R. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPAR δ regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. **Cell Metabolism**, 2008.

KELTON, D.; LYSECKI, C.; AUKEMA, H.; ANDERSON, B.; KANG, J. X.; MA, D. W. Endogenous synthesis of n-3 PUFA modifies fatty acid composition of kidney phospholipids and eicosanoid levels in the fat-1 mouse. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 89, n. 4, p. 169-177, 2013.

KLIEWER, S. A.; SUNDSETH, S. S.; JONES, S. A.; BROWN, P. J.; WISELY, G. B.; KOBLE, C. S.; DEVCHAND, P.; WAHLI, W.; WILLSON, T. M.; LENHARD, J. M.; LEHMANN, J. M. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 9, p. 4318-4323, 1997.

KOPECKY, J.; ROSSMEISL, M.; FLACHS, P.; KUDA, O.; BRAUNER, P.; JILKOVA, Z.; STANKOVA, B.; TVRZICKA, E.; BRYHN, M. n-3 PUFA: bioavailability and modulation of adipose tissue function. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 68, n. 4, p. 361-369, 2009.

KREBS, J. D.; BROWNING, L. M.; MCLEAN, N. K.; ROTHWELL, J. L.; MISHRA, G. D.; MOORE, C. S.; JEBB, S. A. Additive benefits of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and weight-loss in the management of cardiovascular disease risk in overweight hyperinsulinaemic women. **Int. J. Obes.**, v. 30, n. 10, p. 1535-1544, 2006.

LALIA, A. Z.; JOHNSON, M. L.; JENSEN, M. D.; HAMES, K. C.; PORT, J. D.; LANZA, I. R. Effects of Dietary n-3 Fatty Acids on Hepatic and Peripheral Insulin Sensitivity in Insulin-Resistant Humans. **Diabetes Care**, v. 38, n. 7, p. 1228-1237, 2015.

LAM, Y. Y.; HATZINIKOLAS, G.; WEIR, J. M.; JANOVSKÁ, A.; MCAINCH, A. J.; GAME, P.; MEIKLE, P. J.; WITTERT, G. A. Insulin-stimulated glucose uptake and pathways regulating energy metabolism in skeletal muscle cells: The effects of subcutaneous and visceral fat, and long-chain saturated, n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1811, n. 7-8, p. 468-475, 2011.

LEE, J. Y.; SOHN, K. H.; RHEE, S. H.; HWANG, D. Saturated Fatty Acids, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induce the Expression of Cyclooxygenase-2 Mediated through Toll-like Receptor 4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 20, p. 16683-16689, 2001.

LEESNITZER, L. M.; PARKS, D. J.; BLEDSOE, R. K.; COBB, J. E.; COLLINS, J. L.; CONSLER, T. G.; DAVIS, R. G.; HULL-RYDE, E. A.; LENHARD, J. M.; PATEL, L.; PLUNKET, K. D.; SHENK, J. L.; STIMMEL, J. B.; THERAPONTOS, C.; WILLSON, T. M.; BLANCHARD, S. G. Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. **Biochemistry**, v. 41, n. 21, p. 6640-6650, 2002.

LEFEBVRE, P.; CHINETTI, G.; FRUCHART, J.-C.; STAELS, B. Sorting out the roles of PPAR α in energy metabolism and vascular homeostasis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 3, p. 571-580, 2006.

LEYVRAZ, C.; SUTER, M.; VERDUMO, C.; CALMES, J. M. M.; PAROZ, A.; DARIMONT, C.; GAILLARD, R. C.; PRALONG, F. P.; GIUSTI, V. Selective effects of PPAR γ agonists and antagonists on human pre-adipocyte differentiation. **Diabetes, Obesity & Metabolism**, v. 12, n. 3, p. 195-203, 2010.

LI, J.; LI, F. R.; WEI, D.; JIA, W.; KANG, J. X.; STEFANOVIC-RACIC, M.; DAI, Y.; ZHAO, A. Z. Endogenous ω -3 PUFAs Production Confers Resistance to Obesity, Dyslipidemia, and Diabetes in Mice. **Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 28, n. 8, p. 1316-1328, 2014.

LI, Y.; ZHANG, J.; SCHOPFER, F. J.; MARTYNOWSKI, D.; GARCIA-BARRIO, M. T.; KOVACH, A.; SUINO-POWELL, K.; BAKER, P. R.; FREEMAN, B. A.; CHEN, Y. E.; XU, H. E. Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPAR γ . **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 15, n. 8, p. 865-867, 2008.

LOPEZ-GARCIA, E.; SCHULZE, M. B.; MEIGS, J. B.; MANSON, J. E.; RIFAI, N.; STAMPFER, M. J.; WILLETT, W. C.; HU, F. B. Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 3, p. 562-566, 2005.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, p. 175-184, 2007.

MACHADO, M.; CORTEZ-PINTO, H. Non-alcoholic steatohepatitis and metabolic syndrome. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 9, n. 5, p. 637-642, 2006.

MARTIN, P. G.; GUILLOU, H.; LASSERRE, F.; DÉJEAN, S.; LAN, A.; PASCUSI, J.-M. M.; SANCRISTOBAL, M.; LEGRAND, P.; BESSE, P.; PINEAU, T. Novel aspects of PPAR α -mediated regulation of lipid and xenobiotic metabolism revealed through a nutrigenomic study. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 45, n. 3, p. 767-777, 2007.

MASSAO HIRABARA, S.; DE OLIVEIRA CARVALHO, C. R.; MENDONCA, J. R.; PILTCHER HABER, E.; FERNANDES, L. C.; CURI, R. Palmitate acutely raises glycogen synthesis in rat soleus muscle by a mechanism that requires its metabolism (Randle cycle). **FEBS Lett.**, v. 541, n. 1-3, p. 109-114, 2003.

MEMON, R. A.; TECOTT, L. H.; NONOGAKI, K.; BEIGNEUX, A. Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR- α) and PPAR- γ messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR- γ responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. **Endocrinology**, v. 141, n. 11, p. 4021-4031, 2000.

MENAA, F.; MENAA, A.; MENAA, B.; TRÉTON, J. Trans-fatty acids, dangerous bonds for health? A background review paper of their use, consumption, health implications and regulation in France. **European Journal of Nutrition**, v. 52, n. 4, p. 1289-1302, 2013.

MILANSKI, M.; DEGASPERI, G.; COOPE, A.; MORARI, J.; DENIS, R.; CINTRA, D. E.; TSUKUMO, D. M. L.; ANHE, G.; AMARAL, M. E.; TAKAHASHI, H. K.; CURI, R.; OLIVEIRA, H. C.; CARVALHEIRA, J. B. C.; BORDIN, S.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A. Saturated Fatty Acids Produce an Inflammatory Response Predominantly through the Activation of TLR4 Signaling in Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Obesity. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 2, p. 359-370, 2009.

MORÁN-SALVADOR, E.; LÓPEZ-PARRA, M.; GARCÍA-ALONSO, V.; TITOS, E.; MARTÍNEZ-CLEMENTE, M.; GONZÁLEZ-PÉRIZ, A.; LÓPEZ-VICARIO, C.; BARAK, Y.; ARROYO, V.; CLÀRIA, J. Role for PPAR γ in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. **FASEB J.**, v. 25, n. 8, p. 2538-2550, 2011.

MORI, T. A.; WOODMAN, R. J.; BURKE, V.; PUDDEY, I. B.; CROFT, K. D.; BEILIN, L. J. Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers in treated-hypertensive type 2 diabetic subjects. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 7, p. 772-781, 2003.

MUNRO, I. A.; GARG, M. L. Prior supplementation with long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids promotes weight loss in obese adults: a double-blinded randomised controlled trial. **Food & Function**, v. 4, n. 4, p. 650-658, 2013.

NAKANO, R.; KUROSAKI, E.; YOSHIDA, S.; YOKONO, M.; SHIMAYA, A.; MARUYAMA, T.; SHIBASAKI, M. Antagonism of peroxisome proliferator-activated

receptor γ prevents high-fat diet-induced obesity in vivo. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 1, p. 42-52, 2006.

NEUHOFER, A.; ZEYDA, M.; MASCHER, D.; ITARIU, B. K.; MURANO, I.; LEITNER, L.; HOCHBRUGGER, E. E.; FRAISL, P.; CINTI, S.; SERHAN, C. N. Impaired local production of proresolving lipid mediators in obesity and 17-HDHA as a potential treatment for obesity-associated inflammation. **Diabetes**, v. 62, n. 6, p. 1945-1956, 2013.

NG, M.; FLEMING, T.; ROBINSON, M.; THOMSON, B.; GRAETZ, N.; MARGONO, C.; MULLANY, E. C.; BIRYUKOV, S.; ABBAFATI, C.; ABERA, S. F.; ABRAHAM, J. P.; ABU-RMEILEH, N. M. E.; ACHOKI, T.; ALBUHAIRAN, F. S.; ALEMU, Z. A.; ALFONSO, R.; ALI, M. K.; ALI, R.; GUZMAN, N. A.; AMMAR, W.; ANWARI, P.; BANERJEE, A.; BARQUERA, S.; BASU, S.; BENNETT, D. A.; BHUTTA, Z.; BLORE, J.; CABRAL, N.; NONATO, I. C.; CHANG, J.-C.; CHOWDHURY, R.; COURVILLE, K. J.; CRIQUI, M. H.; CUNDIFF, D. K.; DABHADKAR, K. C.; DANDONA, L.; DAVIS, A.; DAYAMA, A.; DHARMARATNE, S. D.; DING, E. L.; DURRANI, A. M.; ESTEGHAMATI, A.; FARZADFAR, F.; FAY, D. F. J.; FEIGIN, V. L.; FLAXMAN, A.; FOROUZANFAR, M. H.; GOTO, A.; GREEN, M. A.; GUPTA, R.; HAFEZI-NEJAD, N.; HANKEY, G. J.; HAREWOOD, H. C.; HAVMOELLER, R.; HAY, S.; HERNANDEZ, L.; HUSSEINI, A.; IDRISOV, B. T.; IKEDA, N.; ISLAMI, F.; JAHANGIR, E.; JASSAL, S. K.; JEE, S. H.; JEFFREYS, M.; JONAS, J. B.; KABAGAMBE, E. K.; KHALIFA, S. E. A. H.; KENGNE, A. P.; KHADER, Y. S.; KHANG, Y.-H.; KIM, D.; KIMOKOTI, R. W.; KINGE, J. M.; KOKUBO, Y.; KOSEN, S.; KWAN, G.; LAI, T.; LEINSALU, M.; LI, Y.; LIANG, X.; LIU, S.; LOGROSCINO, G.; LOTUFO, P. A.; LU, Y.; MA, J.; MAINOO, N. K.; MENSAH, G. A.; MERRIMAN, T. R.; MOKDAD, A. H.; MOSCHANDREAS, J.; NAGHAVI, M.; NAHEED, A.; NAND, D.; NARAYAN, K. M. V.; NELSON, E. L.; NEUHOUSER, M. L.; NISAR, M. I.; OHKUBO, T.; OTI, S. O.; PEDROZA, A.; PRABHAKARAN, D.; ROY, N.; SAMPSON, U.; SEO, H.; SEPANLOU, S. G.; SHIBUYA, K.; SHIRI, R.; SHIUE, I.; SINGH, G. M.; SINGH, J. A.; SKIRBEKK, V.; STAPELBERG, N. J. C.; STURUA, L.; SYKES, B. L.; TOBIAS, M.; TRAN, B. X.; TRASANDE, L.; TOYOSHIMA, H.; VAN DE VIJVER, S.; VASANKARI, T. J.; VEERMAN, J. L.; VELASQUEZ-MELENDEZ, G.; VLASSOV, V. V.; VOLLSET, S. E.; VOS, T.; WANG, C.; WANG, S. X.; WEIDERPASS, E.; WERDECKER, A.; WRIGHT, J. L.; YANG, Y. C.; YATSUYA, H.; YOON, J.; YOON, S.-J.; ZHAO, Y.; ZHOU, M.; ZHU, S.; LOPEZ, A. D.; MURRAY, C. J. L.; GAKIDOU, E. 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. **The Lancet**, v. 384, n. 9945, p. 766-781, 2014.

