

*Laureane Nunes Masi*

*Sensibilidade periférica à insulina e resposta  
inflamatória na vigência de dietas obesogênicas,  
suplementação com óleo de peixe e ausência de  
TLR-4*

*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  
2014*

*Laureane Nunes Masi*

*Sensibilidade periférica à insulina e resposta  
inflamatória na vigência de dietas obesogênicas,  
suplementação com óleo de peixe e ausência de  
TLR-4*

*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. Rui Curi*

*Versão original*

*São Paulo  
2014*

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

Masi, Laureane Nunes.

Sensibilidade periférica à insulina e resposta inflamatória na vigência de dietas obesogênicas, suplementação com óleo de peixe e ausência de TLR-4 / Laureane Nunes Masi. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Metabolismo celular.

Versão do título para o inglês: Peripheral insulin-sensitivity and inflammatory response under obesogenic diets, fish oil supplementation and absence of TLR-4.

1. Gordura da dieta 2. Carboidrato 3. Ácidos graxos poliinsaturados  
4. Tecidos insulino-sensíveis 5. Obesidade 6. Inflamação I. Curi,  
Prof. Dr. Rui II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências  
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III.  
Título.

ICB/SBIB0109/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Laureane Nunes Masi.

Título da Tese: Sensibilidade periférica à insulina e resposta inflamatória na vigência de dietas obesogênicas, suplementação com óleo de peixe e ausência de TLR-4.

Orientador(a): Prof. Dr. Rui Curi.

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: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 088.13

São Paulo, 31 de outubro de 2013.

REF.: Protocolo nº 125/10.

*"Efeitos de uma dieta rica em gordura saturada na resposta inflamatória no endotélio da aorta de camundongos TLR4(-/-) suplementados com ácidos graxos ômega-3 e ômega-6"*

Prezado Professor,

Sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, foi prorrogada até 15.02.2017.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilmo. Sr.  
Prof. Dr. RUI CURI  
Departamento de Fisiologia e Biofísica  
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

*Aos meus pais, familiares,  
companheiro e amigos, pela  
dedicação, incentivo e apoio  
constante para a minha formação.*

## *AGRADECIMENTOS*

*À Deus que me abençoa com paz, lucidez, saúde e oportunidade de estar no lugar, hora e companhias certas para a realização desse trabalho.*

*Aos meus pais, Carlos Alberto Masi e Elza Nunes Masi, que sempre me apoiaram nas escolhas dos caminhos que tracei na vida e reconheço ser essa a razão pela qual acredito no “final feliz”.*

*Ao meu irmão querido e companheiro, Carlos Daniel Nunes Masi, que demonstra preocupação sem sufocar e carinho sem cobrar. Sua presença me traz conforto familiar e isso faz o retorno diário para casa ser o melhor momento do dia.*

*Ao meu namorado e companheiro Éric Boni Fajardo, que passa momentos maravilhosos e outros bem difíceis ao meu lado, sempre me apoiando e respeitando as dificuldades.*

*Ao meu orientador Professor Dr. Rui Curi que me deu a oportunidade de trabalhar no seu laboratório e me ensinou nos últimos seis anos a ser uma pessoa melhor testemunhando suas atitudes.*

*Às amigas de trabalho com as quais tive o prazer de dividir a bancada, experimentos, grupos de animais, dúvidas e descobertas: Amanda Roque, Amanda Crisma e Cátia Lira do Amaral.*

*Aos amigos do laboratório que estão sempre ao meu lado, tornando meus dias mais alegres e cafeinados, em especial Alice Cristina Rodrigues, Renato Nachbar, Alcione Lescano, Carlos Flores, Gabriel Nassr, Mariana Davanso, Maysa Cruz, Roberta Cunha de Sa, Thiago Belchior, Patricia Chimin, Amanda Roque, Amanda Crisma, Cátia Lira do Amaral, Gilson Murata, Sandro Hirabara, Fábio Takeo, Kaio Vitzel, Diogo Vasconcelos, Luis Gustavo Oliveira.*

*Aos técnicos Roberto Mendonça, Tatiana Alba-Loureiro e Gilson Murata pelo auxílio, paciência e atenção necessária durante o desenvolvimento de todo o trabalho.*

*Ao Professor Dr. André Marette e seu grupo de pesquisa no Departamento de Medicina da Laval University de Quebec no Canadá, por me receber em seu laboratório para estágio e aprimoramento de novas técnicas durante seis meses.*

*Às minhas amigas Paula Druzian e Patricia Costa pelo apoio na vida pessoal e profissional com carinho e compreensão.*

*Ao José Maria e Paloma pela prontidão, preocupação, esclarecimento e ajuda nos prazos e normas da pos-graduação.*

*À FAPESP (Processo 2010/08872-9), CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.*

*“A coragem nem sempre estrondeia. Às vezes, ela é a voz suave no fim do dia que diz: tentarei novamente amanhã.”*

*Mary Anne Radmacher*

## RESUMO

MASI, L. N. **Sensibilidade periférica à insulina e resposta inflamatória na vigência de dietas obesogênicas, suplementação com óleo de peixe e ausência de TLR-4.** 2014. 180 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O objetivo desse estudo foi investigar a associação da inflamação com a resistência periférica à insulina (RI) na vigência de dietas obesogênicas, na suplementação com óleo de peixe (OP) e ausência do receptor TLR-4. Os animais C57Bl/6J foram alimentados por quatro semanas com dieta balanceada (DB) e em seguida submetidos a oito semanas de DB e leite condensado (DB+LC), dieta hiperlipídica (HFD) ou HFD+LC. A suplementação com OP iniciou-se na primeira semana e estendeu-se até o final do protocolo experimental (semana 12) associada à DB ou HFD, em animais C57Bl/6J e TLR-4<sup>-/-</sup>. Os seguintes parâmetros foram analisados: ganho de massa corpórea e peso dos depósitos de gordura, tolerância à glicose e à insulina, glicemia e insulinemia basal, índice HOMA-IR, expressão de genes inflamatórios no fígado e tecido adiposo (TA) (F4/80, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TLR-4, adiponectina e leptina) por RT-PCR e produção de proteínas inflamatórias no TA, aorta torácica (AT) e gordura perivascular (GP) (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 VCAM-1, ICAM-1, adiponectina, leptina e resistina) por ELISA. As dietas DB+LC e HFD levaram ao aumento: no ganho de massa corpórea (2,3 e 2,9 vezes, respectivamente), gordura epididimal (1,7 e 2,2 vezes, respectivamente), intolerância à glicose (1,8 vezes em ambas), expressão de F4/80 (2,3 e 4,2 vezes, respectivamente) e leptina (3,3 e 2,3 vezes, respectivamente) no TA em relação ao DB. A dieta HFD causou ainda redução na expressão de adiponectina (46%) no TA e no conteúdo de IL-10 (27%) da GP. Em relação à HFD, a dieta HFD+LC provocou: aumento na intolerância à glicose (1,3 vezes), no HOMA-IR (4 vezes), nos conteúdos de IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ICAM-1, VCAM-1 (em cerca de 2 vezes) e leptina (5 vezes) no TA e redução no conteúdo de TNF- $\alpha$  (74%) na AT. Comparada à DB+LC, a dieta HF+LC aumentou: ganho de massa corpórea (50%), gordura epididimal (1,7 vezes), intolerância à glicose (1,3 vezes), HOMA-IR (3,5 vezes), conteúdos de IL-6 (1,5 vezes), IL-10 (1,7 vezes), IL-1 $\beta$  (2 vezes) e leptina (3,3 vezes) no TA, com aumento na expressão de F4/80 (2,3 vezes) e redução de leptina (38%) no TA e nos conteúdos de IL-6 (29%), TNF- $\alpha$  (25%) e IL-10 (34%) na GP. O OP associado à DB reduziu a expressão de: F4/80 (28%), TNF- $\alpha$  (44%) e TLR-4 (35,5%) no fígado, os conteúdos de VCAM-1 (17%), IL-6 (31%) e IL-10 (39%) na AT e adiponectina (21%) e resistina (48%) na GP. O OP reduziu o ganho de massa corpórea induzido pela HFD (23%), a gordura epididimal (29%), HOMA-IR (38%) e aumentou o conteúdo de adiponectina (1,5 vezes) no TA. A deleção do receptor TLR-4 elevou o ganho de massa corpórea (80%) no grupo DB+OP e da gordura mesentérica (36%) no HFD+OP. Assim, o consumo elevado de gordura ou açúcar por 8 semanas causou obesidade. A associação entre ambos nutrientes potencializou a obesidade e induziu RI e inflamação no TA e GP. A suplementação com OP atenuou a inflamação associada à DB e a obesidade e RI na vigência de HFD, sendo esses efeitos dependentes do receptor TLR-4.

**Palavras-chave:** Gordura da Dieta. Carboidrato. Tecidos Insulino-Sensíveis. Obesidade. Inflamação.

## *ABSTRACT*

MASI, L. N. **Peripheral insulin-sensitivity and inflammation response under obesogenic diets, fish oil supplementation and absence of TLR-4.** 2014. 180 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, 2014.

The aim of this study was to investigate the association between inflammation and insulin resistance (IR) under obesogenic diets, fish oil supplementation (FO) and in the absence of TLR-4. C57Bl/7J mice were fed four weeks with a balanced diet (BD), and then received BD and condensed milk (BD+CM), high-fat diet (HFD) or high-fat diet and condensed milk (HFD+CM). Fish oil supplementation was initiated in the first week and it was maintained until the end of the treatment (week 12), associated with BD or HFD, in C57Bl/6J or TLR-4<sup>-/-</sup> mice. The following parameters were measured: body weight gain, adipose tissue depot weights, glucose and insulin tolerance, glycemia, insulinemia, HOMA-IR index, mRNA expression (by RT-PCR) of F4/80, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TLR-4, adiponectin and leptin in the liver and adipose tissue, protein contents (by ELISA) of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, VCAM-1, ICAM-1, adiponectin, leptin and resistin in the adipose tissue, thoracic aorta and perivascular fat tissue. The BD+CM and HFD increased: body weight gain (2.3 and 2.9-fold, respectively), epididymal fat weight (1.7 and 2.2-fold, respectively), glucose intolerance (1.8-fold), F4/80 (2.3 and 4.2-fold, respectively) and expression of leptin (3.3 and 2.3-fold, respectively) in adipose tissue compared to BD. The HFD decreased the expression of adiponectin (46 %) in the adipose tissue and the content of IL-10 (27 %) in the perivascular fat tissue. The HFD+CM compared to HFD increased: glucose intolerance (1.3-fold), HOMA-IR (4-fold), the contents of IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ICAM-1, VCAM-1 (about 2-fold) and leptin (5-fold) in the adipose tissue and TNF- $\alpha$  (74 %) of thoracic aorta. As compared to BD+CM, HFD+CM increased: the body weight gain (50%), epididymal fat (1.7-fold), glucose intolerance (1.3-fold), HOMA-IR index (3.5-fold), the contents of IL-6 (1.5-fold), IL-10 (1.7-fold), IL-1 $\beta$  (2-fold) and leptin (3.3-fold) in adipose tissue, increased F4/80 (2.3-fold) and reduced the expression of leptin (3.3-fold) in adipose tissue and the contents of IL-6 (29%), TNF- $\alpha$  (25%) and IL-10 (34%) in the perivascular fat tissue. The FO supplementation associated with BD reduced liver gene expressions of F4/80 (28%), TNF- $\alpha$  (44%) and TLR-4 (35.5%), VCAM-1 (17%), IL-6 (31%) and the aorta thoracic content of IL-10 (39%) and perivascular fat tissue contents of adiponectin (21%) and resistin (48%). FO supplementation reduced body weight gain induced by HFD (23%), epididymal fat (29%), HOMA-IR (38%) and increased the content of adiponectin (1.5-fold) in the adipose tissue. TLR-4 deletion increased body weight gain (80%) in the BD+OP and mesenteric fat (36%) in the HFD+OP. The high consumption of fat or sugar for 8 weeks induced obesity. The association of both potentiated this effect leading to IR and inflammation in adipose tissue and perivascular fat. FO supplementation attenuated the inflammation when associated with BD and the obesity and IR induced by HFD in a TLR-4 dependent-manner.

**Keywords:** Dietary Fat. Carbohydrate. Insulin-Sensitive Tissues. Obesity. Inflammation.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sequência de <i>primers</i> utilizados para genotipagem dos animais <i>knockouts</i> TLR-4 <sup>-/-</sup> .....	41
Quadro 2. Composição de ácidos graxos das dietas balanceada e hiperlipídica avaliada por cromatografia gasosa e apresentada em g/100g de ração.....	45
Quadro 3. Composição de ácidos graxos, determinada por cromatografia gasosa, presente no óleo de peixe utilizado na suplementação oral. Resultados apresentados como g/100g de ácidos graxos. ....	47
Quadro 4. Sequência de <i>primers</i> utilizados para avaliação da expressão gênica no homogenato dos fígados e tecido adiposo epididimal. ....	50
Quadro 5. Resumo das comparações entre padrão versus balanceada (DB), balanceada com leite condensado <i>ad libitum</i> (DB + LC) versus DB, hiperlipídica (HFD) versus DB, hiperlipídica com leite condensado <i>ad libitum</i> (HFD + LC) versus HFD e HFD + LC versus DB + LC, descritas no item 5.1 de Resultados.....	71
Quadro 6. Interações entre os fatores dieta e leite condensado analisada pelo teste <i>two-way</i> ANOVA e descritas no Item 5.1 de Resultados.....	72
Quadro 7. Composição de ácidos graxos no fígado dos animais alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe, avaliada por cromatografia gasosa e apresentada em g/100g de tecido.....	75
Quadro 8. Composição de ácidos graxos no soro dos animais alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe, avaliados por cromatografia gasosa e apresentada em g/100 mL de soro.....	76
Quadro 9. Resumo as relações entre dieta balanceada e suplementação com óleo de peixe (DB + OP) versus dieta balanceada (DB), hiperlipídica e suplementação com óleo de peixe (HFD + OP) versus hiperlipídica (HFD) e HFD + OP versus DB + OP, descritas no item 5.2 de Resultados.....	88
Quadro 10. Composição de ácidos graxos do fígado de animais <i>knockouts</i> para a proteína TLR-4 alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe, avaliada por cromatografia gasosa e apresentada em g/100g de tecido.....	94
Quadro 11. Resumo das relações entre dieta balanceada nos animais TLR-4 <sup>-/-</sup> (DB) versus DB nos C57Bl/6J, balanceada e suplementação com óleo de peixe (DB + OP) nos animais TLR-4 <sup>-/-</sup> versus DB + OP nos C57Bl/6J, hiperlipídica (HFD) nos animais TLR-4 <sup>-/-</sup> versus HFD nos C57Bl/6J e hiperlipídica e suplementação com óleo de peixe (HFD + OP) nos animais TLR-4 <sup>-/-</sup> versus HFD nos C57Bl/6J, descritas no item 5.3 de Resultados.....	97

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. A via de sinalização do receptor *Toll like-4*, com recrutamento da proteína MyD88 e consequente produção de citocinas inflamatórias ou interferons.....32
- Figura 2. Genotipagem da ninhada do cruzamento entre heterozigotos C57Bl/6J x TLR4<sup>-/-</sup> confirmado pelo método da PCR convencional.....41
- Figura 3. Esquema representativo do modelo experimental utilizado no Protocolo Experimental I.....42
- Figura 4. Esquema representativo do modelo experimental utilizado no Protocolo Experimental II. ....43
- Figura 5. Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre a evolução semanal da massa corporal de camundongos C57Bl/6J (A) e a diferença de massa corpórea (massa corporal final – massa corporal inicial) (B) em 12 semanas. ....53
- Figura 6. Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre a ingestão alimentar de camundongos C57Bl/6 tratados durante 12 semanas.....54
- Figura 7. Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre o consumo calórico (A) e a eficiência energética das dietas (B) em camundongos C57Bl/6 tratados durante 12 semanas.....55
- Figura 8. Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre o peso dos depósitos de gordura de camundongos C57Bl/6 tratados durante 12 semanas.....56
- Figura 9. Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre o peso do coração e fígado de camundongos C57Bl/6 tratados durante 12 semanas.....57
- Figura 10. Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre a atividade das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) (A) e alanina amino transferase (ALT) (B) no plasma de camundongos C57Bl/6 tratados durante 12 semanas.....58
- Figura 11. Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre (A) glicemia, (B) colesterol total, (C) lipoproteína de baixa densidade (LDL) e (D) triacilgliceróis no soro de camundongos C57Bl/6 tratados durante 12 semanas.....59
- Figura 12. Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre a concentração sérica de glicose em animais C57Bl/6J (A) e a área incremental da glicose sérica (B) após tratamento de 12 semanas.....60

Figura 13. Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado <i>ad libitum</i> , hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado <i>ad libitum</i> sobre os valores glicêmicos (A) e a taxa de decaimento da glicemia (B) em camundongos C57Bl/6J tratados durante 12 semanas.....	61
Figura 14. Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado <i>ad libitum</i> , hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado <i>ad libitum</i> sobre os valores de insulinemia (A) e o índice HOMA-IR (B) em camundongos C57Bl/6J tratados durante 12 semanas.....	62
Figura 15. Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado <i>ad libitum</i> , hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado <i>ad libitum</i> sobre os conteúdos de IL-6 (A), IL-10 (B), TNF- $\alpha$ (C), IL-1 $\beta$ (D), VCAM-1 (E), ICAM-1 (F), adiponectina (G) e leptina (H) no tecido adiposo epididimal de camundongos C57Bl/6J tratados durante 12 semanas.....	64
Figura 16. Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado <i>ad libitum</i> , hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado <i>ad libitum</i> sobre a expressão de genes inflamatórios no tecido adiposo epididimal de camundongos C57Bl/6J tratados durante 12 semanas.....	66
Figura 17. Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado <i>ad libitum</i> , hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado <i>ad libitum</i> sobre o conteúdo de ICAM-1 (A), VCAM-1 (B), IL-1 $\beta$ (C), IL-6 (D) e TNF- $\alpha$ (E) na aorta torácica de camundongos C57Bl/6J tratados durante 12 semanas.....	68
Figura 18. Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado <i>ad libitum</i> , hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado <i>ad libitum</i> sobre os conteúdos de ICAM-1 (A), VCAM-1 (B), IL-1 $\beta$ (C), IL-6 (D), TNF- $\alpha$ (E), IL-10 (F), adiponectina (G) e leptina (H) na gordura perivascular da aorta torácica de camundongos C57Bl/6J tratados durante 12 semanas.....	70
Figura 19. Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre a composição de ácidos graxos no fígado e soro dos animais C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada.....	77
Figura 20. Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre as proteínas inflamatórias no fígado, aorta torácica e gordura perivascular de animais C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada.....	79
Figura 21. Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre a composição de ácidos graxos no fígado e soro de animais C57Bl/6J alimentados com dieta hiperlipídica.....	81
Figura 22. Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre as proteínas inflamatórias no fígado, aorta torácica, gordura perivascular e tecido adiposo epididimal de animais C57Bl/6J alimentados com dieta hiperlipídica .....	83
Figura 23. Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre a composição de ácidos graxos no fígado e soro de animais C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada ou hiperlipídica.....	85

Figura 24. Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre as proteínas inflamatórias no fígado, aorta torácica, gordura perivascular e tecido adiposo epididimal de animais C57Bl/6J alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica.....	87
Figura 25. Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre o ganho de massa corpórea e peso final dos depósitos de tecido adiposo retroperitoneal e mesentérico de animais <i>knockouts</i> para a proteína TLR-4 em relação aos animais C57Bl/6J alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica.....	91
Figura 26. Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre o conteúdo de gordura total hepática e a composição de ácidos graxos no fígado de animais <i>knockouts</i> para a proteína TLR-4 em relação aos animais C57Bl/6J alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica.....	93
Figura 27. Efeitos da suplementação com óleo de peixe na expressão de RNA mensageiro do fígado e conteúdo de proteínas inflamatórias na aorta torácica de animais <i>knockouts</i> para a proteína TLR-4 em relação aos C57Bl/6J alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica.....	96
Figura 28. Efeitos das dietas obesogênicas: balanceada com leite condensado <i>ad libitum</i> , hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado <i>ad libitum</i> sobre os parâmetros que caracterizam obesidade, resistência à insulina e inflamação.....	108
Figura 29. Efeitos da suplementação com óleo de peixe associado às dietas balanceada ou hiperlipídica sobre os parâmetros que caracterizam obesidade, resistência à insulina e inflamação.....	112
Figura 30. Efeitos da suplementação com óleo de peixe associado às dietas balanceada ou hiperlipídica sobre os parâmetros que caracterizam obesidade, resistência à insulina e inflamação em camundongos <i>knockouts</i> para a proteína TLR-4 em relação aos animais C57Bl/6J com integridade do receptor.....	116

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de glicose plasmática (em mg/dL) para diagnóstico do <i>diabetes mellitus</i> tipo 2 e estágios pré-clínicos.....	26
Tabela 2. Principais características de camundongos C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada (DB) ou hiperlipídica (HFD), suplementados ou não com óleo de peixe (OP).....	44
Tabela 3. Parâmetros metabólicos de camundongos C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada (DB) ou hiperlipídica (HFD), suplementados ou não com óleo de peixe (OP).....	74
Tabela 4. Parâmetros metabólicos de camundongos <i>knockouts</i> para a proteína TLR-4 alimentados com dieta balanceada (DB) ou hiperlipídica (HFD), suplementados ou não com óleo de peixe (OP). balanceada (DB) ou hiperlipídica (HFD), suplementados ou não com óleo de peixe (OP).....	90

## *LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS*

AG: ácidos graxos

ALT: alanina amino-transferase

AST: aspartato amino-transferase

ANOVA: análise de variância

AP-2: *activating protein 2*

CG: cromatografia gasosa

CT: colesterol total

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

DB: dieta balanceada

DB + LC: dieta balanceada e leite condensado *ad libitum*

DB + OP: dieta balanceada e suplementação com óleo de peixe

DCV: doenças cardiovasculares

DHA: ácido docosa-hexaenoico

DMT1: diabetes mellitus tipo 1

DMT2: diabetes mellitus tipo 2

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*

EPA: ácido eicosapentaenoico

g: grama

GLUT: transportador de glicose

GTT: teste de tolerância à glicose

HAEC: célula endotelial de aorta humana

HDL: lipoproteína de alta densidade

HFD: dieta hiperlipídica

HFD + LC: dieta hiperlipídica e leite condensado *ad libitum*

HFD + OP: dieta hiperlipídica e suplementação com óleo de peixe

HOMA-IR: *homeostatic model assessment – insulin resistance*

ICAM-1: molécula de adesão intercelular 1

IDF: Federação Internacional de Diabetes

IFN- $\gamma$ : Interferon  $\gamma$

IRS-1: *insulin receptor substrate 1*  
ITT: teste de tolerância à insulina  
JNK: *c-Jun N-terminal kinase*  
Kcal: quilocalorias  
kITT: taxa de desaparecimento da glicose sanguínea  
Kg: quilogramas  
LDL: lipoproteína de baixa densidade  
LPS: lipopolissacarídeo  
MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinases*  
MCP-1: *monocyte chemotactic protein 1*  
MUFAs: ácidos graxos monoinsaturados  
MyD88: myeloid differentiation primary response protein  
NAFLD: doença hepática não-alcoolica  
NASH: esteatohepatite não-alcoolica  
NF-κB: fator de transcrição nuclear κB  
OMS: Organização Mundial da Saúde  
PAI-1: *Plasminogen activator inhibitor type 1*  
Pb: pares de bases  
PBS: Tampão fosfato salina  
PECAM-1: *Platelet endothelial cell adhesion molecule*  
PI3K: fosfoinositideo quinase 3  
PPAR: *Peroxisome proliferator-activated receptor*  
PUFAs: ácidos graxos poliinsaturados  
RCP: reação em cadeia da polimerase  
RI: Resistência à Insulina  
RNA: ácido ribonucleico  
RT-PCR: *rel time - polymerase chain reaction*  
TAG: triacilgliceróis  
TAM: tecido adiposo marrom  
TAPV: tecido adiposo perivascular  
TCA: ácido tricloroacético  
TGF-β: *Transforming growth factor β*  
TLR: *Toll-like receptors*

TNF- $\alpha$ : *tumor necrosis factor  $\alpha$*

TRAM: *translocating chain-associating membrane*

TRIF: *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$*

VCAM-1: molécula de adesão vascular 1

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>1.1 Epidemiologia da obesidade</b> .....	23
<b>1.2 Obesidade e inflamação</b> .....	23
<b>1.3 Obesidade e resistência à insulina</b> .....	25
<b>1.4 Dietas hipercalóricas: gordura x açúcar</b> .....	27
<b>1.5 PUFA n-3 na obesidade, resistência à insulina e inflamação</b> .....	29
<b>1.6 Ácidos graxos e a ativação dos receptores TLRs</b> .....	31
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	34
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	36
<b>4 ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS</b> .....	38
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	40
<b>5.1 Animais</b> .....	41
<b>5.2 Métodos</b> .....	42
<b>5.2.1 Protocolo experimental I</b> .....	42
<b>5.2.2 Protocolo experimental II</b> .....	43
<b>5.2.3 Administração das dietas, do leite condensado e do óleo de peixe</b> .....	43
<b>5.2.3.1 Protocolo experimental I</b> .....	43
<b>5.2.3.2 Protocolo experimental II</b> .....	44
<b>5.2.4 Extração dos lipídeos, derivatização e condições cromatográficas</b> .....	46
<b>5.2.5 Avaliação da atividade das enzimas hepáticas e lipídios séricos</b> .....	48
<b>5.2.6 Glicemia e Insulinemia</b> .....	48
<b>5.2.7 Teste de tolerância à glicose</b> .....	48
<b>5.2.8 Teste de tolerância à insulina</b> .....	49
<b>5.2.9 Determinação da expressão de genes da inflamação no tecido adiposo epididimal e fígado</b> .....	49
<b>5.2.10 Produção de moléculas de adesão, citocinas e adipocinas pelo tecido adiposo epididimal, aorta torácica e gordura perivascular da aorta torácica</b> .....	50
<b>5.3 Análise estatística</b> .....	50

<b>6 RESULTADOS</b> .....	51
<b>6.1 Efeitos comparativos entre as dietas comercial, balanceada, balanceada e leite condensado, hiperlipídica, hiperlipídica e leite condensado sobre os indicadores de obesidade, resistência à insulina e inflamação</b> .....	52
6.1.1 <i>Ganho de peso, ingestão alimentar, composição corporal, atividades das enzimas hepáticas no soro, concentração de colesterol total, LDL-colesterol, triglicerídeos, glicemia e insulinemia no soro, índice HOMA-IR e testes de tolerância à glicose e à insulina</i> .....	52
6.1.2 <i>Teste de tolerância à glicose (GTT)</i> .....	60
6.1.3 <i>Teste de tolerância à insulina</i> .....	61
6.1.4 <i>Conteúdo de citocinas inflamatórias no tecido adiposo epididimal</i> .....	63
6.1.5 <i>Expressão dos genes F4/80, IL-1<math>\beta</math>, TNF-<math>\alpha</math>, TLR-4, adiponectina e leptina no tecido adiposo epididimal</i> .....	65
6.1.6 <i>Conteúdos de ICAM-1, VCAM-1, IL1-<math>\beta</math>, IL-6 e TNF-<math>\alpha</math> na aorta torácica</i> .....	67
6.1.7 <i>Conteúdos de ICAM-1, VCAM-1, IL1-<math>\beta</math>, IL-6, TNF-<math>\alpha</math>, IL-10, adiponectina e leptina na gordura perivascular da aorta torácica</i> .....	69
<b>6.2 Efeitos da suplementação com óleo de peixe associada às dietas balanceada ou hiperlipídica</b> .....	73
6.2.1 <i>Composição lipídica e razão de ácidos graxos n-6/n-3 no fígado e plasma de camundongos C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada</i> .....	73
6.2.2 <i>Conteúdo dos marcadores inflamatórios no fígado, aorta torácica e tecido adiposo perivascular de animais C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada</i> .....	78
6.2.3 <i>Massa corpórea, sensibilidade à insulina, composição de ácidos graxos e a razão de ácidos graxos n-6/n-3 no fígado e plasma de animais C57Bl/6J alimentados com dieta hiperlipídica</i> .....	80
6.2.4 <i>Marcadores inflamatórios no fígado, aorta torácica e tecido adiposo perivascular, e adiponectina no tecido adiposo epididimal de animais C57Bl/6J alimentados com dieta hiperlipídica</i> .....	82
6.2.5 <i>Massa corpórea, sensibilidade à insulina, composição de ácidos graxos e a razão de ácidos graxos n-6/n-3 no fígado e plasma de animais C57Bl/6J alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica</i> .....	84
6.2.6 <i>Marcadores inflamatórios no fígado e tecido adiposo perivascular, conteúdos de VCAM-1, IL-6 e IL-10 na aorta torácica e expressão de RNA mensageiro de adiponectina no tecido adiposo epididimal de animais C57Bl/6J alimentados com dieta hiperlipídica</i> .....	86

<b>6.3 Participação do receptor TLR-4 nos efeitos da suplementação com óleo de peixe em animais C57Bl/6J alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica.....</b>	<b>89</b>
<i>6.3.1 Massa corpórea e depósitos de gordura em animais knockouts para a proteína TLR-4 suplementados com óleo de peixe e alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica em relação aos camundongos C57Bl/6J.....</i>	<i>89</i>
<i>6.3.2 Efeito da suplementação com óleo de peixe na composição de ácidos graxos do fígado de animais knockouts para a proteína TLR-4 alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica em relação aos camundongos C57Bl/6J.....</i>	<i>92</i>
<i>6.3.3 Expressão de genes inflamatórios no fígado e conteúdos de proteínas inflamatórias na aorta torácica de animais knockouts para a proteína TLR-4 suplementados com óleo de peixe e alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica em relação aos camundongos C57Bl/6J.....</i>	<i>95</i>
<b>7 DISCUSSÃO.....</b>	<b>98</b>
<b>8 CONCLUSÕES.....</b>	<b>117</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>119</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>144</b>
<i>APÊNDICE A – Tabelas de valores individuais.....</i>	<i>145</i>
<i>APÊNDICE B – Artigos publicados.....</i>	<i>171</i>
Artigo 1 - Publicado no <i>Journal of Biomedicine and Biotechnology</i> .....	172
Artigo 2 - Publicado no <i>Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care</i> .....	181

# *1 INTRODUÇÃO*

## 1.1 Epidemiologia da obesidade

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a prevalência global de obesidade dobrou entre 1980 e 2008 sendo mais de 10 % dos adultos, com 20 anos ou mais, obesos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). Projeções estimam que em 2030 serão mais de 65 milhões de adultos obesos nos Estados Unidos e mais de 11 milhões no Reino Unido, causando um aumento de milhões nos casos de *diabetes mellitus* e doenças cardiovasculares (DCV) considerando os dois países (WANG et al., 2011). A obesidade aumenta o risco de desenvolver várias condições patológicas tais como: resistência à insulina (RI), *diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2), dislipidemia, hipertensão e doença hepática não-alcoólica (NAFLD, do inglês *non-alcoholic fatty liver disease*). A associação de intolerância à glicose, hipertensão, dislipidemia e obesidade, principalmente a obesidade abdominal, é denominada de síndrome metabólica (ALBERTI; ZIMMET, 1998; BALKAU; CHARLES, 1999).

## 1.2 Obesidade e inflamação

As células do sistema imune adaptativo (monócitos, linfócitos e neutrófilos) se infiltram em tecidos responsivos à insulina tais como: o tecido adiposo, fígado e músculo esquelético e pâncreas e estimulam respostas inflamatórias (TALUKDAR et al., 2012; WINER et al., 2012) em roedores induzidos à obesidade (SHAW et al., 2014) e indivíduos obesos com síndrome metabólica ou DMT2 (FJELDBORG et al., 2014). A infiltração de células do sistema imune nesses tecidos causa aumento local e sistêmico de moléculas pró-inflamatórias, incluindo fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina IL-1 $\beta$ , IL-6, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), expressão do receptor *toll-like-4* (TLR-4), resistina e ácidos graxos livres (MAKKI; FROGUEL; WOLOWCZUK, 2013). Essas moléculas podem induzir RI diretamente ativando a via da c-Jun amino terminal quinase (JNK) e o fator nuclear *kappa* B (NF $\kappa$ B), induzindo fosforilação em serina do receptor de insulina e/ou seus substratos, como o *insulin receptor substrate 1* (IRS-1) (OLEFSKY; GLASS, 2010). Estudos prospectivos demonstraram que a contagem de leucócitos (DUNCAN et al., 2003; VOZAROVA et al., 2002), citocinas pró-inflamatórias (SPRANGER et al., 2003), quimiocinas (HERDER et al., 2006) e outros marcadores indiretos de inflamação tais como fibrinogênio e PAI-1 (do inglês *plasminogen activator inhibitor 1*) (DUNCAN et al., 2003; FESTA et al., 2003) são preditores de DMT2.

O tecido adiposo secreta mais de 50 hormônios e moléculas de sinalização, chamadas coletivamente de adipocinas, que exercem efeitos de forma autócrina, parácrina ou sistêmica e influencia vários processos relacionados ao metabolismo energético e imunidade (OUCHI et al., 2011). Hotasmiligil et al. (1995) demonstraram aumento na produção e expressão de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo de indivíduos obesos e sua relação com a RI induzida pela obesidade. Outros pesquisadores confirmaram a regulação específica de genes inflamatórios e aumento de citocinas como IL-1 $\beta$  e IL-6 no tecido adiposo de indivíduos obesos (OUCHI et al., 2011). O aumento da sensibilidade sistêmica à insulina induzida por redução da massa corpórea foi acompanhado por diminuição na expressão do RNA mensageiro de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo de mulheres obesas (HOTAMISLIGIL et al., 1995). Assim, a inflamação no tecido adiposo é um fator importante no desenvolvimento da síndrome metabólica e DMT2.

A obesidade induz infiltração de macrófagos no tecido adiposo em camundongos e humanos (O'ROURKE et al., 2011; WEISBERG et al., 2003) e aumento no quadro inflamatório indicado por produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (SHURK et al., 2007). O recrutamento das células imune para o tecido adiposo correlaciona-se com o grau de obesidade, inflamação sistêmica, RI (WEISBERG et al., 2003) e síndrome metabólica (ESSER et al., 2013). A perda de peso decorrente de intervenção cirúrgica (CANCELLO et al., 2005) ou dieta e exercício (BRUUN et al., 2006) resulta em redução no número de macrófagos no tecido adiposo e diminui a expressão de marcadores pró-inflamatórios no plasma e tecido adiposo de indivíduos obesos.

Ao contrário do tecido adiposo, o fígado apresenta macrófagos residentes, denominados células Kupffer, que representam mais de 10 % do total. O número de células Kupffer não aumenta com a obesidade mas o estado de ativação é alterado (CAI et al., 2005; HUANG et al., 2010). A inflamação hepática é importante na progressão da NAFLD. Esta e a RI hepática induzidas pela obesidade aumentam a expressão e produção de marcadores inflamatórios, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (CAI et al., 2005). A ativação do fenótipo anti-inflamatório das células Kupffer (denominado subtipo celular M2) melhora a RI e diminui a progressão de NAFLD em camundongos (HUANG et al., 2010). Esses dados são sugestivos de que a esteatose hepática não-alcoólica induz uma resposta inflamatória aguda no fígado, similar à observada no tecido adiposo induzida pelo acúmulo de lipídeos.

O processo inflamatório também está envolvido na progressão das doenças cardiovasculares e aterosclerose (LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2009). Libby et al. (1986) demonstraram que as células endoteliais e musculares lisas produzem e respondem às

citocinas e mediadores pró-inflamatórios em humanos, provocando um estímulo inicial para o recrutamento de células do sistema imune (LIBBY, 2012).

O tecido adiposo perivascular (TAPV), situado ao redor dos vasos sanguíneos, assim como os depósitos de gordura corporal se encontram aumentados em humanos obesos (GREENSTEIN et al., 2009; LEHMAN et al., 2010) e em animais submetidos à modelos experimentais de obesidade (KETONEN et al., 2010; MA et al., 2010; MARCHESI et al., 2009). Presume-se que a inflamação induzida pela obesidade e presente no tecido adiposo também ocorre no TAPV. Entretanto, a inflamação não está presente no início da obesidade, mas desenvolve-se com a patologia de forma ainda não elucidada (SZASZ; BOMFIM; WEBB, 2013). O TAPV, ao redor da aorta torácica com placas de ateroma, apresenta infiltração de células inflamatórias em relação à aorta de pacientes sem aterosclerose diagnosticada (HENRICHOT et al., 2005). A exposição prolongada à dieta hiperlipídica induz alterações no TAPV que contribui para a disfunção endotelial. A remoção do TAPV melhora a função endotelial após 6 meses da administração de dieta hiperlipídica em ratos (KETONEN et al., 2010).

A inflamação crônica de baixo grau no tecido adiposo, fígado, aorta torácica e gordura perivascular induzida por consumo alimentar excessivo (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011) ocorre concomitantemente com mudanças no metabolismo lipídico (SAMUEL; SHULMAN, 2012) e é a principal causa da resistência à insulina induzida pela obesidade (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011; LUMENG; SALTIEL, 2011). Hotamisligil et al. (1993) demonstraram que o tecido adiposo de camundongos obesos apresentam aumento na concentração de TNF- $\alpha$ . A inibição da expressão de TNF- $\alpha$  pela técnica de recombinação com proteína ligante melhora a sensibilidade à insulina.

### **1.3 Obesidade e resistência à insulina**

A resistência à insulina acompanha a obesidade e distúrbios relacionados como o DMT2 (BODEN, 1997; LILLIOJA et al., 1993; PETERSEN; SHULMAN, 2006; SILVEIRA et al., 2008), sendo definida pela diminuição da capacidade dos tecidos em responder à insulina (JUNG; CHOI, 2014). Os efeitos metabólicos da insulina são mediados por uma rede de sinalização que se inicia quando essa se liga ao seu receptor na membrana celular, levando à fosforilação/ativação do IRS-1 e ativando duas vias principais: a via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)-AKT/proteína quinase B (PKB) e a via MAPK/ERK. A via PI3K-AKT/PKB participa das principais ações metabólicas da insulina. O IRS-1, fosforilado pelo receptor de

insulina, ativa a PI3K pela ligação ao domínio SH2. PI3K gera fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato, um segundo mensageiro lipídico, que ativa fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato-dependente de serina/treonina quinases, incluindo AKT/PKB. Essa cascata de sinalização resulta na translocação do transportador de glicose (GLUT) para a membrana plasmática, levando ao aumento da captação de glicose pelos tecidos responsivos à insulina como o tecido adiposo, músculo esquelético e fígado (CZECH et al., 2013). A via das MAPK quinases não se relacionam com as ações metabólicas da insulina, mas com os estímulos mitogênicos e efeitos no crescimento (JUNG; CHOI, 2014).

A progressão da RI induzida pela obesidade e que leva ao DMT2 não está completamente esclarecida mas implica na incapacidade das células  $\beta$  pancreáticas em produzir insulina em quantidade suficiente para compensar a resposta diminuída dos tecidos sensíveis à insulina e aumentar a captação de glicose (ESSER et al., 2014). Como consequência, ocorre um estado de hiperglicemia crônica e diminuição na produção de insulina por morte ou perda de função das células  $\beta$  pancreáticas (ESSER et al., 2014). A evolução da RI para o DMT2 passa por estágios intermediários com glicemia de jejum aumentada e tolerância à glicose diminuída (DIRETRIZES SBD, 2009). A Tabela 1 apresenta os valores de glicemia para diagnóstico de DMT2 segundo as diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2009).

**Tabela 1.** Valores de glicose plasmática (em mg/dL) para diagnóstico do *diabetes mellitus* tipo 2 e estágios pré-clínicos.

<b>Categoria</b>	<b>Jejum*</b>	<b>2h após 75g de glicose</b>	<b>Casual**</b>
<b>Glicemia normal</b>	Menor que 100	Menor que 140	-----
<b>Tolerância à glicose diminuída</b>	Maior que 100 e menor que 126	Igual ou superior a 140 e menor que 200	-----
<b><i>Diabetes mellitus</i></b>	Igual ou superior a 126	Igual ou superior a 200	Igual ou superior a 200 (com sintomas clássicos)***

\*O jejum é definido como a falta de ingestão calórica por no mínimo 8 horas; \*\*Glicemia casual é aquela realizada a qualquer hora do dia, sem se observar o intervalo desde a última refeição; \*\*\*Os sintomas clássicos de DMT2 incluem poliúria, polidipsia e perda de peso sem fator evidente.

De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (IDF), em 2011, 336 milhões de pessoas no mundo (~ 6,4%) apresentaram diagnóstico de DMT1 ou DMT2 e a projeção é que mais de 550 milhões sejam acometidas pela doença em 2030 (WHITING et al., 2011). O DMT2 é a forma mais comum da doença, representando cerca de 90 – 95% dos casos (PAQUOT et al., 2014). A epidemia de *diabetes mellitus* resulta do aumento de poder econômico da população associado às mudanças no estilo de vida, com redução de atividade

física, aumento do consumo de alimentos industrializados e consequente elevação no número de pessoas com sobrepeso e obesidade (PALERMO et al., 2014).

O consumo excessivo de açúcar na dieta foi associado ao desenvolvimento de resistência à insulina em crianças de 8 a 10 anos avaliadas durante dois anos pelo estudo de coorte *Quebec Adiposity and Lifestyle Investigation in Youth* (WANG, 2014). Em roedores, o aumento na oferta de gordura na dieta (SCHEMMEL; MICKELSEN; GILL, 1970; VINOLO et al., 2012; WEST et al., 1992) e a dieta de cafeteria, considerada altamente palatável e hipercalórica (SAMPEY et al., 2011), resulta em obesidade e DMT2 sendo esse um modelo comumente utilizado para o estudo das consequências patofisiológicas da obesidade.

#### **1.4 Dietas hipercalóricas: gordura versus açúcar**

Em estudos com humanos foi demonstrado que a dieta é o fator determinante no desenvolvimento da obesidade em relação aqueles que influenciam o peso corpóreo, tais como: genético, metabólico, endócrino ou meio ambiente (BILTON, 2013; KAUR, 2014; PEREZ-MARTINEZ et al., 2012). As orientações nutricionais recomendam restrição no consumo de gordura saturada e sua substituição por carboidratos com o intuito de reduzir o risco de doenças cardiovasculares (KRAUSS et al., 2000). Entretanto, a ingestão de carboidratos refinados induz DMT2, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (DCV) (GIBSON et al., 2013; HAVEL, 2010; HELLERSTEIN, 2002; PARKS; HELLERSTEIN, 2000; STANHOPE; TAPPY et al., 2010;). O *American Heart Association* recomenda que o consumo energético diário de gordura deve ser menor que 35 %, carboidratos entre 50% e 60%, proteínas em cerca de 15% e a ingestão calórica de açúcar limitada em 140 kcal/dia para os homens e de 100 kcal/dia para as mulheres (JEOR et al., 2001; JOHNSON et al., 2009; LICHTENSTEIN et al., 2006).

O aumento no consumo de carboidratos refinados com diminuição de fibras na dieta foi relacionado com a ocorrência de DMT2 nos Estados Unidos no século 20 (GROSS et al., 2004). A substituição de gordura saturada por carboidratos refinados (como exemplo o amido de milho) na dieta apresenta pouco efeito sobre os lipídeos séricos (LAWRENCE, 2014). A substituição da gordura da dieta por carboidratos sem alteração na composição de ácidos graxos causa aumento nas concentrações de triglicerídeos séricos sem diferenças no LDL- e HDL-colesterol em homens saudáveis (NELSON; SCHMIDT; KELLEY, 1995).

Os regimes alimentares podem ser divididos em *low-fat high-carbo* (pouca gordura e muito carboidrato) (< 30% do consumo total de energia em gordura) e *high-fat low-carbo*

(muita gordura e pouco carboidrato) (> 30% do consumo total de energia em gordura) (ASTRUP et al., 2000; GRADNER et al., 2007; POPPITT et al., 2002; SHAI et al., 2008; TUOMILEHTO et al., 2001). Segundo uma meta-análise baseada em 32 estudos com humanos (de 1992 à 2010), a dieta *low-fat high-carbo* causa redução no colesterol total e LDL-colesterol enquanto que a dieta *high-fat low-carbo* aumenta o HDL-colesterol e reduz as concentrações de triacilgliceróis no plasma (SCHWINGSHACKL; HOFFMANN, 2013). Em outra meta-análise realizada com ensaios clínicos randomizados (de 1980 à 2005) foi demonstrado que ambas as dietas, *high-fat low-carbo* e *low-fat high-carbo*, sem diferença energética, são igualmente efetivas na redução do peso corpóreo em indivíduos com índice de massa corporal acima de 25 kg/m<sup>2</sup> (NORDMANN et al., 2006).

Os alimentos processados geralmente contém grande quantidade de açúcar e gordura para serem mais palatáveis aos consumidores (LAWRENCE, 2013). Os neurocientistas comparam a obesidade com à dependência de drogas (AHMED et al., 2012; ALLEN et al., 2012; VOLKOW et al., 2007; VOLKOW et al., 2013) e o consumo de alimentos palatáveis, principalmente os que são ricos em açúcar (como por exemplo a sacarose) à dependência de cocaína (AVENA; RADA; HOEBEL, 2008; GEARHARDT et al., 2011; IFLAND et al., 2009).

Conforme estudos epidemiológicos, há relação entre o consumo de açúcar, como por exemplo de refrigerantes, o ganho de peso à longo prazo e o diagnóstico de DMT2 (MALIK et al., 2010; SCHULZE et al., 2004). Os carboidratos de absorção rápida, como a sacarose, aumentam o índice glicêmico da dieta e podem elevar o risco de DCV e DMT2 independente da obesidade, por causar inflamação e resistência à insulina em mulheres (FUNG et al., 2009; LIU et al., 2002; SCHULZE et al., 2004). Neuhofer et al. (2014) demonstraram em camundongos *knockouts* para o receptor LDL que a dieta rica em gordura e açúcar administrada por 12-16 semanas acelera o desenvolvimento de obesidade, resistência à insulina, inflamação do tecido adiposo e formação de placa aterosclerótica comparada com aquela rica apenas em gordura.

Embora seja reconhecida a associação entre gordura dietética e incidência de doenças metabólicas, a contribuição efetiva dos diferentes tipos de lipídeos nas alterações metabólicas não está elucidada (KUMAR; SWATHI; KRISHNA, 2014). O aumento na porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) e diminuição de AG saturados na dieta causa redução do colesterol total e LDL-colesterol séricos (TURLEY et al., 1998). Existem evidências de que associam dietas ricas em PUFAs (BUCKLEY; HOWE, 2009; BUETTNER et al., 2006;

HILL et al., 1993; WANG et al., 2002) com efeitos anti-obesogênicos, menor risco para DMT2 e redução de lipídeos no fígado, em relação às dietas ricas em ácidos graxos saturados.

### **1.5 PUFAs n-3 na obesidade, resistência à insulina e inflamação**

Desde os primeiros estudos com esquimós da Groenlândia até os mais recentes, têm sido confirmada a associação entre os PUFAs n-3 e redução do risco de DCV (He et al., 2009). Os PUFAs n-3 são ácidos monocarboxílicos com uma cadeia carbônica longa, não ramificada, com insaturação na terceira (n-3) posição a partir do hidrocarboneto final, como os ácidos  $\alpha$ -linolênico (C18:3), eicosapentaenóico (EPA; C20:5) e o docosa-hexaenóico (DHA; C22:6). São encontrados principalmente em peixes de água fria como salmão, atum e bacalhau. A *American Heart Association* recomenda consumo mínimo de duas porções de peixe por semana, óleos e alimentos enriquecidos com ácido  $\alpha$ -linolênico, para prevenção primária das DCV (KRIS-ETHERTON et al., 2002). Para os indivíduos com histórico de DCV é recomendado o consumo de aproximadamente 1 g de EPA + DHA por dia e 2 a 4 gramas para o tratamento de hipertrigliceridemia (concentração de triacilgliceróis plasmáticos acima de 150 mL/dL em adultos), ambos pela suplementação com o óleo de peixe (FENTON et al., 2013). Até o ano de 2007, cerca de 30 milhões de pessoas nos Estados Unidos faziam uso da suplementação com óleo de peixe (BARNES et al., 2008).

Alguns estudos são sugestivos de que os AG n-3 modulam a composição da membrana plasmática, aumentando a formação de domínios específicos (*lipid rafts*) e a sua fluidez, o que facilitaria respostas a ligantes extracelulares, dentre esses, a insulina (Haugaard et al., 2006; Yaqoob; Shaikh, 2010). Os efeitos dos PUFAs n-3 no preenchimento dos fosfolípides de membrana com EPA e DHA (Harris, 2007), resulta em aumento da estabilidade da placa aterosclerótica em pacientes destinados à endarterectomia de carótida (THIES et al., 2003), redução da agregação plaquetária (DIN et al., 2008), melhora do tônus autonômico (O'KEEFE et al., 2006), do limiar arritmico (ANAND et al., 2008) e redução da pressão sanguínea (UESHIMA et al., 2007). Por fim, tem sido demonstrado que os AG n-3 regulam a expressão de vários fatores de transcrição e de outros genes envolvidos principalmente no metabolismo de lipídeos no tecido adiposo, como PPAR, HNF-4, SREBP-1C, CREBP e AMPK- $\alpha$ 2, os quais têm sido relacionados com os efeitos benéficos desses metabólitos sobre a sensibilidade à insulina (Jelenik et al., 2010; White et al., 2010).

Além dos efeitos cardiovasculares, a suplementação com PUFAs n-3 melhora a sensibilidade à insulina em ratos, camundongos e humanos (ANDERSEN et al., 2008;

NESCHEN et al., 2007; RAMEL et al., 2008). Itoh et al. (2007) demonstraram que a administração de 1,8 g/dia de EPA durante três meses em indivíduos obesos aumenta significativamente a concentração plasmática de adiponectina, que reduz a inflamação sistêmica e melhora a sensibilidade à insulina. No mesmo estudo, os pesquisadores mostraram que camundongos geneticamente obesos, *ob/ob*, suplementados por quatro semanas com EPA por gavagem (1000 mg/kg de peso corporal por dia) apresentam aumento nas concentrações séricas de adiponectina. Camundongos *knockouts* para a adiponectina apresentam quadro severo de RI em relação aos animais controles (KUBOTA et al., 2002; MAEDA et al., 2002). A suplementação com PUFAs n-3 aumenta a expressão de adiponectina e simultaneamente melhora a RI em ratos tratados com dieta rica em sacarose (ROSSI et al., 2005). Esses estudos são sugestivos de que o aumento da concentração plasmática de adiponectina induzido por PUFAs n-3 pode explicar pelo menos parcialmente seus efeitos na melhora da RI. No entanto, Neschen et al. (2007) demonstraram que o aumento da sensibilidade à insulina induzida por PUFAs n-3 não ocorre em camundongos *knockouts* para PPAR- $\alpha$ , indicando efeito dependente da integridade do receptor. Assim, não está totalmente esclarecido o mecanismo de ação dos PUFAs n-3 na sensibilidade à insulina.

A razão entre PUFAs n-6 e n-3 na dieta é um fator determinante no grau de inflamação, uma vez que derivados do metabolismo de PUFAs podem iniciar e exacerbar respostas inflamatórias (CALDER, 2011). A associação da razão n-6 : n-3 e inflamação foi demonstrada em diferentes patologias, tais como: aterosclerose, sepse, mastite e câncer (SIMOPOULOS, 2006; CONTRERAS; SORDILLO, 2011). Em contrapartida, patologias inflamatórias são prevenidas pela suplementação com PUFAs n-3 em humanos. As concentrações de PUFAs n-3 estão negativamente correlacionadas com biomarcadores inflamatórios, como proteína C reativa, IL-6 e TNF- $\alpha$  e positivamente com marcadores anti-inflamatórios como TGF- $\beta$  e IL-10 no plasma de humanos (FERRUCCI et al., 2006; LOPEZ-GARCIA et al., 2004).

Em roedores, os PUFAs EPA e DHA previnem o aumento de tecido adiposo e RI induzidos por dietas obesogênicas (KALUPAHANA; CLAYCOMBE; MOUSTAID-MOUSSA, 2011). Esse efeito está relacionado ao aumento da oxidação de ácidos graxos no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo e redução na lipogênese induzida (KALUPAHANA; CLAYCOMBE; MOUSTAID-MOUSSA, 2011). A administração de dieta enriquecida com EPA (45 % de energia como gordura e 36 g/kg de EPA) durante 11 semanas preveniu o ganho de peso e a RI induzida pela dieta hiperlipídica com redução de citocinas

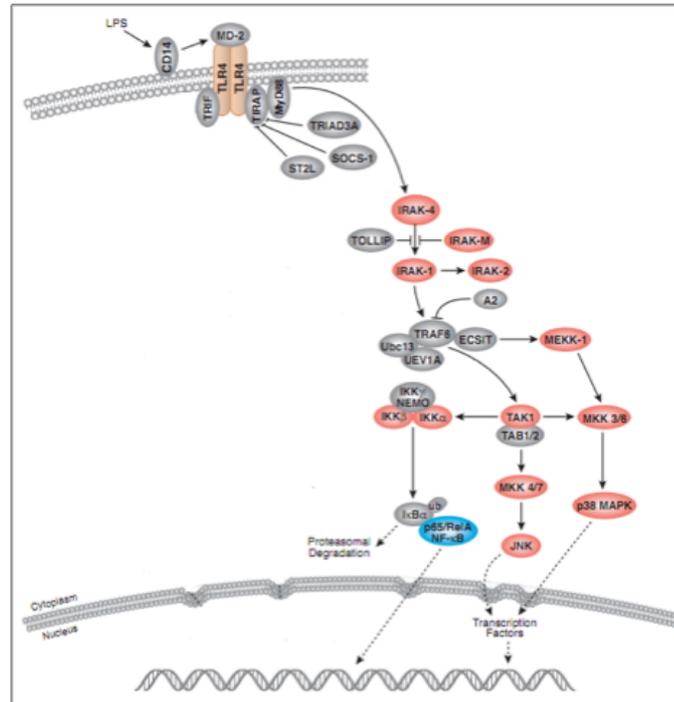
inflamatórias (MCP-1 e PAI-1) no tecido adiposo (KALUPAHANA et al., 2010). PUFAs n-3 inibem a expressão do RNA mensageiro de IL-1 $\beta$  em célula muscular lisa (BOUSSEROUEL et al., 2003), assim como de outros mediadores inflamatórios VCAM-1, ICAM-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 em células endoteliais (DE CATERINA; LIAO; LIBBY, 2000) e TLR-4 de macrófagos em cultura (LEE et al., 2003). Há evidências de que os efeitos anti-inflamatórios dos PUFAs n-3 em macrófagos são mediados pela inibição da via de sinalização do receptor TLR-4 (LEE et al., 2001; LEE et al., 2003). Contudo, os mecanismos pelos quais os ácidos graxos apresentam efeitos imunomodulatórios ainda precisam ser elucidados de modo completo e o receptor TLR-4 participa de forma importante, uma vez que AG saturados de cadeia longa ativam (SUGANAMI et al., 2007) e PUFAs n-3 inibem sua via de sinalização (LEE et al., 2001; LEE et al., 2003).

### **1.6 Ácidos graxos e a ativação dos receptores TLRs**

Os TLRs são membros da superfamília de receptores de interleucina-1 (IL-1R), que respondem a partículas potencialmente patogênicas, levando à ativação da resposta imune inata (KANG; LEE, 2011). Em humanos, foram identificados 10 tipos de receptores TLR funcionais (TLR1 ao TLR10), enquanto que em camundongos foram identificados 12 TLRs (TLR1 ao TLR9 e TLR11 ao TLR13) (LEE; AVALOS; PLOEGH, 2012). Os receptores TLR1, 2, 4 e 6, em animais e humanos, reconhecem porções lipídicas exógenas e endógenas. Dímeros de TLR1/2 reconhecem diacil-lipopeptídeos, dímeros de TLR2/6 reconhecem triacil-lipopeptídeos e TLR-4 reconhece ácidos graxos saturados presentes em lipopolissacarídeos (LPS). A ativação da via de sinalização do TLR leva à indução da expressão de genes relacionados com a produção de citocinas pró-inflamatórias (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Sabe-se que os TLRs são expressos nas células associadas à formação de placas ateroscleróticas como monócitos (AL-OFI; COFFELT; ANUMBA, 2012), células endoteliais (HARRINGTON et al., 2011), célula muscular vascular lisa (Li et al., 2012) e plaquetas (BERTHET et al., 2010) além de hepatócitos (NAKAMOTO; KANAI, 2011) e adipócitos (NAGAI; WATANABE; TAKATSU, 2013).

A associação dos TLRs com seus ligantes ativa duas vias de sinalização: a dependente e a independente do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) (CASANOVA; ABEL; QUINTANA-MURCI, 2011). Após ativação, os TLRs se dimerizam e sofrem mudanças conformacionais necessárias ao recrutamento de moléculas adaptadoras, tais como MyD88 e TRIF, que levam à produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons (IFNs),

respectivamente. A proteína adaptadora MyD88 ativa o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), induzindo a expressão de mediadores inflamatórios (VE et al., 2012) (Figura 1).



**Figura 1.** A via de sinalização do receptor TLR-4, com recrutamento da proteína MyD88 e consequente produção de citocinas inflamatórias ou interferons, respectivamente. \*Figura adaptada do site <http://www.cellsignal.com/>.

Huang et al. (2012) demonstraram que ácidos graxos livres ativam a via de sinalização do receptor TLR-4 em macrófagos (RAW 264.7) e monócitos (THP-1). Erridge e Samani (2009) sugeriram que a indução da expressão de citocinas por ácidos graxos em células RAW 264.7 ocorre por ação de contaminantes presentes na albumina usada na preparação do AG, os quais ativariam o receptor TLR-2. Entretanto, Huang et al. (2012) verificaram que os ácidos graxos aumentam a expressão de COX-2 e TNF- $\alpha$  em macrófagos com deleção da subunidade MyD88<sup>-/-</sup>, eliminando a proposta da ação de contaminantes já que o receptor TLR-2 é dependente da subunidade MyD88. Esses dados colocam o TLR-4 como um mediador-chave da inflamação em condições de excesso de ácidos graxos nos tecidos (MALONEY et al., 2009).

Ácidos graxos saturados (C14:0, C16:0 e C18:0) ativam a via IKK/NF $\kappa$ B e estimulam a produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 em macrófagos via TLR-4. Células 293T transfectadas com o dominante negativo de MyD88 ou macrófagos isolados do peritônio de camundongos TLR-4<sup>-/-</sup> perdem a capacidade de indução da produção de citocinas em resposta ao tratamento com

ácidos graxos. Em estudo *in vivo* com infusão de ácidos graxos saturados (palmitato), verificou-se aumento da translocação do NFκB para o núcleo e elevação da produção de TNF-α e IL-6 em adipócitos de animais selvagens. Esses efeitos não são observados em adipócitos de animais *knockouts* para o receptor TLR-4 (SHI et al., 2006).

Além dos efeitos em macrófagos e adipócitos, ácidos graxos saturado ativam o TLR-4 no hipotálamo desencadeando resposta inflamatória central que resulta em resistência aos sinais anorexigênicos (MILANSKI et al., 2009). Em humanos, polimorfismos no gene TLR-4 Asp299Gly não estão associados ao desenvolvimento de aterosclerose (ZHANG et al., 2012). Entretanto, o receptor TLR-4 atua na ativação da célula endotelial (KIM et al., 2007), geração de citocina/quimiocina (ARBOUR et al., 2000; KIM et al., 2007), remodelamento vascular (HOLLESTELLE et al., 2004) e apoptose de macrófagos (SEIMON; TABAS, 2009).

Ao contrário dos ácidos graxos saturados, os poliinsaturados da família n-3 reduzem a inflamação intestinal induzida por *Escherichia coli* (LPS) em porcos via receptor TLR4. Ocorre aumento da altura das vilosidades e melhora a função da barreira intestinal indicada pela diminuição da atividade da diamina oxidase no plasma e aumento da expressão de proteínas *tight-junction* como ocludina e claudina-1 no epitélio intestinal (LIU et al., 2012). Norris e Dennis (2012) demonstraram, em macrófagos do peritônio, que a suplementação com EPA leva a inibição da via do receptor TLR4 e vias da ciclooxigenase, atenuando a produção de mediadores pró-inflamatórios.

De modo resumido, o TLR-4 participa da gênese de respostas inflamatórias em vários tecidos, incluindo endotélio, fígado e tecido adiposo, e o excesso de ácidos graxos livres plasmáticos está envolvido nesse processo. O alto conteúdo de lipídeos na dieta está associado com a RI e inflamação crônica de grau baixo. Contudo, ainda não estão esclarecidos os efeitos dos principais macronutrientes da dieta, gordura e açúcar, agindo isolada ou concomitantemente, nos processos inflamatórios e sua relação entre eles no estabelecimento da resistência à insulina. A compreensão dos mecanismos envolvidos na ação dos macronutrientes pode elucidar várias questões relacionadas à obesidade, RI e inflamação. Além disso, permitirá o desenvolvimento de novas terapias anti-obesogênicas que têm como alvo vias intracelulares envolvidas no processo inflamatório dos tecidos responsivos à insulina, como fígado e tecido adiposo, e ateroscleróticos, como a aorta torácica e a gordura perivascular.

## *2 OBJETIVO*

Investigar a associação da inflamação com a resistência à insulina na vigência de dietas obesogênicas (ricas em gordura e/ou carboidrato), tratamento com óleo de peixe e na ausência do receptor TLR-4.

# *3 JUSTIFICATIVA*

A obesidade, e em particular o excesso de adiposidade visceral, está associada à resistência à insulina, hiperglicemia, dislipidemia e inflamação crônica de baixa intensidade. Entretanto, alguns indivíduos obesos são diagnosticados como metabolicamente saudáveis por não apresentarem os fatores normalmente associados ao excesso de peso. O consumo de gordura saturada, presente principalmente em alimentos de origem animal, é reconhecido como a principal causa das comorbidades na obesidade. A dieta ocidental é rica em gordura e açúcar, mas a associação desses dois macronutrientes energéticos no estabelecimento dos quadros de resistência à insulina e inflamatório não está estabelecida. Nesse estudo, avaliou-se os efeitos da gordura e açúcar, isolados e associados, na obesidade, sensibilidade periférica à insulina e inflamação no tecido adiposo, fígado, aorta torácica e gordura perivascular.

*4 ESTRATÉGIAS  
EXPERIMENTAIS*

1) Determinar os efeitos de três dietas obesogênicas: balanceada com leite condensado, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado na obesidade, sensibilidade à insulina e inflamação no tecido adiposo, aorta torácica e gordura perivascular em camundongos C57Bl/6J;

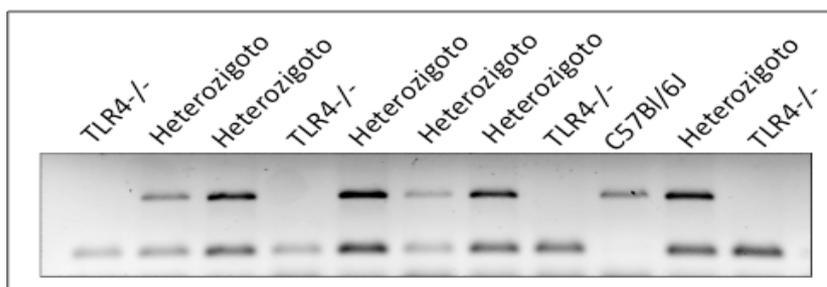
2) Investigar se a suplementação com óleo de peixe modifica os efeitos da dieta hiperlipídica na indução de obesidade, resistência à insulina e inflamação nos tecidos responsivos à insulina (fígado e tecido adiposo) e na aorta torácica e gordura perivascular;

3) Avaliar a participação do receptor TLR-4 nos efeitos obesogênicos e inflamatórios induzidos pela dieta hiperlipídica associada ou não à suplementação com óleo de peixe.

# *5 MATERIAIS E MÉTODOS*

## 5.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57Bl/6J com média de 60 dias de idade fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo para o Protocolo Experimental I (Figura 3) que será detalhado nas seções seguintes. Para o Protocolo Experimental II (Figura 4) utilizou-se a linhagem de animais *knockouts* para o receptor *toll like 4* (TLR-4) e a linhagem *background* C57Bl/6J. A linhagem *knockout* foi gentilmente fornecida pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a qual foi comprada da empresa *Jackson Laboratories* (Sacramento, Califórnia, EUA). Foi realizado o cruzamento dos camundongos C57Bl/6J com os *knockouts* para utilizar animais experimentais com mesmo *background* genético. A confirmação da linhagem foi feita pelo método convencional da reação em cadeia da polimerase (RCP) (Figura 2), a partir do DNA extraído da cauda dos animais, utilizando os *primers* apresentados no Quadro 1. As amostras dos camundongos *knockouts* apresentam uma banda no gel de agarose com peso molecular de 140 pb (pares de base). Os animais heterozigotos são identificados por apresentarem duas bandas, uma com 140 pb e outra com 390 pb, enquanto que os animais C57Bl/6J apresentam apenas a banda de 390 pb (Figura 2).



**Figura 2.** Genotipagem da ninhada do cruzamento entre heterozigotos C57Bl/6J x TLR4<sup>-/-</sup> confirmado pelo método da PCR convencional.