ODEGAARD, J. I.; RICARDO-GONZALEZ, R. R.; GOFORTH, M. H.; MOREL, C. R.; SUBRAMANIAN, V.; MUKUNDAN, L.; RED EAGLE, A.; VATS, D.; BROMBACHER, F.; FERRANTE, A. W.; CHAWLA, A. Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1116-1120, 2007.

OH, D. Y.; TALUKDAR, S.; BAE, E. J.; IMAMURA, T.; MORINAGA, H. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. **Cell**, 2010.

OH, D. Y. A. Y.; WALENTA, E.; AKIYAMA, T. E.; LAGAKOS, W. S.; LACKEY, D.; PESSENTEINER, A. R.; SASIK, R.; HAH, N.; CHI, T. J.; COX, J. M.; POWELS, M. A.; DI SALVO, J.; SINZ, C.; WATKINS, S. M.; ARMANDO, A. M.; CHUNG, H.; EVANS, R. M.; QUEHENBERGER, O.; MCNELIS, J.; BOGNER-STRAUSS, J. G.; OLEFSKY, J. M. A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice. **Nature Medicine**, v. 20, n. 8, p. 942-947, 2014.

OLIVEIRA, V.; MARINHO, R.; VITORINO, D.; SANTOS, G. A.; MORAES, J. C.; DRAGANO, N.; SARTORI-CINTRA, A.; PEREIRA, L.; CATHARINO, R. R.; DA SILVA, A. S.; ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R.; DE SOUZA, C. T.; VELLOSO, L. A.; CINTRA, D. E. Diets containing alpha-linolenic (omega 3) or oleic (omega 9) fatty acids rescues obese mice from insulin resistance. **Endocrinology**, 2015.

PASCUAL, G.; FONG, A. L.; OGAWA, S.; GAMLIEL, A.; LI, A. C.; PERISSI, V.; ROSE, D. W.; WILLSON, T. M.; ROSENFELD, M. G.; GLASS, C. K. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR- γ . **Nature**, v. 437, n. 7059, p. 759-763, 2005.

PETERS, J. M.; RUSYN, I.; ROSE, M. L.; GONZALEZ, F. J.; THURMAN, R. G. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is restricted to hepatic parenchymal cells, not Kupffer cells: implications for the mechanism of action of peroxisome proliferators in hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 4, p. 823-826, 2000.

PRIEUR, X.; MOK, C. Y. L.; VELAGAPUDI, V. R.; NÚÑEZ, V.; FUENTES, L.; MONTANER, D.; ISHIKAWA, K.; CAMACHO, A.; BARBARROJA, N.; O'RAHILLY, S.; SETHI, J. K.; DOPAZO, J.; OREŠIČ, M.; RICOTE, M.; VIDAL-PUIG, A. Differential Lipid Partitioning Between Adipocytes and Tissue Macrophages Modulates Macrophage Lipotoxicity and M2/M1 Polarization in Obese Mice. **Diabetes**, v. 60, n. 3, p. 797-809, 2011.

RODBELL, M. Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 239, p. 375-380, 1964.

ROMANATTO, T.; FIAMONCINI, J.; WANG, B.; CURI, R.; KANG, J. X. Elevated tissue omega-3 fatty acid status prevents age-related glucose intolerance in fat-1 transgenic mice. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1842, n. 2, p. 186-191, 2013.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 847-853, 2006.

SARAVANAN, N.; HASEEB, A.; EHTESHAM, N. Z.; GHAFLOORUNISSA. Differential effects of dietary saturated and trans-fatty acids on expression of genes associated with insulin sensitivity in rat adipose tissue. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 153, n. 1, p. 159-165, 2005.

SATO, A.; KAWANO, H.; NOTSU, T.; OHTA, M.; NAKAKUKI, M.; MIZUGUCHI, K.; ITOH, M.; SUGANAMI, T.; OGAWA, Y. Antiobesity Effect of Eicosapentaenoic Acid in High-Fat/High-Sucrose Diet-Induced Obesity: Importance of Hepatic Lipogenesis. **Diabetes**, v. 59, n. 10, p. 2495-2504, 2010.

SHAH, A.; MEHTA, N.; REILLY, M. P. Adipose Inflammation, Insulin Resistance, and Cardiovascular Disease. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 32, n. 6, p. 638-644, 2008.

SIMOPOULOS, A. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. **Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)**, v. 233, n. 6, p. 674-688, 2008.

SPENCER, M.; FINLIN, B. S.; UNAL, R.; ZHU, B.; MORRIS, A. J.; SHIPP, L. R.; LEE, J.; WALTON, R. G.; ADU, A.; ERFANI, R.; CAMPBELL, M.; MCGEHEE, R. E.; PETERSON, C. A.; KERN, P. A. Omega-3 Fatty Acids Reduce Adipose Tissue Macrophages in Human Subjects With Insulin Resistance. **Diabetes**, v. 62, n. 5, p. 1709-1717, 2013.

STRAUS, D. S.; GLASS, C. K. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 12, p. 551-558, 2007.

SUN, Q.; MA, J.; CAMPOS, H.; HANKINSON, S. E.; MANSON, J. E.; STAMPFER, M. J.; REXRODE, K. M.; WILLETT, W. C.; HU, F. B. A prospective study of trans fatty acids in erythrocytes and risk of coronary heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 14, p. 1858-1865, 2007.

SZALOWSKA, E.; TESFAY, H. A.; VAN HIJUM, S. A.; KERSTEN, S. Transcriptomic signatures of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) in different mouse liver models identify novel aspects of its biology. **BMC Genomics**, v. 15, p. 1106, 2013.

TAI, C. C.; DING, S. T. N-3 polyunsaturated fatty acids regulate lipid metabolism through several inflammation mediators: mechanisms and implications for obesity prevention. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 5, p. 357-363, 2010.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 335-376, 2003.

THAN, N. N.; NEWSOME, P. N. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. **Atherosclerosis**, v. 239, n. 1, p. 192-202, 2015.

TODORIC, J.; LÖFFLER, M.; HUBER, J.; BILBAN, M.; REIMERS, M.; KADL, A.; ZEYDA, M.; WALDHÄUSL, W.; STULNIG, T. M. Adipose tissue inflammation induced by

high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. **Diabetologia**, v. 49, n. 9, p. 2109-2119, 2006.

TONTONOZ, P.; SPIEGELMAN, B. M. Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR γ . **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, n. 1, p. 289-312, 2008.

TSUKUMO, D. M. L.; CARVALHO-FILHO, M. A.; CARVALHEIRA, J. B. C.; PRADA, P. O.; HIRABARA, S. M.; SCHENKA, A. A.; ARAÚJO, E. P.; VASSALLO, J.; CURI, R.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J. A. Loss-of-function mutation in toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 8, p. 1986-1998, 2007.

VELDHOVEN, V. P. P. Biochemistry and genetics of inherited disorders of peroxisomal fatty acid metabolism. **J. Lipid Res.**, 2010.

VIDAL-PUIG, A.; JIMENEZ-LIÑAN, M.; LOWELL, B. B.; HAMANN, A.; HU, E.; SPIEGELMAN, B.; FLIER, J. S.; MOLLER, D. E. Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 11, p. 2553-2561, 1996.

WANDERS, R. J.; POLL-THE, B. T. Role of peroxisomes in human lipid metabolism and its importance for neurological development. **Neuroscience Letters**, 2015.

WHITE, P. J.; ARITA, M.; TAGUCHI, R.; KANG, J. X.; MARETTE, A. Transgenic restoration of long-chain n-3 fatty acids in insulin target tissues improves resolution capacity and alleviates obesity-linked inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice. **Diabetes**, v. 59, n. 12, p. 3066-3073, 2010a.

WHITE, P. J.; ARITA, M.; TAGUCHI, R.; KANG, J. X.; MARETTE, A. Transgenic restoration of long-chain n-3 fatty acids in insulin target tissues improves resolution capacity and alleviates obesity-linked inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice. **Diabetes**, v. 59, n. 12, p. 3066-3073, 2010b.

WILLEBRORDS, J.; PEREIRA, I. V.; MAES, M.; YANGUAS, S. C.; COLLE, I.; BOSSCHE, B. V.; SILVA, T. C.; OLIVEIRA, C. P. P.; ANDRAUS, W.; ALVES, V. A. A.; COGLIATI, B.; VINKEN, M. Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research. **Progress in Lipid Research**, 2015.

WORGALL, T. S.; STURLEY, S. L.; SEO, T.; OSBORNE, T. F.; DECKELBAUM, R. J. polyunsaturated fatty acids decrease expression of promoters with sterol regulatory elements by decreasing levels of mature sterol regulatory element-binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 40, p. 25537-25540, 1998.

YAMAZAKI, R. K.; SHEN, T.; SCHADE, G. B. A diet rich in (n-3) fatty acids increases peroxisomal beta-oxidation activity and lowers plasma triacylglycerols without inhibiting glutathione-dependent detoxication activities in the rat liver. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 920, n. 1, p. 62-67, 1987.

YORE, M. M.; SYED, I.; MORAES-VIEIRA, P. M.; ZHANG, T.; HERMAN, M. A.; HOMAN, E. A.; PATEL, R. T.; LEE, J.; CHEN, S.; PERONI, O. D.; DHANESHWAR, A. S.; HAMMARSTEDT, A.; SMITH, U.; MCGRAW, T. E.; SAGHATELIAN, A.; KAHN, B. B. Discovery of a class of endogenous mammalian lipids with anti-diabetic and anti-inflammatory effects. **Cell**, v. 159, n. 2, p. 318-332, 2014.

YVES, P.; VASILY, D. A.; TUOMO, G.; HILTUNEN, J. K. Peroxisomal β -oxidation—a metabolic pathway with multiple functions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 12, p. 14131426, 2006.

ZHANG, W.; LI, P.; HU, X.; ZHANG, F.; CHEN, J.; GAO, Y. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the brain: metabolism and neuroprotection. **Frontiers in Bioscience (Landmark edition)**, v. 16, p. 2653-2670, 2011.

APÊNDICE A – Tabelas e figuras suplementares

Tabela 1A. Precisão Intra e inter-dias (coeficientes de variação) e acurácia de 12 isômeros HDHA.