**Quadro 1.** Sequência de *primers* utilizados para genotipagem dos animais *knockouts* TLR-4<sup>-/-</sup>.

<i>Primer</i> 5'	Sequência 5' --> 3'	Tipo do <i>primer</i>
oIMR8365	GCA AGT TTC TAT ATG CAT TCT C	<i>Mutant Forward</i>
oIMR8366	CCT CCA TTT CCA ATA GGT AG	<i>Mutant Reverse</i>
oIMR8367	ATA TGC ATG ATC AAC ACC ACA G	<i>Wild type Forward</i>
oIMR8367	TTT CCA TTG CTG CCC TAT AG	<i>Wild type Reverse</i>

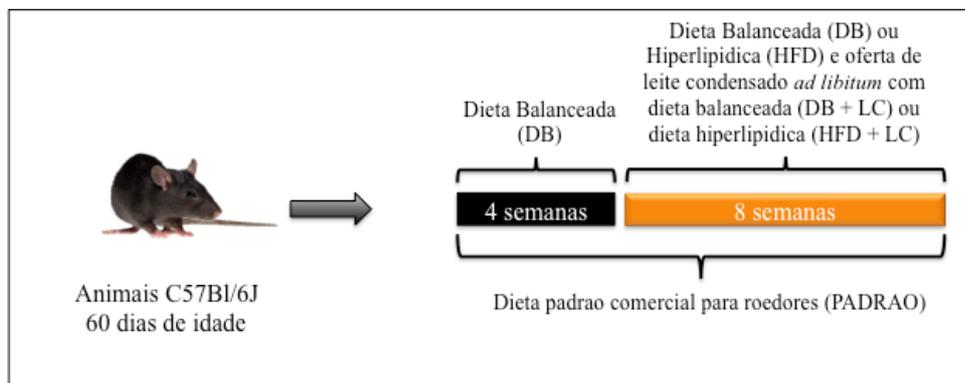
Os animais foram mantidos em sala com ciclo claro-escuro de 12-12 h e temperatura de  $23\pm 2$  °C, no biotério de camundongos do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo com adaptação ambiental de quatro dias antes do início do tratamento, recebendo dieta padrão comercial para roedores (ração Nuvital da Nuvilab, Colombo, PR). As dietas e a água foram oferecidas *ad libitum* durante todo o período experimental. O peso dos animais e o consumo de ração foi avaliado durante as 12 semanas de tratamento. Os procedimentos desse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

## 5.2 Métodos

### 5.2.1 Protocolo experimental I

Os camundongos C57Bl/6J foram distribuídos nos seguintes grupos:

- 1) alimentados com dieta padrão comercial para roedores (PADRAO);
- 2) alimentados com dieta balanceada (DB);
- 3) alimentados com DB e leite condensado *ad libitum* (DB + LC);
- 4) alimentados com dieta hiperlipídica (HFD);
- 5) alimentados com HFD e leite condensado *ad libitum* (HFD + LC).

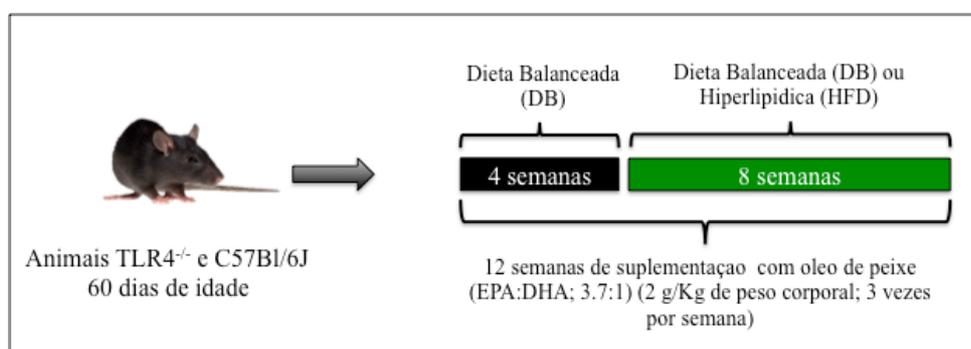


**Figura 3.** Esquema representativo do modelo experimental utilizado no Protocolo Experimental I.

### 5.2.2 Protocolo experimental II

Os camundongos *knockouts* para TLR4<sup>-/-</sup> e C57Bl/6J com mesmo background genético foram distribuídos nos seguintes grupos:

- 1) alimentados com dieta balanceada (DB);
- 2) alimentados com DB e suplementados com óleo de peixe (DB + OP);
- 3) alimentados com dieta hiperlipídica (HFD);
- 4) alimentados com HFD e suplementados com óleo de peixe (HFD + OP).



**Figura 4.** Esquema representativo do modelo experimental utilizado no Protocolo Experimental II.

### 5.2.3 Administração das dietas, do leite condensado e do óleo de peixe

#### 5.2.3.1 Protocolo experimental I

Um grupo de animais recebeu dieta padrão comercial para roedores (ração Nuvital da Nuvilab, Colombo, PR) (56% carboidratos, 3,5% gordura e 19% proteínas) durante todo protocolo experimental. Os outros animais receberam, quatro semanas, dieta balanceada (76% carboidratos, 9% gordura, 15% proteínas; Tabela 2; Quadro 2) e após esse período continuaram com a mesma dieta ou receberam dieta hiperlipídica (26% carboidratos, 59% gordura, 15% proteínas; Tabela 2; Quadro 2) por 8 semanas (da 5ª até a 12ª semanas). O leite condensado (Italac, Goiás, Brasil) (55% carboidratos, 8,5% gordura e 7,5% proteínas) com adição de 10% de mistura de vitaminas (Rhoster, São Paulo, Brasil) foi oferecido *ad libitum* da 5ª semana até o final do período experimental.

**Tabela 2.** Composição das dietas balanceada e hiperlipídica.

<b>Ingredientes (g/kg)</b>	<b>Dieta Balanceada</b>	<b>Dieta Hiperlipídica</b>
<b>Amido de milho</b>	465.7	115.5
<b>Amido de milho dextrinizado</b>	155	132
<b>Sacarose</b>	100	100
<b>Caseína</b>	140	200
<b>Bitartarato de Colina</b>	2.5	2.5
<b>L-Cistina</b>	1.8	3
<b>Mistura vitamínica</b>	10	10
<b>Mistura de minerais</b>	35	35
<b>Celulose microfina</b>	50	50
<b>Oleo de soja</b>	4	35
<b>Banha suína</b>	36	315
<b>Energia (KJ/g)</b>	3.803	5.340

#### 5.2.3.2 Protocolo experimental II

Os animais receberam dieta balanceada (76% carboidratos, 9% gordura, 15% proteínas; Tabela 2; Quadro 2) e suplementação com óleo de peixe por quatro semanas. Após esse período, os animais continuaram com a dieta balanceada ou receberam dieta hiperlipídica (26% carboidratos, 59% gordura, 15% proteínas; Tabela 2; Quadro 2) ambas associadas à suplementação com óleo de peixe por mais 8 semanas (da 5<sup>a</sup> até a 12<sup>a</sup> semana). A suplementação com óleo de peixe foi realizada por gavagem e iniciada na primeira semana (animais com 60 dias de idade), estendendo-se até o final do período experimental (semana 12). Foi utilizado óleo de peixe em cápsula (HiOmega 3, *Naturalis Nutrição & Farma Ltda.*, São Paulo-SP) (Quadro 3) contendo proporção de EPA/DHA de 3,6 : 1 na dose de 2 g por Kg de peso, três vezes por semana.

**Quadro 2.** Composição de ácidos graxos das dietas balanceada e hiperlipídica avaliada por cromatografia gasosa e apresentada em g/100g de ração.

<b>Fórmula</b>	<b>Nome</b>	<b>Balanceada</b>	<b>Hiperlipídica</b>
		<b>g/100 g de ração</b>	
<b>12 : 0</b>	Láurico	0,01 ± 0,00	—
<b>14 : 0</b>	Mirístico	0,04 ± 0,00	0,43 ± 0,02
<b>16 : 0</b>	<b>Palmítico</b>	<b>0,73 ± 0,02</b>	<b>8,03 ± 0,35</b>
<b>16 : 1</b>	Hexadecenóico	0,06 ± 0,00	0,70 ± 0,03
<b>17 : 0</b>	Margárico	0,01 ± 0,00	0,14 ± 0,01
<b>17 : 1</b>	Heptadecenóico	0,01 ± 0,00	0,10 ± 0,00
<b>18 : 0</b>	<b>Estearico</b>	<b>0,36 ± 0,01</b>	<b>4,25 ± 0,17</b>
<b>18 : 1 t (n-9)</b>	Elaidico	0,01 ± 0,00	
<b>18 : 1 (n-9)</b>	<b>Oléico</b>	<b>1,14 ± 0,04</b>	<b>13,93 ± 0,60</b>
<b>18 : 1 (n-11)</b>	Vacênico	0,09 ± 0,01	0,85 ± 0,06
<b>18 : 2 (n-6)</b>	<b>Linoléico</b>	<b>0,70 ± 0,02</b>	<b>6,36 ± 0,28</b>
<b>18 : 3 (n-3)</b>	Linolênico	0,06 ± 0,00	0,35 ± 0,03
<b>20 : 0</b>	Eicosanóico	—	—
<b>20 : 1 (n-9)</b>	Eicosenóico	—	—
<b>22 : 0</b>	Docosanóico	—	—
<b>Totais</b>	<b>Saturados</b>	1,16 ± 0,04	12,85 ± 0,55
	<b>Monoinsaturados</b>	1,29 ± 0,05	15,74 ± 0,69
	<b>Polinsaturados</b>	0,76 ± 0,02	6,71 ± 0,31
	<i>Trans</i>	0,01 ± 0,00	—
<b>% gordura</b>		<b>3,46 ± 0,14</b>	<b>37,83 ± 1,67</b>

\* Os valores estão apresentados como média ± EPM de três análises.

#### 5.2.4 Extração dos lipídeos, derivatização e condições cromatográficas

Os lipídeos foram extraídos pelo método 996.06 da AOAC com modificações. As dietas controle e hiperlipídica foram pesadas (em torno de 100 mg), o óleo de peixe aliquotado, plasma (200  $\mu$ L) e fígado (cerca de 60 mg) foram separados e colocados em tubo de ensaio de 30 mL (Pyrex 9826), com rosca e tampa de teflon. Foram adicionados: 1) o triglicerídeo do ácido tridecanóico (5 mg/ mL clorofórmio) como padrão interno, com volumes variando de 100 a 400  $\mu$ L, conforme a quantidade de tecido utilizada; 2) o ácido pirogálico (25 mg) para minimizar a oxidação dos ácidos graxos, 0,5 mL de etanol a 95% e algumas pérolas de vidro. As amostras foram submetidas à hidrólise ácida com 2,5 mL de HCl e agitadas em banho termostatizado à temperatura de 75 °C por 40 min. Após serem resfriados à temperatura ambiente, foram adicionados 6 mL de éter etílico e cada tubo foi mantido em agitador tipo Vórtex por 1 min. Em seguida, foram adicionados 6 mL de éter de petróleo e os tubos foram novamente agitados. Em seguida, foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min e a fase superior (etérea) foi transferida para outro tubo. O solvente foi evaporado lentamente em banho termostatizado em temperatura menor do que 40 °C, utilizando N<sub>2</sub> gasoso. Após essa etapa, foram adicionados 1 mL de trifluoreto de boro 7% em metanol, 0,5 mL de tolueno e algumas pérolas de vidro. Os tubos foram bem tampados e colocados em banho fervente por 45 minutos. Após serem resfriados à temperatura ambiente, foram adicionados 2,5 mL de água, 1 mL de hexano e aproximadamente 0,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Após agitação, os tubos ficaram em repouso até a separação das fases. A fase superior foi transferida para um “vial”. O solvente foi evaporado completamente. Foram então adicionados 100  $\mu$ L de hexano, o precipitado ressuspense e o volume total transferido para um tubo de 100  $\mu$ L. Um microlitro das amostras foi analisado em cromatógrafo à gás GC 2010 Plus da Shimadzu, Workstation GC solution, equipado com injetor automático AOC-20, detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar de sílica fundida SP-2560 (bis cianopropil polisiloxana) de 100 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu$ m de espessura da fase estacionária da Supelco. A programação de temperatura da coluna foi de 140 °C por 5 min, aquecimento a 4 °C/min até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 20 min. As temperaturas do injetor e detector foram de 250 °C e 260 °C, respectivamente. O gás de arraste foi o hélio a um fluxo de 1 mL/min e a razão de divisão da amostra 1/50. Um microlitro do extrato lipídico derivatizado foi injetado. Os períodos de retenção dos ácidos graxos foram comparados com o padrão 189 19 Sigma. Os cálculos foram baseados na área e

concentração do padrão interno, utilizando-se os fatores de resposta teóricos do FID (*flame ionization detector*) do método Ce 1j-07 da AOCS.

**Quadro 3.** Composição de ácidos graxos, determinada por cromatografia gasosa, presente no óleo de peixe utilizado na suplementação oral. Resultados apresentados como g/100g de ácidos graxos.

<b>Fórmula</b>	<b>Nome</b>	<b>Oleo de Peixe</b>
<b>18 : 0</b>	Estearíco	0,34 ± 0,01
<b>18 : 1 (n-9)</b>	Oléico	1,53 ± 0,03
<b>18 : 2 (n-6)</b>	Linoléico	2,87 ± 0,04
<b>18 : 3 (n-6)</b>	γ-Linolênico	0,64 ± 0,01
<b>20 : 1 (n-9)</b>	Eicosenóico	0,23 ± 0,01
<b>18 : 3 (n-3)</b>	α-Linolênico	0,26 ± 0,01
<b>18 : 4 (n-3)</b>	<b>Octadecatetraenóico</b>	<b>8,15 ± 0,08</b>
<b>22 : 0</b>	Docosanóico	0,28 ± 0,00
<b>20 : 4 (n-6)</b>	Araquidônico	2,80 ± 0,04
<b>20 : 4 (n-3)</b>	Eicosatetraenóico	0,74 ± 0,02
<b>20 : 5 (n-3)</b>	<b>Eicosapentaenóico</b>	<b>60,90 ± 0,25</b>
<b>22 : 5 (n-6)</b>	Docosapentaenóico	0,43 ± 0,00
<b>22 : 5 (n-3)</b>	Docosapentaenóico	1,24 ± 0,02
<b>22 : 6 (n-3)</b>	<b>Docosa-hexaenóico</b>	<b>16,32 ± 0,31</b>
<b>Totais</b>	<b>Saturados</b>	<b>0,83 ± 0,19</b>
	<b>Monoinsaturados</b>	<b>2,46 ± 0,05</b>
	<b>Polinsaturados</b>	<b>95,85 ± 0,18</b>
	<b>Não identificados</b>	<b>1,00 ± 0,09</b>

\* Os valores estão apresentados como média ± EPM de três análises.

### 5.2.5 Avaliação da atividade das enzimas hepáticas e lipídios séricos

Após 3-4 horas de restrição alimentar no período da manhã, os animais foram anestesiados na câmara de CO<sub>2</sub> e o sangue coletado pelo seio orbital para realizar as avaliações plasmáticas. As concentrações plasmáticas de triacilglicerol (BUCOLO; DAVID, 1973), colesterol total (WARNICK, 1997) e atividades da aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (KARMEN, 1955; HENRY et al., 1960) foram determinadas utilizando *kits* específicos (*Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais*). O colesterol-LDL foi calculado pela equação de Friedewald (FRIEDEWALD; LEVY; FREDERICKSON, 1972).

### 5.2.6 Glicemia e Insulinemia

Após restrição alimentar de 6 horas para o teste de tolerância à glicose descrito abaixo, foi coletada a amostra capilar caudal e diluída em ácido tricloroacético (TCA) para dosagem da glicemia (BERGMEYER, 1984; BERGMEYER, 1986) por kit colorimétrico específico (*Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais*) e em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para determinação da insulina por *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) seguindo as instruções do fabricante (*BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ USA*). Com os valores da glicemia e insulinemia foi calculado o índice HOMA-IR (do inglês *Homeostatic Model Assessment Insulin Resistance*) (MATTHEWS et al., 1985) que determina a resistência à insulina:

$$HOMA-IR = \text{glicemia (mmol/L)} \times \text{insulinemia (mU/L)} / 22,5$$

### 5.2.7 Teste de tolerância à glicose

Os animais em restrição alimentar por 6 horas receberam uma sobrecarga de glicose (25%) (2 g/Kg p.c.) por via intraperitoneal. Realizou-se coleta da amostra capilar caudal nos períodos de 0, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos após a administração de glicose. As amostras foram diluídas em ácido tricloroacético (TCA) e centrifugadas e o sobrenadante utilizado para determinação da glicemia utilizando *kit* específico.

### 5.2.8 Teste de tolerância à insulina

Após restrição alimentar de 6 horas, os animais receberam insulina (0,75 mU/g de peso corpóreo) via intraperitoneal. Realizou-se a determinação da glicemia capilar caudal, utilizando glicosímetro (*One Touch Ultra, Johnson & Johnson*) nos períodos de: 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos após a administração de insulina. Os valores foram usados para calcular a taxa de desaparecimento da glicose sanguínea (kITT), baseada na regressão linear do logaritmo neperiano das concentrações de glicose obtidas no teste entre 0-60 minutos.

### 5.2.9 Determinação da expressão de genes da inflamação no tecido adiposo epididimal e fígado

A expressão de genes envolvidos na inflamação (F4/80, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TLR-4 e adiponectina) foi avaliada no fígado e no tecido adiposo epididimal dos animais. Cerca de 20 mg de fígado e 100 mg de tecido adiposo epididimal pulverizado em nitrogênio líquido foram homogeneizados em reagente TRIZOL para extração do RNA total (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987). O RNA foi quantificado por leitura no aparelho Nano Drop 2000 (Thermo Scientific, Uniscience, São Paulo, Brasil) e o grau de pureza determinado pela razão 260/280 nm (razão igual a 2 indica alto grau de pureza). O cDNA foi sintetizado a partir de 1  $\mu$ g do RNA total extraído utilizando transcriptase reversa. A expressão gênica foi quantificada por PCR em tempo real (KUBISTA et al., 2006), utilizando o aparelho ROTOR GENE 3000 da Corbett Research (Mortlake, NSW, Austrália) e SYBER Green (Invitrogen, Life Technologies) como marcador fluorescente, conforme os *primers* de interesse especificados no Quadro 4. A quantificação da expressão dos genes foi realizada usando o método da Ct comparativa (Ct = *threshold cycle*; número de ciclo no qual o produto da PCR atinge o limiar de detecção), tendo a expressão de 36B4 e  $\beta$ 2M como padrão interno do tecido adiposo epididimal e fígado, respectivamente.

**Quadro 4.** Sequência de *primers* utilizados para avaliação da expressão gênica no homogenato dos fígados e tecido adiposo epididimal.

Gene	Temperatura de <i>Melting</i> (°C)	Sequência do <i>Primer</i>
<b>F4/80</b>	60	FW 5' – CCT GAA CAT GCA ACC TGC CAC – 3' RV 5' – GGG CAT GAG CAGBCTG TAG GAT C – 3'
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	60	FW 5' – GGC AGC TAC CTG TGT CTT TCC C – 3' RV 5' – ATA TGG GTC CGA CAG CAC GAG – 3'
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	58	FW 5' – TCT TCT CAT TCC TGC TTG TGG C – 3' RV 5' – CAC TTG GTG GTT TGC TAC GAC G – 3'
<b>TLR-4</b>	55	FW 5' – TTCAGAACTTCAGTGGCTGG - 3' RV 5' – TGTTAGTCCAGAGAAACTTCCTG - 3'
<b>Adiponectina</b>	58	FW 5' – TCT TAA TCC TGC CCA GTC ATG C - 3' RV 5' – TCC AAC ATC TCC TGT CTC ACC C - 3'
<b><math>\beta</math>2M</b>	60	FW 5' – AAT GTG AGG CGG GTG GAA CTG – 3' RV 5' – CAT GGC TCG CTC GGT GAC C – 3'
<b>36B4</b>	63	FW 5' – CCA CTT ACT GAA AAG GTC AAG GC – 3' RV 5' – TGG TTG CTT TGG CGG GAT TA – 3'

### 5.2.10 Produção de moléculas de adesão, citocinas e adipocinas pelo tecido adiposo epididimal, aorta torácica e gordura perivascular da aorta torácica

Após o sacrifício dos animais, conforme descrito na seção 4.2.5, o tecido adiposo epididimal foi separado e a aorta isolada e mantida em PBS gelado para separação da gordura perivascular e tecido conjuntivo. Em seguida, os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido. A gordura epididimal foi pulverizada e 100 mg aliquoteados. As amostras foram homogeneizadas em PBS contendo inibidor de protease (*Complete Mini*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha); a aorta em 150  $\mu$ L, a gordura perivascular em 300  $\mu$ L e o tecido adiposo epididimal em 600  $\mu$ L. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 1000 g e 4 °C por 10 minutos e o sobrenadante coletado. A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976) e as citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10), moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1) e as adipocinas leptina e adiponectina por *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) seguindo as instruções do fabricante (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ USA).

### 5.3 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise estatística da comparação entre os grupos PADRAO vs DB (Protocolo Experimental I), DB vs DB + OP e HFD vs HFD + OP (Protocolo Experimental II) foi realizada por Teste “T” de *Student* considerando significância de  $p < 0,05$ . Para a comparação entre as diferentes dietas utilizadas (DB, DB + LC, HFD e HFD + LC), utilizou-se *two-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de Bonferroni considerando significância de  $p < 0,05$ .

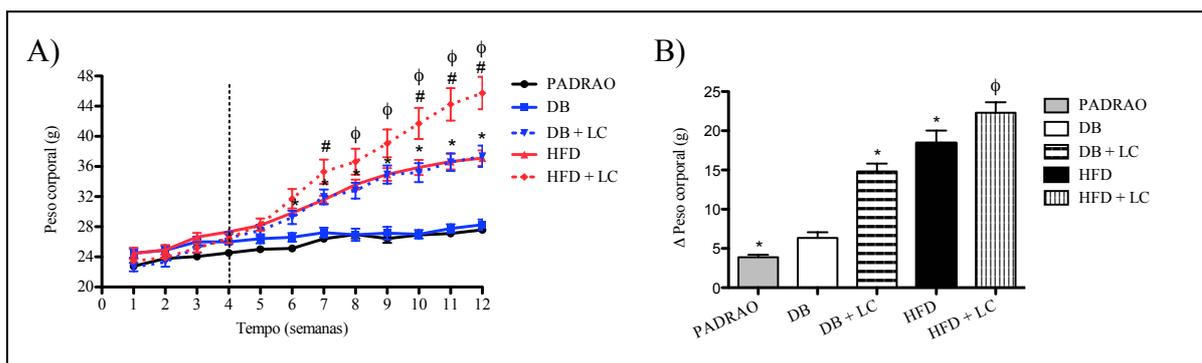
# *6 RESULTADOS*

## **6.1 Efeitos comparativos entre as dietas comercial, balanceada, balanceada e leite condensado, hiperlipídica, hiperlipídica e leite condensado sobre os indicadores de obesidade, resistência à insulina e inflamação**

### *6.1.1 Ganho de peso, ingestão alimentar, composição corporal, atividades das enzimas hepáticas no soro, concentração de colesterol total, LDL-colesterol, triglicerídeos, glicemia e insulinemia no soro, índice HOMA-IR e testes de tolerância à glicose e à insulina*

Na Figura 6A estão apresentadas as médias da massa corpórea durante as 12 semanas de tratamento com as dietas padrão, balanceada, balanceada e leite condensado, hiperlipídica e hiperlipídica e leite condensado, onde a linha pontilhada sobre a 4<sup>a</sup> semana indica o início da administração da dieta hiperlipídica e oferta de leite condensado. Até a quarta semana, todos os grupos, exceto o grupo PADRAO, receberam dieta balanceada. O maior ganho de peso dos grupos que receberam dieta hiperlipídica e dieta rica em carboidrato (leite condensado associado à dieta balanceada ou hiperlipídica) foi evidente a partir das sexta e sétima semanas de tratamento (Figura 5A).

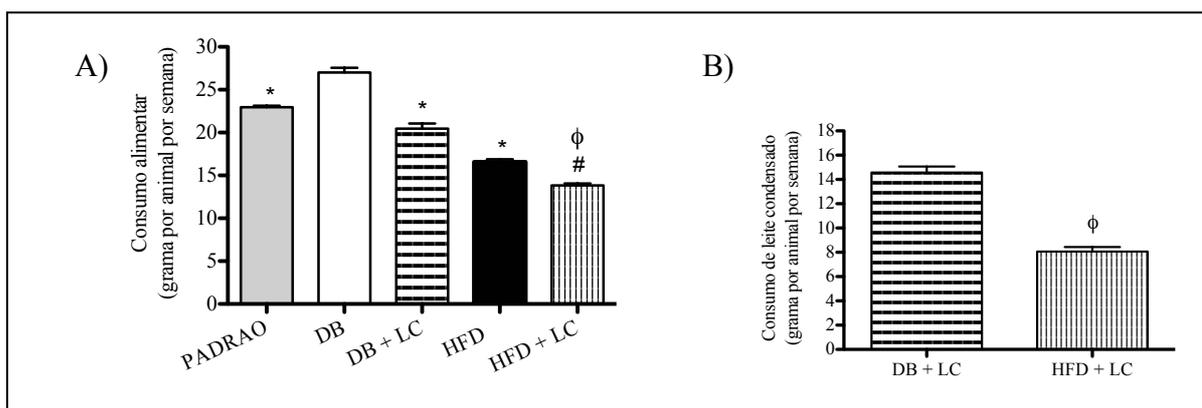
Os animais alimentados por 12 semanas com dieta padrão comercial apresentaram redução de 39% no ganho de peso em relação aos que receberam dieta balanceada (Figura 5B). Os grupos que receberam dietas hiperlipídica e balanceada com oferta de leite condensado apresentaram aumento de 2,9 e 2,3 vezes, respectivamente, no ganho de peso em relação aos animais que receberam apenas dieta balanceada (Figura 5B). O grupo com dieta hiperlipídica e leite condensado, apresentou aumento do ganho de peso em 50% com relação ao grupo BD + LC (Figura 5B).



**Figura 5. Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre a evolução semanal da massa corporal de camundongos C57Bl/6J (A) e a diferença de massa corpórea (massa corporal final – massa corporal inicial) (B) em 12 semanas.** Em (A) estão apresentadas as médias da massa corpórea (g) semanal dos animais submetidos à dieta e a linha pontilhada sobre a semana 4 indica o início da administração da dieta hiperlipídica e oferta de leite condensado. Em (B), estão apresentadas as diferenças entre as massas corpóreas da 12<sup>a</sup> e da 1<sup>a</sup> semanas. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Padrão = dieta comercial para roedores (Nuvilab) (n=13); DB = dieta balanceada (n=13); DB + LC = dieta balanceada e leite condensado *ad libitum* (n=13); HFD = dieta hiperlipídica (n=13); HFD + LC = dieta hiperlipídica e leite condensado *ad libitum* (n=12). \* p<0.05 vs DB;  $\phi$  p<0.05 vs DB + LC; # p<0.05 vs HFD.

Os animais que receberam dieta padrão comercial consumiram 15% menos ração (g/por animal/por semana) em relação aos alimentados com dieta balanceada (Figura 6A). A oferta de leite condensado reduziu o consumo da dieta balanceada em 24% quando comparado ao grupo DB. O grupo que recebeu dieta hiperlipídica consumiu 39% menos ração que o DB. A associação de leite condensado com dieta hiperlipídica reduziu o consumo de ração em 32% em relação ao grupo DB + LC e em 16,5% comparado ao HFD (Figura 6A).

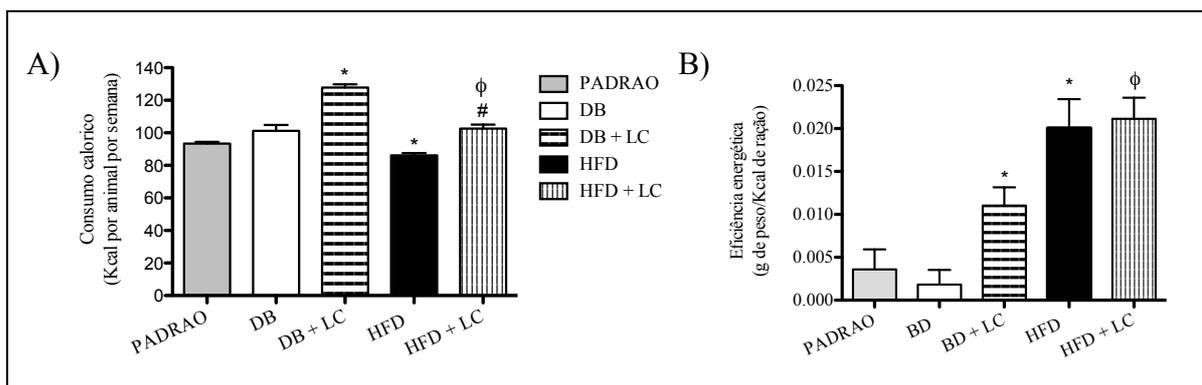
O consumo de leite condensado foi 45% menor (g/por animal/por semana) no grupo que recebeu dieta hiperlipídica comparado aos que consumiram dieta balanceada (Figura 6B).



**Figura 6.** Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre a ingestão alimentar de camundongos C57Bl/6 tratados durante 12 semanas. Em A está apresentado o consumo semanal de ração, em gramas por animal, durante as 8 semanas de administração das dietas (balanceada e hiperlipídica) (A) e em B, o consumo semanal de leite condensado, em gramas por animal, ofertado *ad libitum* durante 8 semanas (B). O consumo das dietas e do leite condensado foi avaliado três vezes por semana e calculado pela diferença entre a oferta e a sobra de alimento em grama, dividido pelo número de animais na caixa. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Padrão = dieta comercial para roedores (Nuvilab) (n=8); DB = dieta balanceada (n=24); DB + LC = dieta balanceada e leite condensado *ad libitum* (n=24); HFD = dieta hiperlipídica (n=24); HFD + LC = dieta hiperlipídica e leite condensado *ad libitum* (n=24). \*  $p < 0.05$  vs DB;  $\phi$   $p < 0.05$  vs DB + LC; #  $p < 0.05$  vs HFD.

O consumo calórico (Kcal por animal por semana) do grupo que recebeu leite condensado e dieta balanceada foi 26% maior que no grupo DB (Figura 7A). Os animais que receberam dieta hiperlipídica consumiram 15% menos calorias que aqueles alimentados com dieta balanceada (Figura 7A). O grupo HFD + LC consumiu 20% menos calorias que o DB + LC e 19% vezes mais calorias que o HFD (Figura 7A).

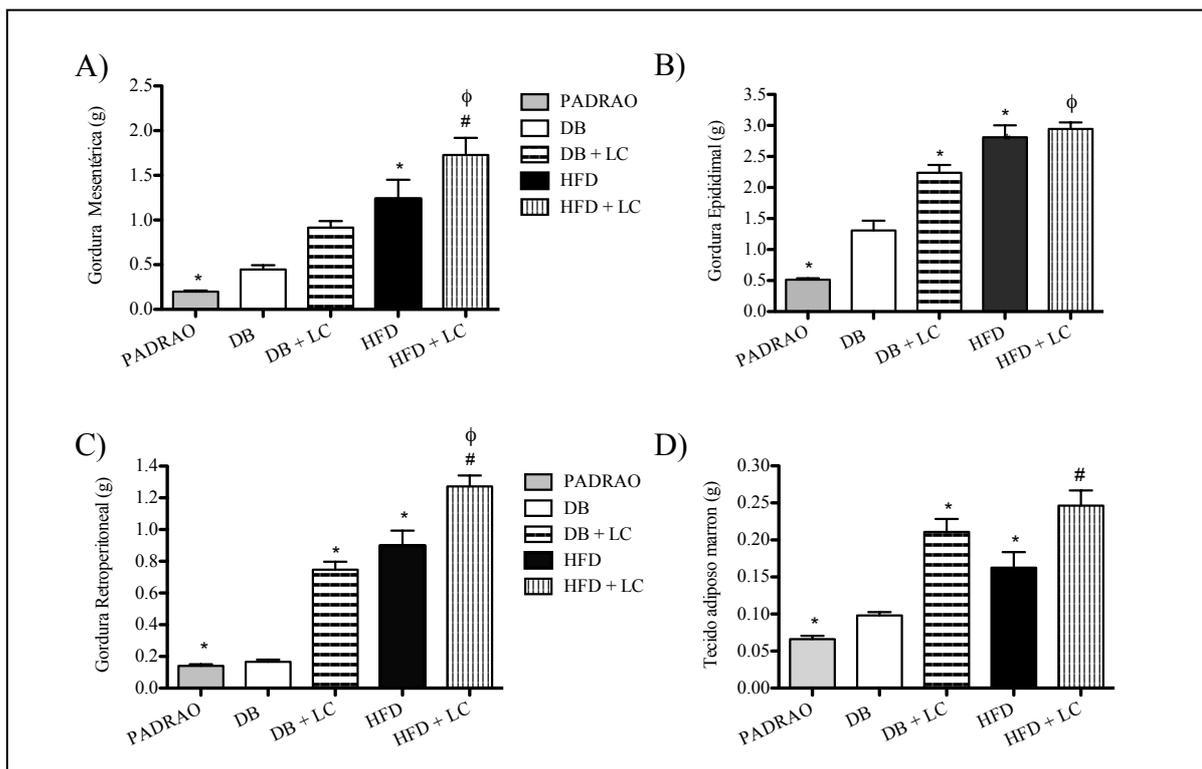
Os animais alimentados com dieta hiperlipídica e oferta ou não de leite condensado apresentaram menor ingestão alimentar (Figura 6A), menor ou igual ingestão calórica (Figura 7A) e maior ganho de peso (Figura 5B) em relação ao grupo que recebeu apenas dieta balanceada, indicando maior eficiência energética da dieta rica em gordura (Figura 7B). A eficiência energética (ganho de peso corpóreo em grama por Kcal de ração consumida) do grupo HFD foi 11 vezes maior em relação ao DB (Figura 7B). O grupo DB + LC apresentou eficiência energética 6 vezes maior que o DB enquanto que o HFD + LC foi 2 vezes maior que DB + LC sem diferença em relação ao HFD (Figura 7B).



**Figura 7.** Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre o consumo calórico (A) e a eficiência energética das dietas (B) em camundongos C57Bl/6 tratados durante 12 semanas. Em (A) está apresentado o consumo calórico, em calorias ingeridas por animal por semana, enquanto que em (B) a ingestão energética está apresentada em relação ao ganho de peso corpóreo por semana, em gramas por quilocaloria de ração consumida na semana, considerando os seguintes valores calóricos das dietas: padrão – 4.068 Kcal/Kg; balanceada – 3.803 Kcal/Kg; hiperlipídica – 5.340 Kcal/Kg e do leite condensado (20 gramas contém 65 Kcal) durante as 8 semanas de dieta. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Padrão = dieta comercial para roedores (Nuvilab) (n=13); DB = dieta balanceada (n=13); DB + LC = dieta balanceada e leite condensado *ad libitum* (n=13); HFD = dieta hiperlipídica (n=13); HFD + LC = dieta hiperlipídica e leite condensado *ad libitum* (n=12). \*  $p < 0.05$  vs DB;  $\phi$   $p < 0.05$  vs DB + LC; #  $p < 0.05$  vs HFD.

Observou-se que os animais alimentados com dieta padrão apresentam redução de 56% no peso da gordura mesentérica, 61% na gordura epididimal, 16% na gordura retroperitoneal e de 32,5% no tecido adiposo marrom em relação ao grupo DB (Figuras 8A, 8B, 8C e 8D, respectivamente). A oferta de leite condensado aumentou o peso dos depósitos de gordura dos animais que receberam dieta balanceada em 71% na gordura epididimal, 4,5 vezes na gordura retroperitoneal e 2,2 vezes no tecido adiposo marrom em relação ao grupo DB (Figuras 8B, 8C e 8D, respectivamente).

A dieta hiperlipídica causou aumento marcante no peso dos depósitos de gordura em: 2,8 vezes na gordura mesentérica, 2,2 vezes na gordura epididimal, 5,4 vezes na gordura retroperitoneal e 66% no tecido adiposo marrom em relação ao grupo DB (Figuras 8A, 8B, 8C e 8D, respectivamente). A oferta de leite condensado associada à dieta hiperlipídica aumentou a gordura mesentérica em 89%, a epididimal em 31,5% e a retroperitoneal em 70% em relação ao grupo DB + LC. Em relação ao grupo HFD, a oferta de leite condensado aumentou a gordura mesentérica, retroperitoneal e tecido adiposo marrom 51% aproximadamente (Figuras 8A, 8C e 8D, respectivamente).

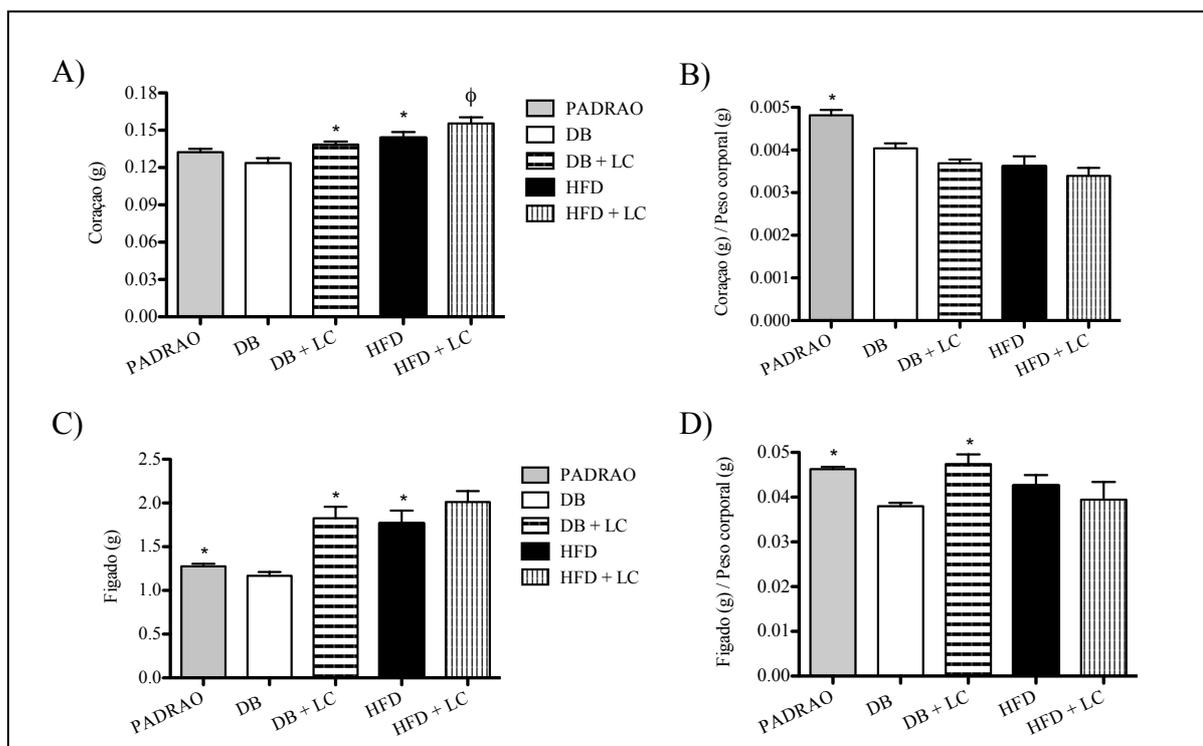


**Figura 8.** Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre o peso dos depósitos de gordura de camundongos C57Bl/6 tratados durante 12 semanas. A Figura apresenta os pesos absolutos da gordura mesentérica (A), gordura epididimal (B), gordura retroperitoneal (C) e tecido adiposo marrom (D) em gramas. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Padrão = dieta comercial para roedores (Nuvilab) (n=13); DB = dieta balanceada (n=13); DB + LC = dieta balanceada e leite condensado *ad libitum* (n=13); HFD = dieta hiperlipídica (n=13); HFD + LC = dieta hiperlipídica e leite condensado *ad libitum* (n=11). \*  $p < 0.05$  vs DB;  $\phi$   $p < 0.05$  vs DB + LC; #  $p < 0.05$  vs HFD.

Os animais mantidos em dieta padrão comercial apresentaram maior (em 20%) peso relativo do coração (peso do órgão/peso corporal) comparado ao grupo DB (Figura 9B). Os pesos absoluto e relativo do fígado dos animais do grupo PADRAO foram 10% e 20%, respectivamente, mais elevados em relação aos animais alimentados com dieta balanceada (Figuras 9C e 9D, respectivamente). Os grupos DB + LC, HFD + LC e HFD apresentaram peso absoluto do coração entre 10% e 20% maior que os grupos DB e DB + LC mas o peso em relação à massa corpórea não foi significativamente diferente entre os tratamentos, indicando que as dietas hipercalóricas não induziram hipertrofia cardíaca (Figura 9A).

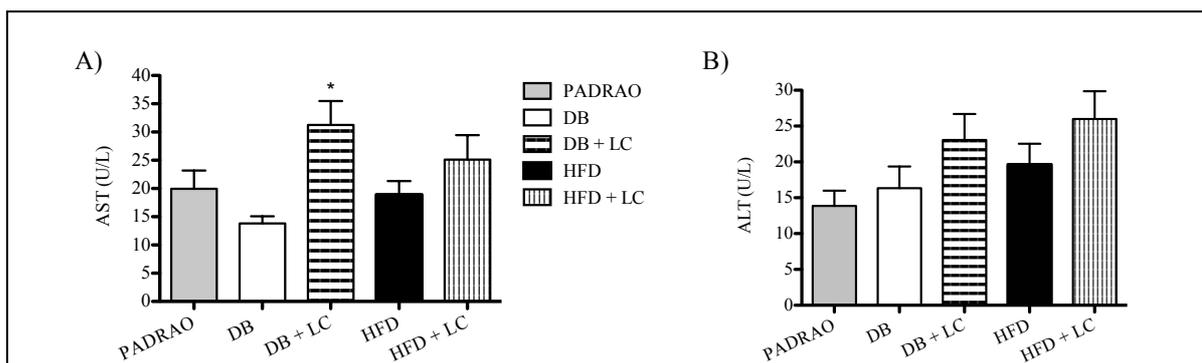
Os pesos absoluto e relativo do fígado dos animais que receberam leite condensado e dieta balanceada foram 56,5% e 25% vezes maior, respectivamente, comparados ao grupo DB (Figuras 9C e 9D, respectivamente). No grupo que recebeu dieta hiperlipídica, apenas o peso

absoluto do fígado foi 51% maior que no grupo DB (Figura 9C), entretanto, quando normalizado pelo peso corporal, não houve diferença significativa (Figura 9D).



**Figura 9.** Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre o peso do coração e fígado de camundongos C57Bl/6 tratados durante 12 semanas. A Figura apresenta o peso absoluto do coração (A), o peso do coração normalizado pela massa corpórea (B), o peso absoluto do fígado (C) e o peso do fígado normalizado pela massa corpórea (D) em gramas. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Padrão = dieta comercial para roedores (Nuvilab) (n=13); DB = dieta balanceada (n=11); DB + LC = dieta balanceada e leite condensado *ad libitum* (n=12 - 13); HFD = dieta hiperlipídica (n=10 - 11); HFD + LC = dieta hiperlipídica e leite condensado *ad libitum* (n=11). \* p < 0.05 vs DB; φ p < 0.05 vs DB + LC; # p < 0.05 vs HFD.

Os animais que receberam dieta balanceada e leite condensado apresentaram aumento de 2,3 vezes na atividade da enzima hepática aspartato aminotransferase (AST) no soro comparado ao grupo que recebeu apenas dieta balanceada (Figura 10A). Não houve diferença significativa entre os outros grupos quanto à atividade da AST (Figura 10A) e da alanina aminotransferase (ALT) (Figura 10B).

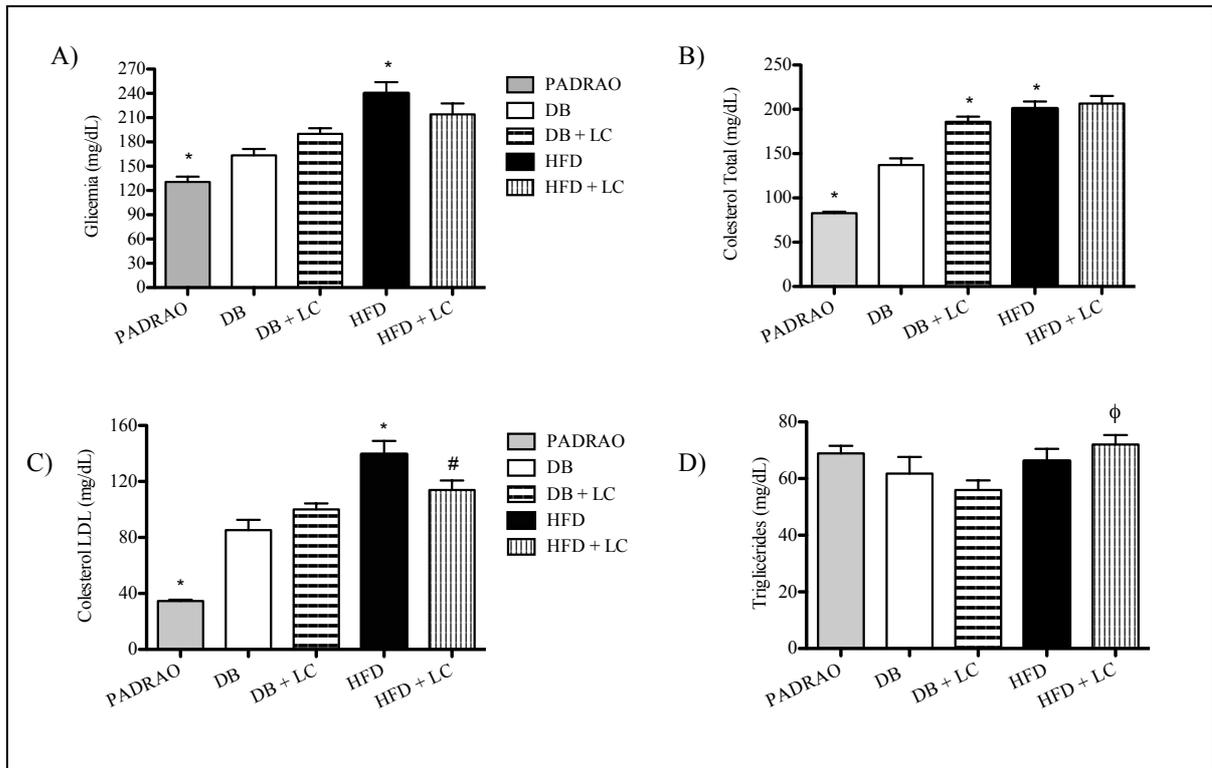


**Figura 10.** Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre a atividade das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) (A) e alanina amino transferase (ALT) (B) no soro de camundongos C57Bl/6 tratados durante 12 semanas. O sangue foi coletado após 4 horas de restrição alimentar e processado para mensuração dos parâmetros séricos. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Padrão = dieta comercial para roedores (Nuvilab) (n=12); DB = dieta balanceada (n=12 - 13); DB + LC = dieta balanceada e leite condensado *ad libitum* (n=11); HFD = dieta hiperlipídica (n=10); HFD + LC = dieta hiperlipídica e leite condensado *ad libitum* (n=11). \*  $p < 0.05$  vs DB;  $\phi$   $p < 0.05$  vs DB + LC; #  $p < 0.05$  vs HFD.

Ao final das 12 semanas, o sangue dos animais com restrição alimentar de 3 a 4 horas foi coletado após o sacrifício dos animais, para determinação dos parâmetros séricos. Os animais alimentados com dieta padrão comercial apresentaram redução nas concentrações séricas de glicose (em 20%), colesterol total (em 40%) e LDL-colesterol (em 59%) em relação ao grupo DB (Figuras 11A, 11B e 11C, respectivamente). A oferta de leite condensado para os animais alimentados com dieta balanceada aumentou a concentração de colesterol total no soro em 35% comparado ao grupo DB (Figura 11B).

Os animais que receberam dieta hiperlipídica apresentaram aumento de 46% na glicemia de jejum e nas concentrações séricas de colesterol total e 64% de LDL-colesterol em relação ao grupo DB (Figuras 11A, 11B e 11C, respectivamente). A dieta hiperlipídica com oferta de leite condensado elevou em 29% a concentração sérica de triacilgliceróis em relação ao grupo DB + LC e reduziu em 18% LDL-colesterol comparado ao grupo HFD (Figuras 11D e 11C, respectivamente).

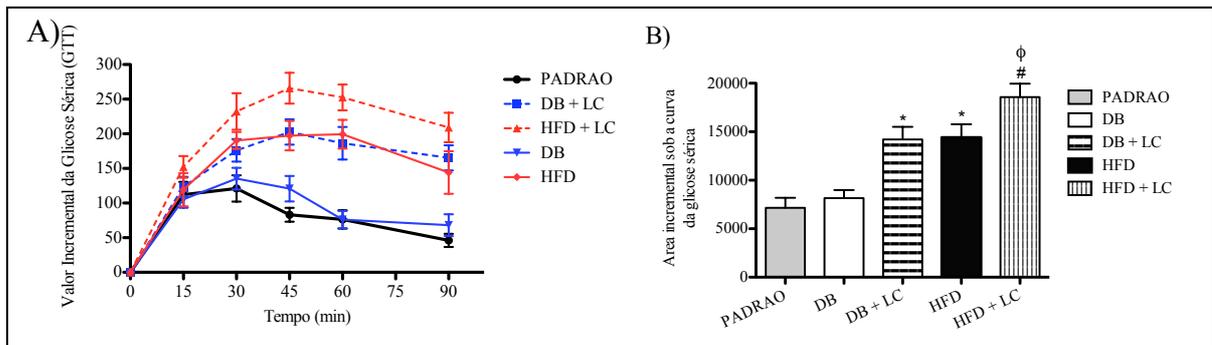
A análise por *two-way* ANOVA indicou interação entre a dieta e o consumo de leite condensado sobre a glicemia ( $p = 0,0182$ ; Quadro 6), colesterol total ( $p = 0,0056$ ; Quadro 6) e LDL-colesterol no soro ( $p < 0,0001$ ; Quadro 6).



**Figura 11.** Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre (A) glicemia, (B) colesterol total, (C) lipoproteína de baixa densidade (LDL) e (D) triacilgliceróis no soro de camundongos C57Bl/6 tratados durante 12 semanas. O sangue foi coletado após 4 horas de restrição alimentar e processado para determinação dos parâmetros plasmáticos. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Padrão = dieta comercial para roedores (Nuvilab) (n=13); DB = dieta balanceada (n=13); DB + LC = dieta balanceada e leite condensado *ad libitum* (n=13); HFD = dieta hiperlipídica (n=13); HFD + LC = dieta hiperlipídica e leite condensado *ad libitum* (n=12). \*  $p < 0.05$  vs DB;  $\phi$   $p < 0.05$  vs DB + LC; #  $p < 0.05$  vs HFD.

### 6.1.2 Teste de tolerância à glicose (GTT)

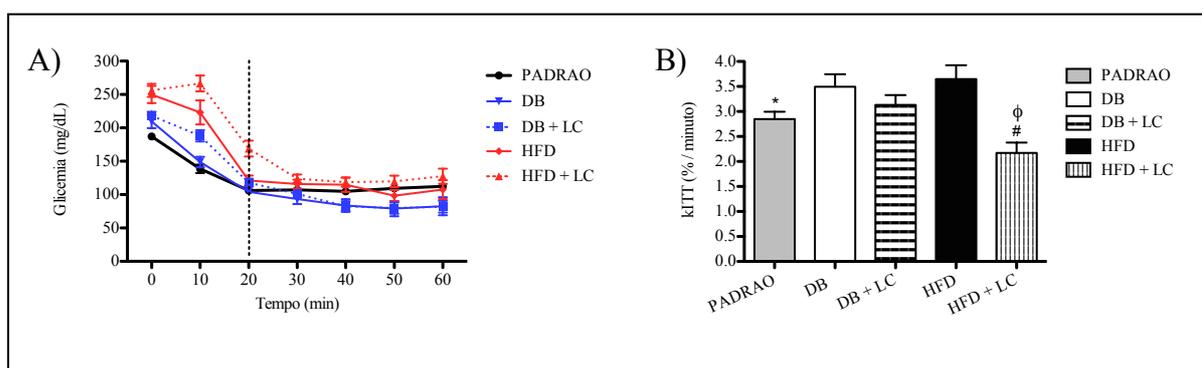
Ao final das 12 semanas de tratamento, os animais foram submetidos ao teste de tolerância à glicose (GTT). Os valores glicêmicos obtidos após sobrecarga de glicose foram utilizados para construir a curva de decaimento da concentração de glicose no soro (Figura 12A) e calcular a área incremental sob a curva (Figura 12B). Os animais dos grupos DB + LC e HFD apresentaram aumento de 77% e 74%, respectivamente, na área incremental sob a curva da glicose sérica em relação aos animais alimentados com dieta balanceada, indicando maior intolerância à glicose (Figura 12B). Os animais que receberam dieta hiperlipídica e oferta de leite condensado apresentaram aumento de 30% na área sob a curva da glicose em relação aos grupos DB + LC e HFD (Figura 12B).



**Figura 12.** Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre a concentração sérica de glicose em animais C57Bl/6J (A) e a área incremental da glicose sérica (B) após tratamento de 12 semanas. O teste de tolerância à glicose foi realizado na última semana de tratamento após 6 horas de restrição alimentar e administração de 2 g/Kg p.c. de glicose, via intraperitoneal, e coleta de sangue via caudal para determinação da glicose sérica nos períodos de 0, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos. Padrão = dieta comercial para roedores (Nuvilab) (n=13); DB = dieta balanceada (n=12); DB + LC = dieta balanceada e leite condensado *ad libitum* (n=13); HFD = dieta hiperlipídica (n=13); HFD + LC = dieta hiperlipídica e leite condensado *ad libitum* (n=12). \*  $p < 0.05$  vs DB; φ  $p < 0.05$  vs DB + LC; #  $p < 0.05$  vs HFD.

### 6.1.3 Teste de tolerância à insulina

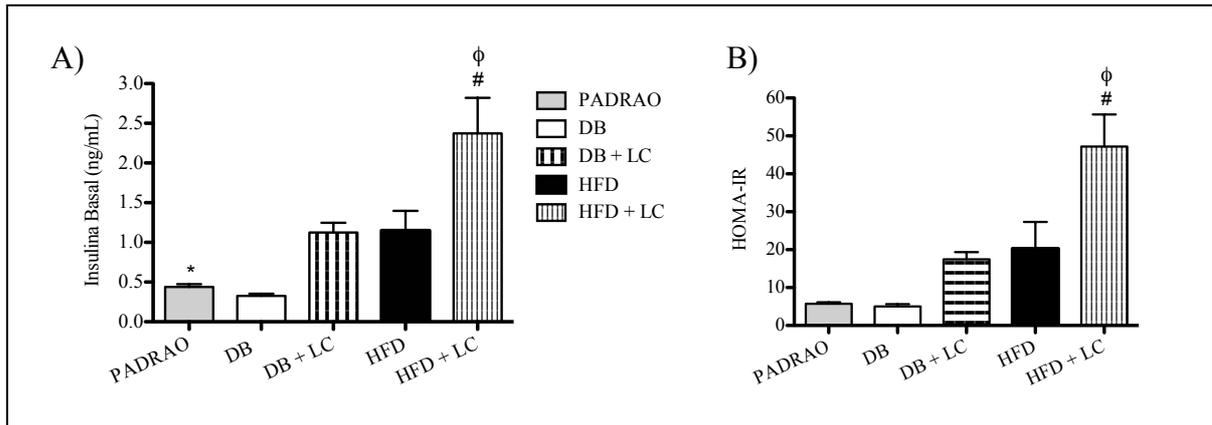
Com os valores glicêmicos obtidos no teste de tolerância à insulina foi construída a curva de decaimento das concentrações séricas de glicose (Figuras 13A) e calculou-se a constante de decaimento (kITT) (Figura 13B). Os animais que receberam a dieta padrão apresentaram taxa de decaimento de glicose 19% menor que o grupo que recebeu dieta balanceada (Figura 13B). O grupo HFD + LC demonstrou redução de 31% no kITT em relação ao grupo DB + LC e 40% comparado ao HFD (Figura 13B). Apesar de não ter sido observada diferença significativa no pós-teste de Bonferroni nos grupos DB + LC e HFD (Figura 13B), a análise por *two-way* ANOVA indica a existência de interação entre a dieta e a oferta de leite condensado ( $p = 0,0229$ ; Quadro 6).



**Figura 13. Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre os valores glicêmicos (A) e a taxa de decaimento da glicemia (B) em camundongos C57Bl/6J tratados durante 12 semanas.** O teste de tolerância à insulina foi realizado na última semana de tratamento com a administração de 0,75 mU/por grama de massa corpórea de insulina após 6 horas de jejum, via intraperitoneal, e coleta de sangue via caudal para determinação da glicose, antes e após a injeção de insulina nos períodos de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Padrão = dieta comercial para roedores (Nuvilab) (n=13); DB = dieta balanceada (n=13); DB + LC = dieta balanceada e leite condensado *ad libitum* (n=13); HFD = dieta hiperlipídica (n=13); HFD + LC = dieta hiperlipídica e leite condensado *ad libitum* (n=12). \*  $p < 0.05$  vs DB; φ  $p < 0.05$  vs DB + LC; #  $p < 0.05$  vs HFD.

A insulinemia de jejum dos animais alimentados com dieta padrão foi 30% maior que nos alimentados com dieta balanceada (Figura 14A). As dietas ricas em açúcar (DB + LC) ou gordura (HFD) elevaram a insulinemia em 3,5 vezes (*two-way* ANOVA;  $p < 0,0007$ ; Quadro 6). O consumo de leite condensado associado à dieta hiperlipídica por 8 semanas aumentou a insulinemia em 2,1 vezes em relação aos grupos HFD e DB + LC (Figura 14A).

O índice HOMA-IR, que indica resistência à insulina por cálculo baseado na insulinemia e glicemia de jejum, foi 3,5 e 4 vezes mais elevado nos grupos DB + LC e HFD, respectivamente, em relação aos animais alimentados com dieta balanceada (*two-way* ANOVA;  $p < 0,0016$ ; Quadro 6). Os animais do grupo HFD + LC apresentaram aumento de 2,3 e 2,7 vezes em relação a HFD e DB + LC, respectivamente (Figura 14B).



**Figura 14.** Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre os valores de insulinemia (A) e o índice HOMA-IR (B) em camundongos C57Bl/6J tratados durante 12 semanas. A insulina foi determinada por ELISA no soro coletado por via caudal na última semana de tratamento após 6 horas de jejum (tempo de restrição alimentar determinado para os testes de tolerância à glicose e à insulina realizados na semana anterior ao sacrifício dos animais). O índice HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment – Insulin Resistance*) foi calculado pela fórmula:  $\text{insulina (mU/L)} \times \text{glicemia (mmol/L)} / 22,5$  e indica resistência à insulina. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Padrão = dieta comercial para roedores (Nuvilab) (n=13); DB = dieta balanceada (n=13); DB + LC = dieta balanceada e leite condensado *ad libitum* (n=13); HFD = dieta hiperlipídica (n=13); HFD + LC = dieta hiperlipídica e leite condensado *ad libitum* (n=12). \*  $p < 0,05$  vs DB;  $\phi$   $p < 0,05$  vs DB + LC; #  $p < 0,05$  vs HFD.

#### 6.1.4 Conteúdo de citocinas inflamatórias no tecido adiposo epididimal

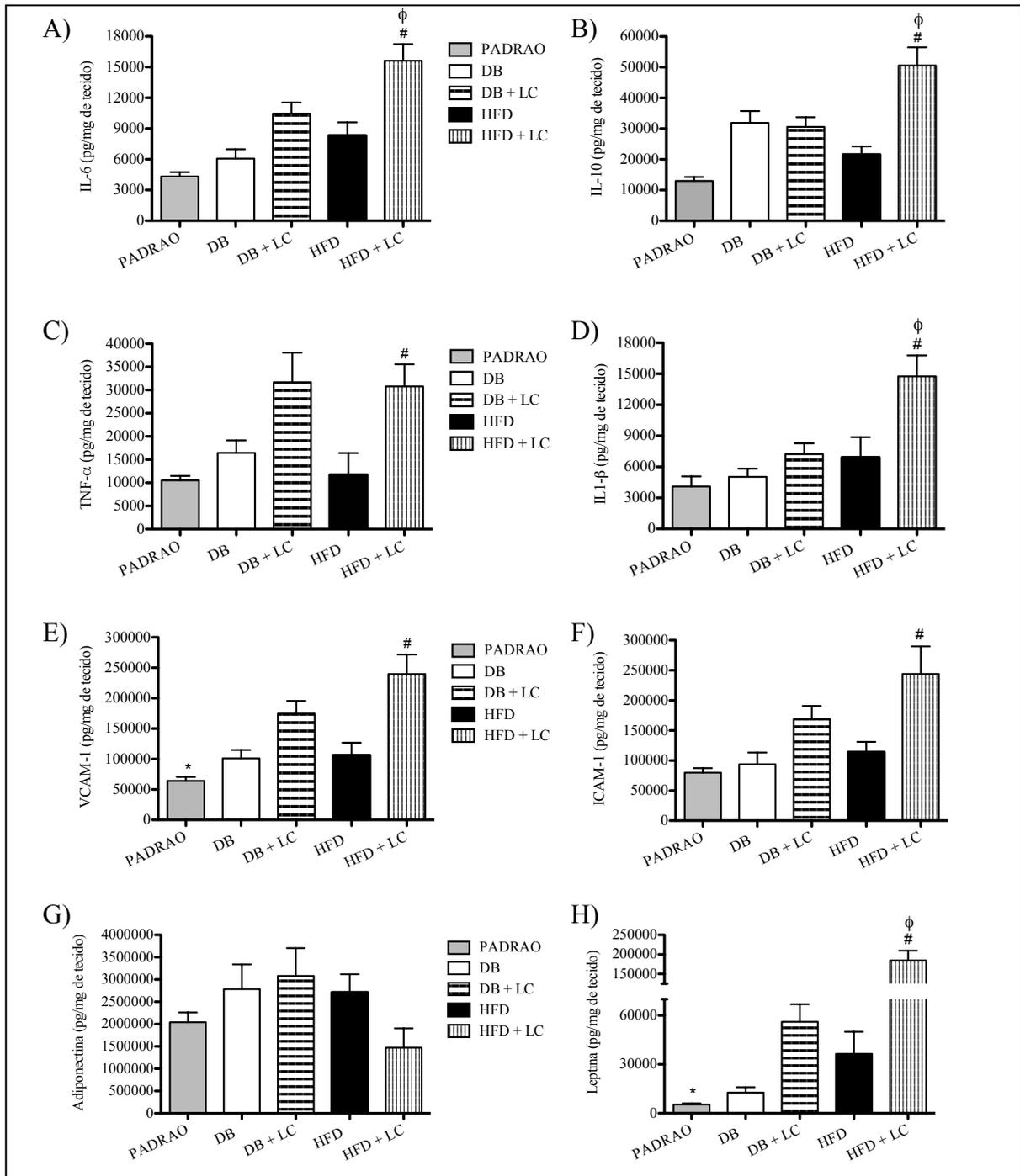
No homogenato do tecido adiposo epididimal, determinou-se o conteúdo das citocinas inflamatórias IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Figuras 15A, 15B, 15C e 15D, respectivamente), moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e vascular (VCAM-1) (Figuras 15E e 15F, respectivamente), adiponectina (Figura 15G) e leptina (Figura 15H) pelo método de ELISA.

O tecido adiposo epididimal dos animais alimentados com dieta padrão comercial para roedores apresentou menor conteúdo de VCAM-1 (37%) e leptina (58%) comparado ao tecido dos animais alimentados com dieta balanceada (Figuras 15E e 15H, respectivamente).

Conforme o Quadro 6, o consumo de leite condensado associado à dieta balanceada levou ao aumento de IL-6 em 72% (*two-way* ANOVA;  $p = 0,0002$ ), TNF- $\alpha$  em 93% (*two-way* ANOVA;  $p = 0,0062$ ), IL-1 $\beta$  em 43 % (*two-way* ANOVA;  $p = 0,0035$ ), VCAM-1 em 72,5% (*two-way* ANOVA;  $p = 0,001$ ), ICAM-1 em 80% (*two-way* ANOVA;  $p = 0,0044$ ) e leptina em 4,4 vezes (*two-way* ANOVA;  $p < 0,0001$ ). No tecido adiposo epididimal dos animais alimentados com dieta rica em gordura, em relação à dieta balanceada, foi observado aumento de 37% nos conteúdos de IL-6 e IL-1 $\beta$  (*two-way* ANOVA;  $p = 0,0091$  e  $p = 0,0054$ , respectivamente) e de 2,9 vezes de leptina (*two-way* ANOVA;  $p = 0,0002$ ).

Os animais que receberam dieta hiperlipídica e leite condensado apresentaram aumento de 49% no conteúdo de IL-6, 65% de IL-10, 2 vezes de IL-1 $\beta$  e 3,3 vezes de leptina em relação ao grupo DB + LC (Figuras 15A, 15B, 15D e 15H, respectivamente). Em relação ao grupo HFD, a oferta de leite condensado elevou o conteúdo de IL-6 (1,9 vezes), IL-10 (2,3 vezes), TNF- $\alpha$  (2,6 vezes), IL-1 $\beta$  (2,1 vezes), VCAM-1 (2,3 vezes), ICAM-1 (2,1 vezes) e leptina (5,1 vezes) (Figuras 15A, 15B, 15C, 15D, 15E, 15F, 15H, respectivamente). Não houve diferença significativa no conteúdo de adiponectina do tecido adiposo epididimal entre os grupos estudados (Figura 15E).

De acordo com o Quadro 6, a análise por *two-way* ANOVA indicou interação entre a dieta e o consumo de leite condensado nos conteúdos de IL-10 ( $p = 0,0028$ ) e leptina ( $p = 0,0054$ ) no tecido adiposo epididimal.