Isômero	HDHA mistura de isômeros (ng/mL)	Intra-dia (n = 3)		Inter-dia (n = 2)	
		Precisão (%)	Acurácia (%)	Precisão (%)	Acurácia (%)
20	1000	9 ± 1	99 ± 9	18 ± 3	102 ± 18
	500	38 ± 1	78 ± 27	32 ± 10	86 ± 26
19	1000	26 ± 7	120 ± 30	12 ± 1	139 ± 17
	500	34 ± 9	105 ± 34	30 ± 9	110 ± 31
17	1000	27 ± 8	111 ± 28	8 ± 1	123 ± 10
	500	13 ± 2	96 ± 12	10 ± 1	114 ± 11
16	1000	15 ± 2	113 ± 17	8 ± 1	132 ± 11
	500	10 ± 1	94 ± 9	36 ± 13	113 ± 39
14	1000	28 ± 8	102 ± 27	4 ± 0	133 ± 5
	500	15 ± 2	104 ± 15	18 ± 3	104 ± 18
13	1000	22 ± 5	97 ± 20	4 ± 0	103 ± 4
	500	23 ± 5	98 ± 22	24 ± 5	98 ± 23
11	1000	2 ± 0	100 ± 2	9 ± 1	108 ± 10
	500	1 ± 0	100 ± 1	12 ± 1	110 ± 13
10	1000	16 ± 3	100 ± 16	14 ± 2	122 ± 17
	500	21 ± 4	93 ± 19	29 ± 8	94 ± 26
8	1000	13 ± 2	99 ± 13	14 ± 2	123 ± 17
	500	19 ± 3	89 ± 16	19 ± 4	101 ± 19
7	1000	24 ± 6	96 ± 23	21 ± 4	116 ± 24
	500	11 ± 1	95 ± 10	25 ± 6	100 ± 24
5	1000	9 ± 1	72 ± 6	86 ± 57	138 ± 92
	500	31 ± 11	100 ± 29	108 ± 82	145 ± 111
4	1000	13 ± 2	99 ± 12	28 ± 7	125 ± 33
	500	23 ± 5	97 ± 22	48 ± 21	111 ± 48

Os ensaios de acurácia e precisão foram realizados pela análise de amostras diluídas em metanol em duas concentrações de uma mistura de HDoHE em 3 replicatas no mesmo dia e em 2 dias consecutivos. A precisão foi calculada a partir da porcentagem e desvio padrão de cada replicata. A acurácia foi determinada pela porcentagem da concentração medida comparado a concentração teórica esperada. Para esse ensaio as amostras foram injetadas diretamente sem extração prévia.

Tabela 2A. Recuperação dos isômeros HDHA em PBS (n=3).

Isômero	HDHA mistura de isômeros (ng/mL)	Recuperação (%)
20	1000	39 ± 4
	500	38 ± 8
19	1000	61 ± 10
	500	61 ± 0
17	1000	64 ± 11
	500	57 ± 11
16	1000	58 ± 5
	500	55 ± 5
14	1000	58 ± 7
	500	51 ± 10
13	1000	54 ± 8
	500	47 ± 9
11	1000	46 ± 9
	500	42 ± 4
10	1000	58 ± 8
	500	53 ± 6
8	1000	56 ± 5
	500	49 ± 10
7	1000	60 ± 4
	500	54 ± 9
5	1000	48 ± 1
	500	41 ± 10
4	1000	41 ± 6
	500	34 ± 10

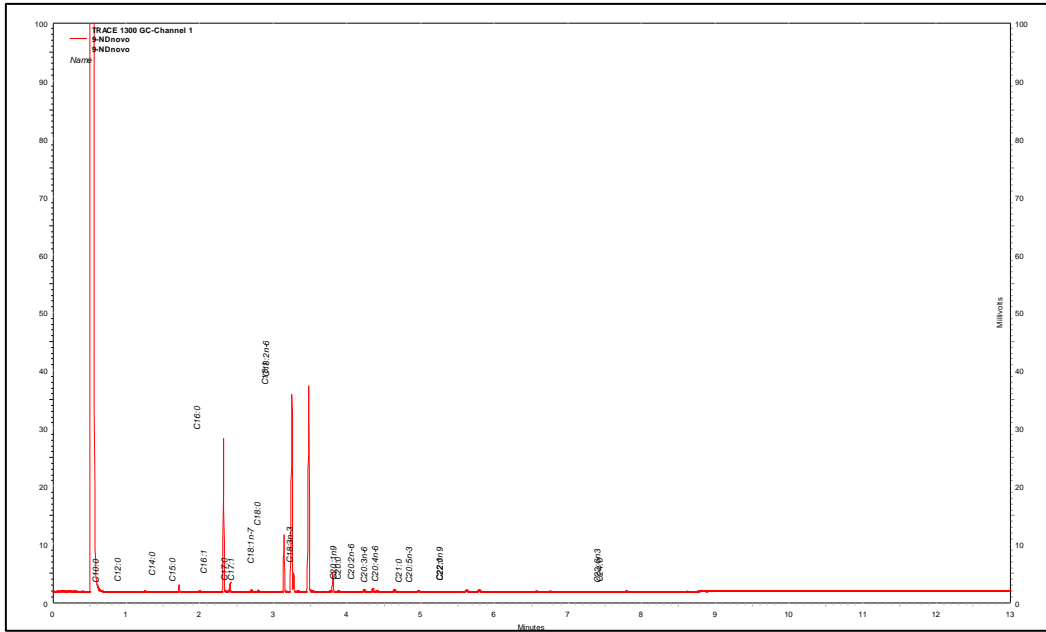


Figura 1A. Cromatograma representativo dos ácidos graxos identificados na dieta normolipídica (DN).

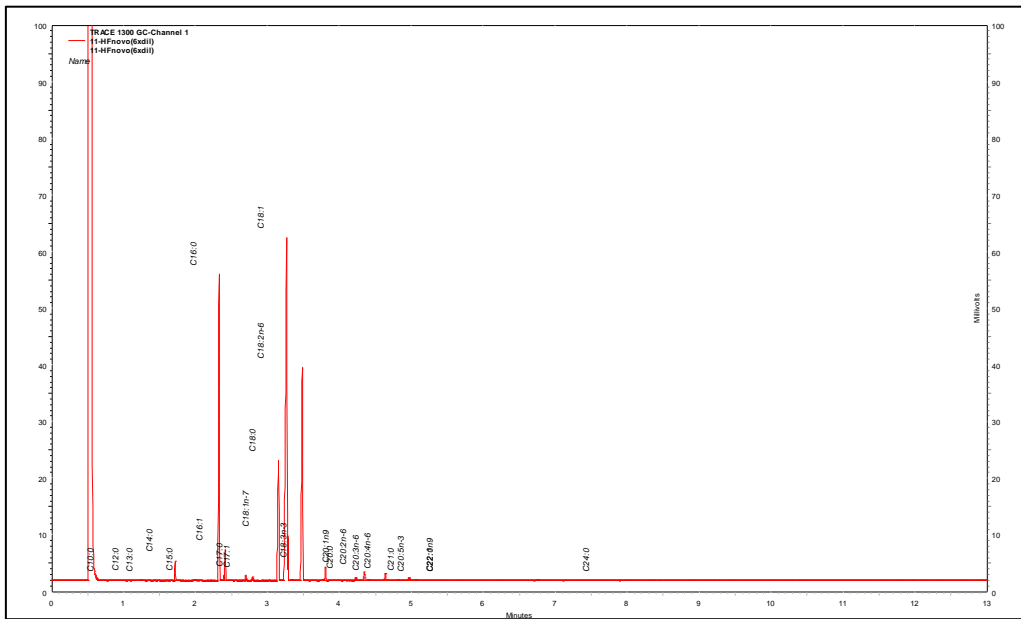


Figura 2A. Cromatograma representativo dos ácidos graxos identificados na dieta hiperlipídica (DH).

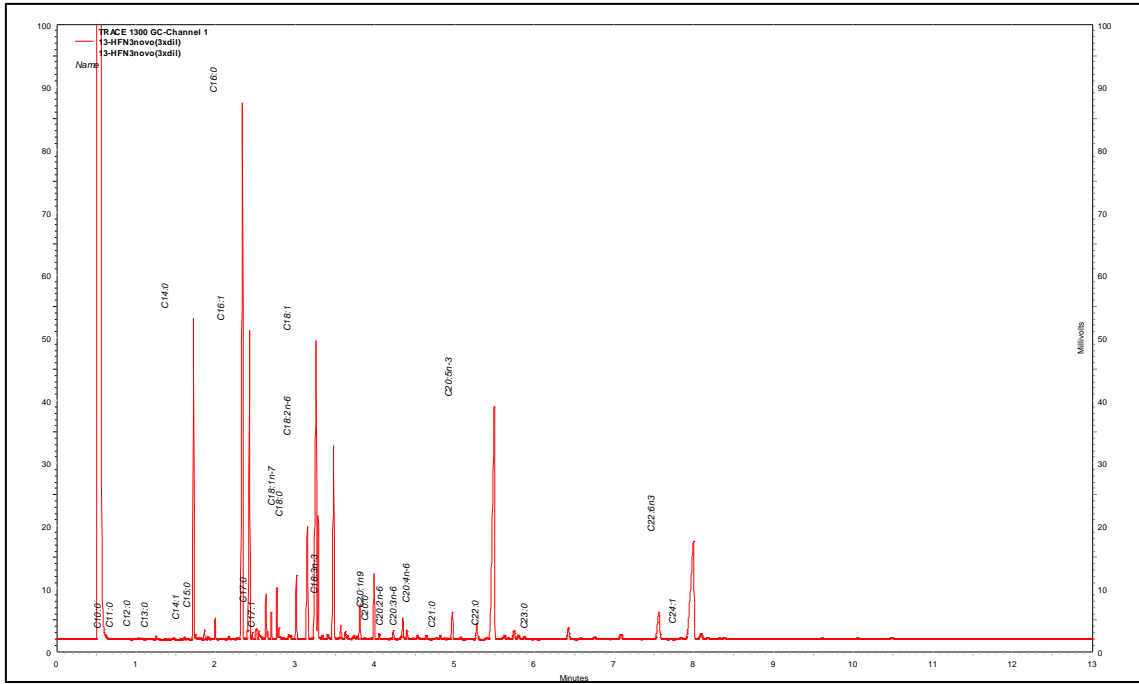


Figura 3A. Cromatograma representativo dos ácidos graxos identificados na dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos n-3 (DHN3).

RESEARCH ARTICLE

Omega-3 fatty acids protect from diet-induced obesity, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation through PPAR γ -dependent and PPAR γ -independent actions

Thiago Belchior¹, Vivian A. Paschoal¹, Juliana Magdalon¹, Patricia Chimin¹, Talita M. Farias¹, Adriano B. Chaves-Filho², Renata Gorjão³, Philippe St.-Pierre⁴, Sayuri Miyamoto², Jing X. Kang⁵, Yves Deshaies⁴, André Marette⁴ and William Festuccia¹

¹ Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

² Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³ Institute of Physical Activity and Sports, Cruzeiro do Sul University, São Paulo, Brazil

⁴ Department of Medicine, Faculty of Medicine, Quebec Heart and Lung Institute Research Center, Université Laval, Quebec, Canada

⁵ Laboratory for Lipid Medicine and Technology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

Scope: We tested herein the hypothesis that peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) is a major mediator of omega-3 (*n*-3) protective actions against high-fat diet (HFD) induced obesity, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation.

Methods and results: C57BL6 wild-type and *fat-1* transgenic (*fat-1*) mice were fed a low-fat diet (LFD) or HFD, treated or not with PPAR γ antagonist, and evaluated for energy balance, adiposity, glucose tolerance, and adipose tissue inflammation. *Fat-1* mice were protected from obesity, fasting hyperglycemia, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation. PPAR γ inhibition completely abolished *fat-1* protection against HFD-induced glucose intolerance, but not obesity or adipose tissue inflammation. To investigate the role of myeloid cell as mediator of *n*-3 beneficial metabolic actions, mice with deletion (LyzM-PPAR γ ^{KO}) or nondeletion (LyzM-PPAR γ ^{WT}) of PPAR γ in myeloid cells were fed either LFD or HFD (lard) or an HFD rich in *n*-3 (fish oil). Our findings indicate that myeloid cell associated PPAR γ is not involved in the attenuation of HFD-induced glucose intolerance and adipose tissue inflammation induced by *n*-3.