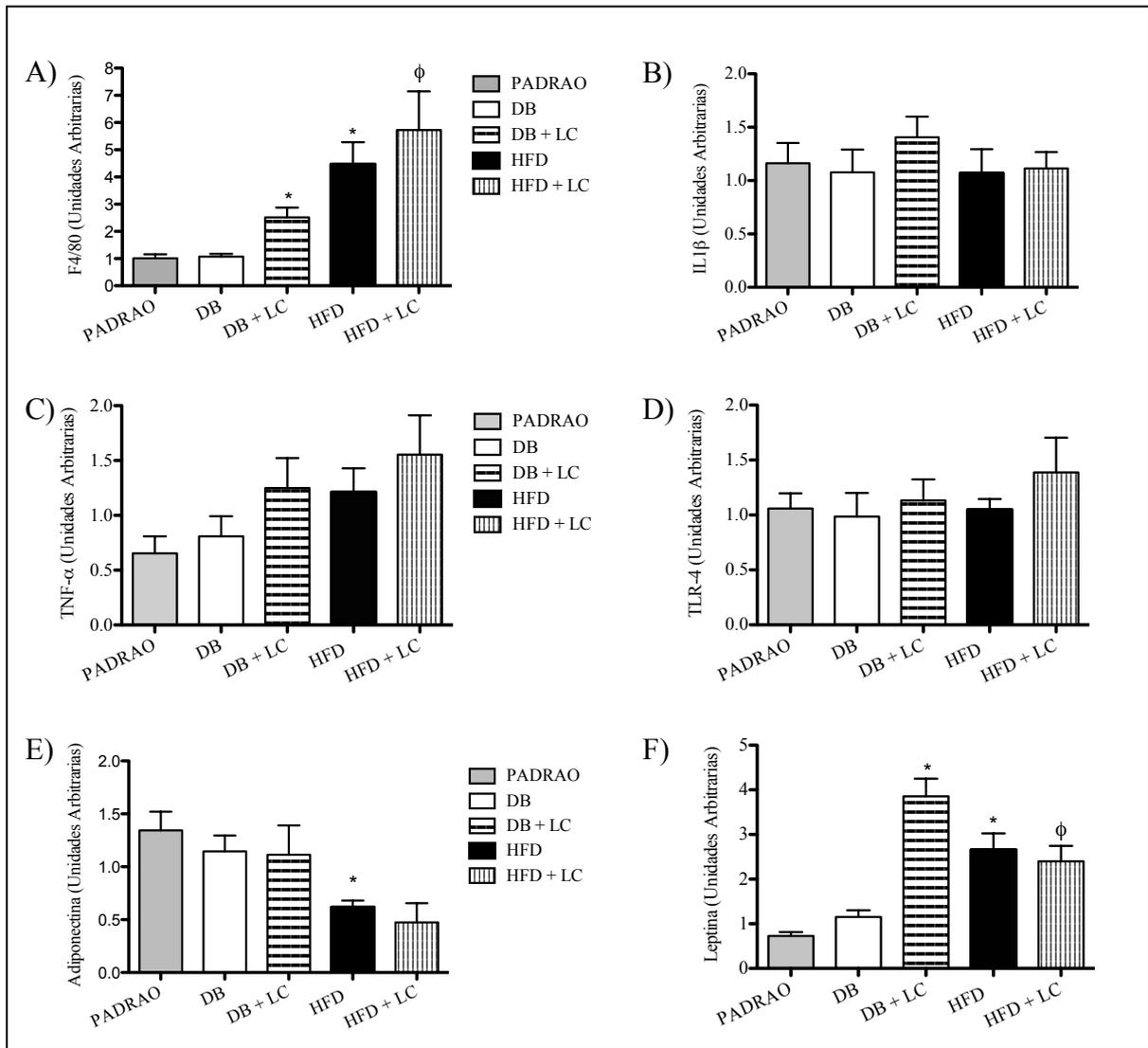
**Figura 15.** Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre os conteúdos de IL-6 (A), IL-10 (B), TNF- $\alpha$  (C), IL-1 $\beta$  (D), VCAM-1 (E), ICAM-1 (F), adiponectina (G) e leptina (H) no tecido adiposo epididimal de camundongos C57Bl/6J tratados durante 12 semanas. O macerado de tecido adiposo epididimal (100 mg) foi homogeneizado em tampão fosfato-salina contendo inibidor de protease e o sobrenadante foi utilizado para ensaio por ELISA. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Padrão = dieta comercial para roedores (Nuvilab) (n=6); DB = dieta balanceada (n=5); DB + LC = dieta balanceada e leite condensado *ad libitum* (n=7); HFD = dieta hiperlipídica (n=4); HFD + LC = dieta hiperlipídica e leite condensado *ad libitum* (n=5). \* p<0.05 vs DB; φ p<0.05 vs DB + LC; # p<0.05 vs HFD.

### *6.1.5 Expressão dos genes F4/80, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TLR-4, adiponectina e leptina no tecido adiposo epididimal*

A partir de 100 miligramas de tecido adiposo epididimal avaliou-se a expressão dos seguintes genes inflamatórios: F4/80, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TLR-4, adiponectina e leptina (Figuras 16A, 16B, 16C, 16D, 16E e 16F, respectivamente) pelo método de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).

Os animais que receberam dieta balanceada e leite condensado apresentaram aumento de 2,3 vezes na expressão de F4/80 e de 3,3 vezes de leptina em relação ao grupo DB (Figuras 16A e 16F, respectivamente). A proteína F4/80 indica aumento de infiltração de macrófagos e processo inflamatório, enquanto a leptina, hormônio produzido principalmente pelos adipócitos, aumenta com a obesidade e causa saciedade. O aumento no conteúdo de RNA mensageiro dessas duas proteínas, F4/80 e leptina, no tecido adiposo epididimal indica estado inflamatório induzido pelo consumo de açúcar (DB + LC).

O grupo HFD apresentou redução de 46% na expressão de RNA mensageiro de adiponectina e aumento de 4,2 vezes na expressão de F4/80 e de 2,3 vezes de leptina, em relação ao grupo DB (Figuras 16E, 16A e 16F, respectivamente). Os animais do grupo HFD + LC apresentaram aumento de 2,3 vezes na expressão de F4/80 e redução de 38% na expressão de leptina em relação ao DB + LC (Figuras 16A e 16F, respectivamente). Não se observou diferença significativa na expressão dos genes IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TLR-4 e adiponectina (Figuras 16B, 16C e 16D respectivamente).



**Figura 16.** Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre a expressão de genes inflamatórios no tecido adiposo epididimal de camundongos C57Bl/6J tratados durante 12 semanas. O tecido adiposo epididimal dos animais foi triturado e 100 mg do macerado foram utilizados para extração de RNA mensageiro. Os conteúdos de RNA mensageiro dos genes F4/80 (A; n=5-16), IL-1 $\beta$  (B; n=4-7), TNF- $\alpha$  (C; n=4-7), TLR-4 (D; n=4-7), adiponectina (E; n=4-16) e leptina (F; n=4-16) foram determinados por RT-PCR. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Padrão = dieta comercial para roedores (Nuvilab); DB = dieta balanceada; DB + LC = dieta balanceada e leite condensado *ad libitum*; HFD = dieta hiperlipídica; HFD + LC = dieta hiperlipídica e leite condensado *ad libitum*. \* p<0.05 vs DB; φ p<0.05 vs DB + LC; # p<0.05 vs HFD.

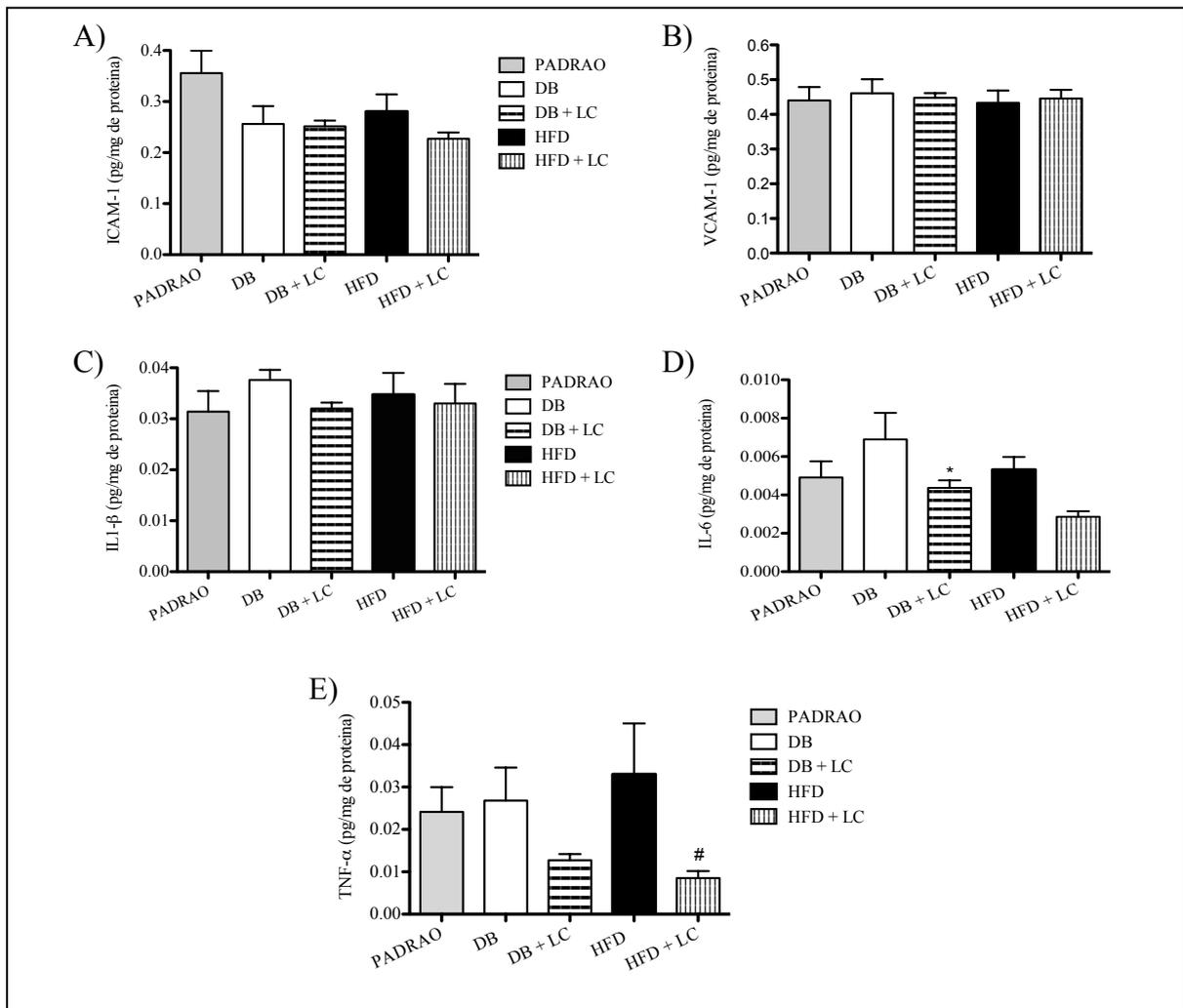
### 6.1.6 Conteúdos de ICAM-1, VCAM-1, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ na aorta torácica

Após 12 semanas de tratamento, os animais foram sacrificados e a aorta torácica dissecada da gordura perivascular e congelada em nitrogênio líquido. No homogenato da aorta, realizou-se a determinação das moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e vascular (VCAM-1) (Figuras 17A e 17B, respectivamente) e das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (Figuras 17C, 17D e 17E, respectivamente) por ELISA.

Não houve diferença significativa nos conteúdos de ICAM-1, VCAM-1 e IL-1 $\beta$  na aorta torácica dos grupos estudados (Figuras 17A, 17B e 17C, respectivamente).

Os animais que receberam leite condensado e dieta balanceada apresentaram redução nos conteúdos de IL-6 em 94% (Figura 17D) e de TNF- $\alpha$  em 53% (*two-way* ANOVA;  $p = 0,0035$ ; Quadro 6) na aorta torácica em relação ao grupo DB.

A aorta dos animais que receberam dieta hiperlipídica e leite condensado apresentou redução de 46% nos conteúdos de IL-6 (*two-way* ANOVA;  $p = 0,0035$ ; Quadro 6; Figura 17D) e de 74% de TNF- $\alpha$  (Figura 17E) em relação ao grupo HFD. O grupo HFD + LC também apresentou redução de 34% no conteúdo de IL-6 (*two-way* ANOVA;  $p = 0,0035$ ; Quadro 6; Figura 17D) comparado ao DB + LC.



**Figura 17.** Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre o conteúdo de ICAM-1 (A), VCAM-1 (B), IL-1 $\beta$  (C), IL-6 (D) e TNF- $\alpha$  (E) na aorta torácica de camundongos C57Bl/6J tratados durante 12 semanas. A aorta torácica foi homogeneizada em tampão fosfato-salina contendo inibidor de protease e o sobrenadante foi utilizado para ensaio por ELISA. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Padrão = dieta comercial para roedores (Nuvilab) (n=7); DB = dieta balanceada (n=5); DB + LC = dieta balanceada e leite condensado *ad libitum* (n=7); HFD = dieta hiperlipídica (n=4); HFD + LC = dieta hiperlipídica e leite condensado *ad libitum* (n=6). \*  $p < 0.05$  vs DB; #  $p < 0.05$  vs HFD.

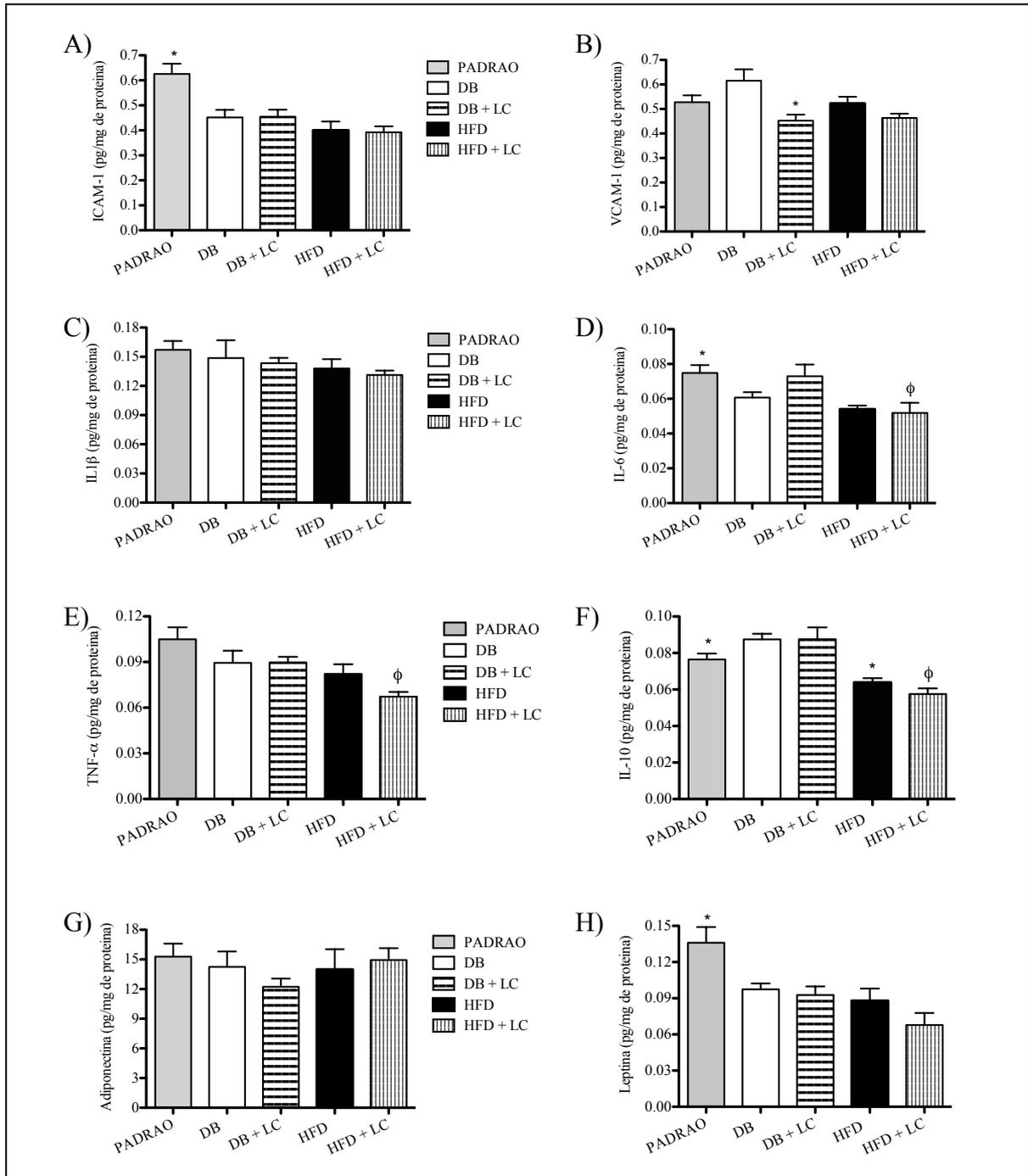
### 6.1.7 Conteúdos de ICAM-1, VCAM-1, IL1- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, adiponectina e leptina na gordura perivascular da aorta torácica

A gordura perivascular que recobre a aorta torácica foi retirada cuidadosamente e congelada em nitrogênio líquido. No homogenato da gordura perivascular, determinou-se a quantidade de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e vascular (VCAM-1) (Figuras 18A e 18B, respectivamente), citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 (Figuras 18C, 18D, 18E e 18F, respectivamente), adiponectina (Figura 18E) e leptina (Figura 18H) por ELISA.

Os animais alimentados com dieta padrão comercial para roedores apresentaram aumento no conteúdo de ICAM-1 (38,5%), IL-6 (23%) e leptina (40%) e redução de IL-10 (12%) na gordura perivascular em relação ao grupo DB (Figuras 18A, 18D e 18H, respectivamente). O grupo DB + LC apresentou redução no conteúdo de VCAM-1 26,5% comparado ao DB (Figura 18B).

O grupo HFD apresentou redução de 11% no conteúdo de IL-6 (*two-way* ANOVA;  $p = 0,0276$ ; Quadro 6), 8% de TNF- $\alpha$  (*two-way* ANOVA;  $p = 0,0149$ ; Quadro 6) e 27% no conteúdo de IL-10 (Figuras 18D, 18E e 18F, respectivamente) em relação aos animais com dieta balanceada. O grupo HFD + LC apresentou menor conteúdo de IL-6 (29%), TNF- $\alpha$  (25%) e IL-10 (34%) em relação ao DB + LC (Figuras 18D, 18E e 18F, respectivamente). O consumo de leite condensado pelo grupo HFD reduziu o conteúdo de VCAM-1 em 11% (*two-way* ANOVA;  $p = 0,0017$ ; Quadro 6) em relação ao HFD (Figura 18B).

Não houve diferença significativa nos conteúdos de IL1- $\beta$  e adiponectina na gordura perivascular da aorta torácica entre os grupos estudados (Figuras 18C e 18G, respectivamente).



**Figura 18.** Efeitos das dietas padrão, balanceada, balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre os conteúdos de ICAM-1 (A), VCAM-1 (B), IL-1 $\beta$  (C), IL-6 (D), TNF- $\alpha$  (E), IL-10 (F), adiponectina (G) e leptina (H) na gordura perivascular da aorta torácica de camundongos C57Bl/6J tratados durante 12 semanas. A gordura perivascular da aorta foi homogeneizada em tampão fosfato-salina contendo inibidor de protease e o sobrenadante utilizado para ensaio por ELISA. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Padrão = dieta comercial para roedores (Nuvilab) (n=7); DB = dieta balanceada (n=5); DB + LC = dieta balanceada e leite condensado *ad libitum* (n=7); HFD = dieta hiperlipídica (n=4); HFD + LC = dieta hiperlipídica e leite condensado *ad libitum* (n=6). \* p < 0.05 vs DB;  $\phi$  p < 0.05 vs DB + LC.

**Quadro 5.** Resumo das comparações entre padrão versus balanceada (DB), balanceada com leite condensado *ad libitum* (DB + LC) versus DB, hiperlipídica (HFD) versus DB, hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* (HFD + LC) versus HFD e HFD + LC versus DB + LC, descritas no item 5.1 de Resultados.

	PADRAO vs DB	DB + LC vs DB	HFD vs DB	HFD + LC vs HFD	HFD + LC vs DB + LC
<b>Δ Peso Corporal</b>	↓	↑	↑	---	↑
<b>Consumo Alimentar</b>	↓	↓	↓	↓	↓
<b>Consumo Calórico</b>	---	↑	↓	↑	↓
<b>Eficiência Energética</b>	---	↑	---	---	↑
<b>Gordura Mesentérica</b>	↓	---	↑	↑	↑
<b>Gordura Retroperitoneal</b>	↓	↑	↑	↑	↑
<b>Gordura Epididimal</b>	---	↑	↑	---	↑
<b>Tecido Adiposo Marrom</b>	↓	↑	↑	↑	---
<b>Fígado/Peso corporal</b>	↑	↑	---	---	---
<b>Coração/Peso corporal</b>	↑	---	---	---	---
<b>AST</b>	---	↑	---	---	---
<b>Glicemia Sérica</b>	↓	---	↑	---	---
<b>Colesterol Total Sérico</b>	↓	↑	↑	---	---
<b>LDL-colesterol Sérico</b>	↓	---	↑	↓	---
<b>Triacilgliceróis Séricos</b>	---	---	---	---	↑
<b>Intolerância à glicose (GTT)</b>	---	↑	↑	↑	↑
<b>Intolerância à insulina (ITT)</b>	↑	---	---	↑	↑
<b>Insulinemia</b>	↑	---	---	↑	↑
<b>HOMA-IR</b>	---	---	---	↑	↑
<b>IL-6</b> (Conteúdo Protéico – Tecido Adiposo Epididimal)	---	---	---	↑	↑
<b>IL-10</b> (Conteúdo Protéico – Tecido Adiposo Epididimal)	---	---	---	↑	↑
<b>TNF-α</b> (Conteúdo Protéico – Tecido Adiposo Epididimal)	---	---	---	↑	---
<b>IL-1β</b> (Conteúdo Protéico – Tecido Adiposo Epididimal)	---	---	---	↑	↑
<b>ICAM-1</b> (Conteúdo Protéico – Tecido Adiposo Epididimal)	---	---	---	↑	---
<b>VCAM-1</b> (Conteúdo Protéico – Tecido Adiposo Epididimal)	↓	---	---	↑	---
<b>Leptina</b> (Conteúdo Protéico – Tecido Adiposo Epididimal)	↓	---	---	↑	↑
<b>F4/80</b> (Expressão Gênica – Tecido Adiposo Epididimal)	---	↑	↑	---	↑
<b>Leptina</b> (Expressão Gênica – Tecido Adiposo Epididimal)	---	↑	↑	---	↓
<b>Adiponectina</b> (Expressão Gênica – Tecido Adiposo Epididimal)	---	---	↓	---	---
<b>TNF-α</b> (Conteúdo Protéico – Aorta Torácica)	---	---	---	↓	---
<b>IL-6</b> (Conteúdo Protéico – Gordura Perivascular)	↑	---	---	---	↓
<b>TNF-α</b> (Conteúdo Protéico – Gordura Perivascular)	---	---	---	---	↓
<b>IL-10</b> (Conteúdo Protéico – Gordura Perivascular)	↓	---	↓	---	↓
<b>ICAM-1</b> (Conteúdo Protéico – Gordura Perivascular)	↑	---	---	---	---
<b>Leptina</b> (Conteúdo Protéico – Gordura Perivascular)	↑	---	---	---	---

Abreviaturas: DB = dieta balanceada; DB + LC = dieta balanceada com oferta de leite condensado *ad libitum*; HFD = dieta hiperlipídica; HFD + LC = dieta hiperlipídica com oferta de leite condensado *ad libitum*; IL = interleucina; TNF-α = fator de necrose tumoral α; ICAM-1 = molécula de adesão intercelular 1.

**Quadro 6.** Interações entre os fatores dieta e leite condensado analisada pelo teste *two-way* ANOVA e descritas no Item 5.1 de Resultados.

	<b>Interação</b>	<b>Fator Dieta</b>	<b>Fator Leite Condensado</b>
<b>Δ Peso Corporal</b>	-----	F(1, 46) = 66,43; p<0,0001	F(1, 46) = 26,31; p<0,0001
<b>Consumo Alimentar</b>	F(1, 92) = 13,68; p = 0,0004	F(1, 92) = 27,12; p<0,0001	F(1, 92) = 80,51; p<0,0001
<b>Consumo Calórico</b>	F(1, 67) = 4,051; p = 0,0482	F(1, 67) = 72,53; p<0,0001	F(1, 67) = 63,39; p<0,0001
<b>Eficiência Energética</b>	-----	F(1, 59) = 31,31; p<0,0001	F(1, 59) = 4,094; p = 0,0476
<b>Gordura Mesentérica</b>	-----	F(1, 46) = 30,06; p<0,0001	F(1, 46) = 10,72; p = 0,002
<b>Gordura Retroperitoneal</b>	-----	F(1, 46) = 96,1; p<0,0001	F(1, 46) = 55,47; p<0,0001
<b>Gordura Epididimal</b>	F(1, 46) = 6,901; p = 0,0117	F(1, 46) = 52,93; p<0,0001	F(1, 46) = 12,31; p = 0,001
<b>Tecido Adiposo Marrom</b>	-----	F(1, 42) = 8,389; p = 0,006	F(1, 42) = 32,25; p<0,0001
<b>Fígado/Peso corporal</b>	F(1, 41) = 6,171; p = 0,0172	-----	-----
<b>Coração/Peso corporal</b>	-----	F(1, 41) = 5,108; p = 0,0295	-----
<b>AST</b>	-----	-----	F(1, 40) = 12,89; p = 0,0009
<b>Glicemia Sérica</b>	F(1, 47) = 5,988; p = 0,0182	F(1, 47) = 21,7; p<0,0001	-----
<b>Colesterol Total Sérico</b>	F(1, 46) = 8,451; p = 0,0056	F(1, 46) = 32,33; p<0,0001	F(1, 46) = 13,41; p = 0,0006
<b>LDL-colesterol Sérico</b>	F(1, 46) = 7,813; p<0,0001	F(1, 46) = 22,41; p = 0,0075	-----
<b>Triacilgliceróis Séricos</b>	-----	F(1, 46) = 5,383; p = 0,0248	-----
<b>Intolerância à glicose (GTT)</b>	-----	F(1, 46) = 25,62; p<0,0001	F(1, 46) = 23,72; p<0,0001
<b>Intolerância à insulina (ITT)</b>	F(1, 47) = 5,536; p<0,0229	-----	F(1, 47) = 15,21; p<0,0003
<b>Insulinemia</b>	-----	F(1, 43) = 13,96; p<0,0005	F(1, 43) = 13,27; p<0,0007
<b>HOMA-IR</b>	-----	F(1, 42) = 14,84; p<0,0004	F(1, 42) = 11,35; p = 0,0016
<b>IL-6</b> (Conteúdo Protéico – Tecido Adiposo Epididimal)	-----	F(1, 17) = 8,662; p = 0,0091	F(1, 17) = 21,44; p = 0,0002
<b>IL-10</b> (Conteúdo Protéico – Tecido Adiposo Epididimal)	F(1, 17) = 12,13; p = 0,0028	-----	F(1, 17) = 10,2; p = 0,0053
<b>TNF-α</b> (Conteúdo Protéico – Tecido Adiposo Epididimal)	-----	-----	F(1, 17) = 9,731; p = 0,0062
<b>IL-1β</b> (Conteúdo Protéico – Tecido Adiposo Epididimal)	-----	F(1, 17) = 10,15; p = 0,0054	F(1, 17) = 11,47; p = 0,0035
<b>ICAM-1</b> (Conteúdo Protéico – Tecido Adiposo Epididimal)	-----	-----	F(1, 18) = 10,61; p = 0,0044
<b>VCAM-1</b> (Conteúdo Protéico – Tecido Adiposo Epididimal)	-----	-----	F(1, 17) = 15,6; p = 0,001
<b>Leptina</b> (Conteúdo Protéico – Tecido Adiposo Epididimal)	F(1, 18) = 9,975; p = 0,0054	F(1, 18) = 21,07; p = 0,0002	F(1, 18) = 33,34; p<0,0001
<b>F4/80</b> (Expressão Gênica – Tecido Adiposo Epididimal)	-----	F(1, 38) = 21,67; p<0,0001	-----
<b>Leptina</b> (Expressão Gênica – Tecido Adiposo Epididimal)	F(1, 23) = 18,99; p = 0,0001	-----	F(1, 23) = 12,95; p = 0,0009
<b>Adiponectina</b> (Expressão Gênica – Tecido Adiposo Epididimal)	-----	F(1, 23) = 10,53; p = 0,0025	-----
<b>TNF-α</b> (Conteúdo Protéico – Aorta Torácica)	-----	-----	F(1, 18) = 11,28; p = 0,0035
<b>IL-6</b> (Conteúdo Protéico – Gordura Perivascular)	-----	-----	F(1, 18) = 11,28; p = 0,0035
<b>TNF-α</b> (Conteúdo Protéico – Gordura Perivascular)	-----	-----	-----
<b>IL-10</b> (Conteúdo Protéico – Gordura Perivascular)	-----	-----	-----
<b>ICAM-1</b> (Conteúdo Protéico – Gordura Perivascular)	-----	-----	-----
<b>Leptina</b> (Conteúdo Protéico – Gordura Perivascular)	-----	-----	-----

Abreviaturas: AST = aspartato aminotransferase (enzima hepática); HOMA-IR = índice de resistência à insulina; IL = interleucina; TNF-α = fator de necrose tumoral α; ICAM-1 = molécula de adesão intercelular 1.

## **6.2 Efeitos da suplementação com óleo de peixe associada às dietas balanceada ou hiperlipídica**

### *6.2.1 Composição lipídica e razão de ácidos graxos n-6/n-3 no fígado e plasma de camundongos C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada*

A suplementação com óleo de peixe por 12 semanas não alterou o ganho de peso, peso dos depósitos de gordura (gorduras mesentérica e epididimal), insulinemia, índice HOMA-IR e os testes de tolerância à glicose e resistência à insulina dos animais alimentados com dieta balanceada (Tabela 3). Entretanto, a suplementação com óleo de peixe associada a dieta balanceada reduziu o LDL-colesterol em 40% e a glicemia em 8,5%, sem alterar os valores de colesterol total, triacilgliceróis e HDL-colesterol (Tabela 3).

A porcentagem de gordura no fígado aumentou (em 65%) com a suplementação (Figura 19A), com diminuição de MUFAs em 17,2% e aumento de AG saturados em 13% e de PUFAs n-3 em 2,5 vezes (Figura 19B).

A suplementação com óleo de peixe não alterou o conteúdo total de lipídeos no plasma dos animais alimentados com dieta balanceada (Figura 19C), mas modificou a quantidade dos ácidos graxos individualmente: reduziu os AG saturados em 12,5%, PUFAs n-6 em 21,8%, AG trans em 14,6% e aumentou os PUFAs em 25% e AGPI n-3 em 3,14 vezes (Figura 19D).

A razão entre PUFAs n-6 e n-3 diminuiu em 64% no fígado e em 75% no soro de animais suplementados com óleo de peixe e alimentados com dieta balanceada (Figuras 19E e 19F, respectivamente).

**Tabela 3.** Parâmetros metabólicos de camundongos C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada (DB) ou hiperlipídica (HFD), suplementados ou não com óleo de peixe (OP).

	DB	DB + OP	HFD	HFD + OP
<b>Ganho de massa corpórea (g)</b>	3,47 ± 0,37	3,42 ± 0,67	12,48 ± 0,9 <sup>a</sup>	9,59 ± 0,58 <sup>b,c</sup>
<b>Ingestão alimentar (g/animal/semana)</b>	25,2 ± 0,7	25,4 ± 0,7	16,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	15,5 ± 0,5 <sup>c</sup>
<b>Consumo calórico (Kcal/animal/semana)</b>	93,9 ± 2,2	95,03 ± 2,4	88,8 ± 2,7	87,6 ± 5,4
<b>Eficiência alimentar (g de peso/Kcal de ração)</b>	0,009 ± 0,009	0,0063 ± 0,0134	0,0746 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,055 ± 0,017 <sup>c</sup>
<b>Gordura epididimal (mg)</b>	0,92 ± 0,11	0,88 ± 0,07	2,47 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,76 ± 0,11 <sup>b,c</sup>
<b>Gordura mesentérica (mg)</b>	0,34 ± 0,02	0,39 ± 0,04	0,86 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,51 ± 0,04 <sup>b</sup>
<b>Gordura retroperitoneal (mg)</b>	0,23 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,91 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,08 <sup>c</sup>
<b>Tecido adiposo marrom (mg)</b>	0,11 ± 0,008	0,11 ± 0,008	0,16 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,008 <sup>b</sup>
<b>Estômago (mg)</b>	0,23 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,22 ± 0,02
<b>Triacilgliceróis (mg/dL)</b>	80,2 ± 5,1	79,8 ± 7,3	67,4 ± 3,7	63,8 ± 2,5 <sup>c</sup>
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	153,1 ± 7,4	146,9 ± 12,8	194,1 ± 11,6 <sup>a</sup>	135,5 ± 10,7 <sup>b</sup>
<b>LDL-Colesterol (mg/dL)</b>	122,3 ± 4,7	73,2 ± 8,5 <sup>a</sup>	156,1 ± 9,8 <sup>a</sup>	99,3 ± 4,3 <sup>b</sup>
<b>HDL-Colesterol (mg/dL)</b>	14,94 ± 0,8	15,68 ± 1,3	15,22 ± 1,14	14,85 ± 0,7
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	183,3 ± 3,53	167,7 ± 6,5 <sup>a</sup>	216,3 ± 5,4 <sup>a</sup>	201,2 ± 3,6 <sup>b,c</sup>
<b>Insulinemia (ng/mL)</b>	0,54 ± 0,01	0,35 ± 0,06	0,93 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,11 <sup>c</sup>
<b>Índice HOMA-IR</b>	5,18 ± 0,6	4,12 ± 1,03	13,12 ± 1,4 <sup>a</sup>	8,7 ± 0,99 <sup>b,c</sup>

Suplementação oral com óleo de peixe rico em AGPI n-3 (2 g/kg de peso corporal, três vezes por semana) ou água, por 12 semanas. Os animais foram alimentados com dieta balanceada ou hiperlipídica a partir da quarta semana. Para o cálculo do consumo calórico (Kcal/semana/animal) foram consideradas as calorias presentes na quantidade de óleo de peixe utilizada na suplementação da semana, conforme informações fornecidas pelo fabricante: 1,804 Kcal/200 mL. Triacilgliceróis, colesterol total, HDL-colesterol, glicemia e insulinemia foram determinados no soro dos animais coletado após 3-4 horas de jejum, no dia do sacrifício dos animais. O LDL-colesterol foi calculado pela equação de Friedewald (1972). O índice HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment – Insulin Resistance*) foi calculado pela fórmula:  $\text{insulina (mU/L)} \times \text{glicemia (mmol/L)} / 22,5$  e indica a resistência à insulina. Os resultados estão apresentados como Média ± EPM (n = 15 – 20). Os dados foram analisados por teste “t” de Student comparando DB vs. HFD, DB vs. DB + OP, HFD vs. HFD + OP e DB + OP vs. HFD + OP (a) p < 0.05 comparado com DB; (b) p < 0.05 comparado com HFD; (c) p < 0.05 comparado com DB + OP.

**Quadro 7.** Composição de ácidos graxos no fígado dos animais alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe, avaliada por cromatografia gasosa e apresentada em g/100g de tecido.

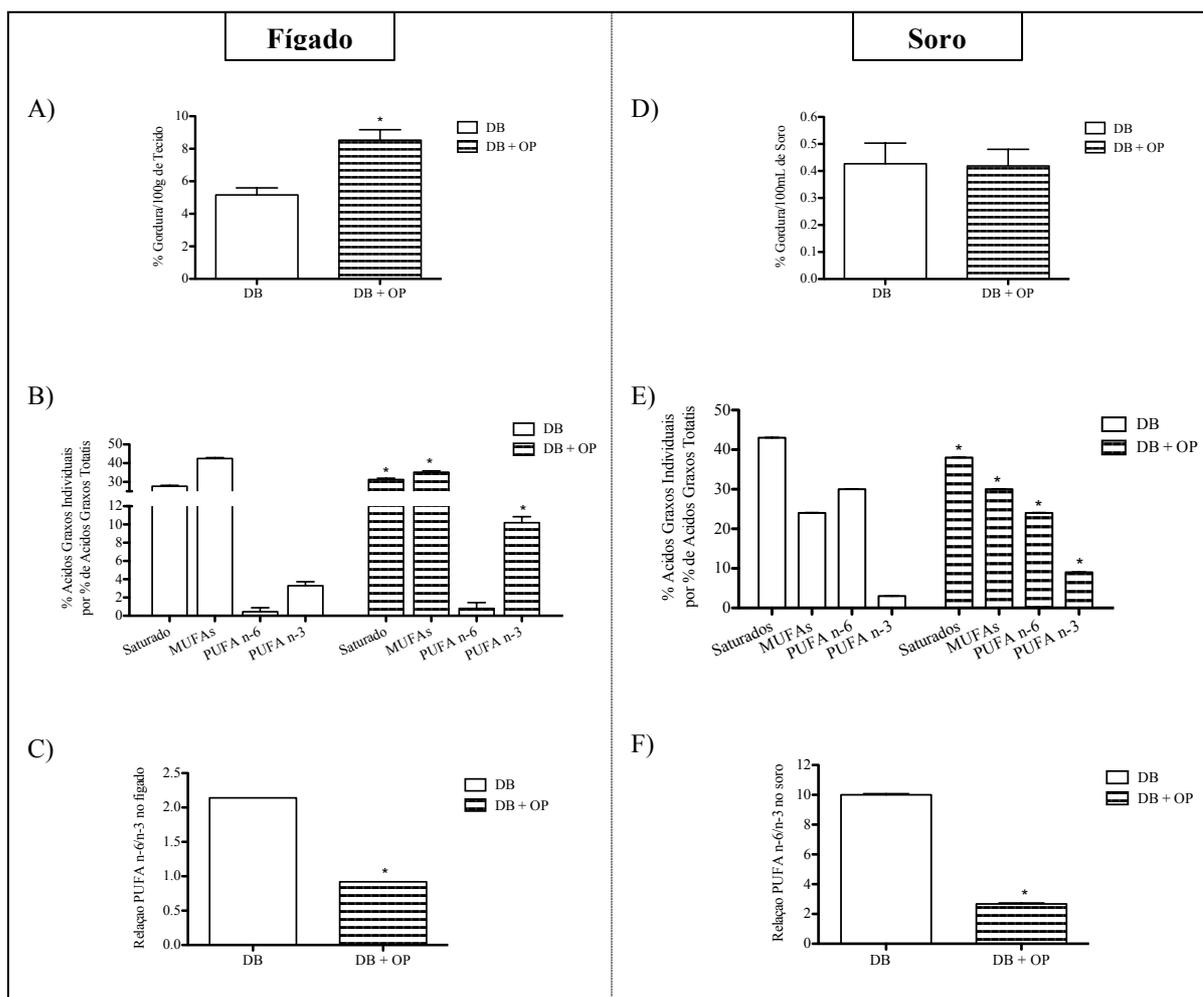
Fórmula	Nome	DB	DB + OP	HFD	HFD + OP
14 : 0	Mirístico	0,027 ± 0,009	0,044 ± 0,015	0,049 ± 0,015	0,040 ± 0,009
16 : 0	<b>Palmitico</b>	<b>1,030 ± 0,289</b>	<b>1,918 ± 0,457</b>	<b>2,591 ± 0,722</b>	<b>2,086 ± 0,457</b>
16 : 1 (n-7)	Hexadecenóico	0,262 ± 0,122	0,397 ± 0,202	0,171 ± 0,074	0,103 ± 0,043
17 : 0	Margárico	—	0,023 ± 0,012	0,033 ± 0,006	0,023 ± 0,012
18 : 0	<b>Estearico</b>	<b>0,339 ± 0,042</b>	<b>0,663 ± 0,056</b>	<b>1,069 ± 0,064</b>	<b>1,076 ± 0,117</b>
18 : 1 (n-9)	<b>Oléico</b>	<b>1,654 ± 0,572</b>	<b>2,257 ± 0,733</b>	<b>3,256 ± 1,157</b>	<b>2,048 ± 0,652</b>
18 : 1 (n-11)	Vacênico	0,241 ± 0,072	0,298 ± 0,086	0,154 ± 0,082	0,123 ± 0,031
18 : 2 (n-6)	<b>Linoléico</b>	<b>0,324 ± 0,157</b>	<b>0,691 ± 0,162</b>	<b>2,435 ± 0,589</b>	<b>1,881 ± 0,402</b>
20 : 0	Eicosanóico	0,008 ± 0,002	0,016 ± 0,005	0,043 ± 0,012	0,029 ± 0,013
18 : 3 (n-6)	γ-Linolênico	0,001 ± 0,102	—	0,056 ± 0,018	0,031 ± 0,016
20 : 1 (n-9)	Eicosenóico	0,036 ± 0,017	0,048 ± 0,013	0,074 ± 0,026	0,040 ± 0,020
18 : 3 (n-3)	α-Linolênico	0,024 ± 0,014	0,025 ± 0,010	0,064 ± 0,021	0,044 ± 0,016
20 : 2 (n-6)	Eicosadienóico	0,014 ± 0,003	0,022 ± 0,019	0,048 ± 0,014	0,038 ± 0,009
22 : 0	Docosanóico	0,027 ± 0,007	0,029 ± 0,015	0,047 ± 0,010	0,043 ± 0,024
20 : 3 (n-6)	Eicosatrienóico	0,053 ± 0,016	0,078 ± 0,017	0,097 ± 0,025	0,073 ± 0,023
20 : 4 (n-6)	<b>Araquidônico</b>	<b>0,445 ± 0,108</b>	<b>0,532 ± 0,089</b>	<b>1,136 ± 0,098</b>	<b>0,927 ± 0,148</b>
20 : 5 (n-3)	<b>Eicosapentaenóico</b>	<b>0,012 ± 0,002</b>	<b>0,133 ± 0,078</b>	<b>0,020 ± 0,014</b>	<b>0,060 ± 0,046</b>
24 : 1 (n-9)	Nervônico	—	—	0,046 ± 0,029	0,023 ± 0,007
22 : 5 (n-6)	Docosapentaenóico	0,055 ± 0,027	0,009 ± 0,008	0,055 ± 0,027	0,009 ± 0,008
22 : 5 (n-3)	Docosapentaenóico	0,047 ± 0,016	0,071 ± 0,049	0,047 ± 0,016	0,059 ± 0,024
22 : 6 (n-3)	<b>Docosa-hexaenóico</b>	<b>0,126 ± 0,016</b>	<b>0,637 ± 0,119</b>	<b>0,480 ± 0,061</b>	<b>0,637 ± 0,099</b>
Totais	<b>Saturados</b>	1,431 ± 0,281	2,670 ± 0,453	3,839 ± 0,792	3,336 ± 0,525
	<b>Monoinsaturados</b>	2,193 ± 0,767	2,999 ± 0,988	3,712 ± 1,306	2,349 ± 0,743
	<b>Polinsaturados</b>	1,075 ± 0,098	2,193 ± 0,290	4,443 ± 0,711	3,760 ± 0,561
	<b>ω-3</b>	0,168 ± 0,021	0,869 ± 0,232	0,616 ± 0,067	0,800 ± 0,158
<b>% gordura</b>		<b>5,166 ± 1,148</b>	<b>8,531 ± 1,703</b>	<b>12,698 ± 2,912</b>	<b>9,999 ± 1,867</b>

\* Os ácidos graxos e seus respectivos valores em negrito são os mais abundantes ou que apresentaram maior alteração pelo tratamento. Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média. DB = dieta balanceada (n = 7); DB + OP = dieta balanceada e suplementação com óleo de peixe (n = 7); HFD = dieta hiperlipídica (n = 8); HFD + OP = dieta hiperlipídica e suplementação com óleo de peixe (n = 8).

**Quadro 8.** Composição de ácidos graxos no soro dos animais alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe, avaliados por cromatografia gasosa e apresentada em g/100 mL de soro.

Fórmula	Nome	DB	DB + OP	HFD	HFD + OP
12 : 0	Laurico	0,005 ± 0,003	0,003 ± 0,003	0,003 ± 0,003	0,004 ± 0,004
14 : 0	Mirístico	0,006 ± 0,003	0,006 ± 0,002	0,05 ± 0,002	0,003 ± 0,003
16 : 0	<b>Palmítico</b>	<b>0,099 ± 0,038</b>	<b>0,097 ± 0,019</b>	<b>0,104 ± 0,006</b>	<b>0,092 ± 0,007</b>
16 : 1 (n-7)	Hexadecenóico	0,013 ± 0,003	0,018 ± 0,004	0,005 ± 0,001	0,005 ± 0,001
17 : 0	Margárico	0,002 ± 0,002	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001
18 : 0	<b>Esteárico</b>	<b>0,071 ± 0,036</b>	<b>0,051 ± 0,023</b>	<b>0,081 ± 0,010</b>	<b>0,068 ± 0,011</b>
18 : 1 (n-9)	<b>Oléico</b>	<b>0,075 ± 0,023</b>	<b>0,095 ± 0,030</b>	<b>0,064 ± 0,021</b>	<b>0,057 ± 0,015</b>
18 : 1 (n-11)	Vacênico	0,012 ± 0,010	0,010 ± 0,011	0,005 ± 0,003	0,004 ± 0,002
18 : 2 (n-6)	<b>Linoléico</b>	<b>0,078 ± 0,035</b>	<b>0,075 ± 0,021</b>	<b>0,131 ± 0,043</b>	<b>0,144 ± 0,031</b>
20 : 0	Eicosanóico	—	—	0,001 ± 0,002	0,001 ± 0,001
18 : 3 (n-6)	γ-Linolênico	—	—	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001
18 : 3 (n-3)	α-Linolênico	0,001 ± 0,002	0,003 ± 0,001	0,002 ± 0,002	0,002 ± 0,001
22 : 0	Docosanóico	0,001 ± 0,001	—	0,001 ± 0,002	0,001 ± 0,002
20 : 3 (n-6)	Eicosatrienóico	0,005 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,005 ± 0,002	0,006 ± 0,001
20 : 4 (n-6)	<b>Araquidônico</b>	<b>0,045 ± 0,009</b>	<b>0,020 ± 0,005</b>	<b>0,093 ± 0,034</b>	<b>0,083 ± 0,013</b>
20 : 5 (n-3)	<b>Eicosapentaenóico</b>	<b>0,001 ± 0,001</b>	<b>0,011 ± 0,005</b>	<b>0,003 ± 0,002</b>	<b>0,003 ± 0,001</b>
24 : 1 (n-9)	Nervônico	0,002 ± 0,000	0,002 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,002 ± 0,001
22 : 5 (n-6)	Docosapentaenóico	0,001 ± 0,002	0,001 ± 0,002	0,001 ± 0,001	—
22 : 5 (n-3)	Docosapentaenóico	0,001 ± 0,002	0,005 ± 0,004	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001
22 : 6 (n-3)	<b>Docosa-hexaenóico</b>	<b>0,009 ± 0,002</b>	<b>0,018 ± 0,004</b>	<b>0,019 ± 0,005</b>	<b>0,025 ± 0,005</b>
Totais	<b>Saturados</b>	0,185 ± 0,082	0,157 ± 0,044	0,199 ± 0,019	0,172 ± 0,027
	<b>Monoinsaturados</b>	0,102 ± 0,029	0,124 ± 0,039	0,075 ± 0,023	0,068 ± 0,017
	<b>Polinsaturados</b>	0,143 ± 0,041	0,139 ± 0,034	0,255 ± 0,075	0,265 ± 0,039
	<b>ω-3</b>	0,013 ± 0,004	0,038 ± 0,010	0,025 ± 0,005	0,031 ± 0,006
<b>% gordura</b>		<b>0,462 ± 0,124</b>	<b>0,450 ± 0,109</b>	<b>0,558 ± 0,101</b>	<b>0,531 ± 0,049</b>

\* Os ácidos graxos e seus respectivos valores em negrito são os mais abundantes ou que apresentaram maior alteração pelo tratamento. Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média. DB = dieta balanceada (n = 5); DB + OP = dieta balanceada e suplementação com óleo de peixe (n = 5); HFD = dieta hiperlipídica (n = 5); HFD + OP = dieta hiperlipídica e suplementação com óleo de peixe (n = 5).

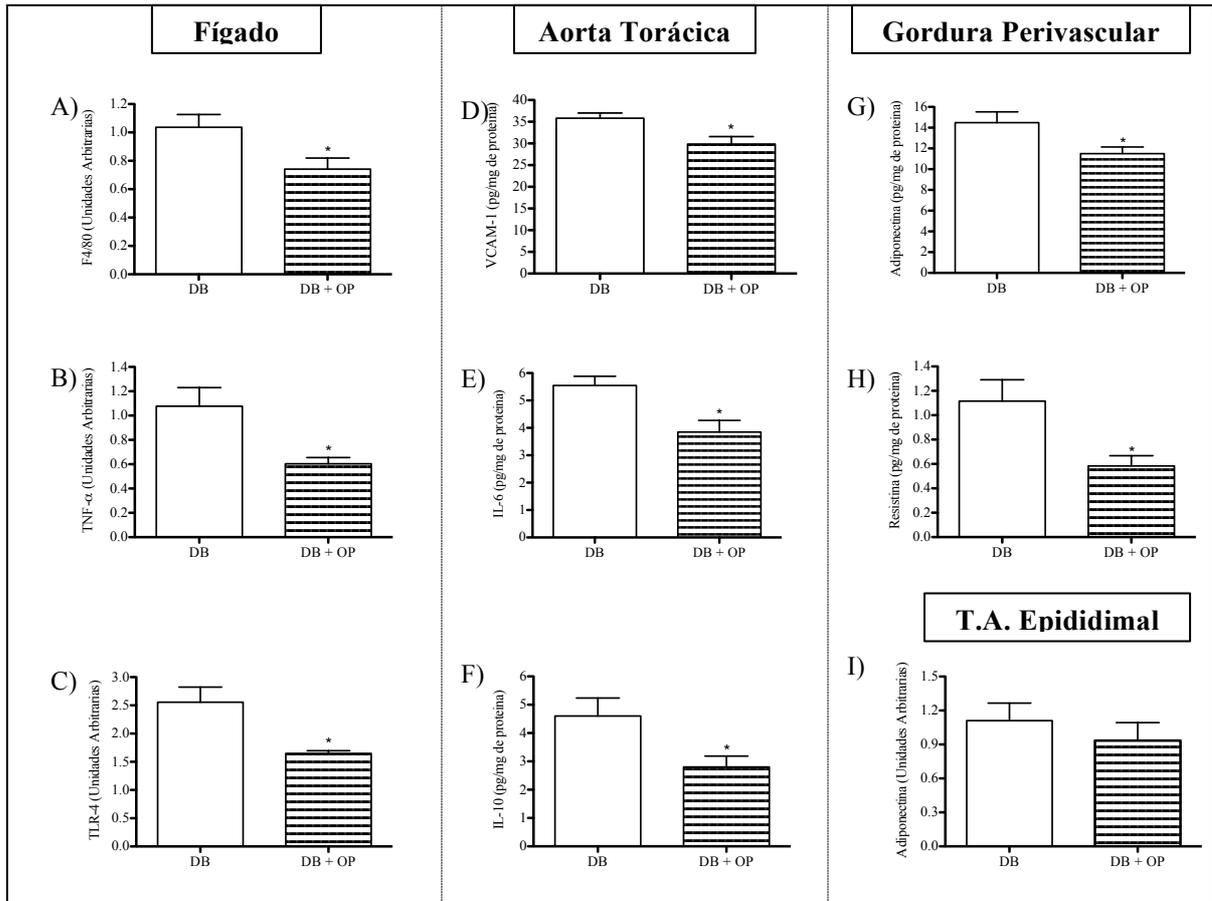


**Figura 19. Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre a composição de ácidos graxos no fígado e soro dos animais C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada.** Os lipídios totais foram extraídos de amostras de tecido hepático (aproximadamente 50 mg) (A e B) e soro (aproximadamente 100  $\mu$ L) (D e E). Os AG foram metilados e a composição desses determinada por cromatografia gasosa como descrito em Materiais e Métodos. Os gráficos C e F foram obtidos da razão entre as porcentagens de PUFAs n-6 e n-3 no fígado e no soro, respectivamente. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 7$  para avaliação do fígado e  $n = 5$  para avaliação do plasma). O teste “t” de Student foi utilizado para análise estatística. DB = dieta balanceada; DB + OP = dieta balanceada e suplementação com óleo de peixe. \*  $p < 0.05$  vs DB. MUFAs = ácidos graxos monoinsaturados; PUFAs = ácidos graxos poliinsaturados.

### *6.2.2 Conteúdo dos marcadores inflamatórios no fígado, aorta torácica e tecido adiposo perivascular de animais C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada*

Os animais suplementados com óleo de peixe e alimentados com dieta balanceada apresentaram redução na expressão de RNA mensageiro dos genes F4/80 (28%), TNF- $\alpha$  (44%) e TLR-4 (35,5%) no fígado comparado ao grupo DB (Figuras 20A, 20B e 20C, respectivamente).

A aorta torácica dos animais suplementados com óleo de peixe também apresentou redução nos conteúdos de VCAM-1 (em 17%), IL-6 (em 31%) e IL-10 (em 39%) em relação ao grupo DB (Figuras 20D, 20E e 20F, respectivamente). O tecido adiposo perivascular da aorta torácica do grupo DB + OP apresentou diminuição dos conteúdos de adiponectina (em 21%) e de resistina (em 48%) comparado aos animais que receberam apenas dieta balanceada (Figuras 20G e 20H, respectivamente).



**Figura 20.** Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre as proteínas inflamatórias no fígado, aorta torácica, gordura perivascular e tecido adiposo epididimal de animais C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada. O fígado dos animais foi triturado e aproximadamente 20 mg utilizados para extração de RNA mensageiro. Os conteúdos de RNA mensageiro dos genes F4/80 (A), TNF- $\alpha$  (B) e TLR-4 (C) no fígado e adiponectina (I) no tecido adiposo epididimal foram determinados por RT-PCR. A aorta torácica e a gordura perivascular da aorta foram homogeneizadas em tampão fosfato-salina contendo inibidor de protease e o sobrenadante utilizado para ensaio colorimétrico de ELISA. VCAM-1 (D), IL-6 (E) e IL-10 (F) foram avaliadas na aorta torácica e adiponectina (G) e resistina (H) na gordura perivascular da aorta. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (n = 5-10). O teste “t” de Student foi utilizado para análise estatística. DB = dieta balanceada; DB + OP = dieta balanceada e suplementação com óleo de peixe. \* p<0.05 vs DB.

### 6.2.3 *Massa corpórea, sensibilidade à insulina, composição de ácidos graxos e a razão de ácidos graxos n-6/n-3 no fígado e plasma de animais C57Bl/6J alimentados com dieta hiperlipídica*

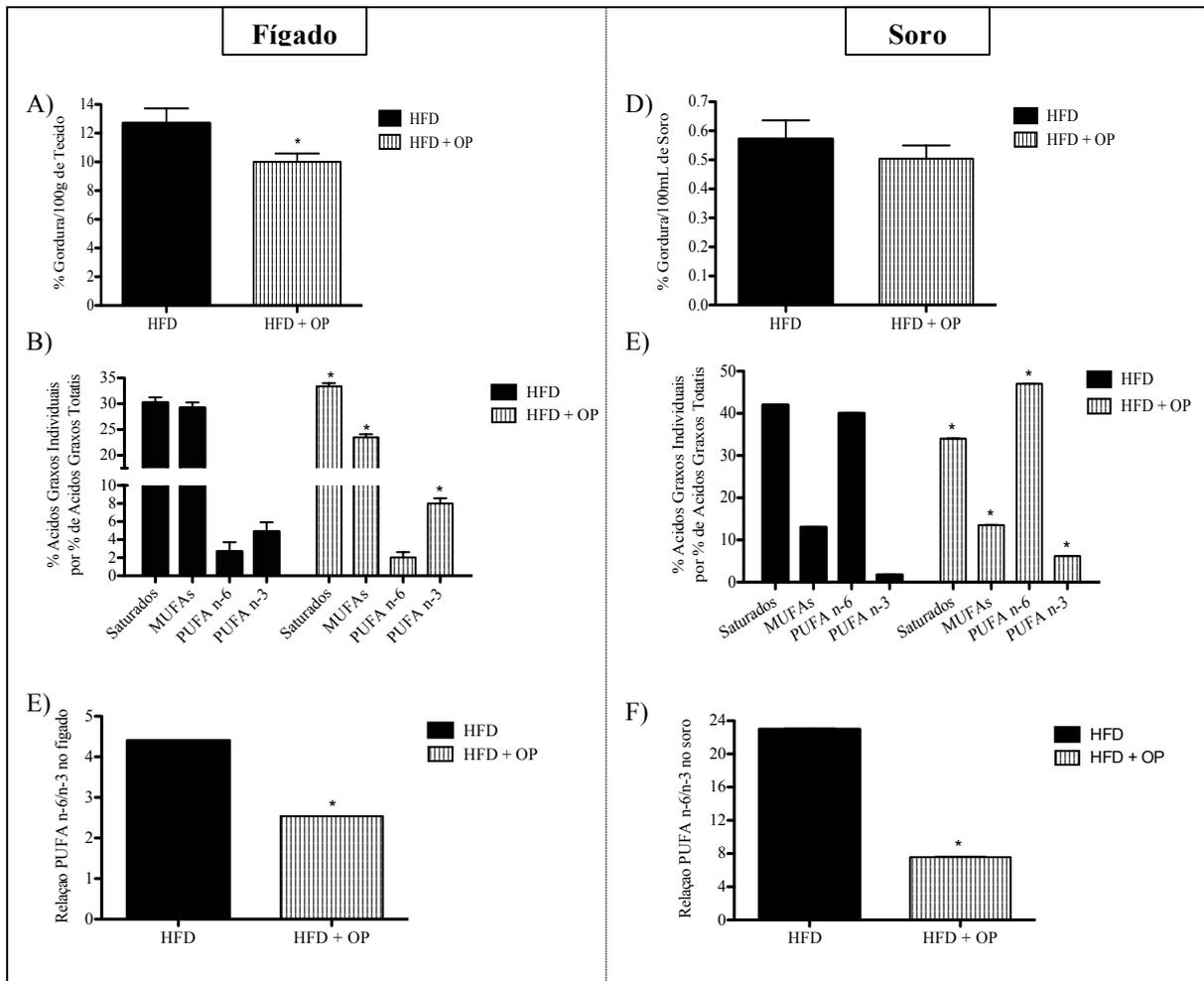
A suplementação com óleo de peixe por 12 semanas reduziu o ganho de peso nos animais alimentados por 8 semanas com dieta hiperlipídica em 23%, a gordura mesentérica em 41% e a gordura epididimal em 29% (Tabela 3).

Os valores de colesterol total e LDL-colesterol no plasma dos animais alimentados com dieta hiperlipídica foram reduzidos pela suplementação com óleo de peixe em 30% e 36%, respectivamente (Tabela 3). A suplementação com óleo de peixe também reduziu a glicemia em 7%, sem alterar a insulina plasmática, resultando em diminuição significativa do índice HOMA-IR em 38% (Tabela 3).

A suplementação com óleo de peixe associada à dieta hiperlipídica reduziu a porcentagem de gordura total no fígado em 21% (Figura 21A) com alteração nos conteúdos individuais de ácidos graxos: redução de MUFAs em 20%, aumento de AG saturados em 10,5% e PUFAs n-3 em 63% (Figura 21B) comparado com o grupo HFD.

O conteúdo de lipídeos totais no soro dos animais alimentados com dieta hiperlipídica não foi alterado pela suplementação com óleo de peixe (Figura 21C) mas a quantidade de AG individuais foram modificadas: houve diminuição de AG saturados em 12,5%, de AGPI n-6 em 21,8%, de AG *trans* em 14,6% e aumento de MUFAs em 4% e de PUFAs n-3 em 3,1 vezes (Figura 21D).

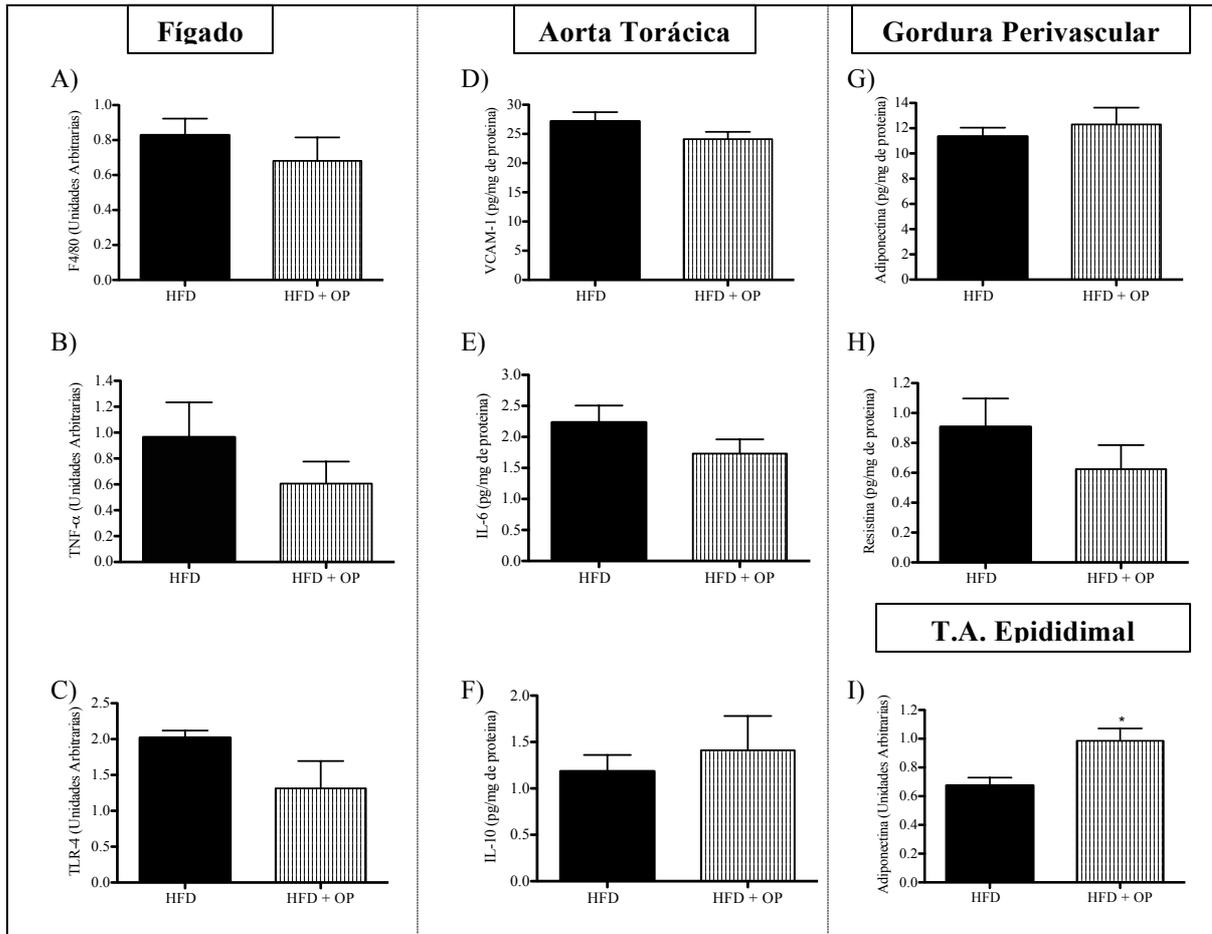
A razão entre PUFAs n-6 e n-3 no fígado e no soro dos animais suplementados com óleo de peixe e alimentados com dieta hiperlipídica foi reduzida em 42% e 18%, respectivamente (Figuras 21E e 21F, respectivamente) em relação ao grupo HFD.



**Figura 21.** Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre a composição de ácidos graxos no fígado e soro de animais C57Bl/6J alimentados com dieta hiperlipídica. Os lipídios totais foram extraídos de amostras de tecido hepático (aproximadamente 50 mg) (A e B) e soro (aproximadamente 100  $\mu$ L) (C e D). Os AG foram metilados e a composição desses determinada por cromatografia gasosa como descrito em Materiais e Métodos. Os gráficos E e F foram obtidos da razão entre a porcentagem de PUFAs n-6 e n-3 no fígado e soro, respectivamente. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. O teste “t” de Student foi utilizado para análise estatística. HFD = dieta hiperlipídica (n = 8 para avaliação do fígado e n = 5 para avaliação do plasma); HFD + OP = dieta hiperlipídica e suplementação com óleo de peixe (n = 10 para avaliação do fígado e n = 5 para avaliação do plasma). \* p < 0.05 vs HFD. MUFAs = ácidos graxos monoinsaturados; PUFAs = ácidos graxos poliinsaturados.

#### *6.2.4 Marcadores inflamatórios no fígado, aorta torácica e tecido adiposo perivascular, e adiponectina no tecido adiposo epididimal de animais C57Bl/6J alimentados com dieta hiperlipídica*

A suplementação com óleo de peixe associada à dieta hiperlipídica não alterou a expressão de RNA mensageiro de genes inflamatórios no fígado (Figuras 22A, 22B e 22C) e o conteúdo de proteínas inflamatórias na aorta torácica (Figuras 22D, 22E e 22F) e no tecido adiposo perivascular (Figuras 22G e 22H). Entretanto, doze semanas de suplementação com óleo de peixe aumentou a expressão do gene da adiponectina em 46% no tecido adiposo epididimal dos animais alimentados com dieta hiperlipídica em relação aqueles que não receberam suplementação (Figura 22I).