Conclusion: High endogenous *n*-3 fatty acid levels protect from HFD obesity, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation. Among these, only protection against glucose intolerance is mediated by non-myeloid cell PPAR γ .

Keywords:

Adiposity / Glucose metabolism / Inflammation / Omega-3 polyunsaturated fatty acids / PPAR γ antagonism



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Correspondence: Dr. William Festuccia, Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 05508-000, Brazil

E-mail: william.festuccia@usp.br

Abbreviations: DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; *Fat-1*, *fat-1* transgenic; F4/80⁺, total macrophage marker; F4/80⁺, CD11c⁺, pro-inflammatory M1 macrophage;

F4/80⁺, CD206⁺, anti-inflammatory M2 macrophage; GPR120, plasma membrane G protein coupled receptor; GTT, glucose tolerance test; GW9662, PPAR γ antagonist 2-chloro-5-nitrobenzamide; HDHA, hydroxy-docosahexaenoic acid; HFD, high-fat diet; HFN3, high-fat diet rich in *n*-3; LFD, low-fat diet; *n*-3, omega-3; *n*-6, omega-6; NF- κ B, nuclear factor kappa B; PPAR γ , peroxisome proliferator activated receptor γ ; WT, wild type

Received: December 17, 2014

Revised: January 23, 2015

Accepted: January 27, 2015

1 Introduction

Obesity is frequently associated with the development of serious, highly prevalent chronic diseases such as type 2 diabetes, hepatic steatosis, and certain types of cancers, all of which are characterized by chronic nonresolving inflammatory processes [1–4]. Excessive intake of a Western-style diet rich in saturated and omega-6 (*n*-6) and poor in omega-3 (*n*-3) PUFAs is considered one of the major factors promoting obesity-associated chronic nonresolving inflammation [5]. For instance, high levels of saturated fatty acids were shown to activate the innate immune Toll-like receptor-4 promoting tissue inflammation and insulin resistance [6, 7], whereas *n*-6 PUFAs, precursors for the synthesis of several lipid mediators including prostaglandins, thromboxanes, and leukotrienes, are also pro-inflammatory and deleterious to glucose homeostasis [5, 8]. In contrast to these fatty acids, the *n*-3 PUFAs eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids and their hydroxide products were demonstrated to have potent anti-inflammatory, hypolipidemic, and weight-reducing properties that counteract the development of obesity and associated chronic diseases [9–11]. In this sense, elevation of body *n*-3 availability either genetically (transgenic *fat-1* (*fat-1*) mice) [12] or through diet is associated with several beneficial health effects including the prevention of obesity [13, 14], age- and HFD-related (HFD is high-fat diet) glucose intolerance [13–15], hepatic tumorigenesis [16, 17], and streptozotocin-induced diabetes [18].

In spite of the general consensus that raising body *n*-3 fatty acid availability is a valid strategy to prevent and/or attenuate chronic metabolic and inflammatory diseases, a complete comprehension of the molecular mechanisms underlying *n*-3 beneficial metabolic actions is still lacking. Mechanistically, *n*-3 fatty acids have been shown to exert their anti-inflammatory actions by inhibiting the conversion of *n*-6 fatty acids into pro-inflammatory lipid mediators [5], by activating the plasma membrane G protein coupled receptor 120 (GPR120) [19]; by serving as a precursor for the synthesis of pro-resolution lipid mediators such as resolvins, protectins, and maresins, among others [9]; and by acting as naturally occurring ligands and activators of peroxisome proliferator activated receptor PPAR γ , a nuclear receptor whose activation leads to the inhibition of nuclear factor κ B (NF- κ B) activity and inflammation. More specifically regarding the latter, endogenous production of *n*-3 fatty acids through the transgenic expression of a desaturase from *Candida elegans* (*fat-1* mice) or intake of a diet rich in fish oil is associated with significant activation of PPAR γ transcriptional activity [14]. Such action may be mediated by either EPA and DHA directly or one of the many lipid mediators derived from the enzymatic and/or spontaneous metabolism of these fatty acids such as 17S-hydroxy-DHA (17-HDHA) and protectin D1, which were previously shown to act as PPAR γ ligands [20–22]. However, the contribution of PPAR γ activation to the beneficial metabolic actions of *n*-3 fatty acids, especially in the in vivo setting, remains to be more thoroughly delineated.

Table 1. Composition of diets provided to mice

Ingredient	LFD	HFD
	(g/kg)	
Casein	189.6	258.4
L-Cystine	2.8	3.9
Cornstarch	413.1	-
Dextrinized cornstarch	161.5	161.5
Sucrose	88.9	88.9
Cellulose	54.6	74.1
Soybean oil	23.7	32.3
Lard	18.9	316.6
Mineral mix AIN93M	35	47.9
Vitamin mix AIN93M	10	13.7
Choline bitartrate	1.9	2.6
	kcal (%)	
Protein	20	20
Carbohydrates	70	20
Fat	10	60

To further expand knowledge on *n*-3 properties and mechanisms of action in the in vivo setting, we tested herein the hypothesis that *n*-3 fatty acids protect from HFD-induced obesity, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation through the activation of the nuclear receptor PPAR γ . To test this hypothesis, we first evaluated whether whole-body pharmacological PPAR γ inhibition with GW9662 affects *n*-3-mediated protection featured by *fat-1* mice against diet-induced obesity, insulin resistance, and inflammation. Subsequently, because adipose tissue residing macrophages have been shown to play an important role in the development of obesity, inflammation, and insulin resistance [23], we next investigated whether *n*-3 fatty acids exert their beneficial metabolic and anti-inflammatory actions through the activation of PPAR γ in these cells. For this, we evaluated whether genetic deletion of PPAR γ in myeloid cells—namely, macrophages, dendritic cells, and neutrophils—abolishes the beneficial anti-obesity, metabolic, and anti-inflammatory phenotypes associated with the intake of a diet rich in *n*-3 fatty acids.

2 Materials and Methods

2.1 Experimental design

Animal experimental procedures were approved by the Animal Care Committee of the Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (#91/CEUA). Mice were kept at 25 \pm 1°C and on a 12:12 h light/dark cycle. Male 8-wk-old C57BL6 wild-type (WT) or *fat-1* littermate mice were matched by weight and fed either a nonpurified diet (LFD (low-fat diet); 70% carbohydrate, 20% protein, 10% fat (in %Kcal)) or HFD (20% carbohydrate, 20% protein, 60% fat (in %kcal); Table 1;

fatty acids diet profile in Supporting information Table 1) for 8 wk. *Fat-1* mice were produced by insertion of the *fat-1* gene from *C. elegans* as previously described [12]. Pharmacological PPAR γ inhibition was achieved through treatment with the PPAR γ antagonist 2-chloro-5-nitrobenzanilide (GW9662) added at 0.1% w/w in the HFD for 8 wk. The GW9662 dose, chosen based on a previous study [24], was efficient in inhibiting PPAR γ as evidenced by the significant reduction in body weight gain and adiposity in WT mice fed an HFD and treated with GW9662. Body weight and food intake were measured weekly. After 8 wk, 6-h fasted mice were euthanized for tissue and blood harvesting.

PPAR $\gamma^{Lox/Lox}$ mice (B6.129-*Pparg*^{tm2Rev/j}, Jackson Laboratories) on a C57BL/6J background were crossed with *Lysozyme M-cre* mice (B6.129P2-*Lyz2*^{tm1(cre)Jfo}/J Jackson Laboratories) on a C57BL/6J background to obtain heterozygous PPAR $\gamma^{Lox/WT}$; *lysozyme M-cre*^{+/-} offspring in the F1 generation. These heterozygous mice were crossed with PPAR $\gamma^{Lox/Lox}$ mice to obtain mice with the genotype PPAR $\gamma^{Lox/Lox}$; *lysozyme M-cre*^{+/-} (referred henceforth as LyzM-PPAR γ^{KO} mice) and their littermates PPAR $\gamma^{Lox/Lox}$; *lysozyme M-cre*^{-/-} (referred henceforth as LyzM-PPAR γ^{WT}). Both LyzM-PPAR γ^{KO} and LyzM-PPAR γ^{WT} were fed with either a nonpurified diet (LFD; 70% carbohydrate, 20% protein, 10% fat, (in %Kcal)) or an HFD rich in MUFAs and saturated fatty acids (HFD; 20% carbohydrate, 20% protein, 60% fat (in %kcal); lard as fat source) or an HFD rich in *n-3* (HFN3, fish oil as fat source) [13] (Table 1). Diets' fatty acid profiles are shown in Supporting Information Table 1. Both HFD and HFN3 are isocaloric. After 8 wk, 6-h fasted mice were euthanized for tissue harvesting. Mice genotypes were determined by PCR analysis of tail genomic DNA.

2.2 Intraperitoneal glucose tolerance test (GTT)

Mice were fasted for 6 h and injected intraperitoneally with glucose (1 g/kg). Tail-vein blood glucose levels were determined before and 15, 30, 45, 60, and 90 min after glucose injection, using a OneTouch Johnson & Johnson glucometer.

2.3 Isolation of stromal-vascular fraction and mature adipocytes from epididymal adipose tissue

Epididymal adipose tissue was digested with collagenase type II (1 mg/mL, Sigma-Aldrich) in Krebs–Hepes buffer containing BSA (1%) and glucose (2 mmol/L), pH 7.4 at 37°C. After filtering, cell suspension was centrifuged (600 \times g, 10 min) for isolation of stromal-vascular cells (pellet) for flow cytometry analysis and the floating mature adipocytes for diameter analysis. For the latter, mature adipocytes were photographed in a microscope (magnification of 40 \times) using a microscope camera (Moticam 1000; Motic, Richmond, BC, Canada), and mean adipocyte diameters were determined by measuring 100 cells using the software Motic-Images Plus 2.0.

2.4 LC-MS/MS analysis

Analysis of serum DHA derivatives (HDHA) was performed by LC-MS/MS essentially as previously described [25] and as detailed in the Supporting Information Tables 2 and 3. Briefly, serum samples (50 μ L) were added to 450 μ L of 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing butylated hydroxytoluene (100 μ M), deferoxamine (100 μ M), and 5-hydroxytetraeicosanoic acid (HETE)-d8 (250 ng/mL); extracted twice with chloroform:ethyl acetate (4:1); and centrifuged. The chloroform layer was dried with nitrogen and the residue was resuspended in isopropanol (1 mL) and mixed with NaOH (0.4 M, 1 mL), for 30 min in the dark at 37°C. After this, samples were neutralized with HCl (2 M) and then extracted twice with hexane. After mixing and centrifugation, the hexane layer was dried with nitrogen, the residue resuspended in 50 μ L of methanol containing 12-HETE-d8 (250 ng/mL) and centrifuged at 2000 \times g for 10 min at 4°C, before analysis in the LC-MS/MS system. The injection volume was 5 μ L. Sample analysis was performed in an HPLC Agilent 1200 (Santa Clara, CA, USA) coupled to 4000-Qtrap mass spectrometry (AB SCIEX, Concord, CA, USA). The theoretical fragments and *m/z* values of the ions used were previously described [25].

2.5 GC analysis

Serum was evaluated for *n-6* and *n-3* fatty acid content by transesterification reaction for GC FAME analysis as previously described [26]. Serum samples (40 μ L) previously extracted as described for LC-MS/MS analysis were mixed with methanol (1.76 mL), margaric acid 1 mg/mL (50 μ L), acetyl chloride (100 μ L) and heated for 60 min at 100°C. After cooling hexane (1.5 mL) was added, and the tubes were vortexed for 1 min and centrifuged at 1500 \times g for 2 min at 4°C. The upper organic phase was collected and evaporated under nitrogen to dryness and the dry residue was then dissolved in 40 μ L of hexane. Individual FAMES were analyzed by injecting 1 μ L of the sample into a GC with flame ionization detection on a Trace 1310 (Thermo Scientific) using a capillary column (DB-FFAP, 15 m \times 0.1 mm id \times 0.1 μ m film thickness, Agilent Technologies). FAME was identified by direct comparison with a FAME standard mix (Supelco 37 Component FAME Mix; Sigma-Aldrich), each individual peak was integrated and normalized by the internal standard. The percentage of individual FAME was calculated in relation to the total area of FAME peaks. As far as the FAMES of interest have similar carbon chain length, it was assumed that they have the same response factor and volatility, allowing a direct comparison of the peak areas to determine sample composition.

2.6 Flow cytometry analysis

Stromal-vascular cells (2 \times 10⁶ cells) were incubated with red blood cell lysis buffer (5 min), centrifuged, and resuspended

in Pharmigen stain buffer (BD Biosciences). Cell suspension was incubated for 30 min with specific macrophages (F4/80-APC, CD11c-FITC and CD206-PE) or (F4/80-PE, CD86-APC and CD206-PB) antibodies (Becton Dickinson and Biotend). Negative controls were labeled with nonreactive IgG. Cells were analyzed in a BD-FACS Aria II cell sorter and BD-FACS Canto II (Becton Dickinson) by using BD Diva software (Becton Dickinson). Cells F4/80⁺, CD11c⁺, CD206⁻ or F4/80⁺, CD86⁺, CD206⁻ and cells F4/80⁺, CD11c⁻, CD206⁺ or F4/80⁺, CD86⁻, CD206⁺ (F4/80⁺ is total macrophage marker; F4/80⁺, CD11c⁺ is pro-inflammatory M1 macrophage; F4/80⁺, CD206⁺ is anti-inflammatory M2 macrophage) were considered as M1 and M2 macrophages, respectively.

2.7 Western blot analysis

Epididymal adipose tissue and bone marrow derived macrophages [27] were homogenized and analyzed by protein content as previously described [28]. Primary antibodies used were NF- κ B p65 (#3987s), phospho(p)NF κ B p65 (#3033s), PPAR γ (#2435), and β -actin (#4967; Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA), diluted 1:1000 in 5% milk. Membranes were incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10 000) and revealed with ECL enhanced chemiluminescence substrate (GE Healthcare).

2.8 Plasma determinations

Plasma insulin, leptin, adiponectin, and resistin were measured by ELISA following the supplier recommendations (Millipore Billerica, MA, USA). Nonesterified fatty acids (NEFA) (WakoChemicals, Richmond, VA, USA), triacylglycerols (TAG), cholesterol, and glucose were measured according to the manufacturer's instructions (Labtest, Lagoa Santa, Brazil).

2.9 Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Multifactorial ANOVA followed by Tukey's post hoc test were performed using Sigmaplot Software (SigmaPlot for Windows v. 11.0). The significance level was set at $p \leq 0.05$.

3 Results

As expected, *fat-1* mice had an increased endogenous production of *n-3* fatty acids as evidenced by the lower *n-6/n-3* and arachidonic acid/*n-3* ratios than WT mice fed with either LFD or HFD (Table 2). As depicted in Fig. 1 and Table 2, there were no differences in body weight gain, food intake and efficiency, and plasma analytes between WT and *fat-1*

mice fed an LFD. Intake of an HFD for 8 wk induced obesity in WT mice as evidenced by the significant increase in body weight gain, food efficiency, adiposity (mass of epididymal fat depot), and plasma leptin levels (Fig. 1A, C, and D and Table 2). *Fat-1* mice, in contrast, were partially protected from HFD-induced obesity as evidenced by the reduced body weight gain and adiposity and increased energy expenditure suggested by the diminished food efficiency. In addition, *fat-1* mice fed the HFD presented reduced plasma leptin levels, but no changes in food intake, plasma triacylglycerol, nonesterified fatty acids, cholesterol, adiponectin, or resistin levels when compared to HFD-fed WT mice (Fig. 1A and Table 2).

Along with adiposity, HFD feeding had deleterious effects on glucose homeostasis in WT mice as evidenced by the increased fasting glycemia and severe glucose intolerance indicated by the higher glucose excursion and area under the curve in response to a bolus glucose injection in the GTT (Table 2 and Fig. 1E and F). *Fat-1* mice, in contrast, were largely protected from the glucose intolerance induced by the HFD as evidenced by the decreased fasting glycemia, glucose excursion, and area under the curve in GTT when compared to obese WT mice (Table 2 and Fig. 1E and F). Despite the differences in glucose tolerance, both WT and *fat-1* mice fed the HFD had similarly increased fasting plasma insulin levels compared to LFD-fed mice (Table 2). Along with glucose intolerance, HFD feeding significantly induced adipose tissue inflammation as evidenced by the increased adipose tissue F4/80⁺ and F4/80⁺, CD11c⁺ in WT mice (Fig. 1G–I). Such macrophage profile was associated with a marked activation of intracellular proinflammatory signaling in adipose tissue as evidenced by the increased content of phosphorylated NF- κ B (Fig. 1J). Conversely, *fat-1* mice not only displayed an anti-inflammatory macrophage profile in adipose tissue when fed the LFD (increased M2 (F4/80⁺, CD206⁺ of adipose tissue) macrophages), but were also protected from the adipose tissue inflammation induced by HFD feeding as shown by the marked reduction in adipose tissue total and M1 macrophages and phosphorylated NF- κ B protein content (Fig. 1H and I). Importantly, such protection from diet-induced obesity and inflammation displayed by *fat-1* mice was associated with a trend for an increase in adipose tissue PPAR γ 2 and PPAR γ 1 protein content ($p = 0.07$ and 0.11 , respectively; Fig. 1L and M).

To explore the hypothesis that PPAR γ activation is involved in the protective actions of *n-3* fatty acids against the deleterious effects of obesity, HFD-fed *fat-1* mice were treated or not treated with GW9662 and evaluated for energy balance, glucose tolerance, and adipose tissue inflammation. As depicted in Fig. 2, treatment with GW9662 was efficient in inhibiting PPAR γ , as evidenced by the significant reduction in body weight gain, adiposity, and adipocyte diameter featured by HFD-fed WT mice treated with this compound, such effects not being due to changes in food intake (Fig. 2B). In contrast to HFD-fed WT mice, treatment with GW9662 did not affect the already reduced body weight gain, fat mass, and adipocyte size of *fat-1* mice fed the HFD (Fig. 2A, C, and D).

Table 2. Serum analytes in WT and *fat-1* mice fed ad libitum with nonpurified LFD or HFD for 8 wk

	LFD		HFD	
	WT	<i>fat-1</i>	WT	<i>fat-1</i>
<i>n-6/n-3</i> ratio ^{a)}	2.75 ± 0.1 ^{c)}	2.08 ± 0.1 ^{d)}	4.03 ± 0.2 ^{e)}	3.02 ± 0.1 ^{c)}
AA/ <i>n-3</i> ratio ^{b)}	1.08 ± 0.1 ^{c)}	0.49 ± 0.1 ^{d)}	1.63 ± 0.1 ^{e)}	0.80 ± 0.1 ^{c)}
TAG (mmol/L)	0.61 ± 0.1 ^{c)}	0.80 ± 0.1 ^{c)}	0.61 ± 0.1 ^{c)}	0.63 ± 0.1 ^{c)}
Cholesterol (mmol/L)	3.22 ± 0.5 ^{c)}	3.84 ± 0.3 ^{c),d)}	5.03 ± 0.3 ^{d)}	3.74 ± 0.5 ^{c),d)}
NEFA (μM)	39 ± 1 ^{c)}	37 ± 5 ^{c)}	44 ± 3 ^{c)}	38 ± 6 ^{c)}
Glucose (mmol/L)	7.93 ± 0.8 ^{c)}	9.87 ± 0.7 ^{c)}	12.3 ± 0.8 ^{d)}	8.26 ± 0.3 ^{c)}
Insulin (pmol/L)	72.6 ± 31 ^{c)}	58.8 ± 17 ^{c)}	148 ± 35 ^{d)}	150 ± 35 ^{d)}
Leptin (ng/mL)	1.70 ± 1.1 ^{c)}	1.44 ± 0.7 ^{c)}	8.77 ± 1.7 ^{d)}	3.16 ± 0.4 ^{e)}
Adiponectin (μg/mL)	6.06 ± 2.2 ^{c)}	5.10 ± 1.3 ^{d)}	3.07 ± 0.8 ^{c)}	2.90 ± 0.4 ^{c)}
Resistin (ng/mL)	1.03 ± 0.5 ^{c)}	1.14 ± 0.3 ^{c)}	1.23 ± 0.2 ^{c)}	0.75 ± 0.3 ^{c)}

a) *n-6* (C18:2, C20:2, C20:3, C20:4)/*n-3* (C18:3, C20:3, C20:5, C22:6).

b) AA (C20:4 *n-6*)/*n-3* (C18:3, C20:3, C20:5, C22:6).

Values are expressed as mean ± SEM ($n = 5$). Means not sharing a common superscript are significantly different from each other ($p \leq 0.05$).

AA, arachidonic acid; NEFA, nonesterified fatty acids; TAG, triacylglycerol.

Despite the absence of changes in energy balance, GW9662 administration to *fat-1* mice significantly reduced circulating levels of DHA derivatives 17- and 14-HDHA, which are the precursors of RvD1 and MaR1, respectively (Fig. 2D and E).

We next evaluated whether pharmacological PPAR γ inhibition affects *fat-1* protection against HFD-induced glucose intolerance. As illustrated in Fig. 3, treatment with GW9662 did not affect glucose homeostasis in HFD-fed WT mice as evidenced by the absence of changes in fasting glycemia and area under the curve in the GTT, but significantly increased fasting insulin levels in these animals. Conversely, GW9662 administration completely abolished *fat-1* mice protection against HFD-induced glucose intolerance as evidenced by the significant increases in fasting glycemia, plasma glucose excursion after glucose injection, and area under the curve in the GTT to levels, which were of similar magnitude to those found in HFD-fed WT mice (Fig. 3A–D). Noteworthy, those changes in glucose tolerance induced by PPAR γ inhibition were not associated with changes in fasting serum insulin levels, which remained similar to untreated HFD-fed *fat-1* mice (Fig. 3B).

In addition to glucose homeostasis, pharmacological PPAR γ inhibition significantly affected the recruitment and polarization of macrophages residing in adipose tissue. As illustrated in Fig. 3, GW9662 administration to HFD-fed WT mice reduced macrophage (F4/80⁺ cells, Panel E) infiltration in adipose tissue and polarization to M1 phenotype (reduced percentage of F4/80⁺ and CD11c⁺ cells, Panel F), while promoting macrophage polarization to the M2 phenotype (increased percentage of F4/80⁺ and CD206⁺ cells, Panel G). In HFD-fed *fat-1* mice, however, treatment with GW9662 did not affect the reduced adipose tissue content of total and M1 macrophages (Fig. 3E and F), despite enhancing macrophage polarization to M2 phenotype (Fig. 3G).