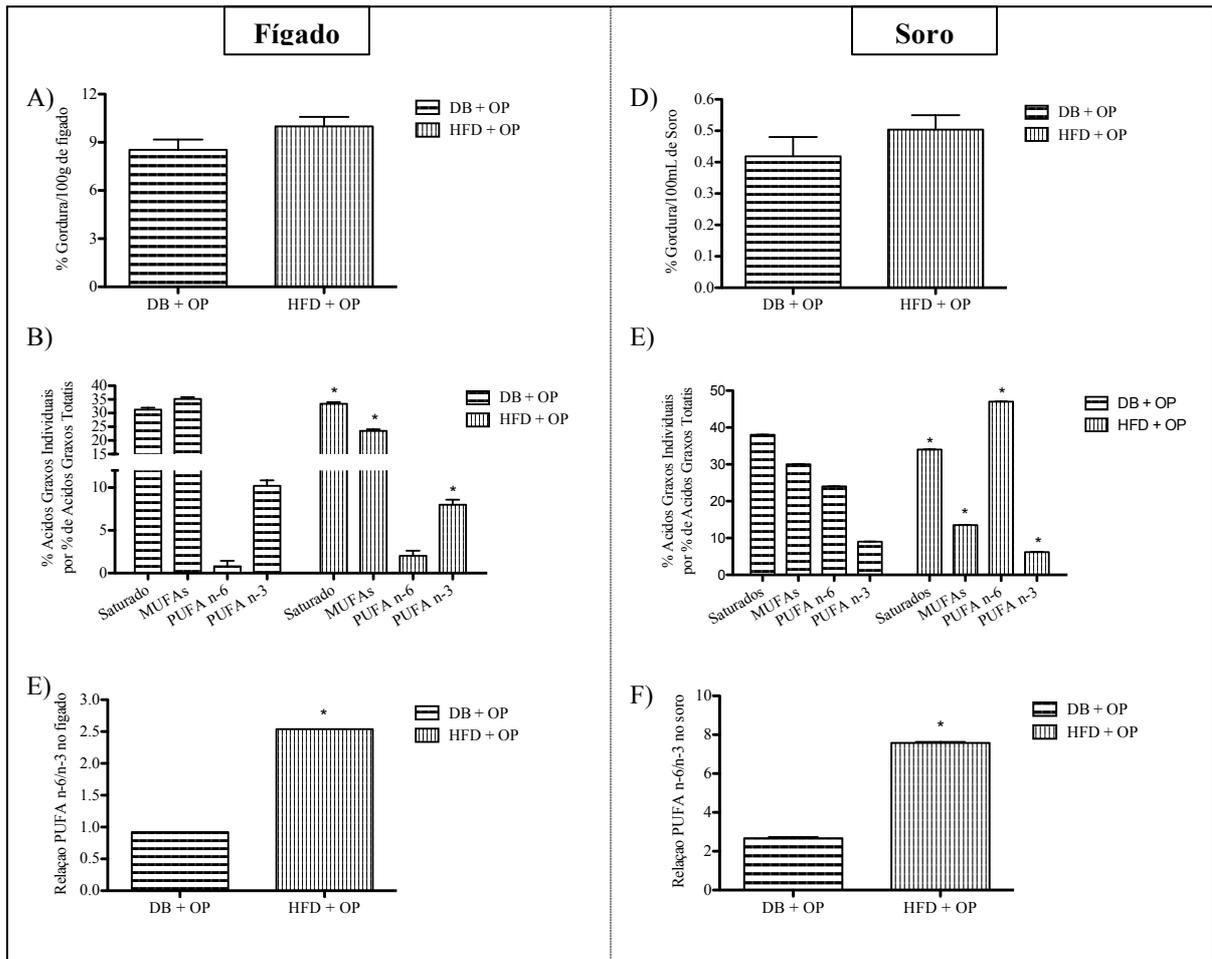


**Figura 22.** Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre as proteínas inflamatórias no fígado, aorta torácica, gordura perivascular e tecido adiposo epididimal de animais C57Bl/6J alimentados com dieta hiperlipídica. O fígado dos animais foi triturado e aproximadamente 20 mg utilizados para a extração de RNA mensageiro. Os conteúdos de RNA mensageiro dos genes F4/80 (A), TNF- $\alpha$  (B) e TLR-4 (C) no fígado e adiponectina (I) no tecido adiposo epididimal foram determinados por RT-PCR. A aorta torácica e a gordura perivascular da aorta foram homogeneizadas em tampão fosfato-salina contendo inibidor de protease e o sobrenadante foi utilizado para ensaio colorimétrico de ELISA. VCAM-1 (D), IL-6 (E) e IL-10 (F) foram avaliadas na aorta torácica e adiponectina (G) e resistina (H) na gordura perivascular da aorta. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (n = 5-10). O teste “t” de Student foi utilizado para análise estatística. HFD = dieta hiperlipídica; HFD + OP = dieta hiperlipídica e suplementação com óleo de peixe. \* p<0.05 vs HFD.

### *6.2.5 Massa corpórea, sensibilidade à insulina, composição de ácidos graxos e a razão de ácidos graxos n-6/n-3 no fígado e plasma de animais C57Bl/6J alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica*

A suplementação com óleo de peixe não aumentou o conteúdo total de lipídeos no fígado e no soro de animais alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica (Figuras 23A e 23D), mas alterou a quantidade individual dos ácidos graxos. No tecido hepático, a suplementação com óleo de peixe associada a dieta hiperlipídica levou ao aumento dos AG saturados (em 6,7%) e redução dos AG monoinsaturados (em 33%) e PUFAs n-3 (em 22%), em relação ao grupo DB + OP (Figura 23B). No soro, a suplementação com óleo de peixe reduziu os AG saturados (em 11%), MUFAs (em 55%) e PUFAs n-3 (em 31%) e aumentou os PUFAs n-6 (em 2 vezes) no grupo HFD + OP comparado ao DB + OP (Figura 23E).

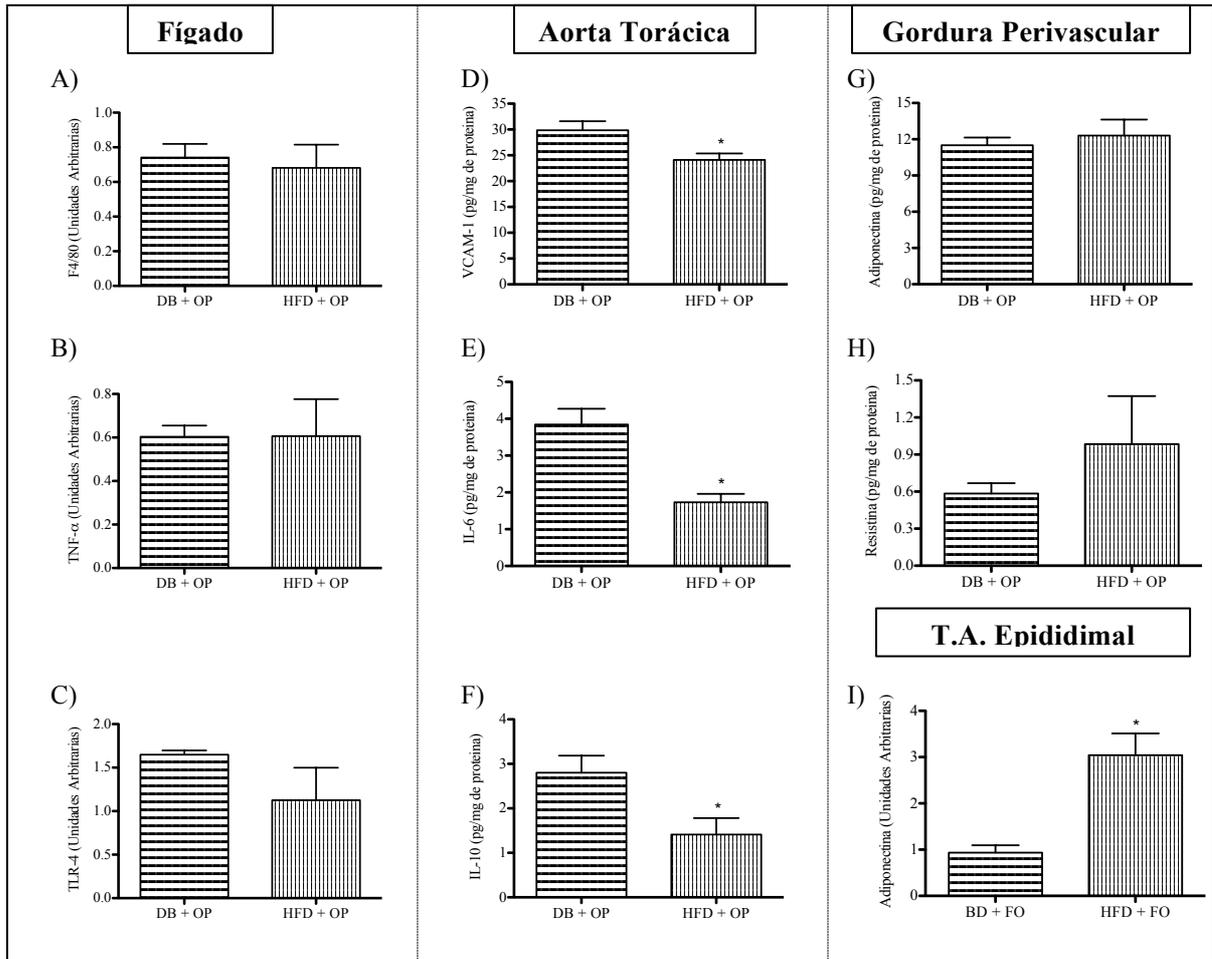
A razão entre os PUFAs n-6 e n-3, indicativo de proteção cardiovascular quando reduzida, aumentou em 2,8 vezes quando a suplementação com óleo de peixe foi associada à dieta hiperlipídica em relação à dieta balanceada (Figuras 23C e 23F).



**Figura 23.** Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre a composição de ácidos graxos no fígado e soro de animais C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada ou hiperlipídica. Os lipídios totais foram extraídos de amostras de tecido hepático (aproximadamente 50 mg) (A e B) e soro (aproximadamente 100  $\mu$ L) (C e D). Os AG foram metilados e a composição desses determinada por cromatografia gasosa como descrito em Materiais e Métodos. Os gráficos E e F foram obtidos da razão entre a porcentagem de PUFAs n-6 e n-3 no fígado e soro, respectivamente. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. O teste “t” de Student foi utilizado para análise estatística. DB + OP = dieta balanceada e suplementação com óleo de peixe (n = 7 para avaliação do fígado e n = 5 para avaliação do plasma); HFD + OP = dieta hiperlipídica e suplementação com óleo de peixe (n = 10 para avaliação do fígado e n = 5 para avaliação do plasma). \* p<0.05 vs DB + OP. MUFAs = ácidos graxos monoinsaturados; PUFAs = ácidos graxos poliinsaturados.

*6.2.6 Marcadores inflamatórios no fígado e tecido adiposo perivascular, conteúdos de VCAM-1, IL-6 e IL-10 na aorta torácica e expressão de RNA mensageiro de adiponectina no tecido adiposo epididimal de animais C57Bl/6J alimentados com dieta hiperlipídica*

A suplementação com óleo de peixe associada à dieta hiperlipídica não alterou o conteúdo de RNA mensageiro de F4/80, TNF- $\alpha$  e TLR-4 no fígado (Figuras 24A, 24B e 24C, respectivamente) e o conteúdo protéico de adiponectina e resistina na gordura perivascular (Figuras 24G e 24H, respectivamente) em relação ao grupo DB + OP. Em relação aos animais que receberam dieta balanceada durante a suplementação com óleo de peixe, o grupo HFD + OP apresentou redução no conteúdo protéico de VCAM-1 (em 19%), IL-6 (em 55%) e IL-10 (em 50%) na aorta torácica (Figuras 24D, 24E e 24F, respectivamente) e aumento de 3,3 vezes na expressão do RNA mensageiro de adiponectina no tecido adiposo epididimal (Figura 24I).



**Figura 24.** Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre as proteínas inflamatórias no fígado, aorta torácica, gordura perivascular e tecido adiposo epididimal de animais C57Bl/6J alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica. O fígado dos animais foi triturado e aproximadamente 20 mg utilizados para a extração de RNA mensageiro. Os conteúdos de RNA mensageiro dos genes F4/80 (A), TNF- $\alpha$  (B) e TLR-4 (C) no fígado e adiponectina (I) no tecido adiposo epididimal foram determinados por RT-PCR. A aorta torácica e a gordura perivascular da aorta foram homogeneizadas em tampão fosfato-salina contendo inibidor de protease e o sobrenadante foi utilizado para ensaio colorimétrico de ELISA. VCAM-1 (D), IL-6 (E) e IL-10 (F) foram avaliadas na aorta torácica e adiponectina (G) e resistina (H) na gordura perivascular da aorta. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (n = 5-10). O teste “t” de Student foi utilizado para análise estatística. DB + OP = dieta balanceada e suplementação com óleo de peixe; HFD + OP = dieta hiperlipídica e suplementação com óleo de peixe. \*  $p < 0.05$  vs DB + OP.

**Quadro 9.** Resumo as relações entre dieta balanceada e suplementação com óleo de peixe (DB + OP) versus dieta balanceada (DB), hiperlipídica e suplementação com óleo de peixe (HFD + OP) versus hiperlipídica (HFD) e HFD + OP versus DB + OP, descritas no item 5.2 de Resultados.

	DB + OP vs DB	HFD + OP vs HFD	HFD + OP vs DB + OP
<b>Δ Peso Corporal</b>	----	↓	↑
<b>Ingestão Alimentar</b>	----	----	↓
<b>Consumo Calórico</b>	----	----	----
<b>Eficiência Alimentar</b>	----	----	↑
<b>Gordura Mesentérica</b>	----	↓	----
<b>Gordura Epididimal</b>	----	↓	↑
<b>Gordura Retroperitoneal</b>	----	----	↑
<b>Tecido Adiposo Marrom</b>	----	↓	----
<b>Triacilgliceróis</b>	----	----	↓
<b>Colesterol Total</b>	----	↓	----
<b>LDL-colesterol</b>	↓	↓	----
<b>HDL-colesterol</b>	----	----	----
<b>Glicemia</b>	↓	↓	↑
<b>Insulinemia</b>	----	----	↑
<b>HOMA-IR</b>	----	↓	↑
<b>% Gordura no Fígado</b>	↑	↓	----
<b>AG Saturados - Fígado</b>	↑	↑	↑
<b>MUFAs - Fígado</b>	↓	↓	↓
<b>PUFAs n-6 - Fígado</b>	----	----	----
<b>PUFAs n-3 - Fígado</b>	↑	↑	↓
<b>% Gordura no Plasma</b>	----	----	----
<b>AG Saturados - Plasma</b>	↓	↓	↓
<b>MUFAs - Plasma</b>	↑	↑	↓
<b>PUFAs n-6 - Plasma</b>	↓	↑	↑
<b>PUFAs n-3 - Plasma</b>	↑	↑	↓
<b>n-6/n-3 - Fígado</b>	↓	↓	↑
<b>n-6/n-3 - Plasma</b>	↓	↓	↑
<b>F4/80 (Expressão gênica hepática)</b>	↓	----	----
<b>TNF-α (Expressão gênica hepática)</b>	↓	----	----
<b>TLR-4 (Expressão gênica hepática)</b>	↓	----	----
<b>VCAM-1 (Conteúdo protéico – aorta torácica)</b>	↓	----	↓
<b>IL-6 (Conteúdo protéico – aorta torácica)</b>	↓	----	↓
<b>IL-10 (Conteúdo protéico – aorta torácica)</b>	↓	----	↓
<b>Adiponectina (Conteúdo protéico – gordura perivascular)</b>	↓	----	----
<b>Resistina (Conteúdo protéico – gordura perivascular)</b>	↓	----	----
<b>Adiponectina (Expressão gênica no tecido adiposo epididimal)</b>	----	↑	↑

Abreviaturas: DB = dieta balanceada; DB + OP = dieta balanceada e suplementação com óleo de peixe; HFD = dieta hiperlipídica; HFD + OP = dieta hiperlipídica e suplementação com óleo de peixe; HOMA-IR = índice de resistência à insulina; AG = ácidos graxos; MUFAs = ácidos graxos monoinsaturados; PUFAs = ácidos graxos poliinsaturados; IL = interleucina; TNF-α = fator de necrose tumoral α; VCAM-1 = molécula de adesão vascular 1.

### 6.3 Participação do receptor TLR-4 nos efeitos da suplementação com óleo de peixe em animais C57Bl/6J alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica

#### 6.3.1 Massa corpórea e depósitos de gordura em animais knockouts para a proteína TLR-4 suplementados com óleo de peixe e alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica em relação aos camundongos C57Bl/6J

Na Tabela 2 estão descritas as principais características dos animais TLR-4<sup>-/-</sup> suplementados ou não com óleo de peixe e alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica. Os resultados com diferenças significativas entre os grupos TLR-4<sup>-/-</sup> DB, TLR-4<sup>-/-</sup> DB + OP, TLR-4<sup>-/-</sup> HFD e TLR-4<sup>-/-</sup> HFD + OP estão apresentados na Tabela 2, mas o objetivo foi comparar os efeitos dos tratamentos nos animais *knockouts* em relação aos animais C57Bl/6J que está demonstrado nas Figuras 25 à 27.

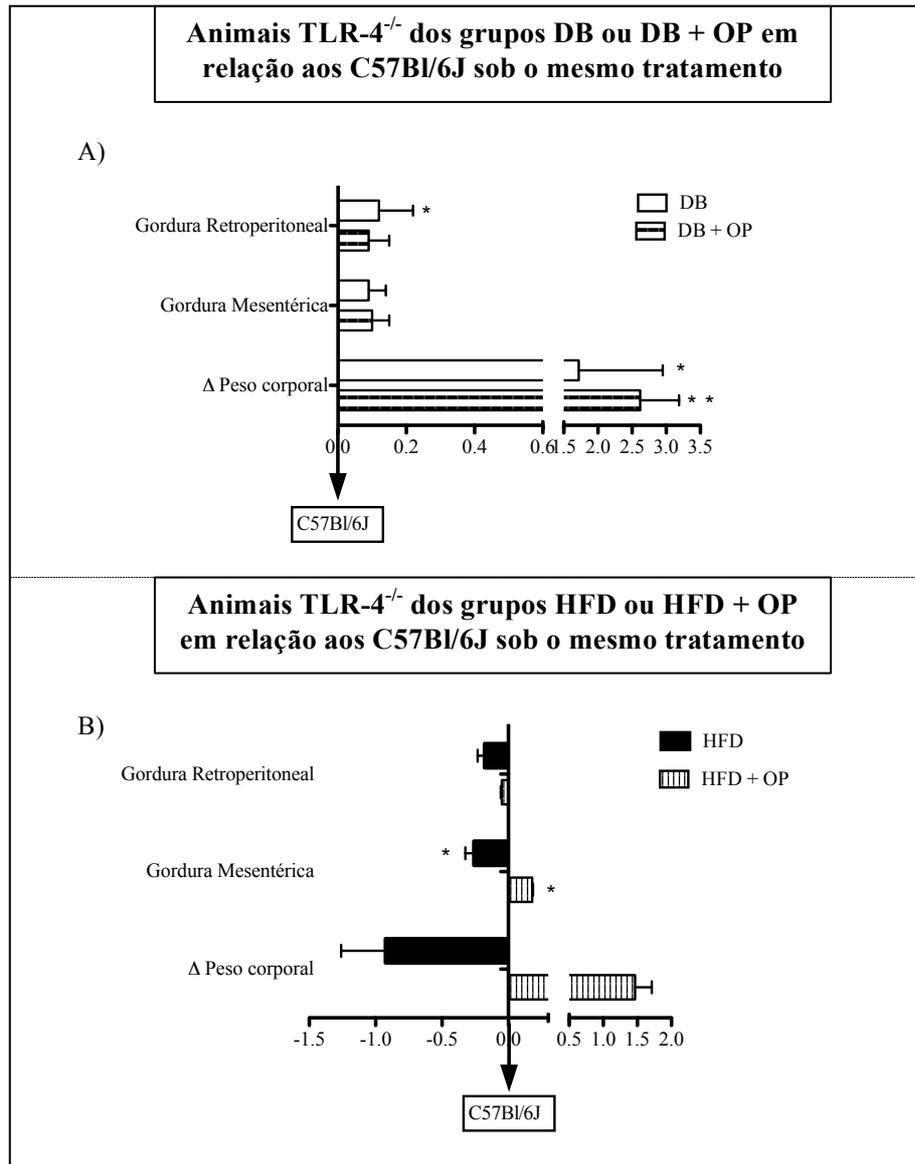
Os animais *knockouts* para a proteína TLR-4 suplementados ou não com óleo de peixe e alimentados com dieta balanceada apresentaram aumento de 1,5 e 1,8 vezes, respectivamente, na massa corpórea (massa corpórea final – massa corpórea inicial) em relação aos animais C57Bl/6J com receptor íntegro (Figura 25A). Os pesos dos depósitos de gordura retroperitoneal e mesentérica não foram estatisticamente diferentes (Figura 25A).

A deleção do receptor TLR-4 atenuou a obesidade induzida pela dieta hiperlipídica, reduzindo o peso do depósito de gordura mesentérica em 31% (Figura 25B). Entretanto, a suplementação com óleo de peixe aumentou o peso do depósito de gordura mesentérica nos animais *knockouts* em relação aos animais com receptor íntegro (Figura 25B) em 36%, resultado contrário ao observado nos animais C57Bl/6J descritos na Tabela 3.

**Tabela 4.** Parâmetros metabólicos de camundongos *knockouts* para a proteína TLR-4 alimentados com dieta balanceada (DB) ou hiperlipídica (HFD), suplementados ou não com óleo de peixe (OP). balanceada (DB) ou hiperlipídica (HFD), suplementados ou não com óleo de peixe (OP).

	TLR-4 <sup>-/-</sup> DB	TLR-4 <sup>-/-</sup> DB + OP	TLR-4 <sup>-/-</sup> HFD	TLR-4 <sup>-/-</sup> HFD + OP
<b>Ganho de massa corpórea (g)</b>	5,2 ± 0,6	6,04 ± 0,5	11,6 ± 0,65 <sup>a</sup>	11,06 ± 0,8 <sup>c</sup>
<b>Média de ingestão alimentar (g)</b>	27,4 ± 0,6	26,4 ± 0,5	15,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	15,8 ± 0,3 <sup>c</sup>
<b>Consumo calórico (Kcal/semana/animal)</b>	104,2 ± 2,1	99,1 ± 1,7	83,1 ± 1,8 <sup>a</sup>	87,9 ± 5,1 <sup>c</sup>
<b>Eficiência alimentar (g de peso/Kcal de ração)</b>	0,004 ± 0,003	0,002 ± 0,002	0,02 ± 0,004 <sup>a</sup>	-0,001 ± 0,002 <sup>c</sup>
<b>Gordura epididimal (mg)</b>	0,93 ± 0,1	0,91 ± 0,08	1,89 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,74 ± 0,15 <sup>c</sup>
<b>Gordura mesentérica (mg)</b>	0,43 ± 0,04	0,49 ± 0,05	0,59 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,69 ± 0,06 <sup>c</sup>
<b>Gordura Retroperitoneal (mg)</b>	0,35 ± 0,04	0,33 ± 0,03	0,73 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,66 ± 0,07 <sup>c</sup>
<b>Tecido adiposo marrom (mg)</b>	0,1 ± 0,007	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,009	0,09 ± 0,01
<b>Estômago (mg)</b>	0,17 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,02
<b>Triacilgliceróis (mg/dL)</b>	81,9 ± 4,7	93,9 ± 6,3	65,6 ± 3,4	58,9 ± 3,2 <sup>c</sup>
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	146,6 ± 10,2	134,2 ± 8,9	151,5 ± 8,2	130,8 ± 4,5
<b>LDL-Colesterol (mg/dL)</b>	48,5 ± 6,6	54,96 ± 8,3 <sup>a</sup>	64,6 ± 4,3	57,5 ± 6,6
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	178,3 ± 6,1	171,7 ± 7,1	209,5 ± 9,3 <sup>a</sup>	196,2 ± 9,4 <sup>c</sup>
<b>Insulinemia (ng/mL)</b>	0,73 ± 0,03	0,98 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,01 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,99 ± 0,11
<b>Índice HOMA-IR</b>	9,96 ± 0,82	13,46 ± 0,94 <sup>a</sup>	15,5 ± 2,6	14,3 ± 2,4

Suplementação oral com óleo de peixe rico em AGPI n-3 (2 g/kg de peso corporal, três vezes por semana) ou água, por 12 semanas. Os animais foram alimentados com dieta balanceada ou hiperlipídica a partir da quarta semana. Para o cálculo do consumo calórico (Kcal/animal/semana) foram consideradas as calorias presentes na quantidade de óleo de peixe utilizada na suplementação da semana, considerando as informações fornecidas pelo fabricante: 1,804 Kcal/200 mL. As dosagens de triacilgliceróis, colesterol total, HDL-colesterol, glicemia e insulinemia foram determinadas no soro dos animais coletado após 3-4 horas de jejum, no dia do sacrifício dos animais. O LDL-colesterol foi calculado pela equação de Friedewald (1972). O índice HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment – Insulin Resistance*) foi calculado pela fórmula: insulina (mU/L) x glicemia (mmol/L) /22,5 e avalia a resistência à insulina. Os resultados estão apresentados como Média ± EPM (n = 7 – 10). Os dados foram analisados por teste “t” de Student comparando TLR-4<sup>-/-</sup> DB vs. TLR-4<sup>-/-</sup> HFD, TLR-4<sup>-/-</sup> DB vs. TLR-4<sup>-/-</sup> DB + OP, TLR-4<sup>-/-</sup> HFD vs. TLR-4<sup>-/-</sup> HFD + OP e TLR-4<sup>-/-</sup> DB + OP vs. TLR-4<sup>-/-</sup> HFD + OP (a) p < 0.05 comparado com TLR-4<sup>-/-</sup> DB; (b) p < 0.05 comparado com TLR-4<sup>-/-</sup> HFD; (c) p < 0.05 comparado com TLR-4<sup>-/-</sup> DB + OP.

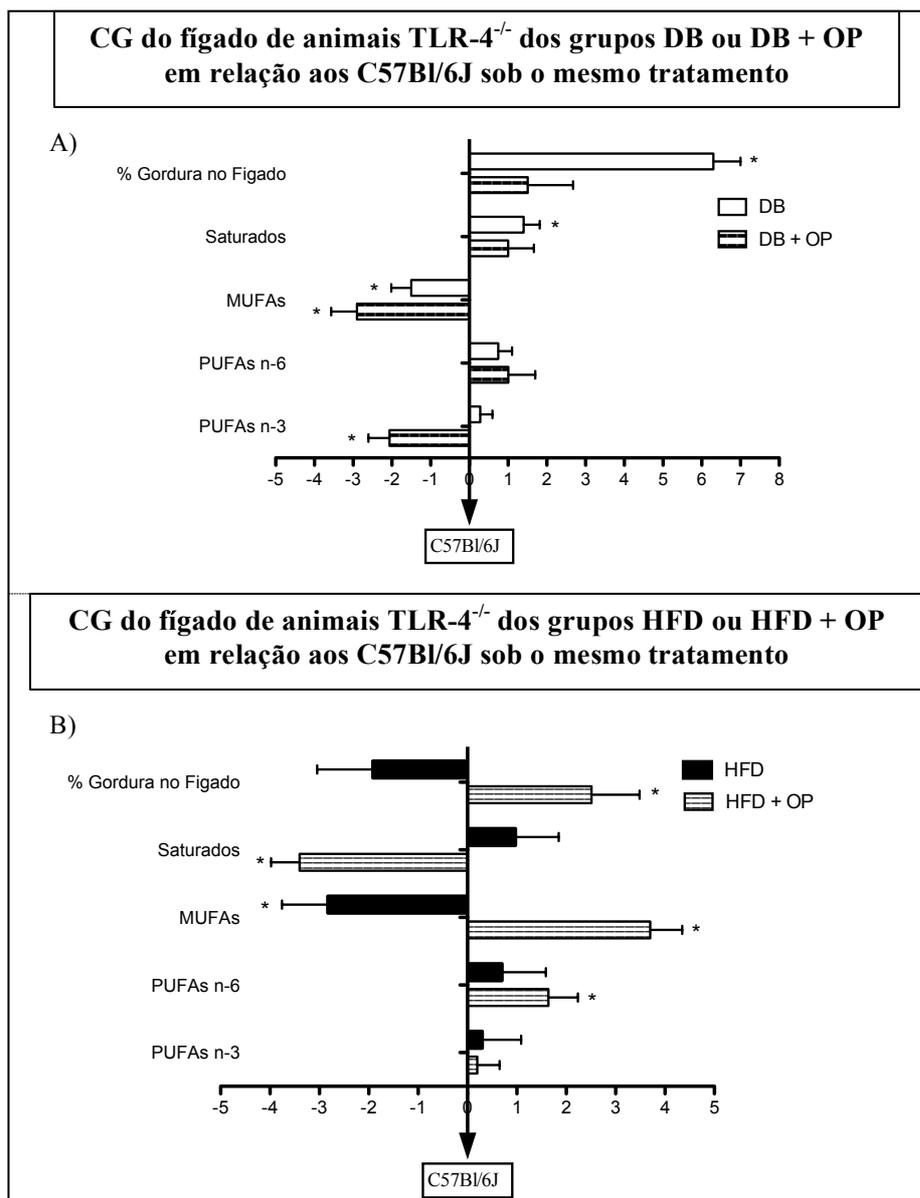


**Figura 25. Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre o ganho de massa corpórea e peso final dos depósitos de tecido adiposo retroperitoneal e mesentérico de animais *knockouts* para a proteína TLR-4 em relação aos animais C57Bl/6J alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica.** Os gráficos apresentam as diferenças entre as médias dos animais *knockouts* para a proteína TLR-4 suplementados ou não com óleo de peixe e alimentados com dietas balanceada (A) ou hiperlipídica (B) e as médias dos animais C57Bl/6J sob o mesmo tratamento no ganho de massa corpórea em gramas (massa corpórea final – massa corpórea inicial) e peso da gordura retroperitoneal (g) e mesentérica (g). Os resultados estão apresentados como a diferença das médias entre C57Bl/6J e TLR4<sup>-/-</sup> sob o mesmo tratamento ± desvio padrão (n = 6 - 10). DB = dieta balanceada; DB + OP = dieta balanceada e suplementação com óleo de peixe; HFD = dieta hiperlipídica; HFD + OP = dieta hiperlipídica e suplementação com óleo de peixe. \* p<0.05 vs C57Bl/6J submetido ao mesmo tratamento (dieta e suplementação).

### 6.3.2 Efeito da suplementação com óleo de peixe na composição de ácidos graxos do fígado de animais *knockouts* para a proteína TLR-4 alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica em relação aos camundongos C57Bl/6J

A ausência do receptor TLR-4 nos animais alimentados com dieta balanceada levou ao aumento em 2,2 vezes na porcentagem de lipídeos totais no fígado e a quantidade dos ácidos graxos isolados também foi alterada: com aumento de AG saturados (em 5%) e diminuição de AG monoinsaturados (em 3,5%) em relação aos animais C57Bl/6J com receptor íntegro (Figura 26A). A suplementação com óleo de peixe associada à dieta balanceada causou redução na quantidade de AG monoinsaturados (em 8,2%) e PUFAs n-3 (em 20%) no fígado dos animais TLR4<sup>-/-</sup> comparado aos C57Bl/6J sob o mesmo tratamento (Figura 26A).

Os animais *knockouts* para a proteína TLR-4 alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram redução de 10% na quantidade de AG monoinsaturados no fígado em relação aos C57Bl/6J sob a mesma dieta (Figura 26B). A suplementação com óleo de peixe associada à dieta hiperlipídica causou aumento de 25% na porcentagem total de gordura hepática nos animais TLR-4<sup>-/-</sup> em relação aos C57Bl/6J, com alteração no conteúdo dos ácidos graxos isolados: redução de 10% nos AG saturados e aumento nos AG monoinsaturados (em 16%) e PUFAs n-6 (em 81%) (Figura 26B).



**Figura 26.** Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre o conteúdo de gordura total hepática e a composição de ácidos graxos no fígado de animais *knockouts* para a proteína TLR-4 em relação aos animais C57Bl/6J alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica. Os gráficos apresentam as diferenças entre as médias dos animais *knockouts* para a proteína TLR-4 suplementados ou não com óleo de peixe e alimentados com dietas balanceada (A) ou hiperlipídica (B) e as médias dos animais C57Bl/6J sob o mesmo tratamento no conteúdo de gordura total e composição de ácidos graxos do fígado determinada por cromatografia gasosa. Os resultados estão apresentados como as diferenças das médias entre C57Bl/6J e TLR4<sup>-/-</sup> sob o mesmo tratamento  $\pm$  desvio padrão (n = 6 - 10). DB = dieta balanceada; DB + OP = dieta balanceada e suplementação com óleo de peixe; HFD = dieta hiperlipídica; HFD + OP = dieta hiperlipídica e suplementação com óleo de peixe. \*  $p < 0.05$  vs C57Bl/6J submetido ao mesmo tratamento (dieta e suplementação).

**Quadro 10.** Composição de ácidos graxos do fígado de animais *knockouts* para a proteína TLR-4 alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe, avaliada por cromatografia gasosa e apresentada em g/100g de tecido.

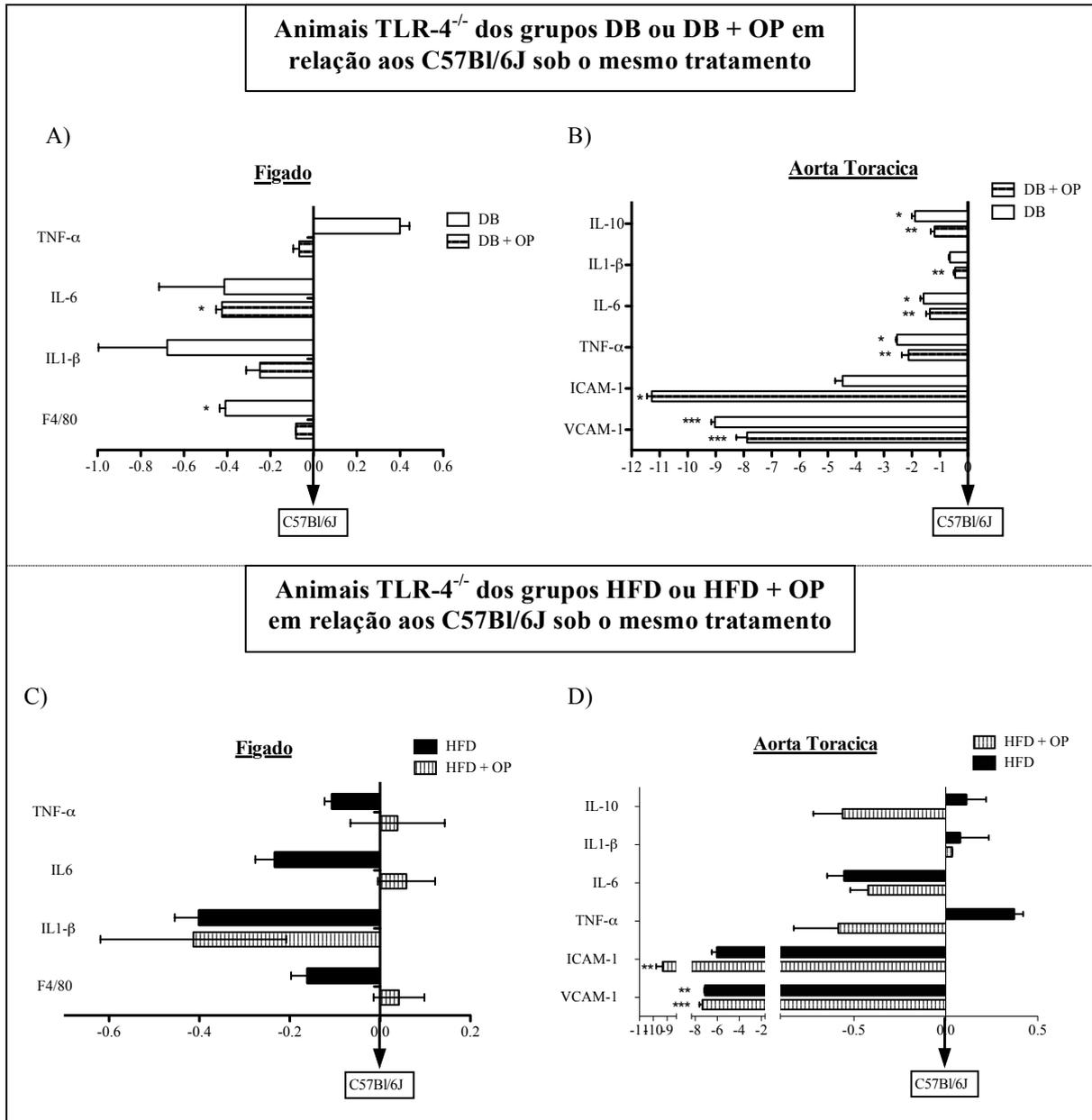
Fórmula	Nome	TLR-4 <sup>-/-</sup> DB	TLR-4 <sup>-/-</sup> DB + OP	TLR-4 <sup>-/-</sup> HFD	TLR-4 <sup>-/-</sup> HFD + OP
14 : 0	Mirístico	0,065 ± 0,011	0,050 ± 0,021	0,029 ± 0,004	0,035 ± 0,012
16 : 0	<b>Palmitico</b>	<b>2,435 ± 0,363</b>	<b>2,356 ± 0,603</b>	<b>2,254 ± 0,304</b>	<b>2,632 ± 0,630</b>
16 : 1 (n-7)	Hexadecenóico	0,659 ± 0,161	0,517 ± 0,338	0,147 ± 0,034	0,187 ± 0,073
17 : 0	Margárico	—	0,028 ± 0,005	2,254 ± 0,304	0,028 ± 0,005
18 : 0	<b>Esteárico</b>	<b>0,764 ± 0,084</b>	<b>0,747 ± 0,260</b>	<b>0,965 ± 0,069</b>	<b>0,974 ± 0,080</b>
18 : 1 (n-9)	<b>Oléico</b>	<b>3,405 ± 0,636</b>	<b>2,539 ± 0,989</b>	<b>2,460 ± 0,485</b>	<b>3,020 ± 0,910</b>
18 : 1 (n-11)	Vacênico	0,530 ± 0,105	0,295 ± 0,123	0,143 ± 0,021	0,109 ± 0,085
18 : 2 (n-6)	<b>Linoléico</b>	<b>0,902 ± 0,143</b>	<b>1,052 ± 0,537</b>	<b>2,072 ± 0,279</b>	<b>2,534 ± 0,613</b>
20 : 0	Eicosanóico	0,032 ± 0,006	0,035 ± 0,025	0,032 ± 0,006	0,035 ± 0,011
18 : 3 (n-6)	γ-Linolênico	0,048 ± 0,009	0,046 ± 0,015	0,048 ± 0,009	0,046 ± 0,015
20 : 1 (n-9)	Eicosenóico	0,047 ± 0,008	0,054 ± 0,018	0,047 ± 0,008	0,056 ± 0,018
18 : 3 (n-3)	α-Linolênico	0,038 ± 0,013	0,042 ± 0,026	0,049 ± 0,009	0,066 ± 0,022
20 : 2 (n-6)	Eicosadienóico	0,038 ± 0,014	0,037 ± 0,029	0,038 ± 0,005	0,041 ± 0,009
22 : 0	Docosanóico	0,050 ± 0,014	0,076 ± 0,030	0,053 ± 0,013	0,049 ± 0,004
20 : 3 (n-6)	Eicosatrienóico	0,108 ± 0,017	0,085 ± 0,024	0,078 ± 0,015	0,085 ± 0,024
20 : 4 (n-6)	<b>Araquidônico</b>	<b>0,935 ± 0,123</b>	<b>0,589 ± 0,293</b>	<b>1,116 ± 0,092</b>	<b>0,967 ± 0,139</b>
20 : 5 (n-3)	<b>Eicosapentaenóico</b>	<b>0,030 ± 0,016</b>	<b>0,132 ± 0,108</b>	<b>0,012 ± 0,014</b>	<b>0,094 ± 0,028</b>
24 : 1 (n-9)	Nervônico	—	—	0,040 ± 0,004	0,019 ± 0,011
22 : 5 (n-6)	Docosapentaenóico	0,067 ± 0,017	—	0,038 ± 0,007	—
22 : 5 (n-3)	Docosapentaenóico	—	0,089 ± 0,028	0,039 ± 0,007	0,089 ± 0,028
22 : 6 (n-3)	<b>Docosa-hexaenóico</b>	<b>0,256 ± 0,032</b>	<b>0,066 ± 0,041</b>	<b>0,464 ± 0,022</b>	<b>0,775 ± 0,090</b>
Totais	<b>Saturados</b>	3,333 ± 0,416	3,237 ± 0,793	3,365 ± 0,365	3,756 ± 0,719
	<b>Monoinsaturados</b>	4,702 ± 0,787	3,237 ± 0,793	2,846 ± 0,554	3,407 ± 1,043
	<b>Polinsaturados</b>	2,399 ± 0,274	2,654 ± 0,926	3,954 ± 0,369	4,698 ± 0,698
	<b>ω-3</b>	0,346 ± 0,044	0,817 ± 0,332	0,564 ± 0,034	1,024 ± 0,150
<b>% gordura</b>		<b>11,467 ± 1,481</b>	<b>10,037 ± 2,680</b>	<b>10,775 ± 1,303</b>	<b>12,512 ± 2,475</b>

\* Os ácidos graxos e seus respectivos valores em negrito são os mais abundantes ou que apresentaram maior alteração pelo tratamento. Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média. TLR-4<sup>-/-</sup> DB = dieta balanceada (n = 7); TLR-4<sup>-/-</sup> DB + OP = dieta balanceada e suplementação com óleo de peixe (n = 7); TLR-4<sup>-/-</sup> HFD = dieta hiperlipídica (n = 6); TLR-4<sup>-/-</sup> HFD + OP = dieta hiperlipídica e suplementação com óleo de peixe (n = 10).

### 6.3.3 *Expressão de genes inflamatórios no fígado e conteúdos de proteínas inflamatórias na aorta torácica de animais knockouts para a proteína TLR-4 suplementados com óleo de peixe e alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica em relação aos camundongos C57Bl/6J*

Os animais TLR-4<sup>-/-</sup> alimentados com dieta balanceada apresentaram redução de 40% no conteúdo de RNA mensageiro de F4/80 no fígado, e quando suplementados óleo de peixe apresentaram diminuição de 41% na expressão do gene IL-6, ambos em relação aos animais C57Bl/6J sob mesmo tratamento mas com integridade do receptor (Figura 27A). A aorta torácica dos animais TLR-4<sup>-/-</sup> alimentados com dieta balanceada apresentou redução nos conteúdos das proteínas inflamatórias avaliadas: VCAM-1 (em 26%), TNF- $\alpha$  (em 38%), IL-6 (em 28,5%) e IL-10 (em 41%), em relação aos animais C57Bl/6J (Figura 27B). A suplementação com óleo de peixe diminuiu o conteúdo das proteínas IL-10 (em 42%), IL-1 $\beta$  (em 51%), IL-6 (em 35%), TNF- $\alpha$  (em 50%), ICAM-1 (em 25%) e VCAM-1 (em 28%), na aorta torácica dos animais TLR-4<sup>-/-</sup> alimentados com dieta balanceada (Figura 27B).

A deleção do receptor TLR-4 não alterou a expressão de genes inflamatórios no fígado dos animais alimentados com dieta hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe, em relação aos que possuíam integridade do receptor (Figura 27C). A dieta hiperlipídica aumentou os conteúdos de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 na aorta torácica dos animais TLR-4<sup>-/-</sup> comparados aos C57Bl/6J (Figura 27D).



**Figura 27.** Efeitos da suplementação com óleo de peixe na expressão de RNA mensageiro do fígado e conteúdo de proteínas inflamatórias na aorta torácica de animais *knockouts* para a proteína TLR-4 em relação aos C57Bl/6J alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica. Os gráficos apresentam as diferenças entre as médias dos animais *knockouts* para a proteína TLR-4 suplementados ou não com óleo de peixe e alimentados com dietas balanceada (A) ou hiperlipídica (B) e as médias dos animais C57Bl/6J sob o mesmo tratamento na expressão de RNA mensageiro dos genes TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e F4-80 avaliados por RT-PCR no fígado e conteúdos protéicos de IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , ICAM-1 e VCAM-1 avaliados por ELISA no homogenato da aorta torácica. O fígado dos animais foi triturado e 20 mg utilizado para a extração de RNA mensageiro. A aorta torácica foi homogeneizada em tampão fosfato-salina contendo inibidor de protease e o sobrenadante utilizado para ensaio colorimétrico de ELISA. Os resultados estão apresentados como a diferença das médias entre C57Bl/6J e TLR4<sup>-/-</sup> sob o mesmo tratamento  $\pm$  desvio padrão (n = 6 - 10). DB = dieta balanceada; DB + OP = dieta balanceada e suplementação com óleo de peixe; HFD = dieta hiperlipídica; HFD + OP = dieta hiperlipídica e suplementação com óleo de peixe. \* p<0.05 vs C57Bl/6J submetido ao mesmo tratamento (dieta e suplementação).

**Quadro 11.** Resumo das relações entre dieta balanceada nos animais TLR-4<sup>-/-</sup> (DB) versus DB nos C57Bl/6J, balanceada e suplementação com óleo de peixe (DB + OP) nos animais TLR-4<sup>-/-</sup> versus DB + OP nos C57Bl/6J, hiperlipídica (HFD) nos animais TLR-4<sup>-/-</sup> versus HFD nos C57Bl/6J e hiperlipídica e suplementação com óleo de peixe (HFD + OP) nos animais TLR-4<sup>-/-</sup> versus HFD nos C57Bl/6J, descritas no item 5.3 de Resultados.

	DB (TLR-4 <sup>-/-</sup> ) vs DB (C57Bl/6J)	DB + OP (TLR-4 <sup>-/-</sup> ) vs DB + OP (C57Bl/6J)	HFD (TLR-4 <sup>-/-</sup> ) vs HFD (C57Bl/6J)	HFD + OP (TLR-4 <sup>-/-</sup> ) vs HFD + OP (C57Bl/6J)
<b>Δ Peso Corporal</b>	↑	↑	----	----
<b>Gordura Mesentérica</b>	↑	----	----	----
<b>Gordura Retroperitoneal</b>	----	----	----	----
<b>% Gordura no Fígado</b>	↑	----	----	↑
<b>AG Saturados - Fígado</b>	↑	----	----	↓
<b>MUFAs - Fígado</b>	↓	↓	↓	↑
<b>PUFAs n-6 - Fígado</b>	----	----	----	↑
<b>PUFAs n-3 - Fígado</b>	----	↓	----	----
<b>TNF-α</b> (Expressão gênica hepática)	----	----	----	----
<b>IL-6</b> (Expressão gênica hepática)	----	↓	----	----
<b>IL-1β</b> (Expressão gênica hepática)	----	----	----	----
<b>F4/80</b> (Expressão gênica hepática)	↓	----	----	----
<b>IL-10</b> (Conteúdo protéico – aorta torácica)	↓	↓	----	----
<b>IL-1β</b> (Conteúdo protéico – aorta torácica)	----	↓	----	----
<b>IL-6</b> (Conteúdo protéico – aorta torácica)	↓	↓	----	----
<b>TNF-α</b> (Conteúdo protéico – aorta torácica)	↓	↓	----	↓
<b>VCAM-1</b> (Conteúdo protéico – aorta torácica)	↓	↓	↓	↓
<b>ICAM-1</b> (Conteúdo protéico – aorta torácica)	↓	↓	↓	↓

Abreviaturas: DB = dieta balanceada; DB + OP = dieta balanceada e suplementação com óleo de peixe; HFD = dieta hiperlipídica; HFD + OP = dieta hiperlipídica e suplementação com óleo de peixe; TNF-α = fator de necrose tumoral α; IL = interleucina; VCAM-1 = molécula de adesão vascular 1; ICAM-1 = molécula de adesão intercelular 1.

# *7 DISCUSSÃO*

Dietas hipercalóricas promovem ganho de peso excessivo e as complicações metabólicas associadas (MANN, 2006; NGUYEN; EL-SERAG, 2010). Nesse estudo, a dieta hiperlipídica (59% de gordura) administrada por oito semanas em camundongos C57Bl/6J causou aumento na massa corpórea, nos depósitos de gordura mesentérica, retroperitoneal e epididimal, no tecido adiposo marrom (TAM), na glicemia de jejum, na concentração sérica de colesterol total e LDL-colesterol e intolerância à glicose. Sampey et al. (2011) demonstraram que a disponibilidade de alimentos industrializados hipercalóricos para ratos Wistar leva a um quadro de síndrome metabólica mais severo que o efeito da exposição à dieta hiperlipídica. No presente estudo, a oferta de leite condensado por oito semanas para os camundongos C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada aumentou a massa corpórea, o peso dos depósitos de gordura mesentérica, retroperitoneal e epididimal, TAM, a concentração sérica de colesterol total e intolerância à glicose. A associação de um alimento muito palatável à dieta de roedores proporciona um modelo relevante para o estudo dos efeitos da dieta ocidental, caracterizada por conteúdo reduzido de fibras, ingestão elevada de açúcar, carboidratos refinados e gordura (SUTER, 2005). Foi demonstrado nesse estudo que a oferta de leite condensado aos animais alimentados com dieta hiperlipídica leva ao aumento dos depósitos de gordura mesentérica, retroperitoneal, TAM, insulinemia, índice HOMA-IR e resistência à insulina, comparado aos animais que receberam apenas a dieta rica em gordura. Em relação aos animais que receberam dieta balanceada e leite condensado, a oferta de gordura e açúcar causou aumento no ganho de peso corpóreo, nos depósitos de gordura mesentérica, retroperitoneal e epididimal, triacilgliceróis séricos, insulinemia, índice HOMA-IR e intolerância à insulina. A associação de dieta hiperlipídica e leite condensado reduziu a ingestão alimentar, mas houve maior eficiência energética.

Muitos estudos de obesidade induzida por dieta utilizam como controle comparativo a dieta comercial para roedores ou uma dieta balanceada de composição similar à hiperlipídica com troca de gordura por carboidrato como o amido de milho (BENOIT et al., 2013). Nesse estudo foi demonstrado que a dieta padrão comercial para roedores, comparada a dieta balanceada, levou a um menor ganho de massa corpórea, menor peso dos depósitos de gordura mesentérica, epididimal, retroperitoneal, o TAM, menor glicemia de jejum e da concentração sérica de colesterol total e LDL-colesterol, aumento na insulinemia e menor taxa de decaimento da glicose em relação aos animais alimentados com dieta balanceada. As diferenças observadas entre os dois grupos que poderiam ser utilizados como controles podem ser devido ao fato de que a dieta padrão comercial tem como fonte de carboidratos os derivados de aveia, trigo, cevada e milho enquanto que a dieta balanceada é preparada com

ingredientes processados como amido de milho, sacarose e maltodextrina, os quais aumentam o índice glicêmico da ração. Os grãos integrais na dieta comercial contém fitoestrogênios e fibras, que possivelmente protegem os animais de desenvolverem resistência à insulina e obesidade (BATHENA; VELASQUEZ, 2002; ISKEN et al., 2010). A comparação entre as dietas PADRAO e DB foi realizada nesse estudo para investigar a relevância da composição nutricional e a fonte dos macronutrientes nos efeitos da dieta hiperlipídica (BENOIT et al., 2013). A dieta balanceada (DB) foi definida como controle desse estudo por ter na composição os mesmos ingredientes da dieta hiperlipídica (Tabela 1). Os animais alimentados com dieta padrão apresentaram menor resposta inflamatória no tecido adiposo epididimal, mas aumento na gordura perivascular da aorta torácica em relação ao grupo DB. Dietas ricas em fibras podem alterar a composição intestinal de microrganismos e promover crescimento de bactérias no intestino grosso que reduzem a inflamação local e no organismo como um todo (VILADOMIU et al., 2013). Embora a gordura perivascular esteja envolvida na inflamação dos vasos e no processo aterosclerótico (BROWN et al., 2014), o aumento de proteínas inflamatórias nos animais alimentados com dieta padrão, em relação à dieta balanceada, não define um quadro de inflamação crônica no organismo e não pode ser interpretado como disfunção endotelial sem que a função dos vasos sanguíneos seja investigada (FAVERO et al., 2014).

Existem vários modelos experimentais para indução de obesidade em roedores. Esses modelos incluem alterações genéticas em roedores como ratos Zucker *fa/fa*, camundongos *ob/ob* e *db/db*, indução cirúrgica ou farmacológica de lesões hipotalâmicas, tratamentos dietéticos, entre outros. Entre esses, a indução de obesidade por dieta constitui um modelo importante por relacionar hábitos dietéticos (como densidade energética e distribuição de macronutrientes) com ganho de massa corpórea e acúmulo de gordura, como observado em humanos (BARRINGTON et al., 2014; JUANOLA-FALGARONA et al., 2014). Entretanto, os hábitos alimentares são diferentes entre humanos e roedores. Ao contrário dos humanos, ratos e camundongos apresentam resistência ao desenvolvimento de obesidade regulando a ingestão energética e mantendo a massa corpórea estável (LEVIN et al., 1987; LEVIN; DUNN-MEYNELL, 2000). Foi observado no presente estudo que animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentam menor consumo alimentar e energético, mas a eficiência energética no ganho de peso corpóreo é significativamente maior. Em humanos e roedores foi demonstrada relação positiva entre o consumo de alimentos com alta densidade energética e o consequente aumento na massa corporal (DUIVENVOORDE et al., 2011; FOGELHOLM et al., 2012; SCHUSDZIARRA et al., 2011). Essa relação demonstra que o conteúdo de gordura

da dieta é um fator importante no balanço energético uma vez que esta apresenta duas vezes mais energia por unidade de peso que proteína ou carboidrato (MCCRORY; BURKE; ROBERTS, 2012).

O consumo de leite condensado, associado à dieta balanceada ou hiperlipídica, levou à redução na ingestão alimentar, mas aumentou o consumo energético e a eficiência energética ao final do tratamento. O leite condensado é um alimento muito palatável, rico em gordura (13,5%) e principalmente açúcar (55%), que aumenta o consumo alimentar por ativação do sistema de recompensa representado por opióides endógenos, dopamina e serotonina, e pelo fenômeno de “resistência”, uma deficiência na cascata de sinalização na resposta de saciedade (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005).

A obesidade ocorre quando a ingestão energética ultrapassa o gasto energético e o excesso passa a ser estocado como gordura corporal, principalmente nos depósitos viscerais como: epididimal, retroperitoneal e mesentérico (HARIRI; THIBAUT, 2010). A obesidade envolve aumento no número de adipócitos (hiperplasia) e no seu tamanho (hipertrofia) (AVRAM; AVRAM; JAMES, 2005; DE FERRANTI; MOZAFFARIAN, 2008). O excesso de adiposidade aumenta o risco de DM2, artrite, apnéia do sono, hipertensão, dislipidemia, doenças cardiovasculares, câncer e morte prematura (TCHERNOF; DESPRÉS, 2013). Foi demonstrado no presente estudo que o consumo excessivo de gordura (na dieta hiperlipídica) e de carboidrato simples (na dieta balanceada com leite condensado) leva ao aumento da gordura visceral (epididimal e retroperitoneal) e do TAM. A combinação de gordura e açúcar na dieta hiperlipídica com leite condensado aumentou ainda mais a gordura visceral (mesentérica e retroperitoneal) e o TAM. Alimentos ricos em açúcar aumentam o ganho de peso por apresentar baixo conteúdo de fibras, densidade energética elevada (POPPITT; PRENTICE, 1996) e palatabilidade pelo sabor adocicado (RABEN; MACDONALD; ASTRUP, 1997). O leite condensado utilizado no presente estudo foi oferecido conforme disponibilizado comercialmente, apresentando consistência pastosa-líquida. A energia consumida na forma líquida induz menor saciedade quando comparada ao mesmo alimento na forma sólida pelo trânsito rápido através do estômago e intestino que reduz a estimulação dos sinais de saciedade e diminui a cognição perceptiva do conteúdo energético (DIMEGLIO; MATTES, 2000). A principal função do TAM é dissipar energia na forma de calor (termogênese) e com isso contribui no gasto energético de roedores e humanos (TOWNSEND; TSENG, 2014). Foi observado em humanos expostos à temperaturas baixas, que o TAM contribui com 15% do gasto energético (STOCK, 1989) e apresenta atividade inversamente proporcional ao índice de massa corporal (IMC) (NUUTILA, 2013; ORAVA et

al., 2013). O principal estímulo para aumento da termogênese no TAM vêm do sistema nervoso simpático, em resposta a mudanças de temperatura (MCALLEN et al., 2010) ou consumo excessivo de alimentos (ROTHWELL; STOCK, 1979). Hageman et al. (2010) demonstraram em camundongos machos DBA/2J que a dieta hiperlipídica (45% de gordura como fonte de energia) por 12 semanas induz obesidade e aumento no peso do tecido adiposo marrom. Com o consumo excessivo de alimentos, o TAM apresenta aumento na atividade termogênica como mecanismo compensatório de gasto energético (FELDMAN et al., 2009).

O aumento na gordura visceral está associado ao risco mais elevado de comorbidades como DM2, doenças cardiovasculares, hipertensão, dislipidemia, RI, inflamação e alguns tipos de câncer (TCHERNOF; DESPRÉS, 2013). O excesso de adiposidade visceral é um marcador de disfunção do tecido adiposo subcutâneo com consequente deposição ectópica de gordura, como o acúmulo de lipídeos no coração, fígado, músculo esquelético e pâncreas (TCHERNOF; DESPRÉS, 2013). Anatomicamente, a gordura visceral esta presente no mesentério e omento e tem acesso direto da veia porta ao fígado (IBRAHIM, 2010). Os adipócitos do tecido adiposo visceral são metabolicamente mais ativos comparados aos da gordura subcutânea, mais sensíveis à lipólise e causam aumento de ácidos graxos livres circulantes, levando o fígado à superprodução de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol) (ADIELS et al., 2008). O consumo livre de açúcar associado a dieta balanceada causou aumento no peso do fígado (em gramas) e da atividade da enzima hepática AST no soro em relação aos demais tratamentos. O aumento no peso dos órgãos, quando não proporcional à elevação do peso corporal, como foi observado no peso do fígado dos animais do grupo DB + LC associado a alteração na atividade da AST, pode indicar acúmulo de gordura e esteatose hepática não-alcóolica (NAFLD, do inglês *non-alcoholic fatty liver disease*). A ingestão excessiva de carboidrato simples, como sacarose e frutose, é a principal causa de ocorrência da NAFLD (YASUTAKE et al., 2014) por ativar o fator de transcrição SREBP-1c (*sterol regulatory elemento-binding protein-1c*) que eleva a expressão de enzimas associadas à síntese de ácidos graxos (YAMAZAKI et al., 2007).

A dislipidemia é frequentemente observada em indivíduos obesos e/ou diabéticos (FRANSSSEN et al., 2011). Nesse estudo, apesar das três dietas hipercalóricas (DB + LC, HFD e HFD + LC) se mostrarem efetivas na indução de obesidade, o consumo excessivo de gordura levou ao aumento da glicemia e das concentrações séricas de colesterol total e LDL-colesterol, enquanto que o consumo de leite condensado com dieta balanceada elevou apenas o colesterol total no soro dos animais. A concentração elevada de colesterol total e LDL-colesterol no sangue está associada ao aumento no risco de doenças cardiovasculares

(GRAHAM et al., 2012; ST-PIERRE et al., 2005). Em comparação à HFD e DB + LC, o consumo de leite condensado associado à dieta rica em gordura elevou os triacilgliceróis e o LDL-colesterol séricos. Kell et al. (2014) demonstraram em crianças de 7 a 12 anos que o aumento no consumo de açúcar, além do naturalmente presente nos alimentos, está associado ao aumento dos triacilgliceróis no sangue. O aumento no tamanho dos adipócitos é um fator importante para determinar o grau de contribuição do tecido adiposo para a dislipidemia. Com a hipertrofia dos adipócitos ocorre aumento na lipólise (ENGFELDT; ARNER, 1988) e das concentrações de ácidos graxos livres circulantes, síntese de triacilgliceróis e resistência à insulina no fígado, exacerbando a dislipidemia (JUNG; CHOI, 2014).

Além da dislipidemia, a obesidade visceral associa-se a outro distúrbio metabólico importante, a resistência à insulina (JUNG; CHOI, 2014). Esta é a condição na qual a quantidade normal de insulina não consegue manter a homeostase glicêmica por redução na captação de glicose pelo músculo esquelético e inibição da gliconeogênese no fígado (FEDOR; KELLEY, 2009; SCHENK; SABERI; OLEFSKY, 2008). A dieta hiperlipídica diminui a sensibilidade à insulina no fígado, músculo esquelético, músculo cardíaco e tecido adiposo de roedores (PARK et al., 2005; SILVEIRA et al., 2008; TURNER et al., 2007). No presente estudo, foi observado que o consumo excessivo de gordura no grupo HFD e de açúcar na dieta DB + LC causa intolerância à glicose nos animais. O efeito foi exacerbado nos animais que consumiram gordura e açúcar (HFD + LC), com aumento da intolerância à glicose e à insulina, aumento da concentração basal de insulina e do índice HOMA-IR. A resistência à insulina nos animais do grupo HFD + LC pode ter sido agravada pelo aumento da gordura visceral em relação aos animais submetidos às outras duas dietas obesogênicas (DB + LC e HFD). A associação entre os fatores ambientais, obesidade e hiperglicemia indica que a progressão para o DMT2 ocorre ao longo de um período "contínuo", não necessariamente linear, que envolve mecanismos celulares diferentes, incluindo alterações na sinalização da insulina, no transporte de glicose, disfunção das células beta pancreáticas, bem como variação na expressão dos genes envolvidos no estresse oxidativo e inflamação (PANENI; COSTANTINO; COSENTINO, 2014).

A inflamação crônica de grau baixo e a ativação do sistema imune estão envolvidas na patogênese da resistência à insulina relacionada à obesidade e DMT2 (ESSER et al., 2014). O tecido adiposo branco, fígado, músculo esquelético e pâncreas apresentam inflamação associada ao quadro de obesidade. Quando ocorre aumento nos depósitos de tecido adiposo, adipocinas são secretadas e contribuem para o processo inflamatório (LEE; LEE; CHOUE, 2013). O consumo de leite condensado com dietas balanceada ou hiperlipídica levou ao

aumento na expressão do RNA mensageiro dos genes F4/80 e leptina no tecido adiposo epididimal em relação ao grupo DB. Pelo teste estatístico *two-way* ANOVA observou-se que o leite condensado foi efetivo no aumento do conteúdo protéico de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , VCAM-1, ICAM-1 e leptina e a dieta em IL-6, IL-1 $\beta$  e leptina no tecido adiposo epididimal. O consumo de gordura e açúcar no grupo HFD + LC aumentou a expressão gênica de F4/80, reduziu de leptina e aumentou o conteúdo protéico de IL-6, IL-10 e IL-1 $\beta$  no tecido adiposo epididimal quando comparado ao grupo DB + LC. Em relação aos animais alimentados com dieta hiperlipídica, o grupo HFD + LC apresentou aumento nos conteúdos de IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , VCAM-1, ICAM-1 e leptina.

O aumento no depósito de tecido adiposo epididimal leva a maior infiltração de macrófagos e é considerado a principal causa de inflamação nesse tecido, sendo a expressão gênica de F4/80 um marcador desse processo (FUENTES et al., 2013; SORISKY; MOLGAT; GAGNON, 2013). Foi observado no presente estudo que as três dietas obesogênicas (DB + LC, HFD e HFD + LC) levaram ao aumento na expressão gênica de F4/80 no tecido adiposo epididimal. Nossos dados corroboram com aqueles de Vieira et al. (2009) que também observaram aumento na expressão do RNA mensageiro de F4/80 no tecido adiposo epididimal de camundongos machos Balb/cByJ alimentados com dieta hiperlipídica (45% de gordura como fonte energética) por 12 semanas. Observou-se que o aumento na infiltração de macrófagos foi acompanhado por maior conteúdo das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 no tecido adiposo epididimal dos animais submetidos às dietas obesogênicas estudadas. Em 1993, Hotamisligil et al. demonstraram que o tecido adiposo de camundongos obesos secreta TNF- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória tipicamente produzida por células do sistema imune. Mostraram também que o TNF- $\alpha$  derivado do tecido adiposo atua diretamente na resistência à insulina causada pela obesidade (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993). Essa foi a primeira associação observada entre obesidade e inflamação que evoluiu para o conceito de inflamação metabólica, uma relação entre a obesidade e suas comorbidades (HOTAMISLIGIL, 2006). Kaneko et al. (2011) demonstraram que camundongos transgênicos com deleção da enzima *Tace* que ativa TNF- $\alpha$  apresentam redução na infiltração de macrófagos e na expressão de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo epididimal, entre outras alterações que melhoram a homeostase energética.

Após o TNF- $\alpha$ , foi demonstrado que o tecido adiposo produz uma série de citocinas e quimiocinas como IL-6, que podem regular positiva ou negativamente o metabolismo sistêmico de glicose e lipídeos (CAO, 2014). Há correlação entre o aumento de IL-6 no soro

de pacientes com resistência à insulina e obesidade (BASTARD et al., 2002; SPRANGER et al., 2013). A IL-1 $\beta$  é produzida principalmente por monócitos e macrófagos e se apresenta aumentada na circulação (SPRANGER et al., 2013) e na ilhota pancreática de humanos e roedores obesos com DMT2, induzindo perda de células  $\beta$  pancreáticas e hiperglicemia (DONATH et al., 1999; EHSES et al., 2009; SAUTER et al., 2008). Pitombo et al. (2006) observaram em camundongos Swiss alimentados por 8 semanas com dieta hiperlipídica (24 g% de gordura saturada) que a remoção cirúrgica do tecido adiposo epididimal leva à redução nas concentrações séricas de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e melhora a sensibilidade periférica à insulina.

Além de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , o tecido adiposo produz outras proteínas inflamatórias, como leptina e adiponectina, que estão alteradas na obesidade. A leptina é um produto do gene obeso (*ob*; também conhecido como *Lep*) e regula o comportamento alimentar atuando no sistema nervoso central (HOUSEKNECHT et al., 1998). Camundongos sem produção de leptina (camundongos *ob/ob*) apresentam hiperfagia (aumento anormal do consumo alimentar), obesidade e resistência à insulina e a administração de leptina à esses animais reverte esse quadro (FRIEDMAN; HALAAS, 1998). A dieta hiperlipídica e a obesidade levam ao aumento na concentração de leptina no plasma, caracterizando um quadro de hiperleptinemia (LEON-CABRERA et al., 2013; LIN et al., 2000; MAFFEI et al., 1995). Houve aumento na expressão gênica e no conteúdo protéico de leptina no tecido adiposo epididimal dos animais dos grupos DB + LC e HFD. Entretanto, os animais alimentados com gordura e açúcar, do grupo HFD + LC, apresentaram aumento no conteúdo protéico de leptina e redução na expressão gênica em relação ao grupo DB + LC, indicando estado de intolerância à leptina ainda mais severo (KNIGHT et al., 2010).