To gain further insight into PPAR γ involvement in *n-3* metabolic and anti-inflammatory actions, we next investigated whether PPAR γ deficiency in myeloid cells interferes

with the protective actions of *n-3* fatty acids against the deleterious consequences of diet-induced obesity. As illustrated in Fig. 4, we have successfully generated mice with deletion of PPAR γ in myeloid cells as evidenced by the almost complete absence of this protein in bone marrow derived macrophages from LyzM-PPAR γ ^{KO} mice (Fig. 4A). As expected, intake of an HFD induced obesity and glucose intolerance in both LyzM-PPAR γ ^{WT} and LyzM-PPAR γ ^{KO} mice as evidenced by their higher body weight gain, food efficiency, epididymal fat mass, and area under the curve in GTT than those of LFD-fed mice (Fig. 4B–G). Importantly, with the exception of glucose intolerance, such HFD effects were of higher magnitude in LyzM-PPAR γ ^{KO} than LyzM-PPAR γ ^{WT} mice, despite similar cumulative food intake in both groups. Conversely, LyzM-PPAR γ ^{KO} and LyzM-PPAR γ ^{WT} mice fed with an HFD isocaloric to HFD, but rich in *n-3* fatty acids (HFN3) were protected from diet-induced obesity as evidenced by the levels of body weight gain, energy efficiency, and adiposity, which were similar to those of control, LFD-fed mice (Fig. 4B, D, and E). Importantly, there were no significant changes in food intake between mice fed either HFD or HFN3 independently of the genotype (Fig. 4C). Along with obesity, LyzM-PPAR γ ^{KO} and LyzM-PPAR γ ^{WT} mice fed the HFN3 presented lower levels of glucose intolerance and adipose tissue inflammation evidenced by the reduced area under the curve in GTT (Fig. 4F and G) and M1 macrophage content of adipose tissue (Fig. 4I), respectively, compared to HFD-fed mice.

4 Discussion

Through a combination of genetic, pharmacological, and dietary tools, we tested herein the hypothesis that PPAR γ is a major mediator of *n-3* protective actions against HFD-induced obesity, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation. Our main findings indicate that increasing body *n-3* fatty acid levels either genetically or through diet

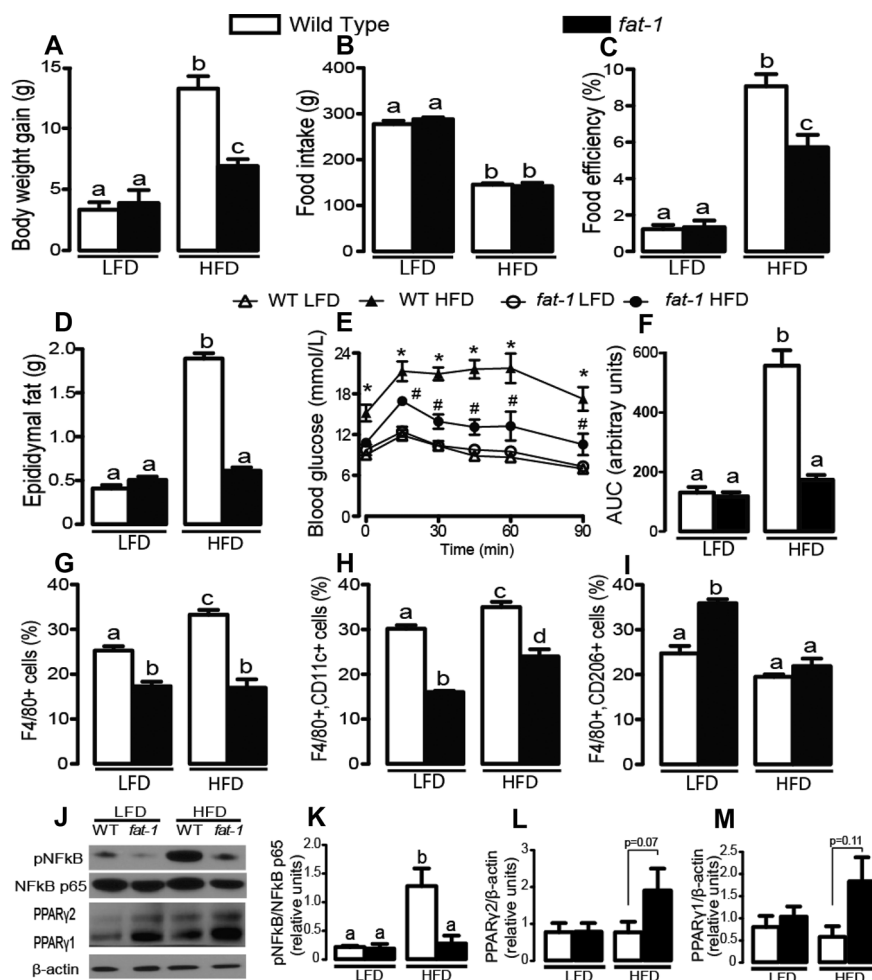


Figure 1. *Fat-1* mice are partially protected from HFD-induced obesity, glucose intolerance, and inflammation. Body weight gain (A), food intake (B), food efficiency (C), epididymal adipose depot mass (D), GTT (E), area under curve from GTT (F), adipose tissue content of total (F4/80⁺ cells, Panel G), M1 (F4/80⁺ and CD11c⁺ cells, Panel H), and M2 (F4/80⁺ and CD206⁺ cells, Panel I) macrophages; representative immunoblots of phosphorylated NF-κB, total NFκB, PPARγ2, PPARγ1, and β-actin (J); and quantification of densitometry analyses of the ratio phosphorylated NF-κB/NF-κB (K), PPARγ2/β-actin (L), and PPARγ1/β-actin in WT and *fat-1* mice fed ad libitum with either an LFD or HFD for 8 wk. Values are expressed as mean ± SEM ($n = 4-5$). Means not sharing a common superscript are significantly different from each other ($p \leq 0.05$). Food efficiency was calculated as gram body weight gain per 100 g food ingested.

indeed protects mice from HFD-induced obesity, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation. Importantly, among these *n-3* protective actions, only the attenuation of HFD-induced glucose intolerance appears to be mediated by PPARγ activation. Our findings also indicate that myeloid-cell PPARγ is not involved in the beneficial actions of dietary *n-3* fatty acids protecting from HFD-associated obesity, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation.

We have shown here that either a genetic or a dietary elevation in body *n-3* levels largely protects mice from HFD-induced obesity. Although the mechanisms underlying these *n-3* actions are undefined, the absence of significant changes on food intake in any of the studies reported herein strongly indicates that this may be due to increased energy expenditure. In this sense, previous reports have found that administration of *n-3* EPA attenuates diet-induced obesity by increasing energy expenditure in mice, such an effect being attributed to an increase in futile substrate cycling of fatty acid reesterification but not to nonshivering thermogenesis [29, 30]. Furthermore, a recent study has found that *fat-1* mice fed an HFD display elevated rates of oxygen consumption and a protection against diet-induced obesity [14], although

the mechanisms underlying these *n-3* actions were not delineated. Contradictorily to these findings, however, a previous study did not find any protection of *fat-1* mice against the development of diet-induced obesity [31], such results having been recently attributed to an insufficient endogenous *n-3* production associated with use of heterozygous, instead of homozygous, *fat-1* mice [14].

In addition to obesity, an elevation in body *n-3* also protected mice from HFD-induced glucose intolerance and adipose tissue inflammation, such findings being in agreement with others reported previously [13, 15, 31]. Importantly, such beneficial actions of *n-3* fatty acids were associated with a significant increase in adipose tissue content of PPARγ, suggesting a likely involvement of this nuclear receptor in *n-3* actions. In spite of much evidence gathered over the years indicating the existence of complex interrelationships between *n-3* fatty acids and PPARγ activity, the involvement of this nuclear receptor as mediator of *n-3* metabolic and anti-inflammatory actions in vivo is still poorly defined. In addition to the previous findings that *n-3* fatty acids and their hydroxide derivatives act as naturally occurring ligands of PPARγ and that an elevation in body *n-3* levels is frequently associated with an increase in

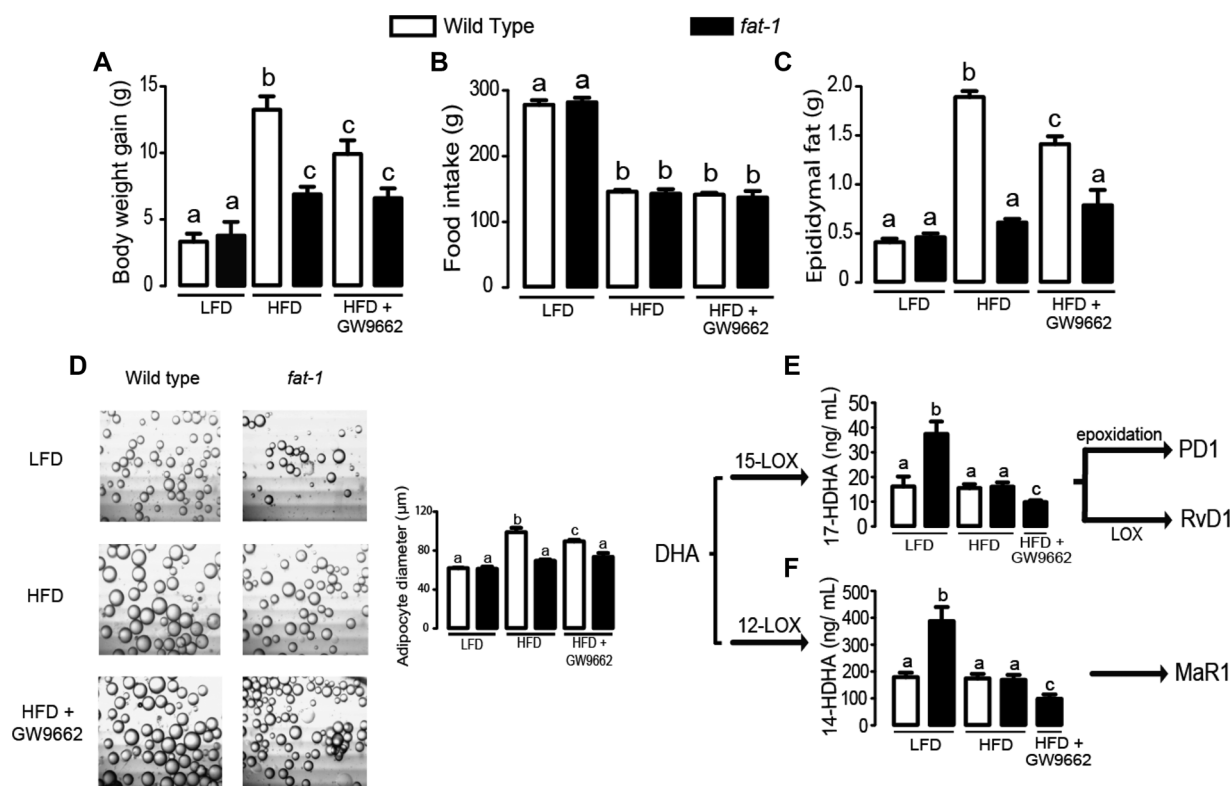


Figure 2. Pharmacological PPAR γ inhibition did not revert the obesity protection in *fat-1* mice. Body weight gain (A), food intake (B), epididymal adipose depot mass (C), epididymal adipocyte diameter (magnification of 40 \times) (D), and serum DHA hydroxides levels 17 and 14 (E and F, respectively) precursors of specialized pro-resolving mediators (SPM) in WT and *fat-1* mice fed with a nonpurified LFD or HFD and treated or not treated with GW9662 for 8 wk. Values are expressed as mean \pm SEM ($n = 4-5$). Means not sharing a common superscript are significantly different from each other ($p \leq 0.05$).

content and transcriptional activity of this nuclear receptor [20, 22, 32], the close resemblance between *n-3* metabolic and anti-inflammatory actions and those found upon pharmacological PPAR γ activation [8, 33–35] strongly suggests that *n-3* may be at least in part acting through PPAR γ . To test this hypothesis, we treated HFD-fed WT and *fat-1* mice with GW9662, a full synthetic and selective PPAR γ antagonist that is widely used in vivo and in vitro to elucidate PPAR γ regulated processes because of its strong affinity to this receptor, which exceeds those of the well-known thiazolidinedione rosiglitazone [24, 36–39]. Confirming its efficiency in vivo, GW9662, previously shown to inhibit adipocyte differentiation in vitro [36, 38], markedly attenuated the increase in WT mouse body weight, adiposity, and adipocyte diameter induced by HFD feeding, such variables being strongly dependent on proper PPAR γ activity. In contrast to WT mice, but in agreement with the role of PPAR γ as a major positive determinant of adiposity, administration of GW9662 did not affect the *n-3* mediated protection displayed by *fat-1* mice against HFD-induced obesity, thereby excluding a likely involvement of PPAR γ in this particular *n-3* action.

Among the various beneficial actions of *n-3* fatty acids protecting against the metabolic dysfunctions associated

with diet-induced obesity reported herein, pharmacological PPAR γ inhibition abolished only the improvement of glucose tolerance displayed by *fat-1* mice fed the HFD. Indeed, PPAR γ inhibition not only did not affect the reduced body weight gain and adiposity, but surprisingly, it had no effect on the attenuation of adipose tissue inflammation seen in *fat-1* mice upon HFD feeding. Corroborating those findings, myeloid-cell deletion of PPAR γ did not affect the reduction in adipose tissue inflammation (reduction in M1 macrophages) induced by the intake of a HFN3. These findings suggest that the improvement in glucose tolerance induced by *n-3* fatty acids is not only mediated by PPAR γ , but also completely independent of the reduction in body weight, adiposity, and adipose tissue inflammation observed in both HFD-fed *fat-1* and HFN3-fed mice. Mechanistically, our finding that the impairment of glucose tolerance in HFD-fed *fat-1* mice occurred without changes in plasma insulin levels indicates a likely involvement of a reduction in peripheral insulin responsiveness as its major underlying cause. Furthermore, our finding that HFN3 diet is equally effective in improving glucose tolerance in mice deficient of PPAR γ in myeloid cells strongly indicates the involvement of other body cell PPAR γ than those of macrophage, dendritic cells, and neutrophils in the

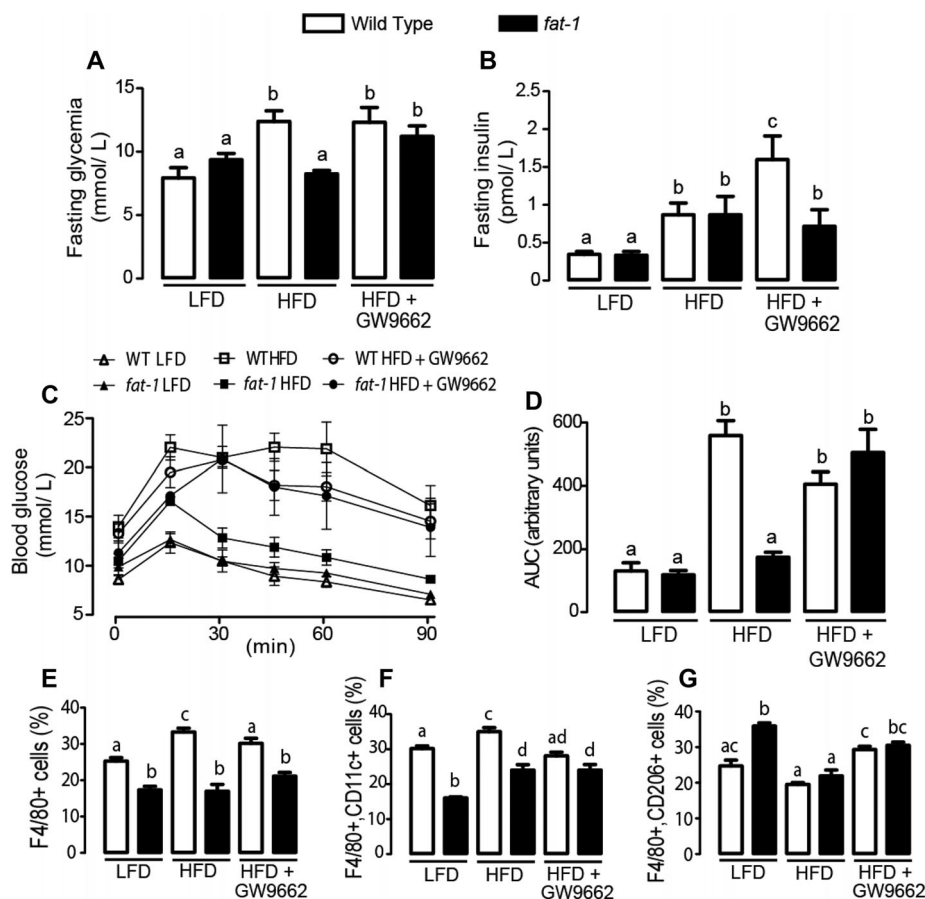


Figure 3. PPAR γ inhibition completely abolished *fat-1* mice protection against HFD-induced glucose intolerance. Fasting blood glucose (A), fasting insulinemia (B), GTT (Panel C) and area under the curve (Panel D), and adipose tissue content of total (F4/80⁺ cells, Panel E), M1 (F4/80⁺ and CD11c⁺ cells, Panel F), and M2 (F4/80⁺ and CD206⁺ cells, Panel G) macrophages in WT and *fat-1* mice fed with a nonpurified LFD or HFD and treated or not treated with GW9662 for 8 wk. Values are expressed as mean \pm SEM ($n = 4-5$). Means not sharing a common superscript are significantly different from each other ($p < 0.05$).

amelioration of glucose homeostasis induced by *n-3* fatty acids. In this sense, pharmacological PPAR γ activation with thiazolidinediones was shown to improve glucose tolerance by enhancing myocytes and adipocytes glucose uptake through several mechanisms including, but not restricted to, promoting insulin sensitivity, adiponectin secretion, adenosin monophosphate (AMP)-activated protein kinase activation, and hypolipidemia [40, 41]. Among these, those that are involved in the improvement in glucose tolerance found in *fat-1* mice need to be further investigated.

Noteworthy, our findings that PPAR γ does not seem to be involved in the protection against obesity-associated adipose tissue inflammation provided by *n-3* fatty acids corroborates previous studies showing that pharmacological PPAR γ inhibition did not affect the NF- κ B inhibition and anti-inflammatory actions of the *n-3* fatty acids EPA and DHA in dendritic cells and murine macrophages in vitro [42, 43]. Thus, perhaps, bioactive lipids such as *n-3* fatty acids and their derivatives exert their anti-inflammatory actions by activating other fatty acid sensors such as the GPR120, which is highly expressed in mature adipocytes and macrophages, and seems to mediate *n-3* fatty acid induced attenuation of obesity-associated inflammation [19, 44]. Importantly, in addition to GPR120 activation, *n-3* fatty acids may also exert anti-

inflammatory actions by changing the composition of cell membrane phospholipids [45] and serving as substrates for the synthesis of several lipid mediators such as resolvins and protectins that were previously shown to inhibit NF- κ B and to resolve inflammatory processes [9, 32, 46, 47]. Be that as it may, our findings indicate that PPAR γ activation is not a major contributor therein, or that its potential anti-inflammatory actions are overshadowed by those of other dominant pathways. Further studies are clearly required to elucidate the precise contribution of each of the above-mentioned mechanisms to the anti-inflammatory actions of *n-3* fatty acids.

In conclusion, our findings indicate that the enhanced body *n-3* fatty acids levels markedly attenuate HFD-induced obesity, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation. These findings support the concept that increasing body *n-3* fatty acid levels may represent an important strategy to counteract the development of obesity and associated diseases. Therefore, elucidation of the mechanisms by which *n-3* fatty acids exert their several beneficial metabolic and anti-inflammatory actions, which as shown here do include, but extend much beyond, PPAR γ activation, are of foremost importance to optimize the preventive/therapeutic efficacy of *n-3* fatty acids against the development of metabolic diseases.