A dieta hiperlipídica também causou redução na expressão do RNA mensageiro do gene da adiponectina no tecido adiposo epididimal. A adiponectina é secretada exclusivamente pelo tecido adiposo na corrente sanguínea e seus valores plasmáticos são inversamente proporcionais ao percentual de gordura corporal em indivíduos adultos (SANTANIEMI et al., 2013). A adiponectina atua na sensibilização à insulina, ações anti-inflamatórias e anti-apoptóticas em diferentes tipos celulares, mas se encontra diminuída nos quadros de obesidade, resistência à insulina, DMT2, asma entre outras (BLUHER, 2014). Okada-Iwabu et al. (2013) reportaram a produção de um composto oral ativo, agonista sintético do receptor de adiponectina, que denominaram AdipoRon (OKADA-IWABU et al., 2013). Essa molécula se liga aos receptores de adiponectina e reduz a resistência à insulina e

intolerância à glicose em camundongos (OKADA-IWABU et al., 2013). O AdipoRon também atenua a DMT2 e prolonga a vida de camundongos *db/db* submetidos à dieta hiperlipídica (OKADA-IWABU et al., 2013).

O consumo excessivo de nutrientes como glicose e ácidos graxos induzem disfunção microvascular em roedores (BOOTH et al., 2002; ELLIS et al., 2008). A microcirculação é o local onde ocorre infiltração de leucócitos nos tecidos inflamados, incluindo o tecido adiposo. A interação de leucócitos circulantes com o endotélio vascular é uma etapa primordial na resposta inflamatória (URSO; HOPPS; CAIMI, 2010) e ocorre em três passos, sendo cada um mediado por uma classe específica de moléculas de adesão expressas na membrana da célula endotelial: 1) o rolamento de leucócitos regulado por P-selectina e E-selectina; 2) a aderência dos leucócitos às moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1; e 3) o extravazamento leucocitário regulado por ICAM-1 e PECAM-1. Nesse estudo, o consumo de açúcar, combinado com as dietas balanceada ou hiperlipídica, levou ao aumento no conteúdo protéico das moléculas de adesão intercelular e vascular (ICAM-1 e VCAM-1, respectivamente) no tecido adiposo epididimal. O grupo HFD + LC apresentou aumento nos conteúdos protéicos de ICAM-1 e VCAM-1 no tecido adiposo epididimal em relação aos animais alimentados apenas com dieta hiperlipídica. Talukdar et al. (2012) demonstraram que o acúmulo de neutrófilos no tecido adiposo ocorre 48 horas após administração de uma dieta hiperlipídica com aumento máximo em 3 dias após alimentação.

Há vários mecanismos pelos quais a obesidade afeta a vasculatura e aumenta o risco de morte por doenças cardiovasculares (ZHANG; CUI; ZHANG, 2010). As adipocinas, citocinas liberadas pelo tecido adiposo, influenciam o desenvolvimento das paredes dos vasos sanguíneos por mudanças metabólicas tais como: hiperlipidemia, hiperglicemia e resistência à insulina, fatores que contribuem no aumento da adiposidade da vasculatura e disfunção do vaso (IKEOKA; MADER; PIEBER, 2010). Há aumento da gordura perivascular na obesidade em humanos (GREENSTEIN et al., 2009; LEHMAN et al., 2010) e em vários modelos de obesidade animal (KETONEN et al., 2010; MA et al., 2010; MARCHESI et al., 2009). Em humanos, o aumento da gordura perivascular correlaciona-se com o acúmulo de gordura visceral e com a ocorrência de hipertensão, resistência à insulina e diabetes (LEHMAN et al., 2010; RITTIG et al., 2008).

A gordura perivascular é composta de tecido adiposo branco e marrom. Este último é rico em mitocôndrias, expressando a proteína desacopladora-1 (UCP-1). O tecido adiposo perivascular também apresenta inflamação induzida pela obesidade assim como é observado nos outros tecidos adiposos, com desbalanço na secreção de adipocinas e indução de estresse

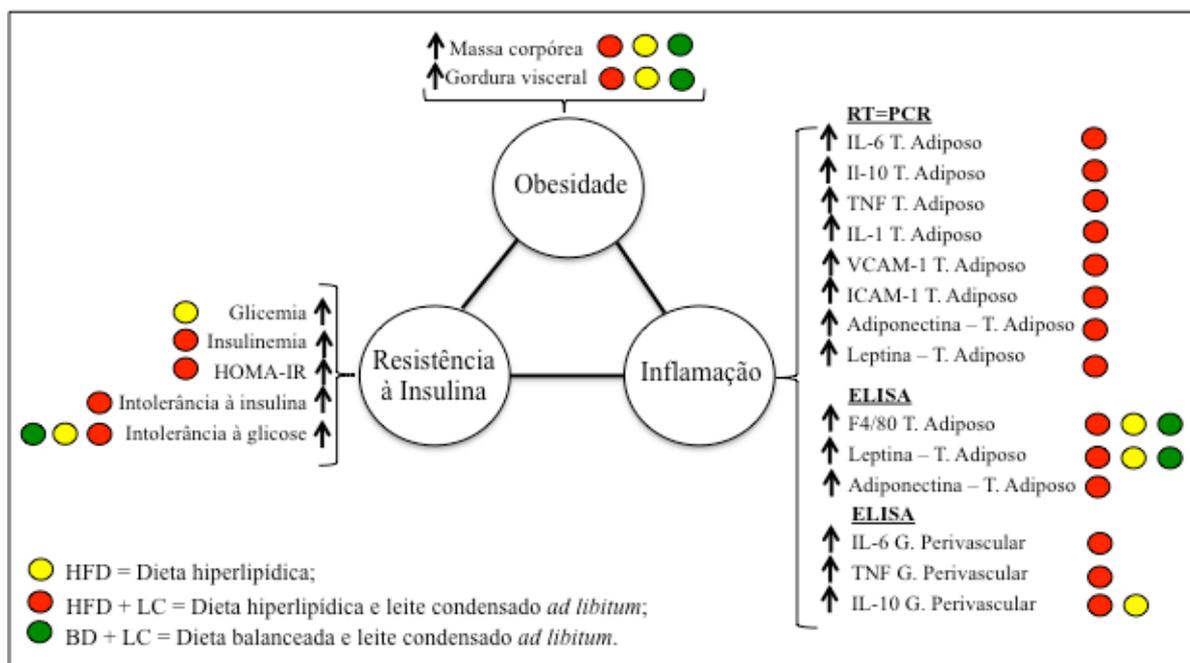
oxidativo, hipóxia e resistência à insulina (DE VOORDE et al., 2014; GOMEZ-HERNANDEZ et al., 2013). Ma et al. (2010) demonstraram que o aumento do tecido adiposo perivascular contribui com a disfunção endotelial de camundongos C57Bl/6J alimentados com dieta hiperlipídica por 6 meses. A remoção da gordura perivascular restaura a função endotelial dos animais (MA et al., 2010). No presente estudo, houve redução do conteúdo protéico de IL-10 na gordura perivascular da aorta torácica dos animais alimentados com dieta hiperlipídica. A interleucina-10 é uma citocina anti-inflamatória que se encontra reduzida no plasma de roedores submetidos à dieta hiperlipídica e humanos obesos (BALLARD et al., 2013; STRANDBERG et al., 2009). Gao et al. (2013) demonstraram que camundongos machos alimentados com dieta hiperlipídica por 31 dias que receberam duas injeções de plasmídeos contendo IL-10 (no primeiro e último dias) apresentaram redução no ganho de peso e aumento da sensibilidade à insulina e tolerância à glicose.

Não houve alteração significativa no conteúdo de proteínas inflamatórias da aorta torácica, com exceção dos grupos BD + LC e HFD + LC que apresentaram redução de TNF- $\alpha$ . Essa resposta pode ser tardia ou até contra-regulatória. Kim et al. (2008) demonstraram que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica em animais C57Bl/6J promove inflamação e resistência à insulina nos vasos sanguíneos antes dessas respostas serem detectadas no músculo esquelético, fígado ou tecido adiposo. A aterosclerose é uma doença da parede arterial apresentando processo inflamatório crônico (ROCHA; LIBBY, 2009). O fator de transcrição nuclear- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) integra vários processos envolvidos na formação de placas ateroscleróticas. O NF $\kappa$ B controla a expressão de genes que direcionam o início e a progressão da aterosclerose, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e as moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 (BAKER; HAYDEN; GHOSH, 2011).

Em resumo, o ganho de massa corpórea e o peso final do tecido adiposo epididimal do grupo HFD + LC não foram diferentes quando comparados ao grupo HFD, mas a intolerância à glicose e a resistência à insulina, a insulinemia de jejum, o índice HOMA-IR e o conteúdo de proteínas pro-inflamatórias na gordura epididimal foram significativamente diferentes. A combinação de gordura e açúcar potencializou a obesidade, resistência à insulina e inflamação nos animais C57Bl/6J.

Assim, como pode ser observado na Figura 28, a obesidade, resistência à insulina e inflamação induzidas por dietas hipercalóricas durante 8 semanas não são necessariamente interligadas. As dietas hiperlipídica e balanceada com leite condensado causaram obesidade e alteraram alguns dos parâmetros inflamatórios avaliados, sem induzir resistência à insulina. A gordura da dieta pode não ser a causa primária da obesidade e suas comorbidades decorrentes.

A associação de gordura e açúcar potencializou a obesidade, induziu resistência periférica à insulina e inflamação no tecido adiposo e na gordura perivascular da aorta torácica. A composição de ácidos graxos da dieta é um fator importante na avaliação dos seus efeitos sobre os parâmetros de obesidade, resistência à insulina e inflamação, uma vez que os ácidos graxos saturados e os ácidos graxos poliinsaturados n-3 podem apresentar efeitos opostos, como pró- e anti-inflamatórios, respectivamente.



**Figura 28.** Efeitos das dietas obesogênicas: balanceada com leite condensado *ad libitum*, hiperlipídica e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* sobre os parâmetros que caracterizam obesidade, resistência à insulina e inflamação.

Dietas ricas em ácidos graxos saturados são associadas com maior risco de obesidade, resistência à insulina e aterosclerose, enquanto que dietas com alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados da família n-3, encontrado principalmente no óleo de peixe, protegem contra as doenças metabólicas (ABETE et al., 2011; GONZALEZ-PERIZ et al., 2009).

Foi observado no presente estudo que os efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre os parâmetros que caracterizam a obesidade, resistência à insulina e inflamação variam de acordo com a quantidade de gordura da dieta. A suplementação com óleo de peixe por 12 semanas não alterou o ganho de massa corpórea e o peso dos depósitos de gordura dos animais C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada. Entretanto, diminuiu significativamente a concentração sérica de LDL-colesterol e a glicemia, aumentou a porcentagem de gordura hepática, reduziu a razão PUFA n-6/n-3 no fígado e no plasma, diminuiu a expressão de RNA

mensageiro de F4/80, TNF- $\alpha$  e TLR-4 no fígado, reduziu os conteúdos protéicos de VCAM-1, IL-6 e IL-10 na aorta torácica e de adiponectina e resistina no tecido adiposo perivascular. A suplementação com óleo de peixe reduziu os efeitos da dieta hiperlipídica observados sobre o ganho de massa corpórea, peso dos depósitos de gordura mesentérica e epididimal, colesterol total, LDL-colesterol, glicemia e índice HOMA-IR. A suplementação com óleo de peixe aumentou o conteúdo de adiponectina no tecido adiposo epididimal dos animais alimentados com dieta hiperlipídica, mas não alterou os parâmetros inflamatórios no fígado, aorta torácica e tecido adiposo perivascular.

Nossos dados corroboram com os estudos de outros autores em que a incorporação do ácido graxo poliinsaturado  $\omega$ -3 em dietas ricas em gordura reduziu o acúmulo de gordura corporal nos animais (BELZUNG; RACLOT; GROSCOLAS, 1993; HAINAULT et al., 1993; RUZICKOVA et al., 2004; TAKAHASHI; IDE, 2008). Baillie et al. (1999) demonstraram redução de 25% no acúmulo de gordura epididimal em ratos, de 4 semanas de idade, tratados por 6 semanas com dieta hiperlipídica (40 % da energia) enriquecida com óleo de peixe, comparada com óleo de milho, sem observar diferença na ingestão calórica. Belzung et al. (1993) também demonstraram diminuição dos depósitos adiposos retroperitoneal e epididimal em ratos Wistar machos com 7 semanas de idade alimentados com dieta hiperlipídica (20% da energia) contendo diferentes quantidades de PUFA n-3 (0-33% EPA + DHA) por 4 semanas. Nesse mesmo estudo, os autores demonstraram que a redução no depósito de gordura retroperitoneal é dose-dependente; doses mais elevadas de PUFA n-3 resulta em menor acúmulo de gordura (BELZUNG; RACLOT; GROSCOLAS, 1993).

Os mecanismos pelos quais PUFAs n-3 reduzem a gordura corporal não estão totalmente esclarecidos. Algumas evidências em humanos (PARRA et al., 2008) e animais (PÉREZ-MATUTE et al., 2007; TAKAHASHI; IDE, 2008) são sugestivas de que os ácidos graxos poliinsaturados n-3 podem contribuir com a melhora na composição corporal pela supressão do apetite (PÉREZ-MATUTE et al., 2007). Entretanto, em outros estudos, foi mostrado que os efeitos dos PUFAs n-3 no peso e gordura corporal são mediados por alterações na expressão de genes envolvidos na regulação do metabolismo de lipídios em diferentes tecidos. A ingestão de PUFAs n-3 aumenta a expressão de genes envolvidos na oxidação de lipídios no fígado, intestino, músculos cardíaco e esquelético e diminui a expressão de genes envolvidos na lipogênese do tecido adiposo, favorecendo a oxidação dos lipídios e reduzindo seu armazenamento (BUCKLEY; HOWE, 2009).

Nesse estudo, a suplementação com óleo de peixe por 12 semanas reduziu os valores de LDL-colesterol no plasma dos animais submetidos a ambas as dietas e colesterol total no

grupo que recebeu dieta hiperlipídica. Esses resultados corroboram com o estudo de Yamazaki et al. (2011) que observaram diminuição do colesterol total em ratos Wistar machos, induzidos a obesidade por glutamato monossódico no período neonatal e que aos 3 meses de idade foram suplementados com óleo de peixe (1 g de óleo por Kg de massa corpórea por dia) por 4 semanas.

A hipercolesterolemia aumenta a expressão de moléculas de adesão envolvidas na aterogênese (STEINBERG, 2002; YAMAZAKI et al., 2011). Assim, a redução dos valores de colesterol total sérico encontrada nesse estudo e outros (BAYS et al., 2009; ZHANG; CUI; ZHANG, 2010) é um fator importante para explicar parte dos efeitos anti-aterogênicos dos PUFAs n-3 em doenças cardiovasculares.

Ao contrário dos ácidos graxos saturados, os PUFAs n-3 suprimem o desenvolvimento da resistência à insulina e diabetes em humanos e roedores (NAVAS-CARRETERO et al., 2009; SENER et al., 2009). Perez-Matute et al. (2007) demonstraram que ratos machos alimentados com dietas controle ou hiperlipídica, recebendo EPA por gavagem, apresentam redução na insulina plasmática de jejum e na resistência à insulina em ambos os grupos. Foi observada no presente estudo redução na glicemia de jejum dos animais suplementados com óleo de peixe submetidos a dieta balanceada ou hiperlipídica. A suplementação com óleo de peixe reduziu significativamente o índice HOMA-IR dos animais que receberam dieta hiperlipídica, indicando maior sensibilidade à insulina.

A suplementação com óleo de peixe causou redução na razão PUFAs n-6 : n-3 no fígado e plasma dos animais submetidos a ambas as dietas. A proporção considerada ótima de PUFAs n-6 : n-3 na dieta seria entre 1-4 : 1 (PATTERSON et al., 2012). Entretanto, com as mudanças de hábitos nutricionais nos países industrializados, essa razão aumentou para 10 : 1 a 20 : 1 (OLIVIER et al., 2011). Em paralelo, aumentou também a incidência de patologias envolvendo processos inflamatórios como doenças cardiovasculares, obesidade, DMT2, artrite reumatóide e câncer. Assim, os efeitos anti-obesogênicos ou anti-inflamatórios da suplementação com óleo de peixe podem ser explicados nesse estudo pela alteração efetiva na razão PUFA n-6 : n-3 no fígado e no plasma dos animais.

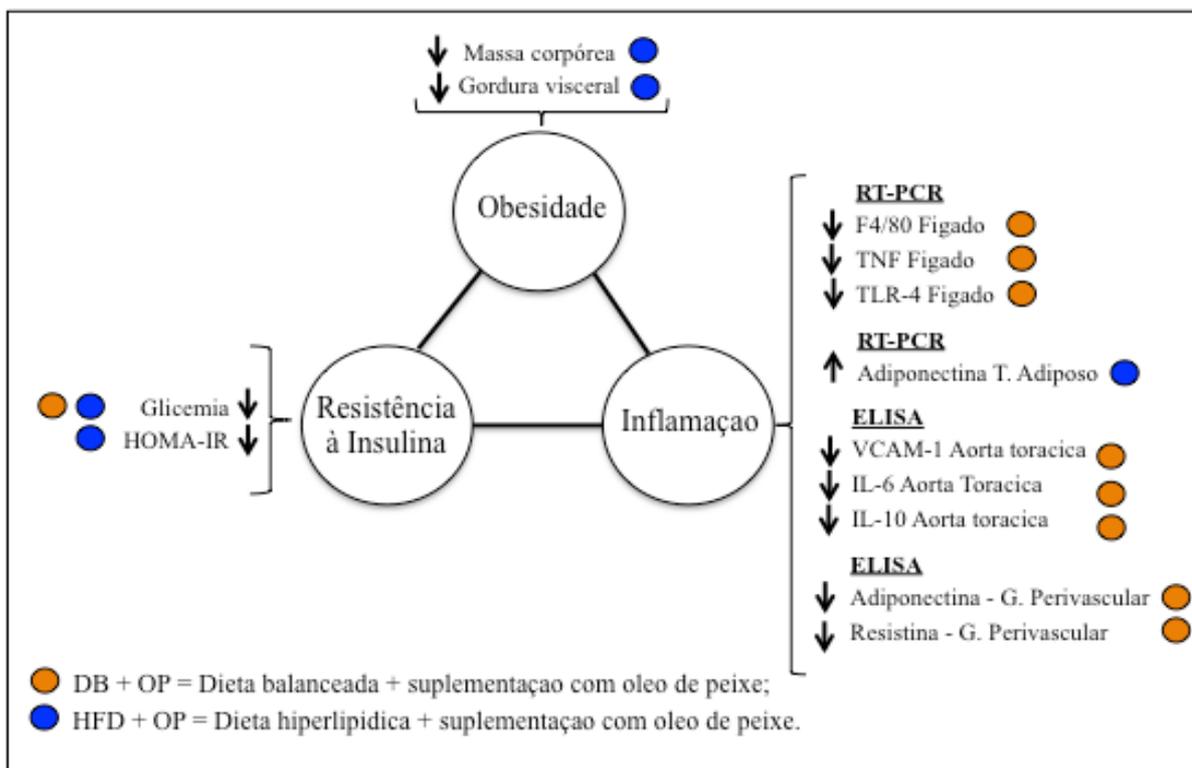
A primeira descrição de que uma dieta hiperlipídica (“high-fat diet”) induz obesidade por intervenção nutricional foi feita em 1959 (MASEK; FABRY, 1959). Em estudos subsequentes foi observado que dietas ricas em lipídios promovem hiperglicemia, resistência à insulina e inflamação. Entretanto, várias dietas com composições de ácidos graxos muito diferentes são consideradas como “high-fat diet”. Isso leva inevitavelmente a variabilidades consideráveis nos resultados descritos. Foi utilizada nesse estudo uma dieta rica em gordura

contendo proporções similares de ácidos graxos saturados (ácido palmítico e esteárico) e monoinsaturados (ácido oléico) e em menor quantidade ácido graxo poliinsaturado da família n-6 (ácido linoléico). Os resultados observados no presente estudo podem ser devido a proporção quantitativa entre os ácidos graxos presentes na dieta, que causou obesidade e resistência à insulina mas não induziu inflamação hepática, no tecido adiposo epididimal, na aorta torácica e gordura perivascular.

O acúmulo de ácidos graxos saturados de cadeia longa em células endoteliais leva à disfunção vascular (SCHAFFER, 2003; UNGER, 2002). Harvey et al. (2010) demonstraram que os ácidos palmítico e esteárico induzem respostas pró-inflamatórias e iniciam a apoptose de células endoteliais de aorta de humanos (HAEC). Os mesmos autores também verificaram que o ácido oléico reduz os efeitos inflamatórios induzidos por ácidos graxos saturados em células endoteliais de aorta de humanos (HAEC), diminuindo a incorporação do ácido esteárico e a ativação de NF- $\kappa$ B .

O ácido oléico protege contra os efeitos lipotóxicos induzidos pelo ácido palmítico em células do ovário de hamster chineses (LISTENBERGER et al., 2003). Gao et al. (2009) verificaram que o efeito protetor do ácido oléico na resistência à insulina induzida pelo ácido palmítico em miotubos L6 é dependente de fosfoinositídeo 3-quinase (GAO; GRIFFITHS; BAILEY, 2009). Em células cancerígenas de mamas (MDA-MB-231), o ácido oléico diminuiu a capacidade dos ácidos graxos saturados de induzirem apoptose (HARDY et al., 2003). Sendo assim, os resultados encontrados no presente estudo podem ser decorrentes da proporção entre os ácidos graxos monoinsaturados e saturados da dieta hiperlipídica utilizada. Não foi observada inflamação na aorta torácica e na gordura perivascular dos animais C57Bl/6J submetidos a dieta hiperlipídica e suplementados com óleo de peixe.

Em resumo, conforme apresentado na Figura 29, a suplementação com óleo de peixe apresentou efeitos anti-inflamatórios quando associada à dieta balanceada e anti-obesogênico com melhora na sensibilidade à insulina na presença da dieta hiperlipídica. Assim como demonstrado anteriormente, os efeitos do óleo de peixe sobre a obesidade, resistência à insulina e inflamação não ocorreram de modo interligado. A suplementação com óleo de peixe alterou a composição de ácidos graxos no plasma e fígado dos animais submetidos à ambas as dietas. A inibição do receptor TLR-4 pelos ácidos graxos poliinsaturados n-3 pode ter resultado nos efeitos anti-obesogênicos observados (LIU et al., 2013).



**Figura 29.** Efeitos da suplementação com óleo de peixe associado às dietas balanceada ou hiperlipídica sobre os parâmetros que caracterizam obesidade, resistência à insulina e inflamação.

Os receptores do tipo *toll-like* reconhecem ligantes endógenos e promovem inflamação crônica não-infecciosa (NAGAI; WATANABE; TAKATSU, 2013). Ácidos graxos livres podem se ligar ao receptor TLR-4 ativando vias de sinalização que promovem produção e liberação de citocinas inflamatórias (VOLPE; NOGUEIRA-MACHADO, 2013). A ação dos ácidos graxos no receptor TLR-4 é um potencial alvo terapêutico no controle da inflamação e por isso foi investigado nesse estudo na vigência de dieta hiperlipídica e suplementação com óleo de peixe.

A dieta hiperlipídica administrada por 8 semanas induziu aumento no ganho de massa corpórea, no peso dos depósitos de gordura retroperitoneal, epididimal e mesentérico, glicemia e insulinemia, nos animais TLR-4<sup>-/-</sup> em relação aos *knockouts* alimentados com dieta balanceada. A suplementação com óleo de peixe associada à dieta balanceada levou ao aumento do LDL-colesterol sérico, insulinemia e resistência à insulina nos animais *knockouts* comparado aos não suplementados. A suplementação com óleo de peixe em animais TLR-4<sup>-/-</sup> não reduziu o ganho de massa corpórea induzido pela dieta hiperlipídica, como ocorreu nos animais C57Bl/6J apresentados anteriormente.

A participação do receptor TLR-4 nas complicações metabólicas não está esclarecida e vários modelos de deficiência desse receptor foram estudados. Dois modelos de camundongos

naturalmente resistentes ao LPS foram identificados: a deficiência espontânea da função do receptor (C3H/HeJ) e a deleção do gene TLR4 (C57Bl/10ScN e C57Bl/6J) (DAVIS et al., 2008; POLTORAK et al., 1998). Outro modelo foi gerado usando a recombinação de cromossomos homólogos (HOSHINO et al., 1999). A composição corporal difere entre os modelos quando os animais são submetidos à dieta hipercalórica, sem alteração (POGGI et al., 2007) ou com redução do peso corporal (DAVIS et al., 2008; SUGANAMI et al., 2007; TSUKUMO et al., 2007) em camundongos C3H/HeJ e C57Bl/10ScN, e sem alteração ou com aumento do peso corporal em camundongos TLR4<sup>-/-</sup> (C57Bl/6J) (SHI et al., 2006). Ainda não está esclarecido se a divergência entre os resultados é devido aos diferentes modelos de mutações no receptor TLR-4, linhagem de camundongos ou ainda por outros fatores como dieta ou idade (KIM; SEARS, 2010). No presente estudo, observou-se que os camundongos *knockouts* para o receptor TLR-4 alimentados com dieta balanceada e suplementados com óleo de peixe apresentam aumento no ganho de massa corporal, nos depósitos de gordura visceral, redução no conteúdo de AG monoinsaturados e PUFAs n-3 no fígado, em relação aos animais C57Bl/6J que apresentam integridade do receptor.

Em estudos anteriores (DAVIS et al., 2008; POGGI et al., 2007; TSUKUMO et al., 2007) foi demonstrado que camundongos sem o receptor TLR-4 funcional são protegidos da obesidade e resistência à insulina induzida pela dieta hiperlipídica. Outros autores observaram que a deleção do receptor TLR-4 promove obesidade (SUGANAMI et al., 2007), resistência a insulina (VIJAY-KUMAR et al., 2011), hiperlipidemia (VIJAY-KUMAR et al., 2010) e um fenótipo diabético em camundongos. A dieta rica em lipídios pode alterar a microflora do ceco, a primeira parte do intestino grosso, o qual recebe o conteúdo proveniente do intestino delgado e tem como função a reabsorção de água e alguns nutrientes. A alteração da microflora do ceco pode modificar a barreira intestinal e a translocação de produtos microbianos, levando à ativação de vias independentes do receptor TLR-4 associadas com inflamação, resistência à insulina, dislipidemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia. Essas condições associadas podem ser exacerbadas na ausência do receptor TLR-4 funcional (VIJAY-KUMAR et al., 2011) e faz-se necessário estudo mais detalhado para explicar esses mecanismos.

Foi demonstrado nesse estudo que a deleção do receptor TLR4 atenua a obesidade induzida pela dieta hiperlipídica mas a suplementação com óleo de peixe reverte esse efeito. O aumento do peso corporal nos animais *knockouts* para o receptor TLR-4, suplementados com óleo de peixe e alimentados com dieta hiperlipídica, sugere correlação do efeito protetor dos PUFAs n-3 na obesidade e a integridade desse receptor. A suplementação com óleo de

peixe nos animais *knockouts* alimentados com dieta hiperlipídica aumentou a porcentagem de gordura hepática, conteúdo hepático de AG monoinsaturados e PUFAs n-6 e redução de AG saturados. Esse é o primeiro estudo a demonstrar que na ausência do receptor TLR-4 os efeitos anti-obesogênicos do óleo de peixe associados à dieta hiperlipídica são atenuados.

Em estudos *in vitro* foi demonstrado que ácidos graxos saturados ativam a sinalização do receptor TLR-4 (ISHIKADO et al., 2009; LEE et al., 2003; STOVER et al., 2004). Os mecanismos moleculares pelos quais os ácidos graxos alteram a sinalização dependente do receptor TLR-4 ainda não foram elucidados. A cadeia de lipídio A presente na estrutura do LPS se liga diretamente a estrutura do complexo MD2-TLR4 (PARK et al., 2009). O mesmo deve ocorrer com os ácidos graxos saturados livres. Outra possibilidade é de que os ácidos graxos saturados podem ser convertidos em ligantes do TLR-4, como por exemplo ceramida que tem estrutura similar ao lipídio A (JOSEPH et al., 1994) e pode desencadear respostas celulares dependentes de TLR-4 (BARBER; PERERA; VOGEL, 1995), além de agir como intermediário nas respostas dependentes de TLR-4 desencadeadas pelo LPS e outros estímulos (CUSCHIERI et al., 2007; FISCHER et al., 2007; JOSEPH et al., 1994). Haversen et al. (2009) demonstraram que o ácido palmítico (C16:0) é convertido em ceramida antes de apresentar efeitos pró-inflamatórios. O aumento na secreção e expressão de RNA mensageiro de citocinas induzido pelo ácido palmítico em células THP-1 é atenuado pela inibição da síntese *de novo* de ceramida e esse efeito é mimetizado pelo tratamento com ceramida *in vitro* (HAVERSEN et al., 2009). Em contraste aos ácidos graxos saturados, os PUFA n-3 podem ser metabolizados em resolvinas, que são moléculas antiinflamatórias (SERHAN et al., 2002) ou atenuar indiretamente as respostas induzidas por LPS ativando receptores dependentes de PPARs (LI et al., 2005).

Ácidos graxos saturados e poliinsaturados podem também atuar na sinalização do receptor TLR por modificação na composição lipídica e protéica dos microdomínios de membrana, denominados *lipid rafts*, para os quais o receptor TLR-4 é translocado quando ativado (TRIANTAFILOU et al., 2002). Os ácidos graxos saturados se intercalam na estrutura glicolipoprotéica rica em colesterol dos *lipid rafts* da membrana e a maioria das proteínas é palmitoilada e/ou miristoilada (MELKONIAN et al., 1999) ativando a molécula adaptadora relacionada-TRIF (TRAM), um co-adaptador pra TRIF na via do TLR-4 (RESH, 2004; ROWE et al., 2006). Em contrapartida, PUFAs n-3 desorganizam a estrutura e a composição lipídica da membrana plasmática (CALDER, 2013; CHAPKIN et al., 2008; LI et al., 2006), alterando a sinalização protéica dos *lipid rafts* (STULNIG et al., 2001; ZEYDA et al., 2002) e

reduzindo a presença do receptor TLR-4 na superfície celular (DE SMEDT-PEYRUSSE et al., 2008).

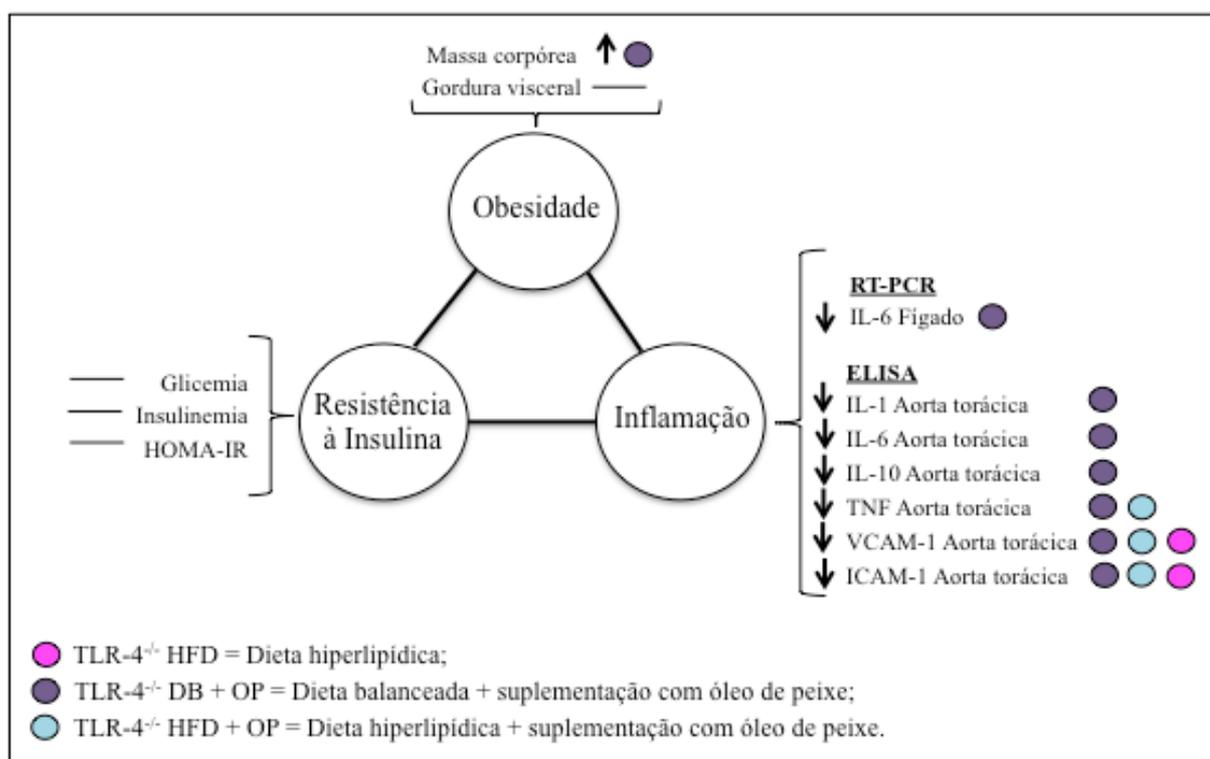
A ativação de TLR4 pode diminuir a ação da insulina diretamente, por meio de ativação de quinases pró-inflamatórias e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e, indiretamente, por ativação da cascata de sinalização de citocinas e liberação sistêmica de fatores pró-inflamatórios (KIM; SEARS, 2010). Duas vias de sinalização são iniciadas pela ativação do receptor TLR-4. Uma delas, modulada por MyD88 e TIRAP, ativa IKK, p38, JNK, CREB, AP2 e NFkB e leva à indução da expressão de genes pró-inflamatórios. A outra via, modulada por TRAM e TRIF, requer internalização do receptor TLR-4, ativa IKK, NF-kB e IRF3 e leva à indução de genes como interferon- $\gamma$  (LUCAS; MAES, 2013). A ativação transcricional induzida por essas vias leva à expressão de centenas de genes, dependendo do tipo celular, que propaga os mecanismos de defesa da imunidade inata.

Observou-se no presente estudo que animais sem o receptor TLR-4 mantidos em dieta balanceada, com ou sem suplementação de óleo de peixe, apresentam redução na expressão gênica hepática de F4/80, IL-1 $\beta$  e IL-6 em relação aos animais C57Bl/6J também alimentados com dieta balanceada. A expressão de RNA mensageiro de TNF- $\alpha$  no fígado dos animais TLR<sup>-/-</sup> recebendo dieta balanceada foi aumentada em relação aos C57Bl/6J. Na aorta torácica, a deleção do receptor TLR-4 levou à redução do conteúdo protéico de IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , ICAM-1 e VCAM-1 nos animais alimentados com dieta balanceada, suplementados ou não com óleo de peixe. De forma similar, Chen et al. (2013) demonstraram que, em porcos submetidos a lesão hepática dependente de macrófago por injeção de *E. coli* LPS, a suplementação com óleo de peixe na dieta atenua a inflamação reduzindo a expressão de citocinas hepáticas pró-inflamatórias, inibindo a via de sinalização do receptor TLR-4 (CHEN et al., 2013).

O efeito da dieta hiperlipídica na obesidade, apesar de ter sido atenuado nos animais *knockouts* TLR-4<sup>-/-</sup>, aumentou o conteúdo protéico de TNF- $\alpha$  e IL-10 na aorta torácica. A suplementação com óleo de peixe nos animais com deleção do receptor exacerbou a obesidade, aumentou a expressão gênica de TNF- $\alpha$ , IL-6 e F4/80 no fígado e o conteúdo protéico de IL-1 $\beta$  na aorta torácica. Nossos dados corroboram com os de Davis et al. (2008). Esses autores mostraram que a deleção do gene TLR-4 em camundongos C57Bl/10ScN não atenua a inflamação no tecido adiposo, indicada pela expressão do RNA mensageiro de TNF- $\alpha$  e IL-6, induzida por dieta hiperlipídica durante 16 semanas. Da mesma forma, Ding et al.

(2012) mostraram que a deficiência do receptor TLR-4 diminui a aterosclerose sem alterar a inflamação induzida pela obesidade e resistência à insulina em camundongos *knockouts* para o receptor de LDL. Liu et al. (2013) demonstraram que ratos machos Sprague-Dawley tratados por 16 semanas em uma dieta com razão 1:1 entre PUFA n-3/ n-6 apresentam redução de TNF- $\alpha$ , IL-6 e de proteína C reativa na circulação com redução de proteína e RNA mensageiro de TLR-4.

Conforme apresentado na Figura 30, a suplementação com óleo de peixe aumentou o ganho de massa corpórea nos animais *knockouts* alimentado com dieta balanceada em relação aos C57Bl/6J, mas reduziu a inflamação no fígado e aorta torácica. A dieta hiperlipídica, com ou sem a suplementação, diminuiu a inflamação na aorta torácica dos animais *knockouts* em relação aos C57Bl/6J sob o mesmo tratamento. Assim, os efeitos anti-obesogênicos da suplementação com óleo de peixe são dependentes da integridade do receptor TLR-4.



**Figura 30.** Efeitos da suplementação com óleo de peixe associado às dietas balanceada ou hiperlipídica sobre os parâmetros que caracterizam obesidade, resistência à insulina e inflamação em camundongos *knockouts* para a proteína TLR-4 em relação aos animais C57Bl/6J com integridade do receptor.

# *8 CONCLUSÕES*

- O consumo excessivo de gordura ou açúcar ou ambos por 8 semanas causa obesidade em camundongos C57Bl/6J. A associação desses macronutrientes na dieta potencializa a obesidade e induz resistência à insulina e inflamação no tecido adiposo e gordura perivascular da aorta torácica;
- a suplementação com óleo de peixe por 12 semanas altera a composição de ácidos graxos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados n-6 e n-3 no fígado e no plasma dos animais C57Bl/6J reduzindo a inflamação associada à dieta balanceada e a obesidade e resistência à insulina na vigência de dieta hiperlipídica;
- os efeitos anti-obesogênicos e anti-diabéticos da suplementação com óleo de peixe na dieta hiperlipídica dependem da integridade do TLR-4, uma vez que esses são abolidos nos animais *knockouts* para esse receptor.

# *REFERÊNCIAS*

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- ABETE, I.; GOYENECHEA, E.; ZULET, M. A.; MARTINEZ, J. A. Obesity and metabolic syndrome: potential benefit from specific nutritional components. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v. 21, p. 1-15, 2011.
- ADIELS, M.; OLOFSSON, S. O.; TASKINEN, M. R.; BORÉN, J. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 28, p. 1225-1236, 2008.
- AHMED, S. H. The science of making drug-addicted animals. **Neuroscience**, v. 211, p. 107-125, 2012.
- ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabet. Med.**, v. 15, p. 539-553, 1998
- ALLEN, P. J.; BATRA, P.; GEIGER, B. M.; WOMMACK, T.; GILHOOLY, C.; POTHOS, E. N. Rationale and consequences of reclassifying obesity as an addictive disorder: neurobiology, food environment and social policy perspectives. **Physiol. Behav.**, v. 107, p. 126-137, 2012.
- AL-OFI, E.; COFFELT, S. B.; ANUMBA, D. O. Monocyte subpopulations from pre-eclamptic patients are abnormally skewed and exhibit exaggerated responses to toll-like receptor ligands. **Plos One**, v. 7, p. 1-13, 2012.
- ANAND, R. G.; ALKADRI, M.; LAVIE, C. J.; MILANI, R. V. The role of fish oil in arrhythmia prevention. **J. Cardiopulm. Rehabil. Prev.**, v. 28, p. 92-98, 2008.
- ANDERSEN, G.; HARNACK, K.; ERBERSDOBLER, H. F.; SOMOZA, V. Dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid are more effective than alpha-linolenic acid in improving insulin sensitivity in rats. **Ann. Nutr. Metab.**, v. 52, p. 250-256, 2008.
- ARBOUR, N. C.; LORENZ, E.; SCHUTTE, B. C.; ZABNER, J.; KLINE, J. N.; JONES, M.; FREES, K.; WATT, J. L.; SCHWARTZ, D. A. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. **Nat. Genet.**, v. 25, p. 187-191, 2000.
- ASTRUP, A.; RYAN, L.; GRUNWALD, G. K.; STORGAARD, M.; SARIS, W.; MELANSON, E.; HILL, J. O. The role of dietary fat in body fatness: evidence from a preliminary meta-analysis of ad libitum low-fat dietary intervention studies. **Br. J. Nutr.**, v. 83, p. 25-32, 2000.
- AVENA, N. M.; RADA, P.; HOEBEL, B. G. Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 32, p. 20-39, 2008.

---

<sup>1</sup> De acordo com:

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

AVRAM, A. S.; AVRAM, M. M.; JAMES, W. D. Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 53, p. 671-683, 2005.

BAILLIE, R. A.; TAKADA, R.; NAKAMURA, M.; CLARKE, S. D. Coordinate induction of peroxisomal acyl-CoA oxidase and UCP-3 by dietary fish oil: a mechanism for decreased body fat deposition. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 60, p. 351-356, 1999.

BAKER, R. G.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- $\kappa$ B, inflammation, and metabolic disease. **Cell Metab.**, v. 13, p. 11-22, 2011.

BALKAU, B.; CHARLES, M. A. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). **Diabet. Med.**, v. 16, p. 442-443, 1999.

BALLARD, K. D.; MAH, E.; GUO, Y.; PEI, R.; VOLEK, J. S.; BRUNO, R. S. Low-fat milk ingestion prevents postprandial hyperglycemia-mediated impairments in vascular endothelial function in obese individuals with metabolic syndrome. **J. Nutr.**, v. 143, p. 1602-1610, 2013.

BARBER, S. A.; PERERA, P. Y.; VOGEL, S. N. Defective ceramide response in C3H/HeJ (Lpsd) macrophages. **J. Immunol.**, v. 155, p. 2303-2305, 1995.

BARRINGTON, W. E.; BERESFORD, S. A.; MCGREGOR, B. A.; WHITE, E. Perceived Stress and Eating Behaviors by Sex, Obesity Status, and Stress Vulnerability: Findings from the Vitamins and Lifestyle (VITAL) Study. **J. Acad. Nutr. Diet.** doi: 10.1016/j.jand.2014.03.015, 2014.

BASTARD, J. P.; MAACHI, M.; VAN NHIEU, J. T.; JARDEL, C.; BRUCKERT, E.; GRIMALDI, A.; ROBERT, J. J.; CAPEAU, J.; HAINQUE, B. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, p. 2084-2089, 2002.

BAYS, H. E.; MAKI, K. C.; DOYLE, R. T.; STEIN, E. The effect of prescription omega-3 fatty acids on body weight after 8 to 16 weeks of treatment for very high triglyceride levels. **Postgrad. Med.**, v. 121, p. 145-150, 2009.

BELZUNG, F.; RACLOT, T.; GROSCOLAS, R. Fish oil n-3 fatty acids selectively limit the hypertrophy of abdominal fat depots in growing rats fed high fat-diets. **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. 1111-1118, 1993.

BENOIT, B.; PLAISANCIÉ, P.; AWADA, M.; GÉLOEN, A.; ESTIENNE, M.; CAPEL, F.; MALPUECH-BRUGÈRE, C.; DEBARD, C.; PESENTI, S.; MORIO, B.; VIDAL, H.; RIEUSSET, J.; MICHALSKI, M. C. High-fat diet action on adiposity, inflammation, and insulin sensitivity depends on the control low-fat diet. **Nutr. Res.**, v. 33, p. 952-960, 2013.

BERTHET, J.; DAMIEN, P.; HAMZEH-COGNASSE, H.; POZZETTO, B.; GARRAUD, O.; COGNASSE, F. Toll-like receptor 4 signal transduction in platelets: novel pathways. **Br. J. Haematol.**, v. 151, p. 89-92, 2010.

BHATENA, S. J.; VELASQUEZ, M. T. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity

and diabetes. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 76, p. 1191-1201, 2002.

BILTON, R. Averting comfortable lifestyle crises. **Sci. Prog.**, v. 96, p. 319-368, 2013.

BLUHER, M. Adipokines - removing road blocks to obesity and diabetes therapy. **Mol. Metab.**, v. 3, p. 230-240, 2014.

BODEN, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. **Diabetes**, v. 46, p. 3-10, 1997.

BOOTH, G.; STALKER, T. J.; LEFER, A. M.; SCALIA, R. Mechanisms of amelioration of glucose-induced endothelial dysfunction following inhibition of protein kinase C in vivo. **Diabetes**, v. 51, p. 1556-1564, 2002.

BOUSSEROUEL, S.; BROUILLET, A.; BÉRÉZIAT, G.; RAYMONDJEAN, M.; ANDRÉANI, M. Different effects of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on the activation of rat smooth muscle cells by interleukin-1 beta. **J. Lipid Res.**, v. 44, p. 601-611, 2003.

BROWN, N. K.; ZHOU, Z.; ZHANG, J.; ZENG, R.; WU, J.; EITZMAN, D. T.; CHEN, Y. E.; CHANG, L. Perivascular Adipose Tissue in Vascular Function and Disease: A Review of Current Research and Animal Models. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 2014. [Epub ahead of print].

BRUNN, J. M.; HELGE, J. W.; RICHELSEN, B.; STALLKNECHT, B. Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 290, p. 961-967, 2006.

BUCKLEY, J. D.; HOWE, P. R. Anti-obesity effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Obes. Rev.**, v. 10, p. 648-659, 2009.

BUCOLO, G.; DAVID, H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. **Clin. Chem.**, v. 19, p. 476-482, 1973.

BUETTNER, R.; PARHOFER, K.G.; WOENCKHAUS, M.; WREDE, C. E.; KUNZ-SCHUGHART, L. A.; SCHOLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 36, p. 485-501, 2006.

CALDER, P. C. Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 668, p. 50-58, 2011.

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

CANCELLO, R.; HENEGAR, C.; VIGUERIE, N.; TALEB, S.; POTOU, C.; ROUAULT, C.; COUPAYE, M.; PELLOUX, V.; HUGOL, D.; BOUILLOT, J. L.; BOULOUMIÉ, A.; BARBATELLI, G.; CINTI, S.; SVENSSON, P. A.; BARSH, G. S.; ZUCKER, J. D.; BASDEVANT, A.; LANGIN, D.; CLÉMENT, K. Reduction of macrophage infiltration and

chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. **Diabetes**, v. 54, p. 2277-2286, 2005.

CAO, H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. **J. Endocrinol.**, v. 220, p. 47-59, 2014.

CASANOVA, J. L.; ABEL, L.; QUINTANA-MURCI, L. Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 29, p. 447-491, 2011.

CHAPKIN, R. S.; WANG, N.; FAN, Y. Y.; LUPTON, J. R.; PRIOR, I. A. Docosahexaenoic acid alters the size and distribution of cell surface microdomains. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1778, p. 466-471, 2008.

CHEN, C. C.; HO, C. Y.; CHAUNG, H. C.; TAIN, Y. L.; HSIEH, C. S.; KUO, F. Y.; YANG, C. Y.; HUANG, L. T. Fish omega-3 fatty acids induce liver fibrosis in the treatment of bile duct-ligated rats. **Dig. Dis. Sci.**, v. 58, p.440-447, 2013.

CONTRERAS, G. A.; SORDILLO, L. M. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 34, p. 281-289, 2011.

CUSCHIERI, J.; BULGER, E.; BILLGRIN, J.; GARCIA, I.; MAIER, R. V. Acid sphingomyelinase is required for lipid raft TLR4 complex formation. **Sur. Infect. (Larchmt)**, v. 8, p. 91-106, 2007.

CZECH, M. P.; TENCEROVA, M.; PEDERSEN, D. J.; AOUADI, M. Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. **Diabetologia**, v. 56, p. 949-964, 2013.

DAVIS, J. E.; GABLER, N. K.; WALKER-DANIELS, J.; SPURLOCK, M. E. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, p. 1248-1255, 2008.

DE CATERINA, R.; LIAO, J. K.; LIBBY, P. Fatty acid modulation of endothelial activation. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 71, p. 213-223, 2000.

DE SMEDT-PEYRUSSE, V.; SARGUEIL, F.; MORANIS, A.; HARIZI, H.; MONGRAND, S.; LAYÉ, S. Docosahexaenoic acid prevents lipopolysaccharide-induced cytokine production in microglial cells by inhibiting lipopolysaccharide receptor presentation but not its membrane subdomain localization. **J. Neurochem.**, v. 105, p. 296-307, 2008.

DE FERRANTI, S.; MOZAFFARIAN, D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. **Clin. Chem.**, v. 54, p. 945-955, 2008.

DE VOORDE, J. V.; BOYDENS, C.; PAUWELS, B.; DECALUWE, K. Perivascular adipose tissue, inflammation and vascular dysfunction in obesity. **Curr. Vasc. Pharmacol.**, v. 12, p. 403-411, 2014.

DIMEGLIO, D. P.; MATTES, R. D. Liquid versus solid carbohydrate: effects on food intake and body weight. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 24, p. 794-800, 2000.

DIN, J. N.; HARDING, S. A.; VALERIO, C. J.; SARMA, J.; LYALL, K.; RIEMERSMA, R. A.; NEWBY, D. E.; FLAPAN, A. D. Dietary intervention with oil rich fish reduces platelet-monocyte aggregation in man. **Atherosclerosis**, v. 197, p. 290-296, 2008.

DING, Y.; SUBRAMANIAN, S.; MONTES, V. N.; GOODSPEED, L.; WANG, S.; HAN, C.; TERESA, A. S.; KIM, J.; O'BRIEN, K. D.; CHAIT, A. Toll-like receptor 4 deficiency decreases atherosclerosis but does not protect against inflammation in obese low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 32, p. 1596-1604, 2012.

DIRETRIZES SBD 2009. Disponível em: [http://www.prograd.uff.br/farmacoclinica/sites/default/files/diretrizes09\\_final\\_0.pdf](http://www.prograd.uff.br/farmacoclinica/sites/default/files/diretrizes09_final_0.pdf). Acessado em junho de 2014.

DUIVENVOORDE, L. P.; VAN SCHOTHORST, E. M.; BUNSCHOTEN, A.; KEIJER, J. Dietary restriction of mice on a high-fat diet induces substrate efficiency and improves metabolic health. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 47, p. 81-97, 2011.

DUNCAN, B. B.; SCHMIDT, M. I.; CHAMBLESS, L. E.; FOLSOM, A. R.; HEISS, G. Inflammation markers predict increased weight gain in smoking quitters. **Obes. Res.**, v. 11, p. 1339-1344, 2003.

EHSES, J. A.; ELLINGSGAARD, H.; BONI-SCHNETZLER, M.; DONATH, M. Y. Pancreatic islet inflammation in type 2 diabetes: from alpha and beta cell compensation to dysfunction. **Arch. Physiol. Biochem.**, v. 115, p. 240-247, 2009.

ELLIS, A.; CHENG, Z. J.; LI, Y.; YANG, J.; PANNIRSELVAM, M.; DING, H.; HOLLENBERG, M. D.; TRIGGLE, C. R. Effects of a Western diet versus high glucose on endothelium-dependent relaxation in murine micro- and macro-vasculature. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 601, p. 111-117, 2008.

ENGFELDT, P.; ARNER, P. Lipolysis in human adipocytes, effects of cell size, age and of regional differences. **Horm. Metab. Res. Suppl.**, v. 19, p. 26-29, 1988.

ERLANSON-ALBERTSSON, C. How palatable food disrupts appetite regulation. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 97, p. 61-73, 2005.

ERRIDGE, C.; SAMANI, N. J. Saturated fatty acids do not directly stimulate Toll-like receptor signaling. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 11, p. 1944-1949, 2009.

ESSER, N.; L'HOMME, L.; DE ROOVER, A.; KOHNEN, L.; SCHEEN, A. J.; MOUTSCHEN, M.; PIETTE, J.; LEGRAND-POELS, S.; PAQUOT, N. Obesity phenotype is related to NLRP3 inflammasome activity and immunological profile of visceral adipose tissue. **Diabetologia**, v. 56, doi: 10.1007/s00125-013-3023-9, 2013.

ESSER, N.; LEGRAND-POELS, S.; PIETTE, J.; SCHEEN, A. J.; PAQUOT, N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes Res. Clin. Pract.** doi: 10.1016/j.diabres, 2014.

FAVERO, G.; PAGANELLI, C.; BUFFOLI, B.; RODELLA, L. F.; REZZANI, R. Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: life style intervention. **Biomed. Res. Int.** doi: 10.1155/2014/801896, 2014.

FEDOR, D.; KELLEY, D. S. Prevention of insulin resistance by n-3 polyunsaturated fatty acids. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 12, p. 138-146, 2009.

FENTON, J. I.; HORD, N. G.; GHOSH, S.; GURZELL, E. A. Immunomodulation by dietary long chain omega-3 fatty acids and the potential for adverse health outcomes. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 89, p. 379-390, 2013.

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. **J. Endocrinol. Metab.**, v. 91, p. 439-446, 2006.

FESTA, A.; HANLEY, A. J.; TRACY, R. P.; D'AGOSTINO, R. Jr.; HAFFNER, S. M. Inflammation in the prediabetic state is related to increased insulin resistance rather than decreased insulin secretion. **Circulation**, v. 108, p. 1822-1830, 2003.

FISCHER, H.; ELLSTROM, P.; EKSTROM, K.; GUSTAFSSON, L.; GUSTAFSSON, M.; SVANBORG, C. Ceramide as a TLR4 agonist; a putative signalling intermediate between sphingolipid receptors for microbial ligands and TLR4. **Cell Microbiol.**, v. 9, p. 1239-1251, 2007.

FJELDBORG, R.; PEDERSEN, S. B.; MOLLER, H. J.; CHRISTIANSEN, T.; BENNETZEN, M.; RICHELSEN B. Human adipose tissue macrophages are enhanced but changed to an anti-inflammatory profile in obesity. **J. Immunol. Res.** doi: 10.1155/2014/309548, 2014.

FOGELHOLM, M.; ANDERSSON, S.; GUNNARSDOTTIR, I.; LAHTI-KOSKI, M. Dietary macronutrients and food consumption as determinants of long-term weight change in adult populations: a systematic literature review. **Food Nutr. Res.**, v. 56, p. 1-45, 2012.

FRANSSON, R.; MONAJEMI, H.; STROES, E. S.; KASTELEIN, J. J. Obesity and dyslipidemia. **Med. Clin. North Am.**, v. 95, p. 893-902, 2011.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, p. 763-770, 1998.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDERICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, v. 18, p. 499-502, 1972.

FUENTES, E.; FUENTES, F.; VILAHUR, G.; BADIMON, L.; PALOMO, I. Mechanisms of chronic state of inflammation as mediators that link obese adipose tissue and metabolic syndrome. **Mediator Inflamm.**, ID 136584, p. 1-11, 2013.

FUNG, T. T.; MALIK, V.; REXRODE, K. M.; MANSON, J. E.; WILLETT, W. C.; HU, F. B. Sweetened beverage consumption and risk of coronary heart disease in women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 89, p. 1037-1042, 2009.

GALLI, C.; RISÉ, P. Fish consumption, omega 3 fatty acids and cardiovascular disease. The science and the clinical trials. **Nutr. Health**, v. 20, p. 11-20, 2009.

GARDNER, C. D.; KIAZAND, A.; ALHASSAN, S.; KIM, S.; STAFFORD, R. S.; BALISE, R. R.; KRAEMES, H. C.; KING, A. C. Comparison of the Atkins, Zone, Ornish, and LEARN diets for change in weight and related risk factors among overweight premenopausal women: the A TO Z Weight Loss Study: a randomized trial. **JAMA**, v. 297, p. 969-977, 2007.

GAO, D.; GRIFFITHS, H. R.; BAILEY, C. J. Oleate protects against palmitate-induced insulin resistance in L6 myotubes. **Br. J. Nutr.**, v. 102, p. 1557-1563, 2009.

GAO, M.; ZHANG, C.; MA, Y.; BU, L.; YAN, L.; LIU, D. Hydrodynamic delivery of miL10 gene protects mice from high-fat diet-induced obesity and glucose intolerance. **Mol. Ther.**, v. 21, p. 1852-1861, 2013.

GOMEZ-HERNANDEZ, A.; PERDOMO, L.; ESCRIBANO, O; BENITO, M. Role of brown and perivascular adipose tissue in vascular complications due to obesity. **Clin. Investig. Arterioscler.**, v. 25, p. 36-44, 2013.

GONZALEZ-PERIZ, A.; HORRILLO, R.; FERRÉ, N.; GRONERT, K.; DONG, B.; MORAN-SALVADOR, E.; TITOS, E.; MARTINEZ-CLEMENTE, M.; LOPEZ-PARRA, M.; ARROYO, V.; CLARIA, J. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. **FASEB J.**, v. 23, p. 1946-1957, 2009.

GRAHAM, I.; COONEY, M. T.; BRADLEY, D.; DUDINA, A.; REINER, Z. Dyslipidemias in the prevention of cardiovascular disease: risks and causality. **Curr. Cardiol. Rep.**, v. 14, p. 709-720, 2012.

GREENSTEIN, A.S.; KHAVANDI, K.; WITHERS, S.B.; SONOYAMA, K.; CLANCY, O.; JEZIORSKA, M.; LAING, I.; YATES, A. P.; PEMBERTON, P. W.; MALIK R. A.; HEAGERTY, A. M. Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. **Circulation**, v. 119, p. 1661-1670, 2009.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 29, p. 415-445, 2011.

GROSS, L. S.; LI, L.; FORD, E. S.; LIU, S. Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 79, p. 774-779.

HAGEMAN, R. S.; WAGENER, A.; HANTSCHHEL, C.; SVENSON, K. L.; CHURCHILL, G. A.; BROCKMANN, G. A. High-fat diet leads to tissue-specific changes reflecting risk factors for diseases in DBA/2J mice. *Physiol. Genomics*, v. 42, p. 55-66, 2010.

HAINAULT, I.; CAROLOTTI, M.; HAJDUCH, E.; GUICHARD, C.; LAVAU, M. Fish oil in a high lard diet prevents obesity, hyperlipemia, and adipocyte insulin resistance in rats. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 683, p. 98-101, 1993.

HARDY, S.; EL-ASSAAD, W.; PRZYBYTKOWSKI, E.; JOLY, E.; PRENTKI, M.; LANGELIER, Y. Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. A role for cardiolipin. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 31861-31870, 2003.

HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutr. Res. Rev.**, v. 23, p. 270-299, 2010.

HARVEY, K. A.; WALKER, C. L.; XU, Z.; WHITLEY, P.; PAVLINA, T. M.; HISE, M.; ZALOGA, G. P.; SIDDIQUI, R. A. Oleic acid inhibits stearic acid-induced inhibition of cell growth and pro-inflammatory responses in human aortic endothelial cells. **J. Lipid Res.**, v. 51, p. 3470-3480, 2010.

HARRINGTON, L.S.; LUNDBERG, M. H.; WAIGHT, M.; ROZARIO, A.; MITCHELL, J. A. Reduced endothelial dependent vasodilation in vessels from TLR(-/-) mice is associated with increased superoxide generation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 408, p. 511-515, 2011.

HARRIS, W. S. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: a case for omega-3 index as a new risk factor. **Pharmacol. Res.**, v. 55, p. 217-223, 2007

HAUGAARD, S. B.; MADSBAD, S.; HOY, C. E.; VAAG, A. Dietary intervention increases n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in skeletal muscle membrane phospholipids of obese subjects. Implications for insulin sensitivity. **Clin. Endocrinol.**, v. 64, p. 169-78, 2006.

HAVERSEN, L.; DANIELSSON, K. N.; FOGELSTRAND, L.; WIKLUND, O. Induction of proinflammatory cytokines by long-chain saturated fatty acids in human macrophages. **Atherosclerosis**, v. 202, p. 382-393, 2009.

HE, K.; LIU, K.; DAVIGLUS, M. L.; JENNY, N. S.; MAYER-DAVIS, E.; JIANG, R.; STEFFEN, L.; SISCOVICK, D.; TSAI, M.; HERRINGTON, D. Associations of dietary long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and fish with biomarkers of inflammation and endothelial activation (from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis [MESA]). **Am. J. Cardiol.**, v. 103, p. 1238-1243. 2009

HELLERSTEIN, M. K. Carbohydrate-induced hypertriglyceridemia: modifying factors and implications for cardiovascular risk. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 13, p. 33-40, 2002.

HENRICHOT, E.; JUGE-AUBRY, C. E.; PERNIN, A.; PACHE, J. C.; VELEBIT, V.; DAYER, J. M.; MEDA, P.; CHIZZOLINI, C.; MEIER, C. A. Production of chemokines by perivascular adipose tissue: a role in the pathogenesis of atherosclerosis? **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 25, p. 2594-2599, 2005.

HENRY, R. J.; CHIAMORI, N.; GOLUB, O. J.; BERKMAN, S. Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase, and lactic acid dehydrogenase. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 34, p. 381-398, 1960.

HERDER, C.; PELTONEN, M.; KOENIG, W.; KRAFT, I.; MULLER-SCHOLZE, S.; MARTIN, S.; LAKKA, T.; ILANNE-PARIKKA, P.; ERIKSSON, J. G.; HAMALAINEN, H.; KEINANEN-KIUKAANNIEMI, S.; VALLE, T. T.; UUSITUPA, M.; LINDSTROM, J.; KOLB, H.; TUOMILEHTO, J. Systemic immune mediators and lifestyle changes in the prevention of type 2 diabetes: results from the Finnish Diabetes Prevention Study. **Diabetes**, v. 55, p. 2340-2346, 2006.

HOLLESTELLE, S. C.; DE VRIES, M. R.; VAN KEULEN, J. K.; SCHONEVELD, A. H.; VINK, A.; STRIJDER, C. F.; VAN MIDDELAAR, B. J.; PASTERKAMP, G.; QUAX, P. H.; DE KLEIJN, D. P. Toll-like receptor 4 is involved in outward arterial remodeling. **Circulation**, v. 109, p. 393-398, 2004.

HOSHINO, K.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; SANJO, H.; OGAWA, T.; TAKEDA, Y.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. **J. Immunol.**, v. 162, p. 3749-3752, 1999.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, p.860-867, 2006.

HOTAMISLIGIL, G. S.; ARNER, P.; CARO, J. F.; ATKINSON, R. L.; SPIEGELMAN, B. M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 95, p. 2409-2415, 1995.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, p. 87-91, 1993.

HOUSEKNECHT, K. L.; BAILE, C. A.; MATTERI, R. L.; SPURLOCK, M. E. The biology of leptin: a review. **J. Anim. Sci.**, v. 76, p. 1405-1420, 1998.

HUANG, H.; FLETCHER, A.; NIU, Y.; WANG, T. T.; YU, L. Characterization of lipopolysaccharide-stimulated cytokine expression in macrophages and monocytes. **Inflamm. Res.**, v. 61, p. 1329-1338, 2012.

HUANG, W.; METLAKUNTA, A.; DEDOUSIS, N.; ZHANG, P.; SIPULA, I.; DUBE, J. J.; SCOTT, D. K.; O'DOHERTY, R. M. Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. **Diabetes**, v. 59, p. 347-357, 2010.

IBRAHIM, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obes. Rev.**, v. 11, p. 11-18, 2010.

IFLAND, J. R.; PREUSS, H. G.; MARCUS, M. T.; ROURKE, K. M.; TAYLOR, W. C.; BURAU, K.; JACOBS, W. S.; KADISH, W.; MANSO, G. Refined food addiction: a classic substance use disorder. **Med. Hypotheses**, v. 72, p. 518-526, 2009.

IKEOKA, D.; MADER, J. K.; PIEBER, T. R. Adipose tissue, inflammation and cardiovascular disease. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 56, p. 116-121, 2010.

ISHIKADO, A.; NISHIO, Y.; MUKOSE, A.; MORINO, K.; MURAKAMI, Y.; SEKINE, O.; MAKINO, T.; MAEGAWA, H.; KASHIWAGI, A. Soy phosphatidylcholine inhibited TLR4-mediated MCP-1 expression in vascular cells. **Atherosclerosis**, v. 205, p. 404-412, 2009.

ISKEN, F.; KLAUSS, S.; OSTERHOFF, M.; PFEIFFER, A. F.; WEICKERT, M. O. Effects of long-term soluble vs. insoluble dietary fiber intake on high-fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice. **J. Nutr. Biochem.**, v. 21, p. 278-284, 2010.

ITOH, M.; SUGANAMI, T.; SATOH, N.; TANIMOTO-KOYAMA, K.; YUAN, X.; TANAKA, M.; KAWANO, H.; YANO, T.; AOE, S.; TAKEYA, M.; SHIMATSU, A.; KUZUYA, H.; KAMEI, Y.; OGAWA, Y. Increased adiponectin secretion by highly purified eicosapentaenoic acid in rodent models of obesity and human obese subjects. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 27, p. 1918-1925, 2007.

JELENIK, T.; ROSSMEISL, M.; KUDA, O.; JILKOVA, Z. M.; MEDRIKOVA, D.; KUS, V.; HENSLER, M.; JANOVSKA, P.; MIKSIK, I.; BARANOWSKI, M.; GORSKI, J.; HÉBRARD, S.; JENSEN, T. E.; FLACHS, P.; HAWLEY, S.; VIOLLET, B.; KOPECKY, J. AMP-activated protein kinase  $\alpha 2$  subunit is required for the preservation of hepatic insulin sensitivity by n-3 polyunsaturated fatty acids. **Diabetes**, v. 59, p. 2737-2746, 2010.

JOHNSON, A. M.; OLEFSKY, J. M. The origins and drivers of insulin resistance. **Cell**, v. 152, p. 673-684, 2013.

JOHNSON, R. K.; APPEL, L. J.; BRANDS, M.; HOWARD, B. V.; LEFEVRE, M.; LUSTIG, R. H.; SACKS, F.; STEFFEN, L. M.; WYLIE-ROSETT, J. Dietary sugars intake and cardiovascular health: a scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**, v. 120, p. 1011-1020, 2009.

JOSEPH, C. K.; WRIGHT, S. D.; BORNMANN, W. G.; RANDOLPH, J. T.; KUMAR, E. R.; BITTMAN, R.; LIU, J.; KOLESNICK, R. N. Bacterial lipopolysaccharide has structural similarity to ceramide and stimulates ceramide-activates protein kinase in myeloid cells. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 17606-17610, 1994.

JUANOLA-FALGARONA, M.; SALAS-SALVADO, J.; IBARROLA-JURADO, N.; RABASSA-SOLER, A.; DIAZ-LOPEZ, A.; GUASCH-FERRÉ, M.; HERNANDEZ-ALONSO, P.; BALANZA, R.; BULLO, M. Effect of the glycemic index of the diet on weight loss, modulation of satiety, inflammation, and other metabolic risk factors: a randomized controlled trial. **Am. J. Clin. Nutr.** 2014. [Epub ahead of print].

JUNG, U. J.; CHOI, M. S. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, p. 6184-6223, 2014.

KALUPAHANA, N. S.; CLAYCOMBE, K. J.; MOUSTAID-MOUSSA, N. (n-3) Fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: mechanistic insights. **Adv. Nutr.**, v. 2, p. 304-316, 2011.

KALUPAHANA, N. S.; CLAYCOMBE, K. J.; NEWMAN, S. J.; STEWART, T.; SIRIWARDHANA, N.; MATTHAN, N.; LICHTENSTEIN, A. H.; MOUSTAID-MOUSSA,

N. Eicosapentaenoic acid prevents and reverses insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice via modulation of adipose tissue inflammation. **J. Nutr.**, v. 140, p. 1915-1922.

KANEKO, H.; ANZAI, T.; HORIUCHI, K.; MORIMOTO, K.; ANZAI, A.; NAGAI, T.; SUGANO, Y.; MAEKAWA, Y.; ITOH, H.; YOSHIKAWA, T.; OKADA, Y.; OGAWA, S.; FUKUDA, K. Tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme inactivation ameliorates high-fat diet-induced insulin resistance and altered energy homeostasis. **Circ. J.**, v. 75, p. 2482-2490, 2011.

KANG, J. Y.; LEE, J. O. Structural biology of the Toll-like receptor family. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 80, p. 917-941, 2011.

KARMEN, A. A note on the spectrometric assay of glutamic-oxalacetic transaminase in human blood serum. **J. Clin. Invest.**, v. 34, p. 131-133, 1955.

KAUR, J. A Comprehensive review on metabolic syndrome. **Cardiol. Res. Pract.**, artigo 943162, 2014.

KELL, K. P.; CARDEL, M. I.; BOHAN BROWN, M. M.; FERNANDEZ, J. R. Added sugars in the diet are positively associated with diastolic blood pressure and triglycerides in children. **Am. J. Clin. Nutr.** 2014. [Epub ahead of print].

KETONEN, J.; SHI, J.; MARTONEN, E.; MERVAALA, E. Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice. **Circ. J.**, v. 74, p. 1479-1487, 2010.

KIM, F.; PHAM, M.; LUTTRELL, I.; BANNERMAN, D. D.; TUPPER, J.; THALER, J.; HAWN, T. R.; RAINES, E. W.; SCHWARTZ, M. W. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. **Circ. Res.**, v. 100, p. 1589-1596, 2007.

KIM, F.; PHAM, M.; MALONEY, E.; RIZZO, N. O.; MORTON, G. J.; WISSE, B. E.; KIRK, E. A.; CHAIT, A.; SCHWARTZ, M. W. Vascular inflammation, insulin resistance, and reduced nitric oxide production precede the onset of peripheral insulin resistance. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 28, p. 1982-1988, 2008.

KIM, J. J.; SEARS, D. D. TLR4 and Insulin Resistance. **Gastroenterol. Res. Pract.**, artigo 212563, p. 1-25, 2010.

KNIGHT, Z. A.; HANNAN, K. S.; GREENBERG, M. L.; FRIEDMAN, J. M. Hyperleptinemia is required for the development of leptin resistance. **Plos One**, v. 5, p. 11376-11385, 2010.

KRAUSS, R. M.; ECKEL, R. H.; HOWARD, B.; APPEL, L. J.; DANIELS, S. R.; DECKELBAUM, R. J.; ERDMAN, J. W. JR.; KRIS-ETHERTON, P.; GOLDBERG, I. J.; KOTCHEN, T. A.; LICHTENSTEIN, A. H.; MITCH, W. E.; MULLIS, R.; ROBINSON, K.; WYLIE-ROSE, J.; ST JEOR, S.; SUTTIE, K.; TRIBBLE, D. L.; BAZZARRE, T. L. AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. **Stroke**, v. 31, p. 2751-2766, 2000.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. **Circulation**, v. 106, p. 2747-2757, 2002.

KUBOTA, N.; TERAUCHI, Y.; YAMAUCHI, T.; KUBOTA, T.; MOROI, M.; MATSUI, J.; ETO, K.; YAMASHITA, T.; KAMON, J.; SATOH, H.; YANO, W.; FROGUEL, P.; NAGAI, R.; KIMURA, S.; KADOWAKI, T.; NODA, T. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 25863-25866, 2002.

KUMAR, G. S.; SWATHI, R.; KRISHNA, A.G. Fat-soluble nutraceuticals and their composition in heat-processed wheat germ and wheat bran. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v. 65, p. 327-334, 2014.

LAWRENCE, G. D. Dietary fats and health: dietary recommendations in the context of scientific evidence. **Adv. Nutr.**, v. 4, p. 294-302, 2013.

LEE, C. C.; AVALOS, A. M.; PLOEGH, H. L. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 12, p. 168-179, 2012.

LEE, H.; LEE, I. S.; CHOUE, R. Obesity, Inflammation and Diet. **Pediatr. Gastroenterol. Hepatol. Nutr.**, v. 16, p. 143-152, 2013.

LEE, J. Y.; PLAKIDAS, A.; LEE, W. H.; HEIKKINEN, A.; CHANMUGAM, P.; BRAY, G.; HWANG, D.H. Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. **J. Lipid Res.**, v. 44, p. 479-486, 2003.

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. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 16683-16689, 2001.

LEHMAN, S. J.; MASSARO, J. M.; SCHLETT, C. L.; O'DONNELL, C. J.; HOFFMANN, U.; FOX, C. S. Peri-aortic fat, cardiovascular disease risk factors, and aortic calcification: the Framingham Heart Study. **Atherosclerosis**, v. 210, p. 656-661, 2010.

LEON-CABRERA, S.; SOLIS-LOZANO, L.; SUAREZ-ALVAREZ, K.; GONZALEZ-CHAVEZ, A.; BÉJAR, Y. L.; ROBLES-DIAZ, G.; ESCOBEDO, G. Hyperleptinemia is associated with parameters of low-grade systemic inflammation and metabolic dysfunction in obese human beings. **Front Integr. Neurosc.**, v. 7, p. 62-73, 2013.

LEVIN, B. E.; DUNN-MEYNELL, A. A. Defense of body weight against chronic caloric restriction in obesity-prone and -resistant rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 278, p. 231-237, 2000.

LEVIN, B. E.; TRISCARI, J.; HOGAN, S.; SULLIVAN, A.C. Resistance to diet-induced obesity: food intake, pancreatic sympathetic tone, and insulin. **Am. J. Physiol.**, v. 252, p. 471-478, 1987.

LI, H.; RUAN, X. Z.; POWIS, S. H.; FERNANDO, R.; MON, W. Y.; WHEELER, D. C.; MOORHEAD, J. F.; VARGHESE, Z. EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2 cells: evidence for a PAR-gamma-dependent mechanism. **Kidney Int.**, v. 67, p. 867-874, 2005.

LI, Q.; TAN, L.; WANG, C.; LI, N.; LI, Y.; XU, G.; LI, J. Polyunsaturated eicosapentaenoic acid changes lipid composition in lipid rafts. **Eur. J. Nutr.**, v. 45, p. 144-151, 2006.

LI, H.; XU, H.; SUN, B. Lipopolysaccharide regulates MMP-9 expression through TLR4/NF- $\kappa$ B signaling in human arterial smooth muscle cells. **Mol. Med. Rep.**, v. 6, p. 774-778, 2012.

LIU, H. Q.; QIU, Y.; MU, Y.; ZHANG, X. J.; LIU, L.; HOU, X. H.; ZHANG, L.; XU, X. N.; JI, A. L.; CAO, R.; YANG, R. H.; WANG, F. A high ratio of dietary n-3/n-6 polyunsaturated fatty acids improves obesity-linked inflammation and insulin resistance through suppressing activation of TLR4 in SD rats. **Nutr. Res.**, v. 33, p. 849-858, 2013.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 32, p. 2045-2051, 2012.

LIBBY, P.; ORDOVAS, K. M.; AUGER, K. R.; ROBBINS, A. H.; BIRINYI, L. K.; DINARELLO, C. A. Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells. **Am. J. Pathol.**, v. 124, p. 179-185, 1986.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G. K. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 54, p. 2129-2138, 2009.

LICHTENSTEIN, A. H.; APPEL, L. J.; BRANDS, M.; CARNETHON, M.; DANIELS, S.; FRANCH, H. A.; FRANKLIN, B.; KRIS-ETHERTON, P.; HARRIS, W. S.; HOWARD, B.; KARANJA, N.; LEFEVRE, M.; RUDEL, L.; SACKS, F.; VAN HORN, L.; WINSTON, M.; WYLIE-ROSETT, J. Summary of American Heart Association Diet and Lifestyle Recommendations revision 2006. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 26, p. 2186-2191, 2006.

LILLIOJA, S.; MOTT, D. M.; SPRAUL, M.; FERRARO, R.; FOLEY, J. E.; RAYUSSIN, E.; KNOWLER, W. C.; BENNETT, P. H.; BOGARDUS, C. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, p. 1988-1992, 1993.

LIN, S.; THOMAS, T. C.; STORLIEN, L. H.; HUANG, X. F. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 24, p. 639-646, 2000.

LISTEMBERG, L. L.; HAN, X.; LEWIS, S. E.; CASES, S.; FARESE, R. V. JR.; ORY, D. S.; SCHAFFER, J. E. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, p. 3077-3082, 2003.

LOPEZ-GARCIA, E.; SCHULZE, M. B.; MANSON, J. E.; MEIGS, J. B.; ALBERT, C. M.; RIFAI, N.; WILLETT, W. C.; HU, F. B. Consumption of (n-3) fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial activation in women. **J. Nutr.**, v. 134, p. 1806-1811, 2004.

LIU, Y.; CHEN, F.; ODLE, J.; LIN, X.; JACOBI, S. K.; ZHU, H.; WU, Z.; HOU, Y. Fish oil enhances intestinal integrity and inhibits TLR4 and NOD2 signaling pathways in weaned pigs after LPS challenge. **J. Nutr.**, v. 142, p. 2017-2024, 2012.

LUCAS, K.; MAES, M. Role of the Toll Like Receptor (TLR) radical cycle in chorinic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. **Mol. Neurobiol.**, v. 48, p. 190-204, 2013.

LUMENG, C. N.; SALTIEL, A. R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **J. Clin. Invest.**, v. 121, p. 2111-2117, 2011.

MA, L.; MA, S.; HE, H.; YANG, D.; CHEN, X.; LUO, Z.; LIU, D.; ZHU, Z. Perivascular fat-mediated vascular dysfunction and remodeling through the AMPK/mTOR pathway in high-fat diet-induced obese rats. **Hyperten. Res.**, v. 33, p. 446-453, 2010.

MAEDA, N.; SHIMOMURA, I.; KISHIDA, K.; NISHIZAWA, H.; MATSUDA, M.; NAGARETANI, H.; FURUYAMA, N.; KONDO, H.; TAKAHASHI, M.; ARITA, Y.; KOMURO, R.; OUCHI, N.; KIHARA, S.; TOCHINO, Y.; OKUTOMI, K.; HORIE, M.; TAKEDA, S.; AOYAMA, T.; FUNAHASHI, T.; MATSUZAWA, Y. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. **Nat. Med.**, v. 8, p. 731-737, 2002.

MAFFEI, M.; HALAAS, J.; RAVUSSIN, E.; PRATLEY, R. E.; LEE, G. H.; ZHANG, Y.; FEI, H.; KIM, S.; LALLONE, R.; RANGANATHAN, S. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. **Nat. Med.**, v. 1, p. 1155-1161, 1995.

MAKKI, K.; FROGUEL, P.; WOLOWCZUK, I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. **ISRN Inflamm.**, artigo 139239, 2013.

MALIK, V. S.; POPKIN, B. M.; BRAY, G. A.; DESPRÉS, J. P.; WILLETT, W. C.; HU, F.B. Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 33, p. 2477-2483, 2010.

MALONEY, E.; SWEET, I. R.; HOCKENBERY, D. M.; PHAM, M.; RIZZO, N. O.; TATEYA, S.; HANDA, P.; SCHWARTZ, M. W.; KIM, F. Activation of NF-kappaB by palmitate in endothelial cells: a key role for NADPH oxidase-derived superoxide in response to TLR4 activation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 29, p. 1370-1375, 2009.

MANN, J. I. Nutrition recommendation for the treatment and prevention of type 2 diabetes and the metabolic syndrome: an evidence-based review. **Nutr. Rev.**, v. 64, p. 422-427, 2006.

MANNINEN, A. H. A statement of the american heart association nutrition committee on dietary protein and weight reduction: a rigorous rebuttal. **Metab. Syndr. Relat. Disord.**, v. 2, p. 9-13, 2004.

MARCHESI, C.; EBRAHIMIAN, T.; ANGULO, O.; PARADIS, P.; SCHIFFRIN, E. L. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome. **Hypertension**, v. 54, p. 1384-1392, 2009.

MASEK, J.; FABRY, P. High-fat diet and the development of obesity in albino rats. **Experientia**, v. 15, p. 444-445, 1959.

MATTHEWS, D. R.; HOSKER, J. P.; RUDENSKI, A. S.; NAYLOR, B. A.; TREACHER, D. F.; TURNER, R. C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, p. 412-419, 1985.

MCALLEN, R. M.; TANAKA, M.; OOTSUKA, Y.; MCKINLEY, M. J. Multiple thermoregulatory effectors with independent central controls. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 109, p. 27-33, 2010.

MCCRORY, M. A.; BURKE, A.; ROBERTS, S. B. Dietary (sensory) variety and energy balance. **Physiol. Behav.**, v. 107, p. 576-583, 2012.

MELKONIAN, K. A.; OSTERMEYER, A. G.; CHEN, J. Z.; ROTH, M. G.; BROWN, D. A. Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 3910-3917, 1999.

MILANSKI, M.; DEGASPERI, G.; COOPE, A.; MORARI, J.; DENIS, R.; CINTRA, D. E.; TSUKUMO, D. M.; ANHE, G.; AMARAL, M. E.; TAKAHASHI, H. K.; CURI, R.; OLIVEIRA, H. C.; CARVALHEIRA, J. B.; 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. **J. Neurosci.**, v. 29, p. 359-370, 2009.

NAGAI, Y.; WATANABE, Y.; TAKATSU, K. The TLR family protein RP105/MD-1 complex: A new player in obesity and adipose tissue inflammation. **Adipocyte**, v. 2, p. 61-66, 2013.

NAKAMOTO, N.; KANAI, T. Role of Toll-Like receptors in immune activation and tolerance in the liver. **Front. Immunol.**, v. 5, p. 221-243, 2014.

NAVAS-CARRETERO, S.; PÉREZ-GRANADOS, A. M.; SCHOPPEN, S.; VAQUERO, M. P. An oily fish diet increases insulin sensitivity compared to a red meat diet in Young iron-deficient women. **Br. J. Nutr.**, v. 102, p. 546-553, 2009.

NELSON, G. J.; SCHMIDT, P. C.; KELLEY, D. S. Low-fat diets do not lower plasma cholesterol levels in healthy men compared to high-fat diets with similar fatty acid composition at constant caloric intake. **Lipids**, v. 30, p. 969-976, 1995.

NESCHEN, S.; MORINO, K.; DONG, J.; WANG-FISCHER, Y.; CLINE, G. W.; ROMANELLI, A. J.; ROSSBACHER, J. C.; MOORE, I. K.; REGITTNIG, W.; MUNOS, D. S.; KIM, J. H.; SHULMAN, G. I. n-3 Fatty acids preserve insulin sensitivity in vivo in a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent manner. **Diabetes**, v. 56, p. 1034-1041, 2007.

NEUHOFER, A.; WERNLY, B.; LEITNER, L.; SARABI, A.; SOMMER, N. G.; STAFFLER, G.; ZEYDA, M.; STULNIG, T. M. An accelerated mouse model for

atherosclerosis and adipose tissue inflammation. **Cardiovasc. Diabetol.**, doi: 10.1186/1475-2840-13-23, 2014.

NGUYEN, D. M., EL-SERAG, H. B. The epidemiology of obesity. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, v. 39, p. 1-7, 2010.

NORDMANN, A. J.; NORDMANN, A.; BRIEL, M.; KELLER, U.; YANCY, W. S. JR.; BREHM, B. J.; BUCHER, H. C. Effects of low-carbohydrate vs low-fat diets on weight loss and cardiovascular risk factors: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Arch. Intern. Med.**, v. 166, p. 285-293, 2006.

NORRIS, P. C.; DENNIS, E. A. Omega-3 fatty acids cause dramatic changes in TLR4 and purinergic eicosanoid signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 109, p. 8517-8522, 2012.

NUUTILA, P. Brown adipose tissue thermogenesis in humans. **Diabetologia**, v. 56, p. 2110-2112, 2013.

OKADA-IWABU, M.; YAMAUCHI, T.; IWABU, M.; HONMA, T.; HAMAGAMI, K.; MATSUDA, K.; YAMAGUCHI, M.; TANABE, H.; KIMURA-SOMEYA, T.; SHIROUZU, M.; OGATA, H.; TOKUYAMA, K.; UEKI, K.; NAGANO, T.; TANAKA, A.; YOKOYAMA, S.; KADOWAKI, T. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature*, v. 503, p. 493-499, 2013.

O'KEEFE, J. H. JR.; ABUISSA, H.; SASTRE, A.; STEINHAUS, D. M.; HARRIS, W. S. Effects of omega-3 fatty acids on resting heart rate, heart rate recovery after exercise, and heart rate variability in men with healed myocardial infarctions and depressed ejection fractions. **Am. J. Cardiol.**, v. 97, p. 1127-1130, 2006.

OLEFSKY, J. M.; GLASS, C. K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 72, p. 219-246, 2010.

OLIVER, E.; MCGILLICUDDY, F.; PHILLIPS, C.; TOOMEY, S.; ROCHE, H. M. The role of inflammation and macrophage accumulation in the development of obesity-induced type 2 diabetes mellitus and the possible therapeutic effects of long-chain n-3 PUFA. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 69, p. 232-243, 2010.

ORAVA, J.; NUUTILA, P.; NOPONEN, T.; PARKKOLA, R.; VILJANEN, T.; ENERBACK, S.; RISSANEN, A.; PIETILAINEN, K. H.; VIRTANEN, K. A. Blunted metabolic responses to cold and insulin stimulation in brown adipose tissue of obese humans. **Obesity**, v. 21, p. 2279-2287, 2013.

O'ROURKE, R. W.; WHITE, A. E.; METCALF, M. D.; OLIVAS, A. S.; MITRA, P.; LARISON, W. G.; CHEANG, E. C.; VARLAMOV, O.; CORLESS, C. L.; ROBERTS, C. T. JR.; MARKS, D. L. Hypoxia-induced inflammatory cytokine secretion in human adipose tissue stromovascular cells. **Diabetologia**, v. 54, p. 1480-1490, 2011.

OUCHI, N.; PARKER, J. L.; LUGUS, J. J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 85-97, 2011.

PALERMO, A.; MAGGI, D.; MAURIZI, A. R.; POZZILLI, P.; BUZZETTI, R. Prevention of type 2 diabetes mellitus: is it feasible? **Diabetes Metab. Res. Rev.**, v. 30, suppl. 1, p. 4-12, 2014.

PANENI, F.; COSTANTINO, S.; COSENTINO, F. Insulin resistance, diabetes, and cardiovascular risk. **Curr. Atheroscler. Rep.**, v. 16, p. 419-427, 2014.

PARRA, D.; RAMEL, A.; BANDARRA, N.; KIELY, M.; MARTÍNEZ, J. A.; THORSODOTTIR, I. A diet rich in long chain omega-3 fatty acids modulates satiety in overweight and obese volunteers during weight loss. **Appetite**, v. 51, p. 676-680, 2008.

PARK, S. Y.; CHO, Y. R.; KIM, H. J.; HIGASHIMORI, T.; DANTON, C.; LEE, M. K.; DEY, A.; ROTHERMEL, B.; KIM, Y. B.; KALINOWSKI, A.; RUSSELL, K. S.; KIM, J. K. Unraveling the temporal pattern of diet-induced insulin resistance in individual organs and cardiac dysfunction in C57BL/6 mice. **Diabetes**, v. 54, p. 3530-3540, 2005.

PARK, B. S.; SONG, D. H.; KIM, H. M.; CHOI, B. S.; LEE, H.; LEE, J. O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. **Nature**, v. 458, p. 1191-1195, 2009.

PARKS, E. J.; HELLERSTEIN, M. K. Carbohydrate-induced hypertriacylglycerolemia: historical perspective and review of biological mechanisms. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 71, p. 412-433, 2000.

PATTERSON, E.; WALL, R.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P.; STANTON, C. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated Fatty acids. **J. Nutr. Metab.**, artigo 539426, p. 1-16, 2012.

PÉREZ-MATUTE, P.; PÉREZ-ECHARRI, N.; MARTÍNEZ, J. A.; MARTI, A.; MORENO-ALIAGA, M. J. Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha. **Br. J. Nutr.**, v. 97, p. 389-398, 2007.

PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Etiology of insulin resistance. **Am. J. Med.**, v. 199, p. 10-16, 2006.

PITOMBO, C.; ARAUJO, E. P.; DE SOUZA, C. T.; PAREJA, J. C.; GELONEZE, B.; VELLOSO, L. A. Amelioration of diet-induced diabetes mellitus by removal of visceral fat. **J. Endocrinol.**, v. 191, p. 699-706, 2006.

POGGI, M.; BASTELICA, D.; GUAL, P.; IGLESIAS, M. A.; GREMEAUX, T.; KNAUF, C.; PEIRETTI, F.; VERDIER, M.; JUHAN-VAGUE, I.; TANTI, J. F.; BURCELIN, R.; ALESSI, M. C. CeH/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. **Diabetologia**, v. 50, p. 1267-1276, 2007.

POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA, I.; LIU, M. Y.; VAN HUFFEL, C.; DU, X.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; LAYTON, B.; BEUTLER, B. Defective LPS signaling in

C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science**, v. 282, p. 2085-2088, 1998.

POPPITT, S.D.; KEOGH, G. F.; PRENTICE, A. M.; WILLIAMS, D. E.; SONNEMANS, H. M.; VALK, E. E.; ROBINSON, E.; WAREHAM, N. J. Long-term effects of ad libitum low-fat, high-carbohydrate diets on body weight and serum lipids in overweight subjects with metabolic syndrome. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 75, p. 11-20, 2002.

POPPITT, S. D.; PRENTICE, A. M. Energy density and its role in the control of food intake: evidence from metabolic and community studies. **Appetite**, v. 26, p. 153-174, 1996.

RABEN, A.; MACDONALD, I.; ASTRUP, A. Replacement of dietary fat by sucrose or starch: effects on 14 d ad libitum energy intake, energy expenditure and body weight in formerly obese and never-obese subjects. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 21, p. 846-859, 1997.

RAMEL, A.; MARTINÉZ, A.; KIELY, M.; MORAIS, G.; BANDARRA, N. M.; THORSODDOTTIR, I. Beneficial effects of long-chain n-3 fatty acids included in an energy-restricted diet on insulin resistance in overweight and obese European young adults. **Diabetologia**, v. 51, p. 1261-1268, 2008.

RESH, M. D. Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. **Subcell Biochem.**, v. 37, p. 217-232, 2004.

RITTIG, K.; STAIB, K.; MACHANN, J.; BOTTCHEER, M.; PETER, A.; SCHICK, F.; CLAUSSEN, C.; STEFAN, N.; FRITSCHKE, A.; HARING, H. U.; BALLETSCHOFER, B. Perivascular fatty tissue at the brachial artery is linked to insulin resistance but not to local endothelial dysfunction. **Diabetologia**, v. 51, p. 2093-2099, 2008.

ROCHA, V. Z.; LIBBY, P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. **Nat. Rev. Cardiol.**, v. 6, p. 399-409, 2009.

ROSSI, A. S.; LOMBARDO, Y. B.; LACORTE, J. M.; CHICCO, A. G.; ROUAULT, C.; SLAMA, G.; RIZKALLA, S. W. Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in sucrose-fed, insulin-resistant rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 289, p. 286-294, 2005.

ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. **Nature**, v. 281, p. 31-35, 1979.

ROWE, D. C.; MCGETTRICK, A. F.; LATZ, E.; MONKS, B. G.; GAY, N. J.; YAMAMOTO, M.; AKIRA, S.; O'NEIL, L. A.; FITZGERALD, K. A.; GOLENBOCK, D. T. The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 103, p. 6299-6304, 2006.

RUZICKOVA, J.; ROSSMEISL, M.; PRAZAK, T.; FLACHS, P.; SPONAROVA, J.; VECK, M.; TVRZICKA, E.; BRYHN, M.; KOPECKY, J. Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. **Lipids**, v.39, p. 1177-1185, 2004.

SAMPEY, B. P.; VANHOOSE, A. M.; WINFIELD, H. M.; FREEMERMAN, A. J.; MUEHKBAUER, M. J.; FUEGER, P. T.; NEWGARD, C. B.; MAKOWSKI, L. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity**, v. 19, p. 1109-1117, 2011.

SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. **Cell**, v. 148, p. 852-871, 2012.

SANTANIEMI, M.; UKKOLA, O.; MALO, E.; BLOIGU, R.; KESANIEMI, Y. A. Metabolic syndrome in the prediction of cardiovascular events: The potential additive role of hsCRP and adiponectin. **Eur. J. Prev. Cardiol.** 2013. [Epub ahead of print].

SAUTER, N. S.; SCHULTHESS, F. T.; GALASSO, R.; CASTELLANI, L. W.; MAEDLER, K. The antiinflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist protects from high-fat diet-induced hyperglycemia. **Endocrinology**, v. 149, p. 2208-2218, 2008.

SCHAFFER, J. E. Lipotoxicity: when tissues overeat. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 14, p. 281-287, 2003.

SCHEMMELE, R.; MICKELSEN, O.; GILL, J. L. Dietary obesity in rats: Body weight and body fat accretion in seven strains of rats. **J. Nutr.**, v. 100, p. 1041-1048, 1970.

SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J. M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. **J. Clin. Invest.**, v. 118, p. 2992-3002, 2008.

SCHULZE, M. B.; MANSON, J. E.; LUDWIG, D. S.; COLDITZ, G. A.; STAMPFER, M. J.; WILLETT, W. C.; HU, F. B. Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. **JAMA**, v. 292, p. 927-934, 2004.

SCHUSDZIARRA, V.; HAUSMANN, M.; WIEDEMANN, C.; HESS, J.; BARTH, C.; WAGENPFEIL, S.; ERDMANN, J. Successful weight loss and maintenance in everyday clinical practice with an individually tailored change of eating habits on the basis of food energy density. **Eur. J. Nutr.**, v. 50, p. 351-361, 2011.

SCHWINGSHACKL, L.; HOFFMANN, G. Long-term effects of low-fat diets either low or high in protein on cardiovascular and metabolic risk factors: a systematic review and meta-analysis. **Nutr. J.**, v. 15, p. 12-48, 2013.

SEIMON, T.; TABAS, I. Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis. **J. Lipid Res.**, v. 50, p. 382-387, 2009.

SENER, A.; ZHANG, Y.; BULUR, N.; LOUCHAMI, K.; MALAISSE, W. J.; CARPENTIER, Y. A. The metabolic syndrome of omega3-depleted rats. II. Body weight, adipose tissue mass and glycemic homeostasis. **Int. J. Mol. Med.**, v. 24, p. 125-129, 2009.

SERHAN, C. N.; HONG, S.; GRONERT, K.; COLGAN, S. P.; DEVCHAND, P. R.; MIRICK, G.; MOUSSIGNAC, R. L. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 1025-1037, 2002.

SHAW, O. M.; POOL, B.; DALBETH, N.; HARPER, J. L. The effect of diet-induced obesity on the inflammatory phenotype of non-adipose-resident macrophages in an in vivo model of gout. **Rheumatology**. 2014. [Epub ahead of print].

SHI, H.; KOKOEVA, M. V.; INOUE, K.; TZAMELI, I.; YIN, H.; FLIER, J. S. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 116, p. 3015-3025, 2006.

SILVEIRA, L. R.; FIAMONCINI, J.; HIRABARA, S. M.; PROCOPIO, J.; CAMBIAGHI, T. D.; PINHEIRO, C. H.; LOPES, L. R.; CURI, R. Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle. **J. Cell Physiol.**, v. 217, p. 1-12, 2008.

SIMOPOULOS, A. P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomed. Pharmacother.**, v. 60, p. 502-507, 2006.

SORISKY, A.; MOLGAT, A. S.; GAGNON, A. Macrophage-induced adipose tissue dysfunction and the preadipocyte: should I stay (and differentiate) or should I go? **Adv. Nutr.**, v. 4, p. 67-75, 2013.

SPRANGER, J.; KROKE, A.; MOHLIG, M.; HOFFMANN, K.; BERGMANN, M. M.; RISTOW, M.; BOEING, H.; PFEIFFER, A. F. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. **Diabetes**, v. 52, p. 812-817, 2003.

STEINBERG, D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. **Nat. Med.**, v. 8, p. 1211-1217, 2002.

STOCK, M. J. The role of brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 48, p. 189-196, 1989.

STOVER, A. G.; DA SILVA CORREIA, J.; EVANS, J. T.; CLUFF, C. W.; ELLIOTT, M. W.; JEFFERY, E. W.; JOHNSON, D. A.; LACY, M. J.; BALDRIDGE, J. R.; PROBST, P.; ULEVITCH, R. J.; PERSING, D. H.; HERSHBERG, R. M. Structure-activity relationship of synthetic toll-like receptor 4 agonists. **J. Biol. Chem.**, v. 6, p. 4440-4449, 2004.

ST-PIERRE, A. C.; CANTIN, B.; MAURIÈGE, P.; BERGERON, J.; DAGENAIS, G. R.; DEPRÉS, J. P.; LAMARCHE, B. Insulin resistance syndrome, body mass index and the risk of ischemic heart disease. **CMAJ**, v. 172, p. 1301-1305, 2005.

STRANDBERG, L.; VERDRENGH, M.; ENGE, M.; ANDERSSON, N.; AMU, S.; ONNHEIM, K.; BENRICK, A.; BRISLERT, M.; BYLUND, J.; BOKAREWA, M.; NILSSON, S.; JANSSON, J. O. Mice chronically fed high-fat diet have increased mortality and disturbed immune response in sepsis. **Plos One**, v. 4, doi: 10.1371/journal.pone.0007605, 2009.

STULNIG, T. M.; HUBER, J.; LEITINGER, N.; IMRE, E. M.; ANGELISOVA, P.; NOWOTNY, P.; WALDHAUSL, W. Polyunsaturated eicosapentaenoic acid displaces

proteins from membrane rafts by altering raft lipid composition. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 37335-37340, 2001.

SUGANAMI, T.; MIEDA, T.; ITOH, M.; SHIMODA, Y.; KAMEI, Y.; OGAWA, Y. Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 354, p. 45-49, 2007.

SUTER, P. M. Carbohydrates and dietary fiber. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 170, p. 231-261, 2005.

SZASZ, T.; BOMFIM, G. F.; WEBB, R. C. The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis. **Vasc. Health Risk Manag.**, v. 9, p. 105-116, 2013.

TAKAHASHI, Y.; IDE, T. Effects of soy protein and isoflavone on hepatic fatty acid synthesis and oxidation and mRNA expression of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activates receptor gamma in adipose tissue of rats. **J. Nutr. Biochem.**, v. 19, p. 682-693, 2008.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, p. 805-820, 2010.

TALUKDAR, S.; OH DA, Y.; BANDYOPADHYAY, G.; LI, D.; XU, J.; McNELIS, J.; LU, M.; LI, P.; YAN, Q.; ZHU, Y.; OFRECIO, J.; LIN, M.; BRENNER, M. B.; OLEFSKY, J. M. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. **Nat. Med.**, v. 18, p. 1407-1412, 2012.

TCHERNOF, A.; DESPRÉS, J. P. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. **Physiol. Rev.**, v. 93, p. 359-404, 2013.

THIES, F.; GARRY, J. M.; YAQOUB, P.; RERKASEM, K.; WILLIAMS, J.; SHEARMAN, C. P.; GALLAGHER, P. J.; CALDER, P. C.; GRIMBLE, R. F. Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 361, p. 477-485, 2003.

TOWSEND, K. L.; TSENG, Y. H. Brown fat fuel utilization and thermogenesis. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 25, p. 168-177, 2014.

TRIANTAFILOU, M.; MIYAKE, K.; GOLENBOCK, D. T.; TRIANTAFILOU, K. Mediators of innate immune recognition in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. **J. Cell Sci.**, v. 115, p. 2603-2611, 2002.

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

TURLEY, M. L.; SKEAFF, C. M.; MANN, J. I.; COX, B. The effect of a low-fat, high-carbohydrate diet on serum high density lipoprotein cholesterol and triglyceride. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 52, p. 728-732, 1998.

TURNER, N.; BRUCE, C. R.; BEALE, S. M.; HOEHN, K. L.; SO, T.; ROLPH, M. S.; COONEY, G. J. Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents. **Diabetes**, v. 56, p. 2085-2092, 2007.

UESHIMA, H.; STAMLER, J.; ELLIOTT, P.; CHAN, Q.; BROWN, I. J.; CARNETHON, M. R.; DAVIGLUS, M. L.; HE, K.; MOAG-STAHLEBERG, A.; RODRIGUEZ, B. L.; STEFFEN, L. M.; VAN HORN, L.; YARNELL, J.; ZHOU, B. Food omega-3 fatty acid intake of individuals (total, linolenic acid, long-chain) and their blood pressure: INTERMAP study. **Hypertension**, v. 50, p. 313-319, 2007.

UNGER, R. H. Lipotoxic diseases. **Annu. Rev. Med.**, v. 53, p. 319-336, 2002.

URSO, C.; HOPPS, E.; CAIMI, G. Adhesion molecules and diabetes mellitus. **Clin. Ter.**, v. 161, p. 17-24, 2010.

VE, T.; GAY, N. J.; MANSELL, A.; KOBE, B.; KELLIE, S. Adaptors in Toll-like receptor signalling and their potential as therapeutic targets. **Curr. Drug Targets**, v. 13, p. 1360-1374, 2012.

VIEIRA, V. J.; VALENTINE, R. J.; WILUND, K. R.; ANTAO, N.; BAYNARD, T.; WOODS, J. A. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 296, p. 1164-1171, 2009.

VIJAY-KUMAR, M.; AITKEN, J. D.; CARVALHO, F. A.; CULLENDER, T. C.; MWANGI, S.; SRINIVASAN, S.; SITARAMAN, S. V.; KNIGHT, R.; LEY, R. E.; GEWIRTZ, A. T. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. **Science**, v. 328, p. 228-231, 2010.

VIJAY-KUMAR, M.; AITKEN, J. D.; CARVALHO, F. A.; ZIEGLER, T. R.; GEWIRTZ, A. T.; GANJI, V. Loss of function mutation in toll-like receptor-4 does not offer protection against obesity and insulin resistance induced by a diet high in trans fat in mice. **J. Inflamm.**, v. 8, p. 1-14, 2011.

VILADOMIU, M.; HONTECILLAS, R.; YUAN, L.; LU, P.; BASSAGANYA-RIERA, J. Nutritional protective mechanisms against gut inflammation. **J. Nutr. Biochem.**, v. 24, p. 929-939, 2013.

VINOLO, M. A.; RODRIGUES, H. G.; FESTUCCIA, W. T.; CRISMA, A. R.; ALVES, V. S.; MARTINS, A.R.; AMARAL, C. L.; FIAMONCINI, J.; HIRABARA, S. M.; SATO, F. T.; FOCK, R. A.; MALHEIROS, G.; DOS SANTOS, M. F.; CURI, R. Tributyrin attenuates obesity-associated inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 302, p. 272-282, 2012.

VIRTANEN, J. K.; MOZAFFARIAN, D.; CHIUVE, S. E.; RIMM, E. B. Fish consumption and risk of major chronic disease in men. **Am. J. Clin., Nutr.**, v. 88, p. 1618-1625, 2008.

VOLKOW, N. D.; FOWLER, J. S.; WANG, G. J.; SWANSON, J. M.; TELANG, F. Dopamine in drug abuse and addiction: results of imaging studies and treatment implications. **Arch. Neurol.**, v. 64, p. 1575-1579, 2007.

VOLKOW, N. D.; WANG, G. J.; TOMASI, D.; BALER, R. D. Obesity and addiction: neurobiological overlaps. **Obes. Rev.**, v. 14, p. 2-18, 2013.

VOLPE, C. M.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A. The dual role of free fatty acid signaling in inflammation and therapeutics. **Recent. Pat. Endocr. Metab. Immune Drug Discov.**, v. 7, p. 189-197, 2013.

VOZARAVA, B.; WEYER, C.; LINDSAY, R. S.; PRATLEY, R. E.; BOGARDUS, C.; TATARANNI, P. A. High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 51, p. 455-461, 2002.

WANG, J. Consumption of added sugars and development of metabolic syndrome components among a sample of youth at risk of obesity. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.**, v. 39, p.512-523, 2014.

WANG, C. H.; LEUNG, C. H.; LIU, S. C.; CHUNG, C. H. Safety and effectiveness of rosiglitazone in type 2 diabetes patients with nonalcoholic fatty liver disease. **J. Formos. Med. Assoc.**, v. 105, p. 743-752, 2006.

WANG, Y. C.; McPHERSON, K.; MARSH, T.; GORTMAKER, S. L.; BROWN, M. Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. **Lancet**, v. 378, p. 815-825, 2011.

WANG, Q.; LIANG, X.; WANG, L.; LU, X.; HUANG, J.; CAO, J.; LI, H.; GU, D. Effect of omega-3 fatty acids supplementation function: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Atherosclerosis**, v. 221, p. 536-543, 2012.

WARNICK, R. J. **Handbook of lipoprotein testing**. Washington: AACC Press, 1997.

WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R. L.; FERRANTE, A. W. JR. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J. Clin. Invest.**, v. 112, p. 1796-1808, 2003.

WEST, D. B.; BOOZER, C. N.; MOODY, D. L.; ATKINSON, R. L. Dietary obesity in nine inbred mouse strains. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. 1025-1032, 1992.

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, p. 3066-3073, 2010.

WHITING, D. R.; GUARIGUATA, L.; WEIL, C.; SHAW, J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 94, p. 311-321, 2011.

WINER, S.; WINER, D. A. The adaptive immune system as a fundamental regulator of adipose tissue inflammation and insulin resistance. **Immunol. Cell Biol.**, v. 90, p. 755-762, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on noncommunicable diseases 2013. Genebra: WHO; 2013. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789240686458\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789240686458_eng.pdf). Acessado em junho de 2014.

XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C. J.; SOLE, J.; NICHOLS, A.; ROSS, J. S.; TARTAGLIA, L. A.; CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 112, p. 1821-1830, 2003.

YAMAZAKI, R. K.; BRITO, G. A.; COELHO, I.; PEQUITTO, D. C.; YAMAGUCHI, A. A.; BORGHETTI, G.; SCHIESSEL, D. L.; KRYCZYK, M.; MACHADO, J.; ROCHA, R. E.; AIKAWA, J.; IAGHER, F.; NALIWAIKO, K.; TANHOFFER, R. A.; NUNES, E. A.; FERNANDES, L. C. Low fish oil intake improves insulin sensitivity, lipid profile and muscle metabolism on insulin resistant MSG-obese rats. **Lipids Health Dis.**, v.10, p. 66-80, 2011.

YAMAZAKI, Y.; KAKIZAKI, S.; TAKIZAWA, D.; ICHIKAWA, T.; SATO, K.; TAKAGI, H.; MORI, M. Interstrain differences in susceptibility to non-alcoholic steatohepatitis. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 23, p. 276-282, 2008.

YAQOOB, P.; SHAIKH, S. R. The nutritional and clinical significance of lipid rafts. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Meatb. Care**, v. 13, p. 156-166, 2010.

YASUTAKE, K.; KOHJIMA, M.; NAKASHIMA, M.; NAKAMUTA, M.; ENJOJI, M. Dietary habits and behaviors associated with nonalcoholic fatty liver disease. **World J. Gastroenterol.**, v. 21, p. 1756-1767, 2014.

ZEYDA, M.; STAFFLER, G.; HOREJSI, V.; WALDHAUSL, W.; STULNIG, T. M. LAT displacement from lipid rafts as a molecular mechanism for the inhibition of T cell signaling by polyunsaturated fatty acids. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 28418-28423, 2002.

ZHANG, H.; CUI, J., ZHANG, C. Emerging role of adipokines as mediators in atherosclerosis. **World J. Cardiol.**, v. 2, p. 370-376, 2010.

ZHANG, J.; WANG, C.; LI, L.; MAN, Q.; SONG, P.; MENG, L.; DU, Z. Y.; FROYLAND, L. Inclusion of Atlantic salmon in the Chinese diet reduces cardiovascular adult men. **Nutr. Res.**, v. 30, p. 447-454, 2010.

# *APÉNDICE*

*APÊNDICE A –  
Tabelas de valores  
individuais*

**Tabela A1a** - Valores individuais referentes à Figura 5A da seção Resultados: Efeitos das dietas padrão, balanceada (DB), balanceada com leite condensado *ad libitum* (DB+LC), hiperlipídica (HFD) e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* (HFD+LC) sobre a evolução semanal da massa corporal (em gramas) de camundongos C57Bl/6J em 12 semanas.

Dieta Padrao										
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Média	DP	EPM
Semana 1	21,3	23,5	23,9	23,1	23,2	22,1	22,3	22,8	0,91	0,34
Semana 2	22,4	24,7	25,1	24,2	24,8	22,4	23	23,8	1,17	0,44
Semana 3	22,3	24,7	24,8	24,2	25,2	23,2	23,9	24,0	1,01	0,38
Semana 4	23,2	24,5	25,8	24,8	25,4	24,5	23,6	24,5	0,92	0,35
Semana 5	23,5	25	26,1	25,4	25,9	24,5	24,7	25,0	0,89	0,34
Semana 6	23,4	25,8	25,8	25,9	26,74	24,1	24,1	25,1	1,24	0,47
Semana 7	24,8	27	27,1	27,3	27,5	25,6	25,6	26,4	1,06	0,40
Semana 8	25,2	27,6	27,7	27,4	29,1	25,9	25,9	27,0	1,36	0,51
Semana 9	24,7	27	27,8	26,6	28,6	25,2	25,1	26,4	1,48	0,56
Semana 10	25,5	26,9	28,1	26,9	28,8	26,1	26,1	26,9	1,18	0,44
Semana 11	26,1	27,6	28,1	27,3	28,1	26,4	26,2	27,1	0,87	0,33
Semana 12	26,6	28,1	28,3	27,7	28,8	27	26,6	27,6	0,87	0,33

Dieta DB										
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Média	DP	EPM
Semana 1	22,4	24,6	27	25,6	24,6	22,8	24,4	24,5	1,57	0,59
Semana 2	23	24,8	26,4	26,4	25,4	22,8	25,4	24,9	1,47	0,56
Semana 3	24,2	26	28	27	27,6	23,2	26	26,0	1,76	0,67
Semana 4	24	26,2	27	27,4	26,6	24,8	25,9	26,0	1,21	0,46
Semana 5	24	26,4	27,8	28	27,4	24,5	26,7	26,4	1,58	0,60
Semana 6	24	26,6	27,2	27,4	28,7	25,2	27,1	26,6	1,55	0,59
Semana 7	24,4	26,6	27,4	27,8	29,4	26,2	28,8	27,2	1,68	0,64
Semana 8	23,2	25,8	26,8	28,2	30	26,5	28	26,9	2,14	0,81
Semana 9	23,8	26,2	27,4	28,4	30,8	25,8	27,6	27,1	2,20	0,83
Semana 10	24,8	27,2	28,4	28,6	28,2	25,4	26,4	27,0	1,51	0,57
Semana 11	25	28,2	28,6	28,4	29,2	26,6	28,4	27,8	1,46	0,55
Semana 12	25	28,2	28,6	28,7	31	27,2	29,2	28,3	1,85	0,70

Dieta DB + LC										
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Média	DP	EPM
Semana 1	21,8	22	24,3	20	23	23,4	24,1	22,7	1,51	0,57
Semana 2	22,4	22,7	24,9	20,6	24,8	23,2	24,5	23,3	1,57	0,59
Semana 3	24,5	25,1	27	21,6	26,5	25,4	26,6	25,2	1,84	0,70
Semana 4	27,3	25,7	27,7	22,3	27	27,7	28	26,5	2,01	0,76
Semana 5	29,1	27,1	28,8	23,3	28	27,3	28,9	27,5	2,01	0,76
Semana 6	31,9	28,42	29,8	24,6	30,1	30,7	29,14	29,2	2,33	0,88
Semana 7	34,9	31,1	31,5	27,3	31,5	32,5	34,9	32,0	2,60	0,98
Semana 8	36,5	32,6	31,8	28,1	32,3	32,4	35,8	32,8	2,78	1,05
Semana 9	38,1	34,4	34,1	29,6	34,1	34,8	39,4	34,9	3,17	1,20
Semana 10	38,5	35	34,1	29,7	33,5	35,7	39,8	35,2	3,33	1,26
Semana 11	39,9	37,3	34,7	31,7	34,9	37,2	40,3	36,6	3,05	1,15
Semana 12	41,8	37,3	35,1	31,5	35,7	38	42,1	37,4	3,76	1,42

Dieta HFD										
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Média	DP	EPM
Semana 1	24,8	25,2	20,2	24,0	25,7	25,7	25,7	24,5	1,98	0,75
Semana 2	25,4	25,6	21,2	24,6	26,0	25,7	26,0	24,9	1,71	0,65
Semana 3	27,2	28,4	24,6	28,2	25,3	25,7	27,0	26,6	1,46	0,55
Semana 4	27,7	28,2	27,0	29,0	26,0	26,0	27,3	27,3	1,11	0,42
Semana 5	28,1	28,9	27,3	28,0	28,0	28,3	28,7	28,2	0,52	0,20
Semana 6	29,4	28,2	29,4	29,5	31,1	30,2	31,1	29,8	1,04	0,39
Semana 7	29,6	30,0	31,4	32,1	33,0	31,7	33,3	31,6	1,40	0,53
Semana 8	31,0	32,0	34,0	35,5	34,7	32,7	35,3	33,6	1,74	0,66
Semana 9	31,2	33,8	35,2	37,4	36,3	33,7	37,0	34,9	2,21	0,83
Semana 10	31,4	34,6	36,2	39,2	37,3	34,3	38,0	35,9	2,64	1,00
Semana 11	31,4	35,6	37,8	39,8	38,3	35,3	38,3	36,7	2,81	1,06
Semana 12	32,6	36,4	39,0	40,4	38,4	34,7	38,2	37,1	2,71	1,03

Dieta HFD + LC										
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Média	DP	EPM	
Semana 1	24,6	23,1	24,4	23,5	23,1	22,1	23,5	0,93	0,38	
Semana 2	25,5	23,6	24,4	23,5	23,2	23,2	23,9	0,90	0,37	
Semana 3	27,2	25,6	25,9	25,1	24,1	23,2	25,2	1,40	0,57	
Semana 4	28,6	27,7	26,6	25,7	24,3	25,7	26,4	1,55	0,63	
Semana 5	30,3	30,5	29,2	26,5	26	27,2	28,3	1,97	0,80	
Semana 6	35,5	34,7	33,1	30	28,1	28,9	31,7	3,13	1,28	
Semana 7	39	40,1	36,9	32,6	30	33,2	35,3	3,98	1,62	
Semana 8	40,3	42	38,4	33,5	31,2	34,4	36,6	4,24	1,73	
Semana 9	42,9	44,9	40,7	35,5	33,2	37,2	39,1	4,52	1,84	
Semana 10	46,6	47,1	43,8	38	34,3	40,4	41,7	5,05	2,06	
Semana 11	49,2	49,5	47,3	39,9	36,7	42,9	44,3	5,27	2,15	
Semana 12	50,3	50,1	49,5	42	37,4	45,2	45,8	5,25	2,14	

**Tabela A1b** - Valores individuais referentes à Figura 5B da seção Resultados: Efeitos das dietas padrão, balanceada (DB), balanceada com leite condensado *ad libitum* (DB+LC), hiperlipídica (HFD) e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* (HFD+LC) sobre a diferença de massa corpórea (massa corporal final – massa corporal inicial; em gramas) em camundongos C57Bl/6J tratados durante 12 semanas.

	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	5,3	3,2	20	10,2	25,7
Animal 2	4,6	4,4	15,3	12,8	27
Animal 3	4,4	2,2	10,8	9,8	25,1
Animal 4	4,6	6,6	11,5	17,8	18,5
Animal 5	5,6	3	12,7	21,7	14,3
Animal 6	4,9	5,7	14,6	19,8	23,1
Animal 7	4,3	6	18	11	24,3
Animal 8	3,2	9,5	21,5	23,7	14,9
Animal 9	3,01	7,1	11,8	24,3	25,6
Animal 10	2,3	8,3	17,6	22,7	23,9
Animal 11	2,8	8,9	12,2	26,6	23
Animal 12	3	7,7	10,2	19,6	
Animal 13	2,5	10	16,4	19,9	
Média	3,89	6,35	14,82	18,45	22,31
DP	1,12	2,56	3,66	5,72	4,40
EPM	0,31	0,71	1,02	1,59	1,33

**Tabela A2** - Valores individuais referentes à Figura 6 da seção Resultados: Efeitos das dietas padrão, balanceada (DB), balanceada com leite condensado *ad libitum* (DB+LC), hiperlipídica (HFD) e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* (HFD+LC) sobre a ingestão alimentar (em gramas por animal por semana) e o consumo de leite condensado (em gramas por animal por semana) de camundongos C57Bl/6 tratados durante 12 semanas.

	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC	PADRAO
caixa 1 semana 5	19,80	19,25	15,10	14,10	23,03
caixa 1 semana 6	23,80	21,51	15,70	15,22	22,70
caixa 1 semana 7	20,60	18,80	15,00	14,90	22,23
caixa 1 semana 8	21,10	18,20	15,40	13,44	23,08
caixa 1 semana 9	22,50	18,70	16,10	14,40	23,77
caixa 1 semana 10	22,70	19,38	14,90	15,60	22,90
caixa 1 semana 11	27,30	18,00	17,55	14,00	22,40
caixa 1 semana 12	27,80	17,90	14,80	14,04	23,50
caixa 2 semana 5	28,30	17,56	15,80	11,83	
caixa 2 semana 6	26,80	25,70	15,70	11,20	
caixa 2 semana 7	26,40	23,35	15,70	12,00	
caixa 2 semana 8	33,95	23,30	14,30	13,40	
caixa 2 semana 9	31,03	22,50	19,60	12,70	
caixa 2 semana 10	27,03	21,25	17,70	16,20	
caixa 2 semana 11	28,18	21,00	18,50	14,00	
caixa 2 semana 12	24,95	17,15	19,20	14,60	
caixa 3 semana 5	29,22	20,48	16,85	13,03	
caixa 3 semana 6	28,83	21,72	17,05	13,53	
caixa 3 semana 7	29,38	18,55	16,80	13,88	
caixa 3 semana 8	33,03	24,12	17,00	14,63	
caixa 3 semana 9	32,73	22,05	17,90	14,18	
caixa 3 semana 10	32,58	23,23	17,75	12,87	
caixa 3 semana 11	27,35	19,98	17,40	13,98	
caixa 3 semana 12	23,07	17,45	16,20	14,56	
Média	27,02	20,46	16,58	13,85	22,95
DP	4,06	2,41	1,43	1,18	0,52
EPM	0,83	0,49	0,29	0,24	0,18

	DB + LC	HFD + LC
caixa 1 semana 5	16,85	11,18
caixa 1 semana 6	11,01	5,09
caixa 1 semana 7	15,40	6,80
caixa 1 semana 8	16,41	5,92
caixa 1 semana 9	13,55	6,99
caixa 1 semana 10	15,40	9,00
caixa 2 semana 5	20,66	3,95
caixa 2 semana 6	13,16	10,77
caixa 2 semana 7	16,30	11,12
caixa 2 semana 8	17,74	8,83
caixa 2 semana 9	14,10	7,27
caixa 2 semana 10	17,00	9,83
caixa 3 semana 5	11,47	
caixa 3 semana 6	15,18	
caixa 3 semana 7	13,93	
caixa 3 semana 8	9,75	
caixa 3 semana 9	12,45	
caixa 3 semana 10	11,98	
Média	14,57	8,06
DP	2,73	2,42
EPM	0,64	0,57

**Tabela A3** - Valores individuais referentes à Figura 7 da seção Resultados: Efeitos das dietas padrão, balanceada (DB), balanceada com leite condensado *ad libitum* (DB+LC), hiperlipídica (HFD) e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* (HFD+LC) sobre o consumo calórico (Kcal por animal por semana) e a eficiência energética das dietas (grama de peso por Kcal de ração) em camundongos C57Bl/6 tratados durante 12 semanas.

	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC	PADRAO
caixa 1 semana 5	97,36	127,96	91,85	111,63	93,70
caixa 1 semana 6	75,30	117,58	80,63	97,82	92,34
caixa 1 semana 7	90,51	121,22	83,84	101,53	90,45
caixa 1 semana 8	78,34	122,55	80,10	91,00	93,90
caixa 1 semana 9	80,24	115,14	82,24	99,64	96,68
caixa 1 semana 10	85,57	123,75	85,97	112,55	
caixa 1 semana 11		130,93	79,57	112,83	
caixa 2 semana 5	86,33	133,93	93,72	82,44	
caixa 2 semana 6	103,82	140,50	79,03	107,26	
caixa 2 semana 7	105,72	141,82	84,37	110,27	
caixa 2 semana 8	107,62	146,26	83,84	106,85	
caixa 2 semana 9	101,92	131,41	83,84	99,36	
caixa 2 semana 10	100,40	136,25	76,36	100,67	
caixa 2 semana 11		127,78			
caixa 3 semana 5	111,11	115,16	89,98		
caixa 3 semana 6	109,65	131,93	91,05		
caixa 3 semana 7	111,74	115,83	89,71		
caixa 3 semana 8	125,63	123,40	90,78		
caixa 3 semana 9	124,48	124,32	95,59		
caixa 3 semana 10	123,91	127,30	94,79		
caixa 3 semana 11	104,01				
Média	101,25	127,75	86,17	102,60	93,41
DP	15,35	8,98	5,86	9,00	2,29
EPM	3,52	1,96	1,34	2,50	1,02

	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC	PADRAO
	0,00342	0,03593	0,00985	0,01720	0,00961
	-0,00177	0,01240	0,01449	0,03864	0,00866
	0,00221	0,01908	0,01894	0,03388	0,00092
	-0,01106	-0,00250	0,00816	0,01495	-0,00231
	0,00665	0,03040	0,01563	0,02369	0,00107
	0,01000	0,03415	0,00081	0,02239	
	0,00348	-0,01265	0,00443	0,01188	
	-0,00193	0,03082	0,00187	0,01188	
	0,00095	0,01431	0,01295	0,01369	
	-0,00186	0,01431	0,02665	0,03252	
	0,00294	0,03369	0,00274	0,01030	
	-0,00204	0,02094	0,02283	0,02621	
	0,00393	0,01490	0,00477	0,02517	
	-0,00209	0,03616	0,01017	0,01348	
Média	0,00072	0,01892	0,01111	0,02144	0,00209
DP	0,00517	0,01467	0,00833	0,00952	0,00465
EPM	0,00138	0,00392	0,00222	0,00255	0,00208

**Tabela A4** - Valores individuais referentes à Figura 8 da seção Resultados: Efeitos das dietas padrão, balanceada (DB), balanceada com leite condensado *ad libitum* (DB+LC), hiperlipídica (HFD) e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* (HFD+LC) sobre o peso dos depósitos de gordura: mesentérica, epididimal, retroperitoneal e tecido adiposo marrom (TAM) de camundongos C57Bl/6 tratados durante 12 semanas.

G. Mesentérica					
	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	0,19	0,343	1,08	0,503	1,7
Animal 2	0,24	0,505	1,26	0,815	2,35
Animal 3	0,21	0,352	0,94	0,623	2,57
Animal 4	0,14	0,227	0,79	1,065	1,67
Animal 5	0,22	0,449	0,62	0,485	1,02
Animal 6	0,19	0,194	0,51	0,426	0,68
Animal 7	0,19	0,203	0,58	0,526	2,18
Animal 8	0,17	0,61	1,4	2,05	0,84
Animal 9	0,14	0,52	0,92	1,95	2,16
Animal 10	0,17	0,58	1,09	1,95	2,05
Animal 11	0,17	0,63	0,91	2,8	1,8
Animal 12	0,26	0,5	0,71	1,45	
Animal 13	0,27	0,7	1,08	1,45	
Média	0,20	0,45	0,91	1,24	1,73
DP	0,04	0,17	0,27	0,77	0,63
EPM	0,01	0,05	0,07	0,21	0,19

G. Epididimal					
	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	0,46	1,21	2,38	2,37	3,27
Animal 2	0,57	0,77	2,81	2,55	2,89
Animal 3	0,56	0,527	2,67	1,358	2,58
Animal 4	0,4	0,614	1,95	2,767	3,2
Animal 5	0,65	0,98	1,62	2,99	3,58
Animal 6	0,5	1,02	1,84	2,6	2,56
Animal 7	0,4	0,72	1,84	2,34	2,76
Animal 8	0,49	2,15	3,06	3,12	2,43
Animal 9	0,52	1,57	1,93	3,21	2,97
Animal 10	0,46	1,88	2,6	3,23	2,99
Animal 11	0,52	1,85	2,17	2,3	3,17
Animal 12	0,47	1,73	1,84	4,07	
Animal 13	0,68	1,97	2,4	3,64	
Média	0,51	1,31	2,24	2,81	2,95
DP	0,08	0,57	0,45	0,69	0,35
EPM	0,02	0,16	0,12	0,19	0,10

G. Retroperitoneal					
	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	0,15	0,203	0,92	0,672	0,94
Animal 2	0,17	0,2667	0,8	0,857	1,48
Animal 3	0,17	0,224	0,83	0,529	1,66
Animal 4	0,07	0,134	0,76	0,985	1,21
Animal 5	0,22	0,191	0,49	0,387	1,24
Animal 6	0,14	0,219	0,5	0,318	0,99
Animal 7	0,11	0,133	0,56	0,726	1,08
Animal 8	0,15	0,15	0,98	1,21	1,12
Animal 9	0,1	0,1	0,79	1,26	1,4
Animal 10	0,09	0,09	0,87	1,22	1,43
Animal 11	0,16	0,16	0,71	1,15	1,45
Animal 12	0,12	0,12	0,51	1,08	
Animal 13	0,17	0,17	1	1,29	
Média	0,14	0,17	0,75	0,90	1,27
DP	0,04	0,05	0,18	0,34	0,23
EPM	0,01	0,01	0,05	0,09	0,07

TAM					
	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	0,05	0,09	0,24	0,13	0,32
Animal 2	0,09	0,09	0,31	0,1	0,24
Animal 3	0,07	0,12	0,26	0,08	0,28
Animal 4	0,07	0,08	0,22	0,07	0,32
Animal 5	0,09	0,11	0,18	0,12	0,2
Animal 6	0,06	0,09	0,13	0,21	0,12
Animal 7	0,04	0,08	0,17	0,22	0,27
Animal 8	0,09	0,11	0,29	0,22	0,16
Animal 9	0,06	0,12	0,17	0,29	0,33
Animal 10	0,06	0,1	0,28	0,18	0,25
Animal 11	0,05	0,09	0,16	0,17	0,22
Animal 12	0,07		0,11		
Animal 13	0,06		0,22		
Média	0,07	0,10	0,21	0,16	0,25
DP	0,02	0,01	0,06	0,07	0,07
EPM	0,004	0,004	0,018	0,021	0,020

**Tabela A5** - Valores individuais referentes à Figura 9 da seção Resultados: Efeitos das dietas padrão, balanceada (DB), balanceada com leite condensado *ad libitum* (DB+LC), hiperlipídica (HFD) e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* (HFD+LC) sobre o peso do coração (em gramas), peso do coração em relação à massa corpórea (ambos em gramas), peso do fígado (em gramas) e o peso do fígado em relação à massa corpórea (ambos em gramas) de camundongos C57Bl/6 tratados durante 12 semanas.

Coração					
	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	0,12	0,11	0,15	0,16	0,14
Animal 2	0,12	0,12	0,14	0,13	0,16
Animal 3	0,12	0,12	0,13	0,13	0,17
Animal 4	0,14	0,11	0,14	0,14	0,16
Animal 5	0,14	0,12	0,13	0,12	0,13
Animal 6	0,14	0,15	0,12	0,15	0,19
Animal 7	0,14	0,14	0,13	0,16	0,16
Animal 8	0,13	0,11	0,14	0,14	0,15
Animal 9	0,12	0,13	0,14	0,16	0,16
Animal 10	0,15	0,12	0,14	0,15	0,15
Animal 11	0,13	0,13	0,14		0,14
Animal 12	0,14		0,15		
Animal 13	0,13		0,15		
Média	0,13	0,12	0,14	0,14	0,16
DP	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
EPM	0,003	0,004	0,002	0,005	0,005

Coração/Massa corporea					
	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	0,0047	0,0044	0,0040	0,0046	0,0031
Animal 2	0,0045	0,0046	0,0034	0,0037	0,0032
Animal 3	0,0044	0,0043	0,0033	0,0047	0,0034
Animal 4	0,0054	0,0044	0,0039	0,0046	0,0032
Animal 5	0,0051	0,0039	0,0038	0,0031	0,0031
Animal 6	0,0054	0,0043	0,0039	0,0029	0,0051
Animal 7	0,0055	0,0041	0,0038	0,0033	0,0032
Animal 8	0,0046	0,0033	0,0031	0,0029	0,0038
Animal 9	0,0041	0,0038	0,0039	0,0030	0,0033
Animal 10	0,0053	0,0038	0,0034	0,0033	0,0030
Animal 11	0,0045	0,0036	0,0037		0,0029
Animal 12	0,0046		0,0042		
Animal 13	0,0046		0,0038		
Média	0,0048	0,0040	0,0037	0,0036	0,0034
DP	0,0005	0,0004	0,0003	0,0007	0,0006
EPM	0,0001	0,0001	0,0001	0,0002	0,0002

Fígado					
	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	1,17	0,98	1,96	1,4	1,89
Animal 2	1,24	1,1	2,31	1,3	2,32
Animal 3	1,23	1,06	1,96	1,63	2,51
Animal 4	1,22	0,98	1,7	1,34	2,19
Animal 5	1,17	1,17	1,37	1,33	1,56
Animal 6	1,15	1,25	1,25	2,14	1,32
Animal 7	1,2	1,19	2,65	2,05	2,47
Animal 8	1,35	1,2	1,46	1,98	1,49
Animal 9	1,38	1,43	2,46	2,92	2,3
Animal 10	1,37	1,11	1,57	1,67	2,22
Animal 11	1,29	1,37	1,43	1,68	1,86
Animal 12	1,5		1,79		
Animal 13	1,32				
Média	1,28	1,17	1,83	1,77	2,01
DP	0,10	0,14	0,45	0,49	0,41
EPM	0,03	0,04	0,13	0,15	0,12

Fígado/Massa corporea					
	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	0,0462	0,0389	0,0519	0,0400	0,0459
Animal 2	0,0464	0,0420	0,0555	0,0375	0,0509
Animal 3	0,0451	0,0381	0,0494	0,0587	0,0442
Animal 4	0,0467	0,0389	0,0470	0,0441	0,0372
Animal 5	0,0425	0,0380	0,0401	0,0345	0,0357
Animal 6	0,0446	0,0355	0,0406	0,0418	0,0032
Animal 7	0,0471	0,0348	0,0584	0,0424	0,0486
Animal 8	0,0474	0,0358	0,0402	0,0407	0,0378
Animal 9	0,0476	0,0423	0,0599	0,0552	0,0471
Animal 10	0,0482	0,0354	0,0414	0,0371	0,0450
Animal 11	0,0448	0,0380	0,0397	0,0370	0,0382
Animal 12	0,0489		0,0450		
Animal 13	0,0463				
Média	0,0463	0,0380	0,0474	0,0426	0,0395
DP	0,0017	0,0025	0,0075	0,0077	0,0131
EPM	0,0005	0,0008	0,0022	0,0023	0,0039

**Tabela A6** - Valores individuais referentes à Figura 10 da seção Resultados: Efeitos das dietas padrão, balanceada (DB), balanceada com leite condensado *ad libitum* (DB+LC), hiperlipídica (HFD) e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* (HFD+LC) sobre a atividade das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) (A) e alanina amino transferase (ALT) (B) no soro de camundongos C57Bl/6 tratados durante 12 semanas.

AST					
	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	28,63	17,50	50,11	11,83	36,84
Animal 2	34,05	13,40	38,06	17,85	43,65
Animal 3	27,06	15,23	46,97	38,06	40,68
Animal 4	28,29	17,02	30,56	17,98	47,84
Animal 5	39,29	11,22	37,71	22,00	17,46
Animal 6	19,38	15,41	48,89	12,40	23,57
Animal 7	11,17	10,30	26,54	18,86	12,57
Animal 8	13,97	9,78	18,33	20,08	7,68
Animal 9	8,21	10,65	17,29	17,46	16,94
Animal 10	4,19	21,13	10,48	12,75	15,02
Animal 11	10,65	18,16	18,86		14,14
Animal 12	14,32	6,11			
Média	19,93	13,83	31,25	18,93	25,13
DP	11,22	4,32	14,04	7,55	14,32
EPM	3,24	1,25	4,23	2,39	4,32

ALT					
	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	19,73	17,50	38,76	11,83	27,24
Animal 2	25,67	13,40	33,87	17,85	39,98
Animal 3	15,71	15,23	41,21	38,06	47,32
Animal 4	23,75	17,02	30,56	17,98	44,00
Animal 5	20,08	43,91	20,43	21,48	20,95
Animal 6	10,83	31,86	27,94	11,87	12,57
Animal 7	3,84	8,51	16,41	17,63	18,86
Animal 8	8,56	6,63	13,10	33,35	8,03
Animal 9	16,24	4,02	9,25	11,35	20,60
Animal 10	7,33	8,90	6,81	15,02	28,29
Animal 11	6,29	19,03	15,36		18,16
Animal 12	8,38	9,08			
Animal 13		17,29			
Média	13,87	16,34	23,06	19,64	26,00
DP	7,31	10,94	11,99	9,14	12,85
EPM	2,11	3,03	3,61	2,89	3,87

**Tabela A7** - Valores individuais referentes à Figura 11 da seção Resultados: Efeitos das dietas padrão, balanceada (DB), balanceada com leite condensado *ad libitum* (DB+LC), hiperlipídica (HFD) e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* (HFD+LC) sobre glicemia, colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triacilgliceróis no soro de camundongos C57Bl/6 tratados durante 12 semanas.