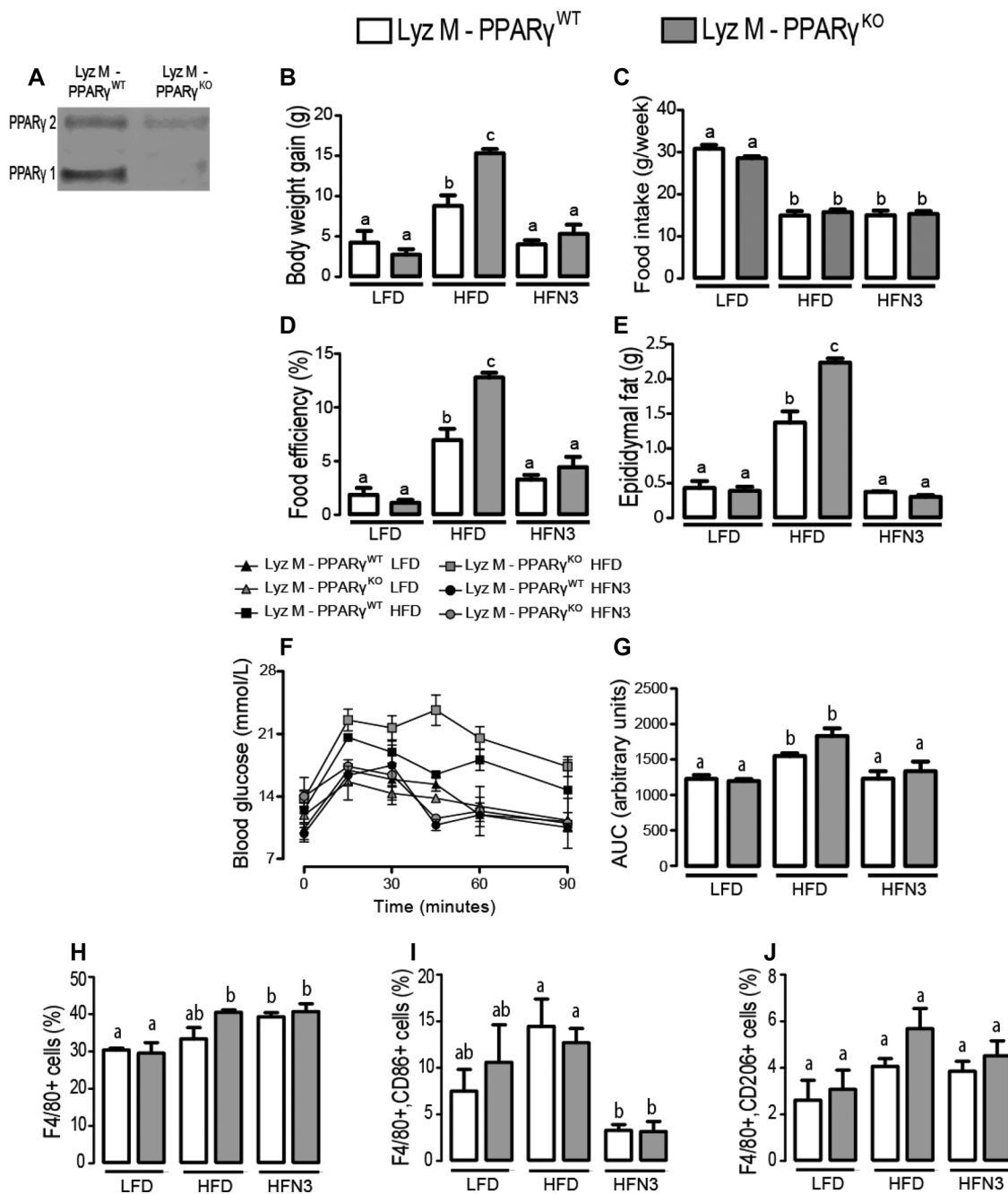


Figure 4. Myeloid-cell PPAR γ is not required for diet *n*-3 fatty acids protective actions against HFD-induced obesity, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation. PPAR γ protein content (A), body weight gain (B), food intake (C), food efficiency (D), epididymal adipose depot mass (E), GTT (F), area under curve from GTT (G), adipose tissue content of total adipose tissue content of total (F4/80⁺ cells, Panel H), M1 (F4/80⁺ and CD86⁺ cells, Panel I), and M2 (F4/80⁺ and CD206⁺ cells, Panel J) macrophages in LyzM-PPAR γ ^{WT} and LyzM-PPAR γ ^{KO} mice fed with a nonpurified LFD or HFD or HFN3 for 8 wk. Values are expressed as mean \pm SEM ($n = 4-5$). Means not sharing a common superscript are significantly different from each other ($p < 0.05$).

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP #09/15354-7 and 10/52191-6 to W.F.) and Agence Universitaire de la Francophonie (Y.D.). T.B. is the recipient of a Ph.D. studentship

from FAPESP (#11/14172-2). We thank Roberto Mendonça for the invaluable technical assistance and Alex Yamashita for comments and revision.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Kahn, S. E., Hull, R. L., Utzschneider, K. M., Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006, *444*, 840–846.
- [2] Martínez, J. A., Mitochondrial oxidative stress and inflammation: an slalom to obesity and insulin resistance. *J. Physiol. Biochem.* 2006, *62*, 303–306.
- [3] Després, J.-P., Abdominal obesity: the most prevalent cause of the metabolic syndrome and related cardiometabolic risk. *Eur. Heart J. Suppl.* 2006, *8*, B4–B12.
- [4] Hotamisligil, G., Shargill, N., Spiegelman, B., Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993, *259*, 87–91.
- [5] Simopoulos, A., The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp. Biol. Med.* 2008, *233*, 674–688.
- [6] Tsukumo, D. M. L., Carvalho-Filho, M. A., Carvalheira, J. B. C., Prada, P. O. et al., Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007, *56*, 1986–1998.
- [7] Hotamisligil, G. S., Erbay, E., Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 2008, *8*, 923–934.
- [8] Adkins, Y., Kelley, D. S., Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Nutr. Biochem.* 2010, *21*, 781–792.
- [9] Serhan, C. N., Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 2014, *510*, 92–101.
- [10] Calder, P., N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006, *83*.
- [11] Calder, P., Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2013, *75*, 645–662.
- [12] Kang, J., Wang, J., Wu, L., Kang, Z., Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature* 2004, *427*, 504.
- [13] Fiamoncini, J., Turner, N., Hirabara, S. M., Salgado, T. M. L. et al., Enhanced peroxisomal β -oxidation is associated with prevention of obesity and glucose intolerance by fish oil-enriched diets. *Obesity* 2013, *21*, 1200–1207.
- [14] Li, J., Li, F. R., Wei, D., Jia, W. et al., Endogenous ω -3 PUFAs production confers resistance to obesity, dyslipidemia, and diabetes in mice. *Mol. Endocrinol.* 2014, *28*, 1316–1328.
- [15] Romanatto, T., Fiamoncini, J., Wang, B., Curi, R., Kang, J. X., Elevated tissue omega-3 fatty acid status prevents age-related glucose intolerance in fat-1 transgenic mice. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, *1842*, 186–191.
- [16] Sun, H., Hu, Y., Gu, Z., Owens, R. et al., Omega-3 fatty acids induce apoptosis in human breast cancer cells and mouse mammary tissue through syndecan-1 inhibition of the MEK-Erk pathway. *Carcinogenesis* 2011, *32*, 1518–1524.
- [17] MacLennan, M., Clarke, S., Perez, K., Wood, G. et al., Mammary tumor development is directly inhibited by lifelong n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Nutr. Biochem.* 2013, *24*, 388–395.
- [18] Bellenger, J., Bellenger, S., Bataille, A., Massey, K. et al., High pancreatic n-3 fatty acids prevent STZ-induced diabetes in fat-1 mice: inflammatory pathway inhibition. *Diabetes* 2011, *60*, 1090–1099.
- [19] Oh, D. Y., Talukdar, S., Bae, E. J., Imamura, T., Morinaga, H., GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 2010, *142*, 687–698.
- [20] Neuhofer, A., Zeyda, M., Mascher, D., Itariu, B. K. et al., Impaired local production of proresolving lipid mediators in obesity and 17-HDHA as a potential treatment for obesity-associated inflammation. *Diabetes* 2013, *62*, 1945–1956.
- [21] González-Pérez, A., Horrillo, R., Ferré, N., Gronert, K. et al., Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB J.* 2009, *23*, 1946–1957.
- [22] González-Pérez, A., Planagumà, A., Gronert, K., Miquel, R. et al., Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA. *FASEB J.* 2006, *20*, 2537–2539.
- [23] Sell, H., Habich, C., Eckel, J., Adaptive immunity in obesity and insulin resistance. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2012, *8*, 709–716.
- [24] Nakano, R., Kurosaki, E., Yoshida, S., Yokono, M. et al., Antagonism of peroxisome proliferator-activated receptor γ prevents high-fat diet-induced obesity in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 2006, *72*, 42–52.
- [25] Rodbell, M., Metabolism of isolated fat cells. *J. Biol. Chem.* 1964, *239*, 375–380.
- [26] Derogis, P. B., Freitas, F. P., Marques, A. S., Cunha, D. et al., The development of a specific and sensitive LC-MS-based method for the detection and quantification of hydroperoxy- and hydroxydocosahexaenoic acids as a tool for lipidomic analysis. *PLoS One* 2013, *8*, e77561.
- [27] Masood, A., Stark, K. D., Salem, N., A simplified and efficient method for the analysis of fatty acid methyl esters suitable for large clinical studies. *J. Lipid Res.* 2005, *46*, 2299–2305.
- [28] Weischenfeldt, J., Porse, B., Bone marrow-derived macrophages (BMM): isolation and applications. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2008, *2008*.
- [29] Festuccia, W. T., Blanchard, P.-G. G., Belchior, T., Chimin, P. et al., PPAR γ activation attenuates glucose intolerance induced by mTOR inhibition with rapamycin in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2014, *306*, 54.
- [30] Sato, A., Kawano, H., Notsu, T., Ohta, M. et al., Antiobesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. *Diabetes* 2010, *59*, 2495–2504.
- [31] Janovská, P., Flachs, P., Kazdová, L., Kopecký, J., Anti-obesity effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in mice fed high-fat diet is independent of cold-induced thermogenesis. *Physiol. Res.* 2013, *62*, 153–161.
- [32] White, P. J., Arita, M., Taguchi, R., Kang, J. X., Marette, A., Transgenic restoration of long-chain n-3 fatty acids in insulin

- target tissues improves resolution capacity and alleviates obesity-linked inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice. *Diabetes* 2010, 59, 3066–3073.
- [33] Sapiaha, P., Stahl, A., Chen, J., Seaward, M. R. et al., 5-Lipoxygenase metabolite 4-HDHA is a mediator of the antiangiogenic effect of ω -3 polyunsaturated fatty acids. *Sci. Transl. Med.* 2011, 3.
- [34] Kliewer, S. A., Sundseth, S. S., Jones, S. A., Brown, P. J. et al., Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997, 94, 4318–4323.
- [35] Pascual, G., Fong, A. L., Ogawa, S., Gamliel, A. et al., A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR- γ . *Nature* 2005, 437, 759–763.
- [36] Mori, T. A., Woodman, R. J., Burke, V., Puddey, I. B. et al., Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers in treated-hypertensive type 2 diabetic subjects. *Free Radic. Biol. Med.* 2003, 35, 772–781.
- [37] Leesnitzer, L. M., Parks, D. J., Bledsoe, R. K., Cobb, J. E. et al., Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry* 2002, 41, 6640–6650.
- [38] Jung, U. J., Torrejon, C., Chang, C. L., Hamai, H. et al., Fatty acids regulate endothelial lipase and inflammatory markers in macrophages and in mouse aorta: a role for PPAR γ . *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012, 32, 2929–2937.
- [39] Leyvraz, C., Suter, M., Verdumo, C., Calmes, J. M. M. et al., Selective effects of PPAR γ agonists and antagonists on human pre-adipocyte differentiation. *Diabetes Obes. Metab.* 2010, 12, 195–203.
- [40] van Ginderachter, J. A., Meerschaut, S., Liu, Y., Brys, L. et al., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) ligands reverse CTL suppression by alternatively activated (M2) macrophages in cancer. *Blood* 2006, 108, 525–535.
- [41] Festuccia, W. T., Laplante, M., Brûlé, S., Houde, V. P. et al., Rosiglitazone-induced heart remodelling is associated with enhanced turnover of myofibrillar protein and mTOR activation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2009, 47, 85–95.
- [42] Festuccia, W., Blanchard, P.-G., Turcotte, V., Laplante, M. et al., The PPAR γ agonist rosiglitazone enhances rat brown adipose tissue lipogenesis from glucose without altering glucose uptake. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2009, 296, 35.
- [43] Draper, E., Reynolds, C. M., Canavan, M., Mills, K. H., Omega-3 fatty acids attenuate dendritic cell function via NF- κ B independent of PPAR γ . *J. Nutr. Biochem.* 2011, 22, 784–790.
- [44] Zhang, M., Fritsche, K. L., Fatty acid-mediated inhibition of IL-12 production by murine macrophages is independent of PPAR γ . *Br. J. Nutr.* 2004, 91, 733–739.
- [45] Yore, M. M., Syed, I., Moraes-Vieira, P. M., Zhang, T. et al., Discovery of a class of endogenous mammalian lipids with anti-diabetic and anti-inflammatory effects. *Cell* 2014, 159, 318–332.
- [46] Calder, P. C., Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J. Nutr.* 2012, 142, 592S–599S.
- [47] Arita, M., Bianchini, F., Aliberti, J., Sher, A. et al., Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J. Exp. Med.* 2005, 201, 713–722.