Glicemia					
	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	118,42	173,18	209,26	172,20	278,28
Animal 2	110,84	182,67	201,18	200,63	252,69
Animal 3	145,61	164,24	199,83	192,63	240,91
Animal 4	149,40	190,56	236,53	235,00	235,86
Animal 5	90,88	167,34	193,10	237,00	205,56
Animal 6	157,32	194,00	194,15	232,00	129,78
Animal 7	143,55	199,00	191,74	258,00	146,30
Animal 8	133,56	108,78	175,56	344,23	222,72
Animal 9	103,61	131,15	206,54	209,64	155,94
Animal 10	104,30	128,06	173,15	270,22	247,85
Animal 11	125,30	185,89	131,50	319,79	242,69
Animal 12	141,48	151,46	185,20	244,75	209,29
Animal 13	172,46	147,68	173,49	206,20	
Média	130,52	163,38	190,09	240,18	213,99
DP	23,99	28,27	24,62	49,20	46,73
EPM	6,65	7,84	6,83	13,64	13,49

Colesterol Total					
	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	73,30	152,59	188,38	249,83	245,10
Animal 2	74,94	152,85	214,08	152,63	239,26
Animal 3	77,71	181,05	172,92	197,43	228,00
Animal 4	79,45	152,63	198,31	163,23	229,74
Animal 5	86,92	103,75	178,14	176,68	195,85
Animal 6	87,13	104,72	180,60	245,21	153,37
Animal 7	86,31	164,48	171,90	187,40	207,98
Animal 8	91,91	114,39	177,93	197,25	183,53
Animal 9	90,41	102,73	155,63	221,13	186,14
Animal 10	78,10	133,80	170,28	215,54	217,59
Animal 11	78,38	168,14	220,48	202,66	186,33
Animal 12	84,07	135,29	220,48	200,61	
Animal 13	86,96	118,03	168,79	203,31	
Média	82,74	137,27	185,99	200,99	206,63
DP	6,05	26,78	21,05	28,19	28,24
EPM	1,68	7,43	5,84	7,82	8,51

LDL-colesterol					
	PADRAO	DB	HFD	DB + LC	HFD + LC
Animal 1	31,93	118,20	162,49	95,52	140,66
Animal 2	28,46	119,99	140,60	120,40	146,27
Animal 3	31,93	100,09	145,86	97,78	123,65
Animal 4	33,65	89,30	208,82	109,14	131,61
Animal 5	40,04	108,02	149,52	101,05	105,23
Animal 6	37,73	111,90	115,22	86,90	72,08
Animal 7	36,79	92,80	201,24	97,20	116,92
Animal 8	35,26	49,95	106,20	95,64	91,91
Animal 9	39,82	45,59	125,56	73,06	101,77
Animal 10	34,14	64,01	120,45	97,62	124,56
Animal 11	31,35	86,62	115,28	120,30	98,96
Animal 12	34,42	64,45	109,79	124,88	
Animal 13	34,23	57,19	113,35	81,11	
Média	34,60	85,24	139,57	100,05	113,96
DP	3,36	26,31	33,78	15,39	22,30
EPM	0,93	7,30	9,37	4,27	6,72

Triacilgliceróis					
	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	75,79	68,41	60,00	66,69	60,59
Animal 2	67,08	72,29	65,17	56,35	70,33
Animal 3	68,86	79,76	66,49	64,96	77,27
Animal 4	76,68	74,44	63,39	92,74	84,06
Animal 5	69,30	96,58	79,34	100,66	76,09
Animal 6	65,46	99,19	57,93	72,94	83,91
Animal 7	52,03	37,30	60,44	52,52	87,47
Animal 8	94,11	44,84	53,26	66,21	67,16
Animal 9	67,05	47,68	50,53	69,26	71,16
Animal 10	60,63	46,32	43,89	59,79	53,79
Animal 11	64,63	50,21	54,11	51,68	60,74
Animal 12	66,84	44,21	40,53	56,42	
Animal 13	67,16	41,47	32,53	50,84	
Média	68,89	61,75	55,97	66,24	72,05
DP	9,75	21,27	12,28	15,32	10,89
EPM	2,70	5,90	3,41	4,25	3,28

**Tabela A8a** - Valores individuais referentes à Figura 12A da seção Resultados: Efeitos das dietas padrão, balanceada (DB), balanceada com leite condensado *ad libitum* (DB+LC), hiperlipídica (HFD) e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* (HFD+LC) sobre a concentração sérica de glicose após 6 horas de restrição alimentar e administração de 2 g/Kg p.c. de glicose, via intraperitoneal, e coleta de sangue via caudal, em animais C57Bl/6J (A) após tratamento de 12 semanas.

Dieta Padrao																
Tempo (min)	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Animal 8	Animal 9	Animal 10	Animal 11	Animal 12	Animal 13	Média	DP	EPM
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
15	106	121	41	182	285	163	121	86	100	50	69	61	76	112	66,5	18,5
30	84	187	160	128	286	168	154	70	97	37	71	60	72	121	68,7	19,1
45	66	85	69	107	133	162	107	59	80	32	55	47	77	83	36,2	10,0
60	19	114	80	116	144	156	117	41	54	26	39	27	61	76	47,7	13,2
90	84	68	-6	60	111	55	76	55	31	9	20	13	23	46	34,0	9,4

Dieta DB																
Tempo (min)	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Animal 8	Animal 9	Animal 10	Animal 11	Animal 12	Média	DP	EPM	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	
15	145	64	151	83	51	121	105	145	68	49	120	162	105	41,1	11,9	
30	112	194	132	54	53	93	101	181	173	141	170	218	135	53,9	15,6	
45	109	143	141	16	47	25	140	160	124	126	193	224	121	63,6	18,3	
60	56	75	36	74	79	25	156	145	112	58	20	77	76	43,1	12,5	
90	52	135	86	0	0	-6	85	36	127	43	141	117	68	54,8	15,8	

Dieta DB + LC																
Tempo (min)	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Animal 8	Animal 9	Animal 10	Animal 11	Animal 12	Animal 13	Média	DP	EPM
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
15	72	243	137	168	179	146	128	83	68	92	112	66	112	124	51,6	14,3
30	158	216	164	196	269	163	163	151	76	130	301	159	143	176	58,5	16,2
45	126	324	141	168	254	187	248	148	208	179	325	157	170	203	65,9	18,3
60	180	327	123	183	213	247	195	36	123	92	319	239	148	186	84,6	23,5
90	161	255	79	129	151	263	188	105	112	153	289	145	121	165	65,5	18,2

Dieta HFD																
Tempo (min)	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Animal 8	Animal 9	Animal 10	Animal 11	Animal 12	Animal 13	Média	DP	EPM
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
15	156	76	213	177	129	212	168	-91	158	-7	149	84	127	119	86,7	24,0
30	242	175	206	205	188	209	177	149	288	104	171	186	176	190	44,0	12,2
45	321	160	205	278	184	214	93	77	278	154	277	207	118	197	76,4	21,2
60	165	234	170	308	124	199	102	144	373	149	221	220	181	199	74,8	20,7
90	330	127	73	308	33	76	55	37	316	128	225	86	80	144	110,7	30,7

Dieta HFD + LC																
Tempo (min)	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Animal 8	Animal 9	Animal 10	Animal 11	Animal 12	Média	DP	EPM	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	
15	177	222	108	146	142	205	251	137	168	106	83	85	152	54,0	15,6	
30	274	241	148	242	214	414	325	86	293	205	108	239	232	91,7	26,5	
45	313	305	132	241	196	414	283	247	373	230	227	228	266	77,2	22,3	
60	341	268	151	268	156	242	372	276	243	244	203	265	253	64,4	18,6	
90	321	235	110	191	94	358	198	203	180	196	218	205	209	73,8	21,3	

**Tabela A8b** - Valores individuais referentes à Figura 12B da seção Resultados: Efeitos das dietas padrão, balanceada (DB), balanceada com leite condensado *ad libitum* (DB+LC), hiperlipídica (HFD) e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* (HFD+LC) sobre a área incremental da glicose sérica em animais C57Bl/6J (A) após tratamento de 12 semanas.

	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	5516	7521	11791	19448	23924
Animal 2	9467	9741	22931	13354	21074
Animal 3	5770	8471	10573	14274	10862
Animal 4	9761	3957	14037	21458	18338
Animal 5	15467	4040	17577	10824	13203
Animal 6	11720	4088	16928	15119	26312
Animal 7	9515	9973	15281	9689	24232
Animal 8	4983	11091	8112	7715	16306
Animal 9	5840	9893	9725	23992	20685
Animal 10	2514	6702	10373	9156	16544
Animal 11	4094	9829	22595	17305	14104
Animal 12	3320	12547	13281	13399	17306
Animal 13	5091		11507	11587	
Média	7158	8154	14209	14409	18574
DP	3748	2912	4704	4945	4772
EPM	1039	840,6	1372	1305	1377

**Tabela A9a** - Valores individuais referentes à Figura 13A da seção Resultados: Efeitos das dietas padrão, balanceada (DB), balanceada com leite condensado *ad libitum* (DB+LC), hiperlipídica (HFD) e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* (HFD+LC) sobre os valores glicêmicos após a administração de 0,75 mU/por grama de massa corpórea de insulina após 6 horas de jejum, via intraperitoneal, e coleta de sangue via caudal, de camundongos C57Bl/6J tratados durante 12 semanas.

Dieta Padrao																
Tempo (min)	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Animal 8	Animal 9	Animal 10	Animal 11	Animal 12	Animal 13	Média	DP	EPM
0	192	176	163	192	185	184	179	200	194	176	221	189	182	187	14,0	3,9
10	106	142	129	156	160	125	132	168	103	112	168	152	148	139	22,6	6,3
20	93	112	106	109	96	121	93	116	94	107	120	101	111	106	10,0	2,8
30	96	112	108	104	107	107	102	109	107	106	130	96	110	107	8,4	2,3
40	97	102	101	107	98	105	94	105	113	115	122	93	111	105	8,6	2,4
50	95	111	107	112	117	111	102	113	113	118	127	88	109	109	10,0	2,8
60	96	127	106	122	114	117	102	113	123	126	122	82	112	112	13,1	3,6

Dieta DB																
Tempo (min)	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Animal 8	Animal 9	Animal 10	Animal 11	Animal 12	Animal 13	Média	DP	EPM
0	198	199	168	187	156	167	194	262	230	232	228	237	268	210	36,0	10,0
10	115	149	109	109	165	168	122	167	154	187	197	139	153	149	28,7	8,0
20	88	88	72	122	110	104	84	114	116	127	111	108	109	104	16,2	4,5
30	69	62	38	104	74	104	76	127	115	115	102	107	122	93	26,9	7,5
40	52	42	28	84	55	101	45	118	118	111	103	111	120	84	34,2	9,5
50	46	29	19	58	48	103	34	132	123	99	111	98	127	79	40,9	11,3
60	54	22	16	46	49	111	29	137	138	93	133	95	150	83	48,7	13,5

Dieta DB + LC																
Tempo (min)	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Animal 8	Animal 9	Animal 10	Animal 11	Animal 12	Animal 13	Média	DP	EPM
0	233	230	206	209	218	245	249	227	213	225	213	168	201	218	20,9	5,8
10	217	171	155	181	161	222	246	200	186	216	188	151	152	188	30,4	8,4
20	124	98	97	113	108	169	154	119	121	99	119	108	102	118	21,7	6,0
30	114	96	90	92	113	126	112	124	90	112	118	51	76	101	21,4	5,9
40	105	97	66	77	106	107	102	110	67	37	101	37	63	83	26,5	7,3
50	125	88	74	69	101	91	97	94	57	72	103	0	67	80	30,3	8,4
60	121	80	90	57	106	81	107	102	68	62	112	0	79	82	31,7	8,8

Dieta HFD																
Tempo (min)	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Animal 8	Animal 9	Animal 10	Animal 11	Animal 12	Animal 13	Média	DP	EPM
0	229	206	175	269	235	237	232	275	272	249	371	270	229	250	46,3	12,8
10	234	189	158	290	177	172	130	253	246	225	368	278	182	223	64,9	18,0
20	133	110	113	196	113	101	104	114	135	110	148	98	99	121	27,1	7,5
30	105	122	74	135	108	100	90	119	111	115	172	138	116	116	24,0	6,7
40	95	144	59	133	83	85	77	115	106	188	178	131	99	115	38,7	10,7
50	98	163	55	129	82	66	59	112	105	110	93	120	88	98	30,0	8,3
60	107	190	57	138	64	49	55	121	102	101	217	116	81	108	51,1	14,2

Dieta HFD + LC																
Tempo (min)	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Animal 8	Animal 9	Animal 10	Animal 11	Animal 12	Média	DP	EPM	
0	306	325	229	225	210	255	243	252	231	277	253	268	256	33,7	9,7	
10	338	329	264	255	201	261	208	253	243	294	277	275	267	41,1	11,9	
20	258	225	129	133	124	178	170	127	176	192	152	163	169	41,3	11,9	
30	162	146	118	109	97	146	90	133	102	124	118	140	124	22,2	6,4	
40	163	136	109	108	98	144	75	126	99	129	113	122	119	23,4	6,8	
50	166	165	117	111	100	122	60	136	100	139	108	114	120	29,3	8,5	
60	180	198	123	121	96	135	53	152	99	153	113	108	128	39,4	11,4	

**Tabela A9b** - Valores individuais referentes à Figura 13B da seção Resultados: Efeitos das dietas padrão, balanceada (DB), balanceada com leite condensado *ad libitum* (DB+LC), hiperlipídica (HFD) e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* (HFD+LC) sobre a taxa de decaimento da glicemia após a administração de 0,75 mU/por grama de massa corpórea de insulina após 6 horas de jejum, via intraperitoneal, e coleta de sangue via caudal, em camundongos C57Bl/6J tratados durante 12 semanas.

	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	3,62	4,06	3,15	2,72	0,85
Animal 2	2,26	4,08	4,27	3,14	1,84
Animal 3	2,15	4,24	3,77	2,19	2,87
Animal 4	2,83	2,14	3,08	1,58	2,63
Animal 5	3,28	1,75	3,51	3,66	2,63
Animal 6	2,10	2,37	1,86	4,27	1,80
Animal 7	3,27	4,19	2,40	4,01	1,79
Animal 8	2,72	4,16	3,23	4,40	3,43
Animal 9	3,62	3,42	2,83	3,50	1,36
Animal 10	2,49	3,01	4,11	4,09	1,83
Animal 11	3,05	3,60	2,91	4,60	2,55
Animal 12	3,13	3,93	2,21	5,07	2,49
Animal 13	2,47	4,50	3,39	4,19	
Média	2,85	3,49	3,13	3,65	2,17
DP	0,53	0,90	0,71	1,00	0,72
EPM	0,15	0,25	0,20	0,28	0,21

**Tabela A10** - Valores individuais referentes à Figura 14 da seção Resultados: Efeitos das dietas padrão, balanceada (DB), balanceada com leite condensado *ad libitum* (DB+LC), hiperlipídica (HFD) e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* (HFD+LC) sobre os valores de insulinemia (ng/mL) e o índice HOMA-IR em camundongos C57Bl/6J tratados durante 12 semanas.

Insulinemia						HOMA-IR					
	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC		PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	0,461	0,281	1,321	0,527	1,882	Animal 1	6,302	3,301	21,915	6,191	41,003
Animal 2	0,674	0,240	1,576	0,346	4,439	Animal 2	8,446	2,085	25,808	4,065	102,717
Animal 3	0,649	0,354	2,190	1,268	5,366	Animal 3	7,532	4,260	32,121	24,827	87,490
Animal 4	0,347	0,230	1,065	1,512	4,039	Animal 4	4,744	4,290	15,848	29,282	64,704
Animal 5	0,551	0,271	0,819	1,087	2,062	Animal 5	7,258	4,438	12,712	19,271	30,831
Animal 6	0,527	0,334	0,906	3,727	1,359	Animal 6	6,904	5,517	15,804	98,448	24,674
Animal 7	0,445	0,409	1,135	0,998	0,273	Animal 7	5,671	6,639	20,122	19,185	41,070
Animal 8	0,271	0,469	1,157	1,390	2,289	Animal 8	3,859	7,914	18,700	22,663	10,049
Animal 9	0,366	0,350	0,662	0,858	0,611	Animal 9	5,055	6,678	10,040	7,566	55,636
Animal 10	0,383		0,410	1,224	2,821	Animal 10	4,799		6,568	12,398	35,450
Animal 11	0,290		1,361	0,348	1,968	Animal 11	4,563		20,640	2,986	25,405
Animal 12	0,432		0,968	1,379	1,383	Animal 12	5,813		11,579	15,036	
Média	0,450	0,326	1,131	1,222	2,374	Média	5,912	5,014	17,655	21,826	47,184
DP	0,130	0,079	0,460	0,886	1,544	DP	1,396	1,837	7,128	25,589	28,156
EPM	0,038	0,026	0,133	0,256	0,446	EPM	0,403	0,612	2,058	7,387	8,128

**Tabela A10** - Valores individuais referentes à Figura 15 da seção Resultados: Efeitos das dietas padrão, balanceada (DB), balanceada com leite condensado *ad libitum* (DB+LC), hiperlipídica (HFD) e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* (HFD+LC) sobre os conteúdos de IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , VCAM-1, ICAM-1, adiponectina e leptina no tecido adiposo epididimal de camundongos C57Bl/6J tratados durante 12 semanas.

IL-6	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	4171	4781	16184	7200	21582
Animal 2	4332	7752	9367	10664	16184
Animal 3	4629	6696	11570	5304	14104
Animal 4	2480	3210	10660	10167	14080
Animal 5	5460	7906	8532		12172
Animal 6	4900		9323		
Animal 7			7605		
Média	4329	6069	10463	8334	15624
DP	1013,8	2026,9	2839,9	2533,6	3620,2
EPM	413,9	906,5	1073,4	1266,8	1619,0

IL-10	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	12328	43792	43792	22032	57552
Animal 2	14136	31285	31285	28208	38341
Animal 3	14784	47960	39160	15164	38700
Animal 4	7653	21190	21190	20838	69333
Animal 5	17160	24516	24516		48927
Animal 6	11700	24043	24043		
Animal 7		30176	30176		
Média	12960	31852	30594	21561	50571
DP	3240,3	10276,5	8331,8	5349,4	13171,6
EPM	1322,9	3884,2	3149,1	2674,7	5890,5

TNF- $\alpha$	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	7912	20543	26973	9648	39894
Animal 2	10184	20976	34095	25456	27744
Animal 3	11723	12816	26522	7072	40936
Animal 4	8827	7490	26000	4832	30720
Animal 5	14473	20414	68364		14559
Animal 6	10000		21467		
Animal 7			18277		
Média	10520	16448	31671	11752	30771
DP	2329,3	6050,5	16914,0	9345,5	10707,0
EPM	950,9	2705,9	6392,9	4672,8	4788,3

IL-1 $\beta$	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	3251	4260	10155	5760	22236
Animal 2	3458	6941	10303	12384	11753
Animal 3	3920	3744	9434	3196	12900
Animal 4	1707	3281	3250	6342	11093
Animal 5	8710	6962	4860		15752
Animal 6	3567		6379		
Animal 7			6133		
Média	4102	5038	7216	6921	14747
DP	2384,5	1781,2	2776,1	3890,3	4550,3
EPM	973,5	796,6	1049,3	1945,1	2035,0

VCAM-1	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	57592	78242	233875	141040	301276
Animal 2	78318	105032	168975	70176	337552
Animal 3	71083	109512	265042	108015	188512
Animal 4	40720	67981	170950		264960
Animal 5	81900	145376	133056		223392
Animal 6	55133		121440		122368
Animal 7			128923		
Média	64124	101229	174609	106410	239677
DP	15729,8	30273,3	55342,1	35459,2	78304,1
EPM	6421,6	13538,6	20917,4	20472,4	31967,5

ICAM-1	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	81297	53297	245457	68832	297570
Animal 2	94886	130517	221803	119024	296321
Animal 3	78064	85464	224102	118116	349848
Animal 4	57200	52501	132730	150799	299307
Animal 5	105863	147382	116748		171363
Animal 6	61667		118128		50859
Animal 7			123280		
Média	79830	93832	168893	114193	244211
DP	18717,4	43688,5	58301,0	33844,4	111758,1
EPM	7641,4	19538,1	22035,7	16922,2	45625,1

Adiponectina	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	1242000	1467333	6267334	2304000	1090000
Animal 2	1976000	2432000	3465667	3182000	963333
Animal 3	2240000	3492000	2047000	1802000	3612000
Animal 4	1840000	1997333	910000	3573667	960000
Animal 5	2903333	4543000	2808000		1312667
Animal 6	2050000		3312000		887467
Animal 7			2760000		
Média	2041889	2786333	3081429	2715417	1470911
DP	541539,0	1232038,8	1648940,1	807854,6	1059572,4
EPM	221082,4	550984,5	623240,8	403927,3	432568,6

Leptina	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	5980	5633	89488	52992	216038
Animal 2	6384	8056	81677	65876	196520
Animal 3	5077	14400	86508	10948	221536
Animal 4	2613	10914	44720	16006	242560
Animal 5	7627	24544	35640		156804
Animal 6	4300		26741		74411
Animal 7			27968		
Média	5330	12709	56106	36456	184645
DP	1750,1	7380,3	28563,0	27128,3	61267,2
EPM	714,5	3300,6	10795,8	13564,2	25012,2

**Tabela A11** - Valores individuais referentes à Figura 16 da seção Resultados: Efeitos das dietas padrão, balanceada (DB), balanceada com leite condensado *ad libitum* (DB+LC), hiperlipídica (HFD) e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* (HFD + LC) sobre a expressão de genes inflamatórios: F4/80, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TLR-4, adiponectina e leptina no tecido adiposo epididimal de camundongos C57Bl/6J tratados durante 12 semanas.

F4/80	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	1,51	0,97	2,05	3,29	1,86
Animal 2	1,49	1,07	3,38	3,27	11,14
Animal 3	0,79	1,59	2,17	10,54	8,21
Animal 4	0,43	1,12	4,25	7,45	6,14
Animal 5	1,08	0,54	1,76	1,51	3,29
Animal 6	0,79	1,23	1,71	2,12	3,70
Animal 7	0,97	1,41	2,28	1,43	
Animal 8		1,12		3,38	
Animal 9		0,51		5,34	
Animal 10		1,74		2,23	
Animal 11		1,48		2,49	
Animal 12		1,25		7,00	
Animal 13		1,08		8,04	
Animal 14		0,57			
Animal 15		0,54			
Animal 16		0,94			
Média	1,01	1,07	2,52	4,47	5,72
DP	0,39	0,38	0,95	2,92	3,48
EPM	0,15	0,10	0,36	0,81	1,42

IL-1 $\beta$	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	1,47	1,72	1,38	1,34	0,70
Animal 2	1,85	0,72	1,48	0,71	0,99
Animal 3	0,67	0,80	0,32	1,55	0,92
Animal 4	1,67	0,69	1,74	0,68	1,30
Animal 5	1,03	1,45	1,35		1,00
Animal 6	0,56		1,87		1,77
Animal 7	0,90		1,69		
Média	1,16	1,08	1,41	1,07	1,11
DP	0,50	0,48	0,52	0,45	0,38
EPM	0,19	0,21	0,19	0,22	0,15

TNF- $\alpha$	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	0,57	1,11	0,90	1,84	0,59
Animal 2	1,02	0,31	0,67	0,83	1,86
Animal 3	0,33	0,77	1,00	1,15	1,36
Animal 4	0,40	1,05	1,42	1,03	1,44
Animal 5	1,24		0,83		3,11
Animal 6	0,37		2,80		0,97
Animal 7			1,12		
Média	0,65	0,81	1,25	1,21	1,55
DP	0,38	0,37	0,72	0,44	0,88
EPM	0,16	0,18	0,27	0,22	0,36

TLR-4	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	1,20	1,72	0,90	1,12	1,00
Animal 2	1,41	1,01	0,80	0,77	1,74
Animal 3	0,52	1,02	0,69	1,22	0,78
Animal 4	0,78	0,78	1,41	1,09	0,91
Animal 5	1,57	0,41	0,60		2,81
Animal 6	0,87		1,87		1,08
Animal 7	1,07		1,66		
Média	1,06	0,99	1,13	1,05	1,39
DP	0,37	0,48	0,51	0,19	0,78
EPM	0,14	0,21	0,19	0,10	0,32

Adiponectina	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	1,80	2,58	0,86	0,87	1,01
Animal 2	1,87	1,27	0,88	0,61	0,20
Animal 3	0,74	0,97	0,40	0,29	0,12
Animal 4	1,08	0,96	0,64	0,21	0,22
Animal 5	1,79	0,33	0,71	0,68	0,82
Animal 6	0,95	1,23	2,30	0,62	
Animal 7	1,18	1,72	2,01	0,98	
Animal 8		1,06		0,75	
Animal 9		0,44		0,38	
Animal 10		0,73		0,57	
Animal 11		1,88		0,81	
Animal 12		1,37		0,60	
Animal 13		1,73		0,67	
Animal 14		0,78			
Animal 15		0,53			
Animal 16		0,74			
Média	1,34	1,15	1,11	0,62	0,47
DP	0,46	0,60	0,73	0,22	0,41
EPM	0,18	0,15	0,28	0,06	0,18

Leptina	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	0,80	1,60	3,73	3,34	2,62
Animal 2	0,96	0,72	4,56	1,96	2,08
Animal 3	0,35	1,85	3,29	0,36	1,53
Animal 4	0,65	1,16	3,11	0,36	2,17
Animal 5	1,03	0,40	2,73	3,41	3,60
Animal 6	0,64	1,38	5,85	3,20	
Animal 7	0,65	1,43	3,73	2,85	
Animal 8		2,11		3,43	
Animal 9		0,75		3,27	
Animal 10		1,78		1,92	
Animal 11		2,10		1,72	
Animal 12		0,45		4,08	
Animal 13		0,82		4,69	
Animal 14		0,71			
Animal 15		0,46			
Animal 16		0,72			
Média	0,73	1,15	3,86	2,66	2,40
DP	0,23	0,60	1,05	1,32	0,77
EPM	0,09	0,15	0,40	0,37	0,35

**Tabela A12** - Valores individuais referentes à Figura 17 da seção Resultados: Efeitos das dietas padrão, balanceada (DB), balanceada com leite condensado *ad libitum* (DB+LC), hiperlipídica (HFD) e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* (HFD+LC) sobre o conteúdo de ICAM-1, VCAM-1, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  na aorta torácica de camundongos C57Bl/6J tratados durante 12 semanas.

ICAM-1	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	0,501	0,207	0,256	0,35	0,193
Animal 2	0,397	0,187	0,257	0,198	0,224
Animal 3	0,427	0,211	0,27	0,317	0,274
Animal 4	0,396	0,369	0,214	0,257	0,241
Animal 5	0,359	0,307	0,27		0,196
Animal 6	0,264		0,207		0,235
Animal 7	0,146		0,287		
Média	0,356	0,256	0,252	0,281	0,227
DP	0,117	0,078	0,030	0,067	0,030
EPM	0,044	0,035	0,011	0,034	0,012

VCAM-1	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	0,44	0,392	0,455	0,36	0,346
Animal 2	0,48	0,412	0,436	0,408	0,444
Animal 3	0,488	0,441	0,425	0,527	0,529
Animal 4	0,471	0,62	0,478	0,439	0,469
Animal 5	0,528	0,438	0,481		0,469
Animal 6	0,457		0,475		0,418
Animal 7	0,218		0,385		
Média	0,440	0,461	0,448	0,434	0,446
DP	0,102	0,091	0,035	0,070	0,061
EPM	0,038	0,041	0,013	0,035	0,025

IL-1 $\beta$	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	0,04	0,039	0,037	0,034	0,023
Animal 2	0,045	0,039	0,027	0,042	0,029
Animal 3	0,034	0,03	0,031	0,023	0,026
Animal 4	0,031	0,042	0,034	0,04	0,049
Animal 5	0,035	0,038	0,032		0,038
Animal 6	0,02		0,03		0,033
Animal 7	0,015		0,033		
Média	0,031	0,038	0,032	0,035	0,033
DP	0,011	0,005	0,003	0,009	0,009
EPM	0,004	0,002	0,001	0,004	0,004

IL-6	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	0,0069	0,0066	0,005	0,0042	0,0033
Animal 2	0,007	0,004	0,0024	0,0047	0,0027
Animal 3	0,0071	0,0065	0,0045	0,0052	0,0028
Animal 4	0,0035	0,0121	0,0056	0,0072	0,002
Animal 5	0,0053	0,0053	0,0043		0,0024
Animal 6	0,0029		0,0039		0,004
Animal 7	0,0017		0,0049		
Média	0,0049	0,0069	0,0044	0,0053	0,0029
DP	0,0022	0,0031	0,0010	0,0013	0,0007
EPM	0,0008	0,0014	0,0004	0,0007	0,0003

TNF- $\alpha$	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	0,036	0,036	0,016	0,026	0,01
Animal 2	0,045	0,011	0,011	0,025	0,007
Animal 3	0,028	0,017	0,016	0,013	0,008
Animal 4	0,016	0,053	0,006	0,068	0,005
Animal 5	0,033	0,017	0,012		0,005
Animal 6	0,004		0,011		0,016
Animal 7	0,007		0,017		
Média	0,024	0,027	0,013	0,033	0,009
DP	0,015	0,017	0,004	0,024	0,004
EPM	0,006	0,008	0,001	0,012	0,002

**Tabela A13** - Valores individuais referentes à Figura 18 da seção Resultados: Efeitos das dietas padrão, balanceada (DB), balanceada com leite condensado *ad libitum* (DB+LC), hiperlipídica (HFD) e hiperlipídica com leite condensado *ad libitum* (HFD+LC) sobre os conteúdos de ICAM-1, VCAM-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, adiponectina e leptina na gordura perivascular da aorta torácica de camundongos C57Bl/6J tratados durante 12 semanas.

ICAM-1	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	0,617	0,409	0,427	0,297	0,395
Animal 2	0,553	0,381	0,468	0,443	0,451
Animal 3	0,759	0,544	0,531	0,447	0,304
Animal 4	0,561	0,422	0,403	0,414	0,463
Animal 5	0,630	0,502	0,560		0,369
Animal 6	0,777		0,341		0,372
Animal 7	0,482		0,452		
Média	0,626	0,452	0,455	0,400	0,392
DP	0,109	0,068	0,075	0,070	0,059
EPM	0,041	0,031	0,028	0,035	0,024

VCAM-1	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	0,471	0,535	0,404	0,582	0,416
Animal 2	0,510	0,484	0,403	0,556	0,511
Animal 3	0,565	0,722	0,568	0,471	0,492
Animal 4	0,415	0,631	0,459	0,482	0,447
Animal 5	0,538	0,705	0,508		0,500
Animal 6	0,649		0,428		0,415
Animal 7	0,547		0,395		
Média	0,528	0,615	0,452	0,523	0,464
DP	0,074	0,104	0,065	0,055	0,043
EPM	0,028	0,047	0,024	0,027	0,018

IL-1 $\beta$	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	0,146	0,160	0,133	0,137	0,138
Animal 2	0,171	0,178	0,157	0,157	0,122
Animal 3	0,189	0,108	0,126	0,112	0,128
Animal 4	0,132	0,194	0,141	0,146	0,146
Animal 5	0,181	0,104	0,147		0,137
Animal 6	0,155		0,134		0,117
Animal 7	0,126		0,166		
Média	0,157	0,149	0,143	0,138	0,131
DP	0,024	0,041	0,014	0,019	0,011
EPM	0,009	0,018	0,005	0,010	0,004

IL-6	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	0,0821	0,0700	0,0769	0,0517	0,0360
Animal 2	0,0752	0,0638	0,0654	0,0600	0,0374
Animal 3	0,0794	0,0577	0,0581	0,0508	0,0699
Animal 4	0,0541	0,0608	0,0622	0,0536	0,0479
Animal 5	0,0900	0,0513	0,1110		0,0671
Animal 6	0,0780		0,0711		0,0528
Animal 7	0,0654		0,0660		
Média	0,075	0,061	0,073	0,054	0,052
DP	0,012	0,007	0,018	0,004	0,014
EPM	0,004	0,003	0,007	0,002	0,005

TNF- $\alpha$	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	0,102	0,114	0,090	0,082	0,068
Animal 2	0,119	0,097	0,097	0,098	0,063
Animal 3	0,126	0,078	0,072	0,082	0,061
Animal 4	0,094	0,091	0,096	0,067	0,079
Animal 5	0,131	0,067	0,097		0,065
Animal 6	0,086		0,080		
Animal 7	0,077		0,096		
Média	0,105	0,089	0,090	0,082	0,067
DP	0,021	0,018	0,010	0,013	0,007
EPM	0,008	0,008	0,004	0,006	0,003

IL-10	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	0,081	0,098	0,078	0,061	0,055
Animal 2	0,077	0,081	0,070	0,071	0,059
Animal 3	0,090	0,089	0,115	0,062	0,048
Animal 4	0,062	0,089	0,071	0,062	0,059
Animal 5	0,079	0,081	0,097		0,071
Animal 6	0,076		0,080		0,053
Animal 7	0,070		0,101		
Média	0,076	0,087	0,088	0,064	0,058
DP	0,009	0,007	0,017	0,005	0,008
EPM	0,003	0,003	0,007	0,002	0,003

Adiponectina	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	15,73	11,73	12,50	17,70	17,60
Animal 2	21,33	18,32	9,84	10,83	19,01
Animal 3	17,09	15,74	14,83	10,13	12,63
Animal 4	13,28	15,76	10,89	17,30	13,29
Animal 5	10,67	9,65	11,66		11,67
Animal 6	16,19		10,31		15,43
Animal 7	12,66		15,55		
Média	15,28	14,24	12,23	13,99	14,94
DP	3,49	3,48	2,21	4,07	2,92
EPM	1,32	1,56	0,84	2,03	1,19

Leptina	PADRAO	DB	DB + LC	HFD	HFD + LC
Animal 1	0,122	0,103	0,083	0,099	0,066
Animal 2	0,177	0,096	0,081	0,108	0,072
Animal 3	0,181	0,102	0,090	0,083	0,072
Animal 4	0,105	0,107	0,102	0,062	0,103
Animal 5	0,155	0,079	0,125		0,068
Animal 6	0,103		0,067		0,026
Animal 7	0,109		0,101		
Média	0,136	0,097	0,093	0,088	0,068
DP	0,034	0,011	0,019	0,020	0,025
EPM	0,013	0,005	0,007	0,010	0,010

**Tabela A14a** - Valores individuais referentes à Tabela 3 da seção Resultados: Parâmetros metabólicos de camundongos C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada (DB) ou hiperlipídica (HFD), suplementados ou não com óleo de peixe (OP): ganho de massa corpórea, consumo alimentar, consumo calórico e eficiência alimentar.

Ganho de massa corporea				
	DB	DB + OP	HFD	HFD + OP
Animal 1	3,2	4,2	10,2	8,6
Animal 2	4,4	3,6	12,8	10
Animal 3	2,2	1,8	9,8	9,4
Animal 4	6,6	1,2	17,8	13,6
Animal 5	3	1,6	21,7	8,6
Animal 6	5,7	2,6	19,8	10,2
Animal 7	6	6	11	15,8
Animal 8	4,8	6,3	9,4	11,9
Animal 9	4,2	8,7	7,6	10,4
Animal 10	3,6	8,4	10,2	10,6
Animal 11	3,4	8,6	19	7,2
Animal 12	2,6	-2,6	17,2	7,2
Animal 13	4,9	2,2	13,4	11
Animal 14	3,6	3,2	10	10,2
Animal 15	1,9	4	12,1	3,6
Animal 16	-0,3	4	12,9	10
Animal 17	4	-2,9	11,2	6,4
Animal 18	3,1	2,3	10,7	10,7
Animal 20	2,9	2,3	8,6	9,4
Animal 21	2,6	2,9	7,2	10,8
Animal 22	0,5	3,4	9,5	5,8
Média	3,47	3,42	12,48	9,59
DP	1,67	3,06	4,18	2,66
EPM	0,36	0,65	0,89	0,57

Consumo alimentar				
	DB	DB + OP	HFD	HFD + OP
caixa 1 semana 5	19,8	25,6	15,1	12
caixa 1 semana 6	23,8	22,9	15,7	13,2
caixa 1 semana 7	20,6	20,4	15	12,7
caixa 1 semana 8	21,1	21,3	15,4	13,3
caixa 1 semana 9	22,5	22,2	16,1	12,8
caixa 1 semana 10	22,7	27,8	14,9	14,55
caixa 1 semana 11	27,3	27,25	17,55	14,55
caixa 1 semana 12	27,8	29,65	14,8	17,35
caixa 2 semana 5	26,8	28,75	15,7	15,45
caixa 2 semana 6	26,4	28,2	15,7	16,54
caixa 2 semana 7	33,95	27,14	14,3	15,98
caixa 2 semana 8	31,025	26,8	19,6	17,52
caixa 2 semana 9	27,025	22,16	17,7	10,2
caixa 2 semana 10	28,175	19,84	18,5	16,44
caixa 2 semana 11	24,95	20,8	19,2	17,7
caixa 2 semana 12	30,6	20,8	19,8	19,4
caixa 3 semana 5	27,225	20,44	21,3	17,2
caixa 3 semana 6	25,76	32,02	19,9	15,1
caixa 3 semana 7	26,1	28,94	16,72	16,6
caixa 3 semana 8	23,72	27,3	15,86	13,4
caixa 3 semana 9	20,72	27,16	13,86	17,6
caixa 3 semana 10	20,18	27,54	16,2	17,5
caixa 3 semana 11	22,4	28,52	13,02	17,8
caixa 3 semana 12	24,16	26,26	13,62	17,5
Média	25,2	25,4	16,5	15,5
DP	3,7	3,6	2,2	2,3
EPM	0,8	0,7	0,5	0,5

Consumo calórico				
	DB	DB + OP	HFD	HFD + OP
caixa 1 semana 5	97,36	90,89	91,85	76,36
caixa 1 semana 6	75,3	93,55	80,63	64,08
caixa 1 semana 7	90,51	83,67	83,84	70,49
caixa 1 semana 8	78,34	77,58	80,1	67,82
caixa 1 semana 9	80,24	81	82,24	71,02
caixa 1 semana 10	85,57	81	85,97	71,02
caixa 1 semana 11	86,33	81	79,57	71,02
caixa 2 semana 5	103,82	81	93,72	71,02
caixa 2 semana 6	105,72	105,72	79,03	77,96
caixa 2 semana 7	107,62	103,82	84,37	77,96
caixa 2 semana 8	101,92	112,95	83,84	92,92
caixa 2 semana 9	100,4	114,47	83,84	82,24
caixa 2 semana 10	98,12	109,34	76,36	82,77
caixa 2 semana 11	101,92	107,24	100,93	171,95
caixa 3 semana 5	95,84	98,12	85,97	100,93
caixa 3 semana 6	99,26	101,92	93,98	85,97
caixa 3 semana 7	88,23	95,84	77,43	93,98
caixa 3 semana 8	90,89	99,26	108,94	77,43
caixa 3 semana 9	96,6	88,23	124,42	108,94
caixa 3 semana 10	95,4	90,89	99,86	124,42
caixa 3 semana 11	94,2	96,6	110,3	99,86
Média	93,98	94,96	89,87	87,63
DP	9,01	11,46	12,65	24,63
EPM	1,97	2,50	2,76	5,37

Eficiência alimentar				
	DB	DB + OP	HFD	HFD + OP
caixa 1 semana 5	0,060	0,010	0,200	0,120
caixa 1 semana 6	0,000	0,040	0,110	0,030
caixa 1 semana 7	0,020	0,040	0,150	0,090
caixa 1 semana 8	0,020	-0,050	0,110	0,040
caixa 1 semana 9	-0,040	0,030	0,100	0,040
caixa 1 semana 10	0,000	0,060	0,100	0,020
caixa 1 semana 11	0,000	-0,080	0,000	0,070
caixa 1 semana 12	-0,020	0,110	0,060	0,060
caixa 2 semana 5	0,040	0,040	0,120	0,030
caixa 2 semana 6	0,050	0,060	0,020	0,040
caixa 2 semana 7	0,010	-0,030	0,090	-0,020
caixa 2 semana 8	-0,010	-0,110	0,030	-0,080
caixa 2 semana 9	-0,080	-0,030	0,040	-0,020
caixa 2 semana 10	0,080	-0,010	0,020	-0,010
caixa 2 semana 11	0,060	0,120	0,050	0,080
caixa 2 semana 12	-0,060	-0,120	0,000	-0,080
caixa 3 semana 5	0,090	0,050	0,070	0,310
caixa 3 semana 6	-0,050	-0,060	0,130	0,000
caixa 3 semana 7	0,020	0,000	0,110	0,190
caixa 3 semana 8	0,040	0,060	0,090	0,050
caixa 3 semana 9	0,000	0,030	0,070	0,050
caixa 3 semana 10	-0,040	-0,050	0,070	0,150
caixa 3 semana 11	0,060	0,090	0,050	0,120
caixa 3 semana 12	-0,040	-0,050	0,000	0,050
Média	0,0088	0,0063	0,0746	0,0554
DP	0,0458	0,0658	0,0508	0,0837
EPM	0,0094	0,0134	0,0104	0,0171

**Tabela A14b** - Valores individuais referentes à Tabela 3 da seção Resultados: Parâmetros metabólicos de camundongos C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada (DB) ou hiperlipídica (HFD), suplementados ou não com óleo de peixe (OP): gordura epididimal, mesentérica, retroperitoneal e tecido adiposo marrom (TAM).

G. Epididimal				
	DB	DB + OP	HFD	HFD + OP
Animal 1	1,21	0,93	2,37	1,22
Animal 2	0,77	1,57	2,55	1,57
Animal 3	0,53	0,98	1,36	1,81
Animal 4	0,61	0,62	2,77	1,59
Animal 5	0,98	0,72	2,99	2,15
Animal 6	1,02	0,69	2,60	2,40
Animal 7	0,72	0,98	2,34	1,66
Animal 8	0,43	0,72	1,77	1,87
Animal 9	0,53	1,11	1,94	2,00
Animal 10	0,61	1,27	2,79	2,24
Animal 11	0,76	1,17	2,42	2,03
Animal 12	1,08	0,68	2,37	1,80
Animal 13	1,01	0,58	2,79	2,15
Animal 14	1,59	0,55	2,27	0,91
Animal 15	1,91	0,66	3,65	1,02
Média	0,92	0,88	2,47	1,76
DP	0,41	0,30	0,54	0,44
EPM	0,11	0,08	0,14	0,11

G. Mesentérica				
	DB	DB + OP	HFD	HFD + OP
Animal 1	0,34	0,40	0,50	0,51
Animal 2	0,51	0,51	0,82	0,53
Animal 3	0,35	0,51	0,62	0,58
Animal 4	0,23	0,33	1,07	0,30
Animal 5	0,45	0,36	0,49	0,78
Animal 6	0,19	0,27	0,43	0,28
Animal 7	0,20	0,75	0,53	0,39
Animal 8	0,23	0,24	0,47	0,39
Animal 9	0,27	0,29	0,64	0,42
Animal 10	0,49	0,22	1,36	0,33
Animal 11	0,51	0,23	1,93	0,82
Animal 12	0,36	0,38	1,30	0,35
Animal 13	0,29	0,69	0,74	0,57
Animal 14	0,27	0,28	0,63	0,81
Animal 15	0,35	0,45	1,35	0,59
Média	0,34	0,39	0,86	0,51
DP	0,11	0,16	0,44	0,18
EPM	0,03	0,04	0,11	0,05

G. Retroperitoneal				
	DB	DB + OP	HFD	HFD + OP
Animal 1	0,20	0,11	0,67	0,40
Animal 2	0,27	0,32	0,86	0,54
Animal 3	0,22	0,19	0,53	1,00
Animal 4	0,13	0,15	0,99	0,70
Animal 5	0,19	0,26	0,39	0,78
Animal 6	0,22	0,15	0,32	0,46
Animal 7	0,13	0,47	0,73	0,20
Animal 8	0,20	0,12	0,75	0,24
Animal 9	0,16	0,14	0,72	0,61
Animal 10	0,30	0,16	1,13	0,50
Animal 11	0,38	0,19	1,51	1,30
Animal 12	0,33	0,16	1,36	1,00
Animal 13	0,21	0,38	1,92	1,08
Animal 14	0,29	0,42	0,74	0,99
Animal 15	0,24	0,46	1,04	0,86
Média	0,23	0,24	0,91	0,71
DP	0,07	0,13	0,43	0,32
EPM	0,02	0,03	0,11	0,08

TAM				
	DB	DB + OP	HFD	HFD + OP
Animal 1	0,075	0,07	0,113	0,073
Animal 2	0,074	0,082	0,124	0,089
Animal 3	0,084	0,065	0,094	0,123
Animal 4	0,071	0,132	0,137	0,091
Animal 5	0,11	0,102	0,27	0,102
Animal 6	0,12	0,077	0,15	0,15
Animal 7	0,12	0,129	0,14	0,13
Animal 8	0,08	0,14	0,21	0,17
Animal 9	0,09	0,12	0,26	0,14
Animal 10	0,11	0,14	0,16	0,17
Animal 11	0,11	0,1	0,25	0,14
Animal 12	0,17	0,09	0,11	0,12
Animal 13	0,09	0,09	0,12	0,09
Animal 14	0,16	0,15	0,11	0,09
Animal 15	0,12	0,15	0,14	0,16
Média	0,11	0,11	0,16	0,12
DP	0,03	0,03	0,06	0,03
EPM	0,01	0,01	0,02	0,01

Estômago				
	DB	DB + OP	HFD	HFD + OP
Animal 1	0,15	0,14	0,25	0,19
Animal 2	0,18	0,2	0,22	0,2
Animal 3	0,37	0,27	0,19	0,24
Animal 4	0,21	0,17	0,28	0,27
Animal 5	0,16	0,25	0,37	0,4
Animal 6	0,28	0,2	0,18	0,19
Animal 7	0,24	0,21	0,2	0,16
Animal 8	0,29	0,18	0,22	0,16
Animal 9	0,14	0,3	0,24	0,2
Animal 10	0,24	0,28	0,27	0,19
Animal 11	0,33			
Animal 12	0,2			
Média	0,23	0,22	0,24	0,22
DP	0,07	0,05	0,06	0,07
EPM	0,02	0,02	0,02	0,02

**Tabela A14c** - Valores individuais referentes à Tabela 3 da seção Resultados: Parâmetros metabólicos de camundongos C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada (DB) ou hiperlipídica (HFD), suplementados ou não com óleo de peixe (OP): triacilgliceróis, colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol séricos.

Triacilgliceróis				
	DB	DB + OP	HFD	HFD + OP
Animal 1	68,4	68,6	66,7	56,6
Animal 2	72,3	63,0	56,4	73,9
Animal 3	79,8	72,2	65,0	60,0
Animal 4	74,4	131,6	92,7	63,3
Animal 5	96,6	63,3	100,7	80,3
Animal 6	99,2	54,7	72,9	72,2
Animal 7	37,3	110,0	52,5	71,2
Animal 8	64,6	37,3	77,2	50,3
Animal 9	114,7	32,6	91,0	38,5
Animal 10	122,8	74,1	55,2	74,5
Animal 11	127,9	167,6	59,7	66,1
Animal 12	100,3	55,6	81,2	51,7
Animal 13	87,9	111,5	44,4	55,8
Animal 14	76,5	75,3	43,1	76,8
Animal 15	89,8	92,8	62,1	60,7
Animal 16	71,6	129,6	63,3	71,9
Animal 17	43,0	81,0	90,7	74,4
Animal 18	63,1	61,8	63,9	64,3
Animal 19	64,9	58,1	48,0	65,8
Animal 20	48,8	76,4	61,5	47,4
Média	80,2	80,9	67,4	63,8
DP	24,9	33,9	16,7	11,1
EPM	5,6	7,6	3,7	2,5

Colesterol total				
	DB	DB + OP	HFD	HFD + OP
Animal 1	152,59	109,23	249,83	193,53
Animal 2	152,85	153,33	152,63	178,95
Animal 3	181,05	194,74	197,43	108,42
Animal 4	152,63	252,63	163,23	152,63
Animal 5	103,75	122,11	176,68	196,75
Animal 6	104,72	109,18	245,21	127,31
Animal 7	164,48	127,19	187,40	113,74
Animal 8	158,67	136,20	136,20	82,38
Animal 9	187,06	141,45	225,03	110,78
Animal 10	155,82	123,32	155,02	137,12
Animal 11	155,36	146,81	250,00	108,38
Animal 12	168,81	146,81	190,36	116,02
Média	153,15	146,92	194,09	135,50
DP	25,46	40,51	40,14	37,08
EPM	7,35	11,69	11,59	10,70

LDL-colesterol				
	DB	DB + OP	HFD	HFD + OP
Animal 1	124,18	18,64	162,49	104,35
Animal 2	121,83	86,78	140,60	93,14
Animal 3	145,19	101,57	145,86	83,50
Animal 4	118,20	85,32	208,82	112,40
Animal 5	120,00	107,27	149,52	74,19
Animal 6	142,29	60,59	115,22	84,82
Animal 7	141,06	110,46	201,24	109,20
Animal 8	149,58	13,48	127,78	107,34
Animal 9	111,90	81,98	240,48	105,33
Animal 10	100,10	86,40	158,68	97,81
Animal 11	89,30	69,37	197,59	120,70
Animal 12	120,54	49,36	122,31	
Animal 13	119,58	80,39	117,01	
Animal 14	108,02		96,19	
Animal 15			159,58	
Animal 16			154,31	
Média	122,27	73,20	156,11	99,34
DP	17,43	30,65	39,02	14,09
EPM	4,66	7,91	9,76	4,25

HDL-colesterol				
	DB	DB + OP	HFD	HFD + OP
Animal 1	17,35	16,72	14,81	12,06
Animal 2	12,28	15,87	8,04	12,91
Animal 3	16,3	10,79	20,32	12,91
Animal 4	17,57	17,35	20,95	14,18
Animal 5	17,78	23,07	19,68	16,93
Animal 6	11,22	17,78	9,95	13,54
Animal 7	11,85	23,49	11,85	18,84
Animal 8	14,6	12,7	11,01	19,05
Animal 9	12,06	14,18	23,07	16,51
Animal 10	16,3	14,39	13,54	13,76
Animal 11	21,16	12,28	17,78	11,85
Animal 12	12,06	9,52	17,35	15,66
Animal 13	12,91		13,54	14,81
Animal 14	15,66		13,54	
Animal 15			12,91	
Média	14,9	15,7	15,2	14,8
DP	3,0	4,4	4,4	2,4
EPM	0,8	1,3	1,1	0,7

**Tabela A14d** - Valores individuais referentes à Tabela 3 da seção Resultados: Parâmetros metabólicos de camundongos C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada (DB) ou hiperlipídica (HFD), suplementados ou não com óleo de peixe (OP): glicemia, insulinemia e índice HOMA-IR.

Glicemia				
	DB	DB + OP	HFD	HFD + OP
Animal 1	173,2	145,4	173,2	172,2
Animal 2	182,7	161,3	182,7	200,6
Animal 3	164,2	171,7	164,2	192,6
Animal 4	190,6	129,7	190,6	235,0
Animal 5	167,3	121,2	167,3	237,0
Animal 6	194,0	96,0	194,0	232,0
Animal 7	199,0	154,0	199,0	258,0
Animal 8	226,0	179,0	226,0	235,0
Animal 9	175,0	172,0	175,0	203,0
Animal 10	186,0	213,5	186,0	191,0
Animal 11	194,0	155,0	194,0	168,0
Animal 12	176,0	188,0	176,0	218,0
Animal 13	171,0	192,0	171,0	233,0
Animal 14	174,0	179,0	174,0	248,0
Animal 15	166,0	180,0	166,0	215,0
Animal 16	182,0	162,0	182,0	230,0
Animal 17	201,0	184,0	201,0	228,0
Animal 18	193,0	186,0	193,0	215,0
Animal 19	191,0	215,0	191,0	199,0
Animal 20	160,1	170,0	160,1	216,3
Média	183,3	167,7	183,3	216,3
DP	15,8	29,1	15,8	24,0
EPM	3,5	6,5	3,5	5,4

Insulinemia				
	DB	DB + OP	HFD	HFD + OP
Animal 1	0,26	0,34	0,26	0,51
Animal 2	0,40	0,27	0,40	0,51
Animal 3	0,39	0,25	0,39	0,22
Animal 4	0,88	0,32	0,88	0,78
Animal 5	0,35	0,59	0,35	1,28
Animal 6	0,28		0,53	0,72
Animal 7	0,24		0,35	0,68
Animal 8	0,35		1,55	0,78
Animal 9			1,29	0,76
Animal 10			0,99	0,68
Animal 11			1,18	0,86
Média	0,39	0,35	0,74	0,71
DP	0,20	0,14	0,45	0,26
EPM	0,07	0,06	0,14	0,08

HOMA-IR				
	DB	DB + OP	HFD	HFD + OP
Animal 1	1,48	3,92	7,57	6,92
Animal 2	3,87	2,71	12,40	6,55
Animal 3	3,57	2,51	2,99	2,39
Animal 4	7,38	3,33	15,04	8,64
Animal 5	3,14	8,14	1,72	15,18
Animal 6	3,30		6,19	9,05
Animal 7	2,09		4,07	8,58
Animal 8	4,26		17,36	10,13
Animal 9			16,36	8,91
Animal 10			15,37	7,08
Animal 11				12,22
Média	3,64	4,12	9,91	8,70
DP	1,77	2,31	6,04	3,27
EPM	0,62	1,03	1,91	0,99

**Tabela A15a** - Valores individuais referentes à Figura 19 da seção Resultados: Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre a % de gordura, razão entre PUFAs n-6 e n-3 e % de ácidos graxos individuais pela % de ácidos graxos totais no fígado dos animais C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada.

% Gordura no Fígado			
	Média	Desvio Padrão	N
DB	5,16	1,15	7
DB+OP	8,53	1,7	7

PUFAs n-6 : n-3		
	Média	N
DB	2,14	7
DB+OP	0,92	7

% de AG individuais por % de AG totais						
	DB			DB+OP		
	Média	Desvio Padrão	N	Média	Desvio Padrão	N
Saturado	27,7	1,148	7	31,3	1,703	7
MUFAs	42,5	1,148	7	35,2	1,703	7
PUFA n-6	0,447	1,148	7	0,8	1,703	7
PUFA n-3	3,3	1,148	7	10,2	1,703	7

**Tabela A15b** - Valores individuais referentes à Figura 19 da seção Resultados: Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre a % de gordura, razão entre PUFAs n-6 e n-3 e % de ácidos graxos individuais pela % de ácidos graxos totais no soro dos animais C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada.

% Gordura no Soro				PUFAs n-6 : n-3	
	Média	Desvio Padrão	N		N
<b>DB</b>	0,43	0,2	5	10	5
<b>DB+OP</b>	0,42	0,14	5	2,7	5

% de AG individuais por % de AG totais						
	Média	Desvio Padrão	N	Média	Desvio Padrão	N
<b>Saturado</b>	43	0,17	5	38	0,137	5
<b>MUFAs</b>	24	0,17	5	30	0,137	5
<b>PUFA n-6</b>	30	0,17	5	24	0,137	5
<b>PUFA n-3</b>	3	0,17	5	9	0,137	5

**Tabela A16** - Valores individuais referentes à Figura 20 da seção Resultados: Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre as proteínas inflamatórias no fígado (F4/80, TNF- $\alpha$  e TLR-4), aorta torácica (VCAM-1, IL-6 e IL-10), gordura perivascular (adiponectina e resistina) e tecido adiposo epididimal (adiponectina) de animais C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada.

F4/80 - Fígado			TNF- $\alpha$ - Fígado			TLR-4 - Fígado		
	DB	DB + OP		DB	DB + OP		DB	DB + OP
Animal 1	1,374	0,291	Animal 1	1,438	0,630	Animal 1	3,673	1,667
Animal 2	1,247	0,757	Animal 2	1,342	0,690	Animal 2	3,598	1,621
Animal 3	1,364	0,524	Animal 3	1,210	0,446	Animal 3	2,963	1,737
Animal 4	0,677	0,876	Animal 4	1,992	0,519	Animal 4	1,955	1,451
Animal 5	0,945	1,063	Animal 5	0,630	0,892	Animal 5	2,309	1,849
Animal 6	0,778	0,558	Animal 6	0,942	0,568	Animal 6	2,245	1,566
Animal 7	1,578	1,238	Animal 7	0,676	0,630	Animal 7	1,901	1,655
Animal 8	0,852	0,696	Animal 8	0,704	0,455	Animal 8	1,811	
Animal 9	0,852	0,773	Animal 9	0,760				
Animal 10	0,888	0,731						
Animal 11	0,846	0,650						
Média	1,0364	0,7415	Média	1,077	0,604	Média	2,557	1,650
DP	0,2983	0,2576	DP	0,457	0,145	DP	0,756	0,126
EPM	0,0899	0,0777	EPM	0,152	0,051	EPM	0,267	0,048

VCAM - aorta			IL-6 - aorta			IL-10 - aorta		
	DB	DB + OP		DB	DB + OP		DB	DB + OP
Animal 1	36,89	30,08	Animal 1	6,69	4,8	Animal 1	7,01	4,49
Animal 2	39,41	35,72	Animal 2	6,3	5,71	Animal 2	5,19	3,8
Animal 3	34,72	32,77	Animal 3	5,67	3,87	Animal 3	4,72	2,86
Animal 4	34,31	29,55	Animal 4	5,17	2,67	Animal 4	4,51	1,68
Animal 5	38,17	32,8	Animal 5	4,54	4	Animal 5	2,28	2,38
Animal 6	31,31	21,97	Animal 6	4,9	3,28	Animal 6	3,91	2,5
Animal 7		25,99	Animal 7		2,59	Animal 7		1,9
Média	35,8017	29,8400	Média	5,5450	3,8457	Média	4,6033	2,8014
DP	2,9456	4,6336	DP	0,8323	1,1321	DP	1,5516	1,0157
EPM	1,2025	1,7513	EPM	0,3398	0,4279	EPM	0,6334	0,3839

Adiponectina G. Perivascular			Resistina G. Perivascular			Adiponectina T.A. Epididimal		
	DB	DB + OP		DB	DB + OP		DB	DB + OP
Animal 1	18,951	10,761	Animal 1	0,679	0,480	Animal 1	1,226	0,787
Animal 2	15,716	14,439	Animal 2	0,930	0,266	Animal 2	1,721	0,855
Animal 3	19,686	11,609	Animal 3	1,528	0,686	Animal 3	1,060	2,194
Animal 4	15,389	14,143	Animal 4	2,260	0,429	Animal 4	0,442	0,749
Animal 5	11,909	9,117	Animal 5	0,719	0,553	Animal 5	0,729	1,184
Animal 6	13,594	12,173	Animal 6	1,200	0,940	Animal 6	1,884	1,314
Animal 7	15,952	8,988	Animal 7	1,271	0,737	Animal 7	1,369	0,621
Animal 8	10,501	11,590	Animal 8	0,655		Animal 8	1,733	1,640
Animal 9	13,309	10,683	Animal 9	0,800		Animal 9	0,781	0,468
Animal 10	9,883					Animal 10	0,534	0,413
						Animal 11	0,744	0,523
						Animal 12		0,471
Média	14,489	11,500	Média	1,116	0,584	Média	1,111	0,935
DP	3,289	1,914	DP	0,525	0,223	DP	0,511	0,550
EPM	1,040	0,638	EPM	0,175	0,084	EPM	0,154	0,159

**Tabela A17a** - Valores individuais referentes à Figura 21 da seção Resultados: Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre a % de gordura, razão entre PUFAs n-6 e n-3 e % de ácidos graxos individuais pela % de ácidos graxos totais no fígado dos animais C57Bl/6J alimentados com dieta hiperlipídica.

% Gordura no Fígado				PUFAs n-6 : n-3		
	Média	Desvio Padrão	N	HFD		N
HFD	12,7	2,91	8		4,4	8
HFD+OP	9,99	1,9	10	HFD+OP	2,54	10

% de AG individuais por % de AG totais						
	HFD			HFD+OP		
	Média	Desvio Padrão	N	Média	Desvio Padrão	N
Saturado	30,23	2,912	8	33,4	1,867	10
MUFAs	29,23	2,912	8	23,5	1,867	10
PUFA n-6	2,691	2,912	8	2,032	1,867	10
PUFA n-3	4,9	2,912	8	8	1,867	10

**Tabela A17b** - Valores individuais referentes à Figura 21 da seção Resultados: Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre a % de gordura, razão entre PUFAs n-6 e n-3 e % de ácidos graxos individuais pela % de ácidos graxos totais no soro dos animais C57Bl/6J alimentados com dieta hiperlipídica.

% Gordura no Soro				PUFAs n-6 : n-3		
	Média	Desvio Padrão	N	HFD		N
HFD	0,57	0,14	5		23	5
HFD+OP	0,5	0,1	5	HFD+OP	7,6	5

% de AG individuais por % de AG totais						
	HFD			HFD+OP		
	Média	Desvio Padrão	N	Média	Desvio Padrão	N
Saturado	42	0,143	5	34	0,102	5
MUFAs	13	0,143	5	13,5	0,102	5
PUFA n-6	40	0,143	5	47	0,102	5
PUFA n-3	1,74	0,143	5	6,2	0,102	5

**Tabela A18** - Valores individuais referentes à Figura 22 da seção Resultados: Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre as proteínas inflamatórias no fígado (F4/80, TNF- $\alpha$  e TLR-4), aorta torácica (VCAM-1, IL-6 e IL-10), gordura perivascular (adiponectina e resistina) e tecido adiposo epididimal (adiponectina) de animais C57Bl/6J alimentados com dieta hiperlipídica.

F4/80 - Fígado		
	HFD	HFD + OP
Animal 1	1,116	0,687
Animal 2	1,006	0,869
Animal 3	0,578	1,230
Animal 4	0,615	0,778
Animal 5	0,971	0,659
Animal 6	0,828	1,171
Animal 7	1,108	0,550
Animal 8	0,403	0,060
Animal 9		0,129
Média	0,8281	0,6816
DP	0,2679	0,4021
EPM	0,0947	0,1340

TNF- $\alpha$ - Fígado		
	HFD	HFD + OP
Animal 1	1,783	0,541
Animal 2	0,549	1,144
Animal 3	0,317	1,185
Animal 4	0,609	0,765
Animal 5	0,861	0,416
Animal 6	0,481	0,071
Animal 7	2,150	0,120
Média	0,964	0,606
DP	0,712	0,450
EPM	0,269	0,170

TLR-4 - Fígado		
	HFD	HFD + OP
Animal 1	2,110	1,544
Animal 2	2,277	1,737
Animal 3	1,599	2,764
Animal 4	1,968	1,195
Animal 5	2,215	0,210
Animal 6	1,955	0,428
Média	2,020	1,313
DP	0,243	0,933
EPM	0,099	0,381

VCAM - aorta		
	HFD	HFD + OP
Animal 1	24,78	23,21
Animal 2	27,98	22,8
Animal 3	31,27	22,35
Animal 4	24,62	20,87
Animal 5		25,85
Animal 6		29,52
Média	27,16	24,10
DP	3,15	3,11
EPM	1,57	1,27

IL-6 - aorta		
	HFD	HFD + OP
Animal 1	2,94	2,17
Animal 2	2,39	0,94
Animal 3	1,82	2,03
Animal 4	1,78	1,1
Animal 5		2,24
Animal 6		1,9
Média	2,23	1,73
DP	0,55	0,56
EPM	0,27	0,23

IL-10 - aorta		
	HFD	HFD + OP
Animal 1	1,55	2,88
Animal 2	1,42	0,57
Animal 3	0,86	1,83
Animal 4	0,91	0,5
Animal 5		1,7
Animal 6		0,98
Média	1,1850	1,4100
DP	0,3510	0,9099
EPM	0,1755	0,3715

Adiponectina G. Perivascular		
	HFD	HFD + OP
Animal 1	16,28	15,51
Animal 2	13,63	18,41
Animal 3	9,92	10,73
Animal 4	13,44	21,94
Animal 5	11,27	15,39
Animal 6	9,27	11,77
Animal 7	10,72	9,54
Animal 8	11,07	8,66
Animal 9	7,90	3,71
Animal 10	10,85	13,25
Animal 11	10,51	7,98
Animal 12		13,47
Animal 13		9,54
Média	11,35	12,30
DP	2,32	4,79
EPM	0,70	1,33

Resistina G. Perivascular		
	HFD	HFD + OP
Animal 1	0,171	0,232
Animal 2	0,872	0,187
Animal 3	0,743	0,487
Animal 4	0,404	1,963
Animal 5	1,036	0,477
Animal 6	2,413	1,159
Animal 7	1,302	0,304
Animal 8	1,055	0,871
Animal 9	1,204	0,620
Animal 10	0,537	0,213
Animal 11	0,247	0,352
Média	0,908	0,624
DP	0,628	0,536
EPM	0,189	0,162

Adiponectina T.A. Epididimal		
	HFD	HFD + OP
Animal 1	0,680	0,671
Animal 2	0,617	1,184
Animal 3	0,982	0,643
Animal 4	0,755	1,458
Animal 5	0,383	1,389
Animal 6	0,572	1,120
Animal 7	0,809	1,217
Animal 8	0,604	0,724
Animal 9	0,666	0,861
Animal 10		0,600
Animal 11		1,112
Animal 12		0,849
Média	0,674	0,986
DP	0,167	0,298
EPM	0,056	0,086

**Tabela A19a** - Valores individuais referentes à Figura 23 da seção Resultados: Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre a % de gordura, razão entre PUFAs n-6 e n-3 e % de ácidos graxos individuais pela % de ácidos graxos totais no fígado dos animais C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada ou hiperlipídica.

% Gordura no Fígado				PUFAs n-6 : n-3		N
	Média	Desvio Padrão	N			
<b>DB+OP</b>	8,53	1,7	7	<b>DB+OP</b>	0,92	7
<b>HFD+OP</b>	9,99	1,9	10	<b>HFD+OP</b>	2,54	10

% de AG individuais por % de AG totais						
	DB+OP			HFD+OP		
	Média	Desvio Padrão	N	Média	Desvio Padrão	N
<b>Saturado</b>	31,3	1,703	7	33,4	1,867	10
<b>MUFAs</b>	35,2	1,703	7	23,5	1,867	10
<b>PUFA n-6</b>	0,8	1,703	7	2,032	1,867	10
<b>PUFA n-3</b>	10,2	1,703	7	8	1,867	10

**Tabela A19b** - Valores individuais referentes à Figura 23 da seção Resultados: Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre a % de gordura, razão entre PUFAs n-6 e n-3 e % de ácidos graxos individuais pela % de ácidos graxos totais no soro dos animais C57Bl/6J alimentados com dieta balanceada ou hiperlipídica.

% Gordura no Soro				PUFAs n-6 : n-3		N
	Média	Desvio Padrão	N			
<b>DB+OP</b>	0,42	0,14	5	<b>DB+OP</b>	0,92	7
<b>HFD+OP</b>	0,5	0,1	5	<b>HFD+OP</b>	2,54	10

% de AG individuais por % de AG totais						
	DB+OP			HFD+OP		
	Média	Desvio Padrão	N	Média	Desvio Padrão	N
<b>Saturado</b>	38	0,137	5	34	0,102	5
<b>MUFAs</b>	30	0,137	5	13,5	0,102	5
<b>PUFA n-6</b>	24	0,137	5	47	0,102	5
<b>PUFA n-3</b>	9	0,137	5	6,2	0,102	5

**Tabela A20** - Valores individuais referentes à Figura 24 da seção Resultados: Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre as proteínas inflamatórias no fígado (F4/80, TNF- $\alpha$  e TLR-4), aorta torácica (VCAM-1, IL-6 e IL-10), gordura perivascular (adiponectina e resistina) e tecido adiposo epididimal (adiponectina) de animais C57Bl/6J alimentados com dieta hiperlipídica.

F4/80 - Fígado			TNF- $\alpha$ - Fígado			TLR-4 - Fígado		
	DB + OP	HFD + OP		DB + OP	HFD + OP		DB + OP	HFD + OP
<b>Animal 1</b>	0,291	0,687	<b>Animal 1</b>	0,630	0,541	<b>Animal 1</b>	1,667	1,544
<b>Animal 2</b>	0,757	0,869	<b>Animal 2</b>	0,690	1,144	<b>Animal 2</b>	1,621	1,737
<b>Animal 3</b>	0,524	1,230	<b>Animal 3</b>	0,446	1,185	<b>Animal 3</b>	1,737	2,764
<b>Animal 4</b>	0,876	0,778	<b>Animal 4</b>	0,519	0,765	<b>Animal 4</b>	1,451	1,195
<b>Animal 5</b>	1,063	0,659	<b>Animal 5</b>	0,892	0,416	<b>Animal 5</b>	1,849	0,210
<b>Animal 6</b>	0,558	1,171	<b>Animal 6</b>	0,568	0,071	<b>Animal 6</b>	1,566	0,428
<b>Animal 7</b>	1,238	0,550	<b>Animal 7</b>	0,630	0,120	<b>Animal 7</b>	1,655	
<b>Animal 8</b>	0,696	0,060	<b>Animal 8</b>	0,455		<b>Média</b>	1,650	1,313
<b>Animal 9</b>	0,773	0,129	<b>Média</b>			<b>DP</b>	0,126	0,933
<b>Animal 10</b>	0,731		<b>DP</b>	0,604	0,606	<b>EPM</b>	0,048	0,381
<b>Animal 11</b>	0,650		<b>EPM</b>	0,145	0,450			
<b>Média</b>	0,7415	0,6816		0,051	0,170			
<b>DP</b>	0,2576	0,4021						
<b>EPM</b>	0,0777	0,1340						

VCAM - aorta			IL-6 - aorta			IL-10 - aorta		
	DB + OP	HFD + OP		DB + OP	HFD + OP		DB + OP	HFD + OP
Animal 1	30,08	23,21	Animal 1	4,8	2,17	Animal 1	4,49	2,88
Animal 2	35,72	22,8	Animal 2	5,71	0,94	Animal 2	3,8	0,57
Animal 3	32,77	22,35	Animal 3	3,87	2,03	Animal 3	2,86	1,83
Animal 4	29,55	20,87	Animal 4	2,67	1,1	Animal 4	1,68	0,5
Animal 5	32,8	25,85	Animal 5	4	2,24	Animal 5	2,38	1,7
Animal 6	21,97	29,52	Animal 6	3,28	1,9	Animal 6	2,5	0,98
Animal 7	25,99		Animal 7	2,59		Animal 7	1,9	
Média	29,84	24,10	Média	3,85	1,73	Média	2,80	1,41
DP	4,63	3,11	DP	1,13	0,56	DP	1,02	0,91
EPM	1,75	1,27	EPM	0,43	0,23	EPM	0,38	0,37

Adiponectina G. Perivascular			Resistina G. Perivascular			Adiponectina T.A. Epididimal		
	DB + OP	HFD + OP		DB + OP	HFD + OP		DB + OP	HFD + OP
Animal 1	10,761	15,51	Animal 1	0,480	0,232	Animal 1	0,787	0,671
Animal 2	14,439	18,41	Animal 2	0,266	0,187	Animal 2	0,855	1,184
Animal 3	11,609	10,73	Animal 3	0,686	0,487	Animal 3	2,194	0,643
Animal 4	14,143	21,94	Animal 4	0,429	1,963	Animal 4	0,749	1,458
Animal 5	9,117	15,39	Animal 5	0,553	0,477	Animal 5	1,184	1,389
Animal 6	12,173	11,77	Animal 6	0,940	1,159	Animal 6	1,314	1,120
Animal 7	8,988	9,54	Animal 7	0,737	0,304	Animal 7	0,621	1,217
Animal 8	11,590	8,66	Animal 8		0,871	Animal 8	1,640	0,724
Animal 9	10,683	3,71	Animal 9		0,620	Animal 9	0,468	0,861
Animal 10		13,25	Animal 10		0,213	Animal 10	0,413	0,600
Animal 11		7,98	Animal 11		0,352	Animal 11	0,523	1,112
Animal 12		13,47				Animal 12	0,471	0,849
Animal 13		9,54						
Média	11,50	12,30	Média	0,584	0,624	Média	0,935	0,986
DP	1,91	4,79	DP	0,223	0,536	DP	0,550	0,298
EPM	0,64	1,33	EPM	0,084	0,162	EPM	0,159	0,086

**Tabela A21a** - Valores individuais referentes à Tabela 4 da seção Resultados: Parâmetros metabólicos de camundongos *knockouts* para a proteína TLR-4 alimentados com dieta balanceada (DB) ou hiperlipídica (HFD), suplementados ou não com óleo de peixe (OP). balanceada (DB) ou hiperlipídica (HFD), suplementados ou não com óleo de peixe (OP): ganho de massa corpórea, consumo alimentar, consumo calórico e eficiência alimentar.

Ganho de massa corporea				
	TLR-4/- DB	TLR-4/- DB + OP	TLR-4/- HFD	TLR-4/- HFD + OP
Animal 1	2,2	4,6	10,6	8,8
Animal 2	1,2	4,0	7,6	8,0
Animal 3	7,6	7,4	12,4	10,0
Animal 4	3,8	3,4	14,4	14,2
Animal 5	3,6	4,2	12,6	14,8
Animal 6	5,8	4,0	12,6	10,6
Animal 7	2,6	7,2	12,5	18,0
Animal 8	-0,4	5,4	9,2	12,0
Animal 9	2,6	3,6	7,9	12,4
Animal 10	7,3	3,2	13,1	16,0
Animal 11	7,3	4,2	6,8	11,2
Animal 12	6,4	9,0	16,6	7,8
Animal 13	5,9	4,8	11,4	11,4
Animal 14	4,7	5,6	11,6	10,8
Animal 15	12,8	3,8	11,6	10,1
Animal 16	6,3	6,8	13,6	5,9
Animal 17	7,0	7,3	8,1	19,7
Animal 18	5,2	10,7	15,4	10,6
Animal 20	7,7	6,8		7,1
Animal 21	4,3	12,0		6,5
Animal 22		8,8		6,3
Média	5,20	6,04	11,56	11,06
DP	2,91	2,50	2,75	3,79
EPM	0,63	0,53	0,65	0,81

Consumo alimentar				
	TLR-4/- DB	TLR-4/- DB + OP	TLR-4/- HFD	TLR-4/- HFD + OP
caixa 1 semana 7	29,20	30,10	17,15	17,80
caixa 1 semana 8	27,00	25,20	15,15	16,30
caixa 1 semana 9	28,50	27,50	14,70	15,50
caixa 1 semana 10	27,65	27,30	15,10	15,80
caixa 1 semana 11	26,45	24,80	13,75	14,20
caixa 1 semana 12	23,75	26,50	15,30	14,40
caixa 2 semana 7	29,20	25,30	17,10	17,00
caixa 2 semana 8	26,50	23,90	14,10	14,10
caixa 2 semana 9	28,60	26,30	16,50	15,80
caixa 2 semana 10	30,20	27,70	15,80	16,80
caixa 2 semana 11	24,40	26,10	16,90	16,50
caixa 2 semana 12	27,30	26,20	15,20	15,40
Média	27,40	26,41	15,56	15,80
DP	1,94	1,62	1,14	1,16
EPM	0,56	0,47	0,33	0,34

Consumo calorico					Eficiência alimentar				
	TLR-4/- DB	TLR-4/- DB + OP	TLR-4/- HFD	TLR-4/- HFD + OP		TLR-4/- DB	TLR-4/- DB + OP	TLR-4/- HFD	TLR-4/- HFD + OP
caixa 1 semana 5	111,05	114,47	91,58	95,05	caixa 1 semana 5	0,0063	-0,0029	0,0328	-0,0035
caixa 1 semana 6	102,68	95,84	80,90	87,04	caixa 1 semana 6	-0,0019	0,0035	0,0087	0,0038
caixa 1 semana 7	108,39	104,58	78,50	82,77	caixa 1 semana 7	0,0101	-0,0013	0,0089	-0,0016
caixa 1 semana 8	105,15	103,82	80,63	84,37	caixa 1 semana 8	-0,0086	0,0019	0,0124	0,0024
caixa 1 semana 9	100,59	94,31	73,43	75,83	caixa 1 semana 9	0,0050	-0,0092	-0,0014	-0,0114
caixa 1 semana 10	90,32	94,31	81,70	75,83					
caixa 1 semana 11		94,31		75,83					
					caixa2 semana 5	0,0180	0,0042	0,0372	-0,0022
caixa 2 semana 5	111,05	94,31	91,31	75,83	caixa 2 semana 6	-0,0079	0,0077	0,0066	0,0037
caixa 2 semana 6	100,78	96,22	75,29	150,05	caixa 2 semana 7	0,0147	0,0075	0,0227	-0,0018
caixa 2 semana 7	108,77	90,89	88,11	90,78	caixa 2 semana 8	0,0070	-0,0014	0,0107	0,0024
caixa 2 semana 8	114,85	100,02	84,37	75,29	caixa 2 semana 9	-0,0129	0,0045	0,0255	-0,0097
caixa 2 semana 9	92,79	105,34	90,25	84,37	caixa 2 semana 10	0,0100	0,0055	0,0100	0,0061
caixa 2 semana 10	103,82	99,26	81,17	89,71					
caixa 2 semana 11		99,64		88,11					
					Média	0,0036	0,0018	0,0158	-0,0011
Média	104,19	99,09	83,10	87,92	DP	0,0101	0,0051	0,0120	0,0056
DP	7,36	6,24	6,10	19,05	EPM	0,0030	0,0015	0,0036	0,0017
EPM	2,13	1,67	1,76	5,09					

**Tabela A21b** - Valores individuais referentes à Tabela 4 da seção Resultados: Parâmetros metabólicos de camundongos *knockouts* para a proteína TLR-4 alimentados com dieta balanceada (DB) ou hiperlipídica (HFD), suplementados ou não com óleo de peixe (OP). gordura epididimal, mesentérica, retroperitoneal, tecido adiposo marrom (TAM) e estômago (todos em gramas).

G. Epididimal					G. Mesentérica				
	TLR-4/- DB	TLR-4/- DB + OP	TLR-4/- HFD	TLR-4/- HFD + OP		TLR-4/- DB	TLR-4/- DB + OP	TLR-4/- HFD	TLR-4/- HFD + OP
Animal 1	0,69	0,55	1,36	0,96	Animal 1	0,40	0,58	0,47	0,56
Animal 2	0,43	1,26	1,29	1,22	Animal 2	0,30	0,71	0,54	0,82
Animal 3	1,17	1,06	1,77	1,82	Animal 3	0,43	0,16	0,35	0,73
Animal 4	0,67	0,58	1,44	2,32	Animal 4	0,30	0,25	0,69	0,47
Animal 5	0,74	0,73	2,77	2,33	Animal 5	0,33	0,23	0,44	0,49
Animal 6	0,66	0,66	2,23	1,47	Animal 6	0,41	0,47	0,55	0,93
Animal 7	0,85	0,92	2,17	2,90	Animal 7	0,28	0,39	0,57	0,98
Animal 8	0,80	1,00	1,40	1,54	Animal 8	0,36	0,37	0,59	1,03
Animal 9	0,82	1,14	1,40	2,12	Animal 9	0,45	0,79	0,46	0,64
Animal 10	1,53	0,94	2,26	1,71	Animal 10	0,72	0,45	0,84	0,34
Animal 11	1,34	0,50	0,86	1,60	Animal 11	0,69	0,79	0,39	0,58
Animal 12	1,58	1,67	3,20	0,69	Animal 12	0,74	0,60	1,12	0,66
Animal 13	1,44	0,79	1,95	1,70	Animal 13	0,44	0,31	0,68	0,93
Animal 14	0,46	1,18	1,95	1,58	Animal 14	0,29	0,59	0,68	0,79
Animal 15	0,80	0,60	2,37	2,13	Animal 15	0,32	0,75	0,55	0,47
Média	0,93	0,91	1,89	1,74	Média	0,43	0,49	0,59	0,69
DP	0,38	0,32	0,62	0,57	DP	0,16	0,21	0,19	0,21
EPM	0,10	0,08	0,16	0,15	EPM	0,04	0,05	0,05	0,06

G. Retroperitoneal					TAM				
	TLR-4/- DB	TLR-4/- DB + OP	TLR-4/- HFD	TLR-4/- HFD + OP		TLR-4/- DB	TLR-4/- DB + OP	TLR-4/- HFD	TLR-4/- HFD + OP
Animal 1	0,26	0,24	0,58	0,53	Animal 1	0,09	0,08	0,09	0,06
Animal 2	0,09	0,46	0,49	0,33	Animal 2	0,06	0,13	0,09	0,05
Animal 3	0,43	0,38	0,53	0,53	Animal 3	0,08	0,10	0,06	0,08
Animal 4	0,19	0,13	0,48	1,00	Animal 4	0,06	0,10	0,09	0,09
Animal 5	0,25	0,30	0,91	0,12	Animal 5	0,10	0,05	0,11	0,10
Animal 6	0,32	0,16	0,86	0,71	Animal 6	0,09	0,09	0,12	0,08
Animal 7	0,31	0,36	0,83	1,30	Animal 7	0,14	0,12	0,09	0,15
Animal 8	0,27	0,40	0,74	0,72	Animal 8	0,11	0,14	0,10	0,09
Animal 9	0,44	0,38	0,62	0,65	Animal 9	0,13	0,11	0,09	0,10
Animal 10	0,66	0,45	1,03	0,65	Animal 10	0,14	0,06	0,13	0,09
Animal 11	0,60	0,17	0,34	0,72	Animal 11	0,13	0,23	0,07	0,11
Animal 12	0,55	0,55	0,96	0,32	Animal 12	0,12	0,12	0,19	0,07
Animal 13	0,50	0,32	0,84	0,69	Animal 13	0,10	0,12	0,19	0,11
Animal 14	0,19	0,48	0,68	0,65	Animal 14	0,08	0,09	0,14	0,13
Animal 15	0,16	0,18	1,09	0,96	Animal 15	0,13	0,17	0,12	0,12
Média	0,35	0,33	0,73	0,66	Média	0,10	0,11	0,11	0,09
DP	0,17	0,13	0,22	0,29	DP	0,03	0,04	0,04	0,03
EPM	0,04	0,03	0,06	0,07	EPM	0,01	0,01	0,01	0,01

Estômago				
	TLR-4/- DB	TLR-4/- DB + OP	TLR-4/- HFD	TLR-4/- HFD + OP
Animal 1	0,18	0,17	0,21	0,16
Animal 2	0,2	0,26	0,18	0,23
Animal 3	0,15	0,3	0,17	0,23
Animal 4	0,18	0,22	0,18	0,16
Animal 5	0,12	0,23	0,18	0,14
Animal 6			0,12	0,17
Animal 7			0,15	
Média	0,17	0,24	0,17	0,18
DP	0,03	0,05	0,03	0,04
EPM	0,01	0,02	0,01	0,02

**Tabela A21c** - Valores individuais referentes à Tabela 4 da seção Resultados: Parâmetros metabólicos de camundongos *knockouts* para a proteína TLR-4 alimentados com dieta balanceada (DB) ou hiperlipídica (HFD), suplementados ou não com óleo de peixe (OP). balanceada (DB) ou hiperlipídica (HFD), suplementados ou não com óleo de peixe (OP): triacilgliceróis, colesterol total, LDL-colesterol, glicemia, insulinemia e índice HOMA-IR.

Triacilgliceróis				
	TLR-4/- DB	TLR-4/- DB + OP	TLR-4/- HFD	TLR-4/- HFD + OP
Animal 1	63,39	62,89	67,12	53,48
Animal 2	78,46	153,27	53,19	55,71
Animal 3	102,56	109,55	63,25	59,66
Animal 4	94,02	97,44	58,12	75,21
Animal 5	85,47	94,02	88,37	64,96
Animal 6	107,69	116,24	93,70	85,47
Animal 7	103,48	80,81	73,93	58,12
Animal 8	92,52	132,67	56,91	75,04
Animal 9	104,44	85,85	62,54	55,04
Animal 10	65,76	75,93	55,31	37,94
Animal 11	49,52	71,33	72,35	40,19
Animal 12	70,58	71,38	63,50	58,20
Animal 13	70,90	107,56	55,63	59,49
Animal 14	68,01	82,80	54,66	54,50
Animal 15	71,54	94,69		49,84
Animal 16		65,59		
Média	81,9	93,9	65,6	58,9
DP	18,0	25,1	12,6	12,6
EPM	4,7	6,3	3,4	3,2

Colesterol total				
	TLR-4/- DB	TLR-4/- DB + OP	TLR-4/- HFD	TLR-4/- HFD + OP
Animal 1	164,96	152,49	180,01	125,60
Animal 2	140,00	142,70	164,21	132,75
Animal 3	193,68	180,00	197,89	142,11
Animal 4	178,95	102,11	131,95	147,37
Animal 5	190,53	151,58	127,14	126,32
Animal 6	145,24	166,51	159,58	136,84
Animal 7	146,58	115,21	117,90	118,38
Animal 8	129,26	117,04	155,73	125,12
Animal 9	132,05	96,92	155,73	94,51
Animal 10	90,38	117,71	124,83	126,56
Animal 11	100,67			139,36
Animal 12				155,15
Média	146,57	134,23	151,50	130,84
DP	33,70	28,28	25,91	15,60
EPM	10,16	8,94	8,19	4,50

LDL-colesterol				
	TLR-4/- DB	TLR-4/- DB + OP	TLR-4/- HFD	TLR-4/- HFD + OP
Animal 1	64,27	85,2	60,1	54,97
Animal 2	54,65	45,07	57,09	62,86
Animal 3	57,93	51,58	76,89	34,27
Animal 4	32,25	36,51	50,58	51,95
Animal 5	33,17	56,42	74,15	57,15
Animal 6			77,47	83,75
Animal 7			55,74	
Média	48,45	54,96	64,57	57,49
DP	14,79	18,48	11,25	16,09
EPM	6,61	8,27	4,25	6,57

Glicemia				
	TLR-4/- DB	TLR-4/- DB + OP	TLR-4/- HFD	TLR-4/- HFD + OP
Animal 1	150,62	163,98	224,78	113,97
Animal 2	164,24	139,53	203,49	207,85
Animal 3	176,99	186,05	182,01	196,22
Animal 4	180,83	132,01	171,37	202,65
Animal 5	151,8	136,87	208,33	210,94
Animal 6	167,82	164,89	243,06	156,12
Animal 7	162,04	175,25	231,48	199,44
Animal 8	205,44	164,93	165,82	233,15
Animal 9	158,02	150,46	194,98	233,15
Animal 10	193,96	179,78	243,47	230,59
Animal 11	176,67	179,78	173,62	182,43
Animal 12	191,93	150,9	291,29	250,93
Animal 13	234,66	220,75	195,32	185,83
Animal 14	181,42	185,15	203,46	172,94
Animal 15		212,28		166,16
Animal 16		204,82		
Média	178,3	171,7	209,5	196,2
DP	22,9	26,5	34,6	35,3
EPM	6,1	7,1	9,3	9,4

Insulinemia				
	TLR-4/- DB	TLR-4/- DB + OP	TLR-4/- HFD	TLR-4/- HFD + OP
Animal 1	0,73	1,02	0,91	0,92
Animal 2	0,85	0,96	1,10	0,66
Animal 3	0,71	1,19	1,14	1,44
Animal 4	0,71	0,73	0,77	0,87
Animal 5	0,78	1,00	1,31	1,04
Animal 6	0,62		1,07	1,03
Animal 7			0,77	
Média	0,73	0,98	1,01	0,99
DP	0,08	0,17	0,20	0,26
EPM	0,03	0,07	0,08	0,11

HOMA-IR				
	TLR-4/- DB	TLR-4/- DB + OP	TLR-4/- HFD	TLR-4/- HFD + OP
Animal 1	8,26	10,93	10,70	11,30
Animal 2	11,81	15,05	15,29	7,77
Animal 3	8,94	15,71	19,77	23,61
Animal 4	9,73	11,02	9,53	11,25
Animal 5	13,00	14,60	27,25	18,52
Animal 6	8,03		14,83	13,58
Animal 7			11,20	
Média	9,96	13,46	15,51	14,34
DP	2,02	2,30	6,24	5,76
EPM	0,82	0,94	2,55	2,35

**Tabela A22** - Valores individuais referentes à Figura 25 da seção Resultados: Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre o ganho de massa corpórea e peso final dos depósitos de tecido adiposo retroperitoneal e mesentérico de animais *knockouts* para a proteína TLR-4 em relação aos animais C57Bl/6J alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica.

	DB			DB+OP		
	≠ entre C57 e TLR4-/-	Desvio Padrão (dos 2)	N (dos dois)	≠ entre C57 e TLR4-/-	Desvio Padrão (dos 2)	N (dos dois)
Ganho de massa corporea	1,72	1,23	20	2,62	0,57	21
Gordura Mesentérica	0,09	0,05	15	0,1	0,05	15
Gordura Retroperitoneal	0,12	0,1	15	0,09	0,06	15

	HFD			HFD+OP		
	≠ entre C57 e TLR4-/-	Desvio Padrão (dos 2)	N (dos dois)	≠ entre C57 e TLR4-/-	Desvio Padrão (dos 2)	N (dos dois)
Ganho de massa corporea	-0,9254	1,42	18	1,4667	1,13	21
Gordura Mesentérica	-0,26	0,25	15	0,18	0,02	15
Gordura Retroperitoneal	-0,18	0,2	15	-0,05	0,03	15

**Tabela A23** - Valores individuais referentes à Figura 26 da seção Resultados: Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre o conteúdo de gordura total hepática e a composição de ácidos graxos no fígado de animais *knockouts* para a proteína TLR-4 em relação aos animais C57Bl/6J alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica.

	DB			DB+OP		
	≠ entre C57 e TLR4-/-	Desvio Padrão (dos 2)	N (dos dois)	≠ entre C57 e TLR4-/-	Desvio Padrão (dos 2)	N (dos dois)
PUFAs n-3	0,28	1,19	14	-2,06	2,04	14
PUFAs n-6	0,75	1,33	14	1,01	2,60	14
MUFAs	-1,50	1,94	14	-2,90	2,50	14
Saturados	1,40	1,56	14	1,00	2,50	14
% Gordura no Fígado	6,30	2,63	14	1,51	4,38	14

	HFD			HFD+OP		
	≠ entre C57 e TLR4-/-	Desvio Padrão (dos 2)	N (dos dois)	≠ entre C57 e TLR4-/-	Desvio Padrão (dos 2)	N (dos dois)
PUFAs n-3	0,30	2,95	14	0,20	2,02	20
PUFAs n-6	0,70	3,32	14	1,64	2,67	20
MUFAs	-2,83	3,47	14	3,70	2,91	20
Saturados	0,97	3,28	14	-3,40	2,59	20
% Gordura no Fígado	-1,92	4,22	14	2,51	4,34	20

**Tabela A24** - Valores individuais referentes à Figura 27 da seção Resultados: Efeitos da suplementação com óleo de peixe na expressão de RNA mensageiro do fígado e conteúdo de proteínas inflamatórias na aorta torácica de animais *knockouts* para a proteína TLR-4 em relação aos C57Bl/6J alimentados com dietas balanceada ou hiperlipídica.

Fígado						
	DB			DB+OP		
	≠ entre C57 e TLR4-/-	Desvio Padrão (dos 2)	N (dos dois)	≠ entre C57 e TLR4-/-	Desvio Padrão (dos 2)	N (dos dois)
F4/80	-0,4080355	0,08	9	-0,0812859	0,002	10
IL-1 $\beta$	-0,6771796	0,9	8	-0,2486672	0,2	10
IL-6	-0,4127901	0,8	7	-0,4243195	0,08	9
TNF- $\alpha$	0,4000208	0,13	9	-0,0658387	0,08	8

Fígado						
	HFD			HFD+OP		
	≠ entre C57 e TLR4-/-	Desvio Padrão (dos 2)	N (dos dois)	≠ entre C57 e TLR4-/-	Desvio Padrão (dos 2)	N (dos dois)
F4/80	-0,1608731	0,08817644	6	0,04217202	0,1776368	10
IL-1 $\beta$	-0,4007782	0,1313471	6	-0,4132491	0,650292	10
IL-6	-0,2328587	0,1061232	6	0,0585179	0,1902846	9
TNF- $\alpha$	-0,1063859	0,03631491	5	0,03883615	0,2954039	8

Aorta toracica						
		DB			DB+OP	
	≠ entre C57 e TLR4-/-	Desvio Padrão (dos 2)	N (dos dois)	≠ entre C57 e TLR4-/-	Desvio Padrão (dos 2)	N (dos dois)
VCAM-1	-9,026667	0,4	9	-7,88	1,27	11
ICAM-1	-4,470953	0,7	7	-11,27855	0,58	11
TNF- $\alpha$	-2,532222	0,11	9	-2,117792	0,8	11
IL-6	-1,580556	0,3	7	-1,357533	0,4	9
IL-1 $\beta$	-0,6383333	0,14	9	-0,452987	0,16	11
IL-10	-1,885556	0,35	9	-1,187792	0,47	11

Aorta toracica						
		DB			DB+OP	
	≠ entre C57 e TLR4-/-	Desvio Padrão (dos 2)	N (dos dois)	≠ entre C57 e TLR4-/-	Desvio Padrão (dos 2)	N (dos dois)
VCAM-1	-7,0875	0,269211	7	-7,345	0,8580521	10
ICAM-1	-6,0075	1,265258	7	-9,312333	1,519722	10
TNF- $\alpha$	0,3709524	0,1307899	7	-0,5853333	0,7660519	10
IL-6	-0,5510714	0,2486323	7	-0,423	0,3036975	10
IL-1 $\beta$	0,07714286	0,4156484	7	0,03566667	0,000468969	10
IL-10	0,1107143	0,2870202	7	-0,562	0,5010223	10

*APÊNDICE B –  
ARTIGOS  
PUBLICADOS*

## Artigo 1:

Hindawi Publishing Corporation  
Journal of Biomedicine and Biotechnology  
Volume 2012, Article ID 945131, 9 pages  
doi:10.1155/2012/945131

### Research Article

# Sunflower Oil Supplementation Has Proinflammatory Effects and Does Not Reverse Insulin Resistance in Obesity Induced by High-Fat Diet in C57BL/6 Mice

Laureane Nunes Masi,<sup>1</sup> Amanda Roque Martins,<sup>1</sup> José César Rosa Neto,<sup>1</sup>  
Cátia Lira do Amaral,<sup>1</sup> Amanda Rabello Crisma,<sup>1</sup> Marco Aurélio Ramirez Vinolo,<sup>1</sup>  
Edson Alves de Lima Júnior,<sup>1</sup> Sandro Massao Hirabara,<sup>1,2</sup> and Rui Curi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Avenu Professor Lineu Prestes, Butantã, 1524 São Paulo, SP, Brazil

<sup>2</sup> Post-Graduate Program in Human Movement Sciences, Institute of Physical Activity Sciences and Sports, Cruzeiro do Sul University, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Sandro Massao Hirabara, sandromh@yahoo.com.br

Received 15 June 2012; Accepted 5 August 2012

Academic Editor: Ji An Pan

Copyright © 2012 Laureane Nunes Masi et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

High consumption of polyunsaturated fatty acids, such as sunflower oil has been associated to beneficial effects in plasma lipid profile, but its role on inflammation and insulin resistance is not fully elucidated yet. We evaluated the effect of sunflower oil supplementation on inflammatory state and insulin resistance condition in HFD-induced obese mice. C57BL/6 male mice (8 weeks) were divided in four groups: (a) control diet (CD), (b) HFD, (c) CD supplemented with n-6 (CD + n-6), and (d) HFD supplemented with n-6 (HFD + n-6). CD + n-6 and HFD + n-6 were supplemented with sunflower oil by oral gavage at 2 g/Kg of body weight, three times per week. CD and HFD were supplemented with water instead at the same dose. HFD induced whole and muscle-specific insulin resistance associated with increased inflammatory markers in insulin-sensitive tissues and macrophage cells. Sunflower oil supplementation was not efficient in preventing or reducing these parameters. In addition, the supplementation increased pro-inflammatory cytokine production by macrophages and tissues. Lipid profile, on the other hand, was improved with the sunflower oil supplementation in animals fed HFD. In conclusion, sunflower oil supplementation improves lipid profile, but it does not prevent or attenuate insulin resistance and inflammation induced by HFD in C57BL/6 mice.

## 1. Introduction

Occidental diet is characterized by high caloric intake, mainly saturated fatty acids and glucose consumption, contributing to the development of obesity and insulin resistance. In the past 15 years, obesity has been associated to chronic inflammation in several tissues and cells, such as liver, adipose tissue, skeletal muscle, and immune cells.

In fact, chronic and subclinical “low-grade” inflammatory state is a hallmark of obesity, and this condition has been proposed to play a central role in the development of insulin resistance, type 2 *diabetes mellitus*, and steatosis [1]. During the past decades, the prevalence of obesity has

enormously increased worldwide [2]. A possible interaction factor between metabolic disorders and inflammation is the disruption in lipid metabolism caused by high levels of saturated fatty acids from high-fat and caloric diet [3, 4].

C57BL/6 mice develop obesity, insulin resistance (IR), *diabetes mellitus*, advanced fatty liver, and fatty pancreatic diseases when submitted to a high-fat diet (HFD), mainly enriched with saturated fatty acids [5]. The composition of fatty acids on diet can be an important modulator of lipid metabolism and inflammation. Some studies have showed that an increase in circulating levels of mono- or polyunsaturated fatty acids improves insulin sensitivity and ameliorates hepatic steatosis [6, 7]. Sunflower oil is rich in

mono- (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA), mainly linoleic acid, a member of the n-6 family.

Diet enriched with sunflower oil decreases plasma triacylglycerol and has beneficial effects on plasma lipid profile [8]. Moreover, acute administration of sunflower oil in rats potentially prevents the gastric damages generated by indomethacin administration through increased anti-inflammatory response [9]. However, mice fed with sunflower oil-enriched diet present increased IL-6 (a pro-inflammatory cytokine) levels in white adipose tissue [8]. Thus, further studies are required to adequately determine the pro- or anti-inflammatory effects of n-6 fatty acids.

Adipose tissue, skeletal muscle, liver, and immune cells have been identified as critical targets for the disruption in metabolic and inflammatory signaling in obesity. The imbalance between metabolic alterations and inflammatory signaling pathways leads to insulin resistance, hepatic steatosis, and related diseases [4, 10].

In this study, we evaluated the effect of sunflower oil supplementation on inflammation and insulin sensitivity in mice fed a balanced diet and a HFD (rich in saturated fatty acids). The protecting or potentiating effect of sunflower oil supplementation on insulin resistance and inflammation was investigated. Whole body (Insulin Tolerance Test—ITT and Glucose Tolerance Test—GTT) and skeletal muscle (glucose uptake and metabolism) insulin sensitivity was examined. Inflammatory markers were investigated in liver, adipose tissue, skeletal muscle, and peritoneal macrophages. The strategy used was to investigate the effect of sunflower oil supplementation in mice fed a balanced diet and a HFD. Under this last condition, a clear inflammatory state is established and so a possible anti-inflammatory effect could be pronounced.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Animals.** All animal studies were performed according to protocols approved by the Animal Care and Use Committee from the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo. C57BL/6 male mice (8 weeks-old) were used for the study. Animals were housed in a room with light-dark cycle of 12-12 h and temperature of  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . Animals were divided in four groups: (a) control diet (CD), (b) high-fat diet (HFD), (c) control diet supplemented with n-6 (CD + n-6), and (d) high-fat diet supplemented with n-6 (HFD + n-6). During the first 4 weeks preceding the induction of obesity by HFD, all the four experimental groups were fed *ad libitum* with a control diet (76% carbohydrates, 9% fat, 15% proteins). CD + n-6 and HFD + n-6 were supplemented with sunflower oil (n-6 PUFA source) by oral gavage at 2 g per Kg of body weight, three times per week, during 12 weeks. This dosage of oil was chosen based on previous studies using different oils from our group and others [11–13]. CD and HFD received water at the same dose.

**2.2. HFD-Induced Obesity and Insulin Resistance.** After the first 4 weeks, animals from the HFD and HFD + n-6 groups received high-fat diet (26% carbohydrates, 59% fat, 15%

proteins) during the next 8 weeks. CD and CD + n-6 groups remained on the control diet. Supplementation with n-6 (sunflower oil, 2 g/Kg b.w.) was kept until the end of the 12 weeks.

**2.3. Glucose and Insulin Tolerance Tests.** Tolerances to glucose (GTT) and to insulin (ITT) were evaluated after 6 h fasting. For GTT, mice were intraperitoneally injected (i.p.) with glucose (2 g/Kg body weight). Blood glucose measurements were performed at 0, 15, 30, 45, 60, and 90 min after glucose injection. Glucose concentration versus time was plotted and the area under the curve (AUC) was calculated for each animal. For ITT, animals were i.p. injected with insulin (Humulin R, Lilly, 0.75 U/kg b.w.) and glucose measurements were performed at 0, 10, 20, 30, 40, 50, and 60 min after injection. Glucose concentration versus time was plotted and the glucose lowering rate was calculated.

In both tests, blood samples were collected from the tail vein. For GTT, serum glucose was measured by colorimetric assay commercially available (PAP Liquiform Glucose, Labtest) and for ITT, glucose was measured by using glucometer (One Touch Ultra, Johnson & Johnson).

**2.4. Serum Parameters Analysis.** After 6 hours fasting, animals were anesthetized and blood was collected by puncturing the orbital plexus. Serum glucose, triacylglycerol, total cholesterol, LDL-cholesterol, and HDL-cholesterol were determined by colorimetric assays (Labtest Diagnostics, Lagoa Santa, MG, Brazil).

**2.5. Responsiveness to Insulin in Isolated Soleus Muscle.** Animals were euthanized by cervical dislocation and soleus muscles rapidly and carefully isolated, weighed (8–10 mg), attached to stainless steel clips to maintain resting tension, and preincubated for 30 min, at  $37^\circ\text{C}$ , in Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRBB) containing 5.6 mM glucose and 1% bovine serum albumin (BSA), pH 7.4, pre-gassed for 30 min with 95%  $\text{O}_2/5\% \text{CO}_2$ , with agitation at 100 oscillations per min. After this period, muscles were transferred to other vials containing the same buffer, but added of  $0.3 \mu\text{Ci/mL}$  D-[ $^{14}\text{C}$ ]-glucose and  $0.2 \mu\text{Ci/mL}$  2-deoxy-D-[2,6- $^3\text{H}$ ]-glucose. Phenylethylamine (0.2 mL), diluted 1:1 v/v in methanol, was added into a separate compartment for  $^{14}\text{CO}_2$  adsorption. Incubation was then performed for 1 h under similar conditions, in the absence or presence of 7 nM insulin. Gasification with 95%  $\text{O}_2/5\% \text{CO}_2$  was maintained during the preincubation and the first 15 min of the incubation period and then stopped.

After the incubation period, muscles were briefly washed in cold KRBB at  $4^\circ\text{C}$ , dried on filter paper and frozen in liquid  $\text{N}_2$ . Samples were processed for measurements of uptake of 2-deoxy-D-[2,6- $^3\text{H}$ ]-glucose, D-[ $^{14}\text{C}$ ]-glucose incorporation, [ $^{14}\text{C}$ ]-glycogen synthesis, and decarboxylation of D-[ $^{14}\text{C}$ ]-glucose, according to methods described by Challiss et al. [14], Espinal et al. [15] and Leighton et al. [16], respectively, and routinely have been used by our group [11, 17–22].

TABLE 1: Obesity characteristics from mice fed with control diet (CD) or high-fat diet (HFD), supplemented or not with sunflower oil (rich in n-6 fatty acids).

	CD	HFD	CD + n6	HFD + n6
Body weight gain (g)	2.90 ± 0.42	11.30 ± 0.91*	3.99 ± 0.65	10.33 ± 0.50 <sup>#</sup>
Food ingestion (g/day/animal)	3.61 ± 0.091	2.44 ± 0.164*	4.53 ± 0.158*	2.45 ± 0.033 <sup>#</sup>
Food efficiency (body weight gain (g)/food ingestion (g))	0.014 ± 0.06	0.083 ± 0.022*	0.016 ± 0.008	0.075 ± 0.011 <sup>#</sup>
Epididymal adipose tissue (mg)	737.9 ± 89.4	1777.0 ± 234.3*	555.1 ± 45.5	1450.0 ± 176.8 <sup>#</sup>

Oral supplementation with sunflower oil rich in n-6 (2 g/Kg body weight, three times a week, oral gavage) or water, started four weeks before feeding or not with HFD, maintained until the end of experimental protocol. Animals were fed with HFD or CD for additional eight weeks. Mean ± SEM ( $n = 8-10$ ). Data were analyzed by two-way ANOVA and Bonferroni post-test. \* $P < 0.05$  versus CD; <sup>#</sup> $P < 0.05$  versus CD + n6.

## 2.6. Analysis of Inflammatory Parameters

**2.6.1. Tissue Cytokine and Adipokine Content Measurements.** Mice were euthanized on CO<sub>2</sub> chamber and visceral adipose tissue (epididymal, retroperitoneal, and mesenteric), liver, gastrocnemius muscle, and peritoneal macrophages rapidly collected. About 100 mg of liver, gastrocnemius muscle and retroperitoneal adipose tissue were used for the determination of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-10 content. Tissues were homogenized in RIPA buffer (0.625% Nonidet P-40, 0.625% sodium deoxycholate, 6.25 mM sodium phosphate, and 1 mM ethylenediamine tetra acetic acid at pH 7.4), containing 10 g/mL of a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Homogenates were centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C, supernatant was collected, and protein concentration determined using Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Bovine serum albumin was used as a protein reference. Likewise, about 150 mg of epididymal adipose tissue were cultured in DMEM sterile medium (Gibco), containing 10% FBS, 2 mM glutamine and antibiotics for 24 h, at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> humidified air environment. Thereafter, medium culture was collected and used for the determination of leptin, adiponectin, and resistin contents. For all determinations, we used colorimetric immunoassays ELISA (DuoSet kits, R&D System).

**2.6.2. Peritoneal Macrophage Isolation and Culture.** Cytokine and nitric oxide (NO) production was evaluated in macrophages obtained by washing the peritoneal cavity with 6 mL RPMI culture medium (Gibco), containing 10% FBS and 4 mM glutamine. Macrophage-rich cultures (more than 90% of the cells were F4/80<sup>+</sup>) were obtained by incubating peritoneal cells in 24-well polystyrene culture plates for 2 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub>, humidified air environment. Nonadherent cells were removed by washing with RPMI. Adherent cells were then incubated with 2.5  $\mu$ g/mL of LPS (*E. coli*, serotype 0111:B4, Sigma Chemical Company, USA) for 24 h [23]. Medium was collected for determination of IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$  by ELISA, and nitrite content by Griess method [24].

**2.7. Statistical Analysis.** Data are presented as mean ± SEM. All groups were compared by two-way ANOVA following Bonferroni posttests.  $P < 0.05$  was considered to be significant.

## 3. Results

**3.1. Exposure to HFD Induces Obesity Associated with Glucose and Insulin Intolerance.** Animals fed with HFD for eight weeks showed increased (by 3.8 fold) body weight gain when compared to those fed with CD. Despite reduced food ingestion, the food efficiency of HFD was 6 fold higher than CD. Moreover, epididymal adipose tissues were increased by HFD. Sunflower oil did not change body weight gain, food efficiency, or adipose tissue increased (Table 1).

HFD increased fasted glucose in 18% (Table 2). An increase of 63% in area under the curve in glucose tolerance test (GTT) was also observed in animals treated with HFD, demonstrating glucose intolerance, which was associated with insulin intolerance, as observed by the reduction in glucose clearance during insulin tolerance test (ITT). Supplementation with sunflower oil maintained fasted glucose levels similar to CD. However, the supplementation did not prevent the glucose and insulin intolerance induced by HFD. Furthermore, sunflower oil supplementation induced insulin intolerance itself (CD + n-6 group), reducing the clearance of glucose similar to HFD without supplementation. Total cholesterol and LDL cholesterol levels were increased by HFD and sunflower oil supplementation in association with HFD showed protective effect in the prevention of the increased LDL cholesterol and cholesterol total levels found in HFD.

**3.2. HFD Impaired Glucose Uptake and Metabolism in Soleus Muscle.** Soleus muscles from animals fed with HFD did not respond to insulin stimulus in relation to glucose uptake and metabolism (Figure 1), characterizing muscle insulin resistance state. This effect was not prevented or reduced by sunflower oil supplementation. Interestingly, the supplementation itself (CD + n-6 group) increased basal glucose uptake and glucose oxidation, but it failed to respond to the insulin stimulus when compared to the control group (CD group).

**3.3. HFD and Sunflower Oil Supplementation Induced Inflammation.** Peritoneal macrophages stimulated with LPS showed increased production of nitrite, TNF $\alpha$ , IL6, and IL10 when compared with unstimulated cells (Figure 2). Macrophages from animals with obesity induced by HFD for 8 weeks showed a inflammatory profile, with increased production of nitrite, TNF- $\alpha$ , and IL-6, associated with decreased content of IL-10 when stimulated with LPS.

TABLE 2: Metabolic parameters from mice fed with control diet (CD) or high-fat diet (HFD), supplemented, or not with sunflower oil (rich in n-6 fatty acids).

	CD	HFD	CD + n6	HFD + n6
Fasted glucose (mg/dL)	186.1 ± 5.66	221.0 ± 8.38*	173.8 ± 4.75	196.8 ± 10.66
GTT test (AUC)	7987 ± 779.3	13090 ± 643.9*	7568 ± 1359	14790 ± 1731 <sup>#</sup>
ITT test (% glucose/min)	2.97 ± 0.19	2.13 ± 0.21*	1.94 ± 0.30*	1.98 ± 0.22
Total cholesterol (mg/dL)	148.2 ± 6.72	192.7 ± 11.96*	164.3 ± 14.00	166.3 ± 12.33
LDL cholesterol (mg/dL)	127.4 ± 5.15	165.1 ± 14.49*	128.2 ± 13.77	136.7 ± 13.22
HDL cholesterol (mg/dL)	14.73 ± 0.83	15.52 ± 1.86	19.33 ± 2.21	15.00 ± 1.15
Triglycerides (mg/dL)	68.61 ± 5.56	63.00 ± 4.40	84.70 ± 8.53	72.78 ± 8.71

Oral supplementation with n-6 (2 g/Kg body weight, three times a week, gavage) or water have started four weeks before HFD and continued until the end of experimental period. Animals were fed HFD or CD for eight weeks. GTT: glucose tolerance test; ITT: insulin tolerance test. Mean ± SEM ( $n = 6-15$ ). ANOVA two-way with Bonferroni post tests. \* $P < 0.05$  when compared with CD; <sup>#</sup> $P < 0.05$  when compared with CD + n6.

TABLE 3: Adipokine production in adipose tissue from mice fed with control diet (CD) or high-fat diet (HFD), supplemented, or not with sunflower oil (rich in n-6 fatty acids).

	CD	HFD	CD + n6	HFD + n6
Epididymal adipose tissue <sup>a</sup>				
Leptin	42.51 ± 8.75	81.38 ± 9.90*	62.42 ± 8.80	88.03 ± 10.96
Adiponectin	659.9 ± 39.94	697.6 ± 43.85	730.3 ± 76.68	649.8 ± 45.38
Resistin	625.1 ± 100.8	528.6 ± 71.65	913.0 ± 181.0	327.0 ± 42.15 <sup>#</sup>

Oral supplementation with n-6 (2 g/Kg body weight, three times a week, gavage) or water started four weeks before HFD and continued until the end of experiment. Animals were fed with HFD or CD for eight weeks. Approximately 150 mg of tissue were incubated in DMEM medium for 24 h and the supernatant were used for measures. Mean ± SEM ( $n = 7-11$ ). ANOVA two-way with Bonferroni post tests. \* $P < 0.05$  when compared with CD; <sup>#</sup> $P < 0.05$  when compared with CD + n6. <sup>a</sup>Values are expressed as pg/mL/mg tissue.

Interestingly, supplementation with sunflower oil induced similar inflammatory response in macrophages. For TNF- $\alpha$  only, the association of HFD and n-6 supplementation (HFD + n-6 group) showed beneficial response, decreasing this cytokine production.

In general, HFD induced and increase in the pro-inflammatory cytokine IL6 and decrease in the anti-inflammatory cytokine IL10 contents in the insulin target tissues (liver, skeletal muscle, and adipose tissue; Figure 3). Interesting, sunflower oil supplementation itself (CD + n-6 group) for 12 weeks increased the content of the proinflammatory cytokine IL6 in all tissues. However, when the sunflower oil was associated with HFD (HFD + n-6 group), cytokine concentrations were similar to that found in the HFD group, in liver and adipose tissue.

Adipokines production by epididymal adipose tissue was determined after 24 h culture. Adipose tissues from HFD animals showed increased production of leptin (Table 3). Resistin was reduced only when HFD was associated to sunflower oil supplementation (HFD + n-6 group) in comparison to CD + n6 group.

#### 4. Discussion

This is the first study to investigate the effects of sunflower oil supplementation on inflammation and insulin sensitivity in mice fed a balanced diet and a HFD. We showed that HFD induces decreased glucose tolerance (as demonstrated

by GTT) and insulin sensitivity (as observed in ITT) in the whole body. Surprisingly, this last effect was also verified in the CD + n6 group. Moreover, proinflammatory response was increased in the HFD group without prevention or attenuation by sunflower oil supplementation. This effect was also observed in CD + n6 group. Lipid profile was impaired by HFD. Animals from HFD group showed an increase in total and LDL cholesterol plasma levels. These alterations were ameliorated by sunflower oil supplementation (HFD + n6 group).

HFD has been associated with insulin resistance and inflammatory condition, contributing to the development of several related diseases, such as obesity, diabetes mellitus type 2, metabolic syndrome, cancer, and cardiovascular diseases [25–27]. Various strategies have been investigated in order to decreasing insulin resistance and inflammation, including natural and modified compounds, cyclooxygenase inhibitors, and physical exercise [28–35]. Since skeletal muscle tissue represents 50–60% of the body weight and it is the main insulin-responsive tissue in association to liver and adipose tissue, it has been proposed that skeletal muscle dysfunctions (reduced oxidative capacity and impaired insulin sensitivity) play a central role in the abnormalities of chronic diseases [21, 36–40]. In this work, we investigated the effect of sunflower oil supplementation on insulin sensitivity (in whole animal *in vivo* and in soleus muscle *in vivo*) and inflammatory condition (liver, skeletal muscle, adipose tissue) in mice fed a balanced diet and a HFD. In recent study, Bjerme et al. [41] showed that isocaloric diet with n-6

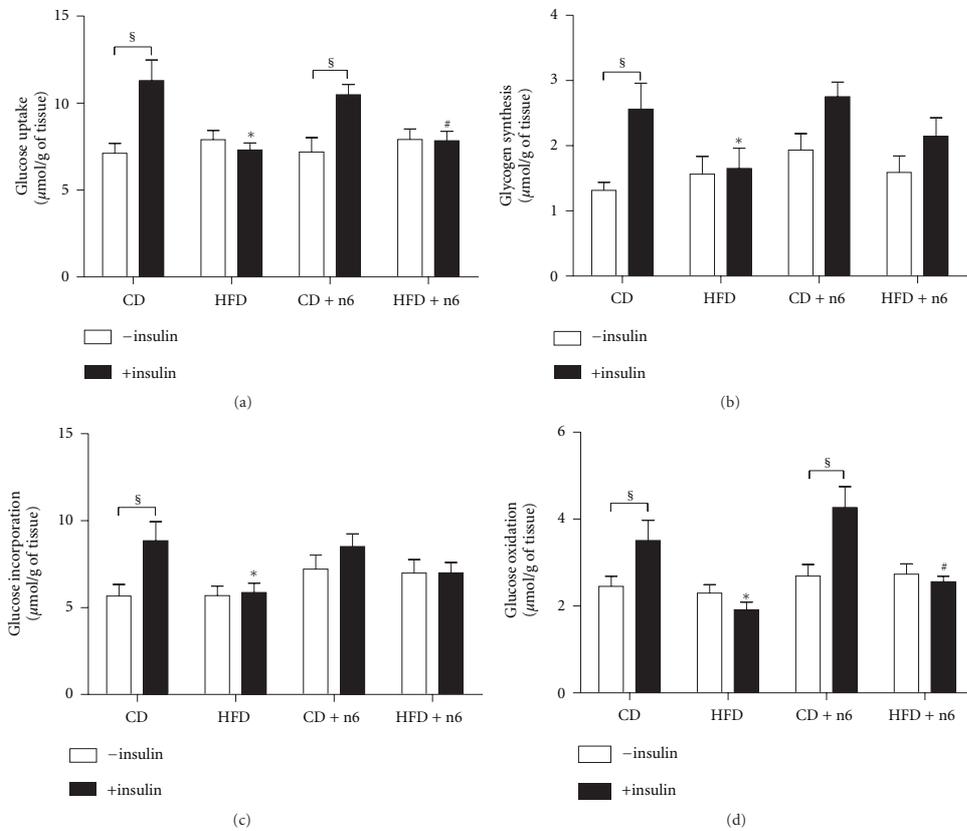


FIGURE 1: Effect of sunflower oil supplementation (rich in n-6 fatty acids) on glucose uptake and metabolism in isolated soleus muscle from C57BL/6 mice. The muscles were incubated in Krebs Ringer buffer, containing 5.6 mM glucose, 0.3  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$  of  $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{-D-glucose}$  and 0.2  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$  of 2-deoxy- $[\text{2,6-}^3\text{H}]\text{-D-glucose}$ , in the absence (white bars) or presence (black bars) of 7 nM insulin, for one hour. At the end of the incubation period, muscles were proceeded to analyze glucose uptake and metabolism as described in Materials and Methods. Results are presented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 10\text{--}16$ ). Two-way ANOVA and Bonferroni posttest were used for statistical analysis. § $P < 0.05$  versus the insulin stimulated (+insulin) of the same group; \* $P < 0.05$  versus CD with insulin; # $P < 0.05$  versus CD + n6 with insulin.

PUFA for 10 weeks reduce liver fat and modestly improves metabolic conditions, without weight loss in humans. In addition, it has been proposed that n-6 PUFA reduce risks of cardiovascular diseases, by improving lipid profile [42]. This improvement in lipid profile was found in our study, whereas HFD + n6 group showed decreased plasma LDL and total cholesterol levels.

Some studies have shown that n-6 PUFA intake positively correlate with obesity and insulin resistance [43, 44]. Treatment with subcutaneous injection of sunflower oil by 7 days in *Wistar* rats impaired insulin sensitivity by decreasing glucose clearance during ITT and GLUT-4 expression and translocation in white adipose tissue (WAT), with no effect in skeletal muscle [7]. In the CD + n6 group, KiTT was

reduced, but glucose uptake and metabolism in isolated soleus muscles were not altered after insulin stimulus. These results suggest that sunflower oil supplementation *per se* is not able to impair insulin response in skeletal muscle, but it possibly reduces total insulin sensitivity by decreasing the response to the hormone in other tissues, such as liver and adipose tissue. This proposition has to be investigated in further studies. In addition, both groups fed with HFD (HFD and HFD + n6 groups) showed skeletal muscle resistance to insulin, showing no beneficial effects of n-6 PUFA on peripheral insulin sensitivity.

Obesity is accompanied by a chronic low grade subclinical inflammation promoted by an increase in fuel availability, leading to infiltration of macrophages into adipose tissue.

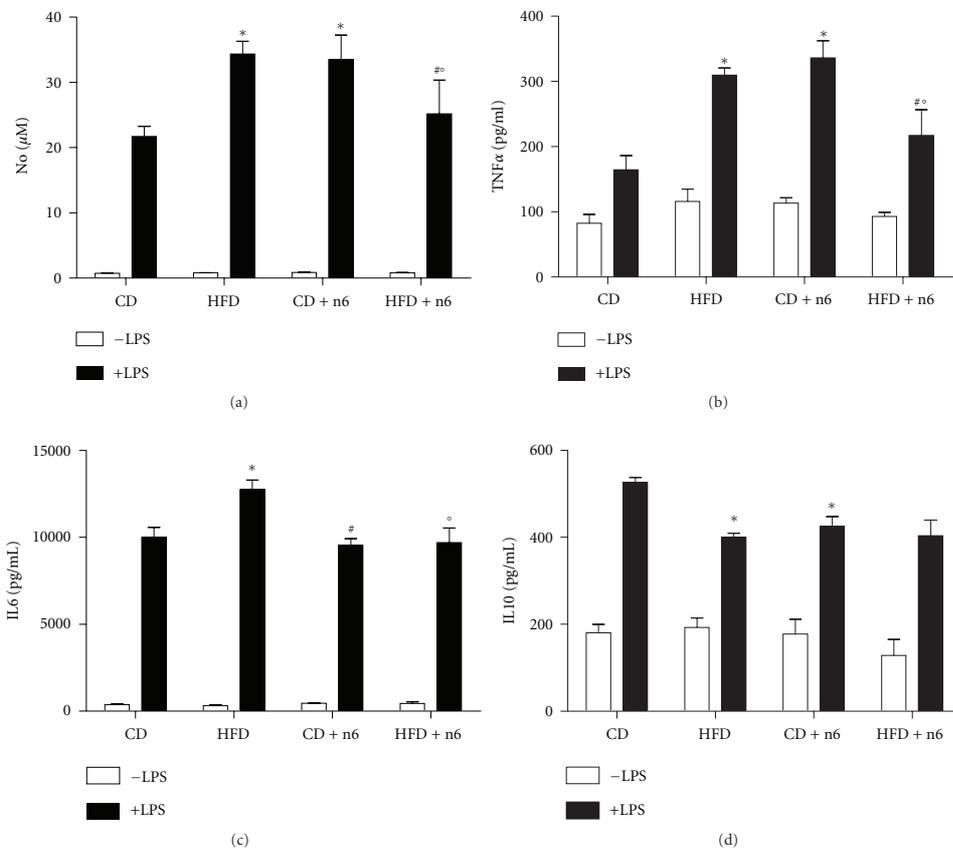


FIGURE 2: Nitric oxide and cytokine production in peritoneal macrophages collected from mice fed with control diet (CD) or high-fat diet (HFD), supplemented or not with sunflower oil (rich in n-6 fatty acids, 2 g/Kg b.w., three times a week, by oral gavage). Animals were fed with HFD or CD for eight weeks. Peritoneal macrophages were collected and cultured for 24 h in the absence (white bars) or presence (black bars) of 2.5  $\mu$ g/mL LPS. Nitric oxide (a), TNF- $\alpha$  (b), IL-6 (c), and IL-10 (d) were measured as described in Material and Methods. Total number of cells in peritoneal exudates was not different among the groups (data not shown). Data are presented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5-10$ ). The CD + n6 group had just 5 samples up to the detection limit in the TNF- $\alpha$  assay. Two-way ANOVA and Bonferroni post-test were used for statistical analysis. All LPS stimulated conditions were different from unstimulated; \* $P < 0.05$  versus CD with LPS; # $P < 0.05$  versus CD + n6 with LPS; <sup>o</sup> $P < 0.05$  versus HFD with LPS.

This condition results in enhanced inflammatory response, which stimulates the production of cytokines by adipose tissue [45]. Moreover, in obesity, increased lipotoxicity caused by high nonesterified fatty acids (NEFA) available, and triacylglycerol content leads to an increase in inflammatory markers and cytokine production in multiple organs [46, 47]. NEFA increases inflammatory response by activating TLR-4 [48]. HFD increased inflammatory response in macrophages, showing high content of IL-6, TNF- $\alpha$ , and NO, and low content of IL-10 (anti-inflammatory cytokine)

when compared to the control group. In peripheral tissues, IL-6 content was increased in the liver and gastrocnemius muscle whereas IL-10 content was decreased in liver and retroperitoneal adipose tissue. Adipose tissue showed increased production of leptin in the HFD and HFD + n6 groups, compared with mice fed with control diet, and resistin was reduced in the HFD + n6 group compared with CD + n6, in epididymal adipose tissue. Whereas in retroperitoneal adipose tissue, IL-6 was elevated in the HFD and CD + n6 groups compared with CD, IL-10 was reduced

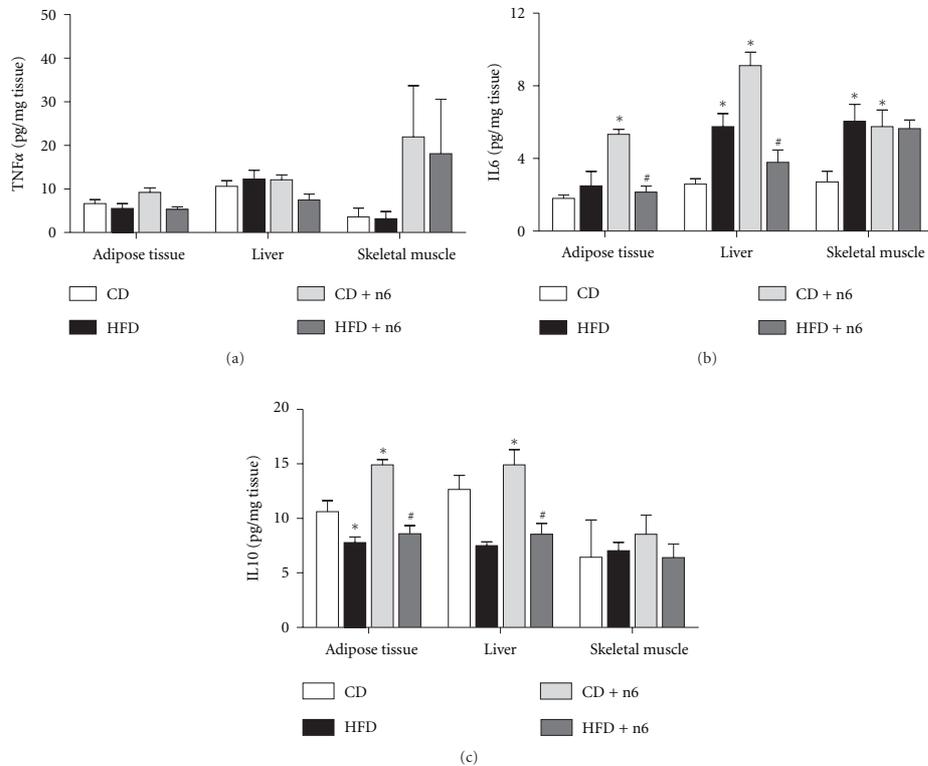


FIGURE 3: Tissue cytokine concentrations of TNF $\alpha$  (a), IL6 (b), and IL10 (c) in adipose tissue (retroperitoneal), liver, and gastrocnemius skeletal muscle from mice treated with control diet (CD) or high-fat diet (HFD), supplemented or not with sunflower oil (rich in n-6 fatty acids). Oral supplementation with n-6 (2 g/Kg body weight, three times a week, gavage) or water started four weeks before HFD and continued until the end of experiment. Animals were fed with HFD or CD for eight weeks. Cytokines were measured in tissue homogenate. Values are expressed as pg/mg protein. Mean  $\pm$  SEM ( $n = 4-6$ ). The statistical analysis was performed using two-way ANOVA with Bonferroni post tests. \* $P < 0.05$  when compared with CD; # $P < 0.05$  when compared with CD + n6.

in the HFD and CD + n6, and adiponectin was reduced only in CD + n6. These results showed the inflammatory characteristics the sunflower oil supplementation and the high fatty diet fed.

Our results showed that sunflower oil supplementation causes a clear pro-inflammatory response in mice fed on control diet and it does not have additive or prophylactic effects in mice fed on HFD. Fatty acid effects on immune system have been studied since 1970's decade [49]. Linoleic acid is an essential fatty acid that leads to inflammatory response by increasing arachidonic acid production, a fatty acid related to elevated pro-inflammatory mediator generation [50]. High intake of linoleic acid has been associated to the development of chronic diseases in several studies [51, 52]. However, few studies have been carried out on the direct effect of this fatty acid on inflammatory markers [53].

In conclusion, our results showed that sunflower oil supplementation has pro-inflammatory effects in macrophages and insulin-sensitive peripheral tissues and induced insulin resistance *in vivo* and *in vitro*. These effects were demonstrated in mice fed a balanced diet and pronounced in mice fed a HFD. Interestingly, sunflower oil supplementation partially prevented the dyslipidemia found in mice submitted to HFD, but it did not improve or even worsened inflammatory state and insulin resistance induced by this diet.

### Acknowledgments

The authors declare no conflict of interests. This study was supported by Grants from São Paulo Research Foundation (FAPESP), Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES), National Council for Scientific

and Technological Development (CNPq)/National Institute of Science and Technology in Obesity and Diabetes (INOD), Center of Lipid Research and Education (CLEAR), and Dean's Office for Research/University of São Paulo.

## References

- [1] P. J. White, M. Arita, R. Taguchi, J. X. Kang, and A. Marette, "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*, vol. 59, no. 12, pp. 3066–3073, 2010.
- [2] R. H. Eckel, S. M. Grundy, and P. Z. Zimmet, "The metabolic syndrome," *Lancet*, vol. 365, no. 9468, pp. 1415–1428, 2005.
- [3] H. N. Ginsberg, Y. L. Zhang, and A. Hernandez-Ono, "Metabolic syndrome: focus on dyslipidemia," *Obesity*, vol. 14, supplement 1, pp. 41S–49S, 2006.
- [4] H. Cao, K. Gerhold, J. R. Mayers, M. M. Wiest, S. M. Watkins, and G. S. Hotamisligil, "Identification of a Lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism," *Cell*, vol. 134, no. 6, pp. 933–944, 2008.
- [5] M. Catta-Preta, M. A. Martins, T. M. Cunha Brunini, A. C. Mendes-Ribeiro, C. A. Mandarin-de-Lacerda, and M. B. Aguila, "Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by different high-fat diets," *Nutrition*, vol. 28, no. 2, pp. 212–219, 2012.
- [6] M. Sekiya, N. Yahagi, T. Matsuzaka et al., "Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression," *Hepatology*, vol. 38, no. 6, pp. 1529–1539, 2003.
- [7] A. C. Poletto, G. F. Anhé, P. Eichler et al., "Soybean and sunflower oil-induced insulin resistance correlates with impaired GLUT4 protein expression and translocation specifically in white adipose tissue," *Cell Biochemistry and Function*, vol. 28, no. 2, pp. 114–121, 2010.
- [8] F. Laugerette, C. Vors, N. Peretti, and M. C. Michalski, "Complex links between dietary lipids, endogenous endotoxins and metabolic inflammation," *Biochimie*, vol. 93, no. 1, pp. 39–45, 2011.
- [9] F. Odabasoglu, Z. Halici, A. Cakir et al., "Beneficial effects of vegetable oils (corn, olive and sunflower oils) and  $\alpha$ -tocopherol on anti-inflammatory and gastrointestinal profiles of indomethacin in rats," *European Journal of Pharmacology*, vol. 591, no. 1-3, pp. 300–306, 2008.
- [10] A. Kontrogianni-Konstantopoulos, G. Benian, and H. Granzier, "Advances in muscle physiology and pathophysiology," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2010, Article ID 780417, 1 pages, 2010.
- [11] M. A. Vinolo, H. G. Rodrigues, W. T. Festuccia et al., "Tributyrin attenuates obesity-associated inflammation and insulin resistance in high-fat fed mice," *American Journal of Physiology—Endocrinology and Metabolism*, vol. 303, no. 2, pp. E272–E282, 2012.
- [12] L. A. Muehlmann, A. L. Zanatta, C. L. A. Farias et al., "Dietary supplementation with soybean lecithin increases pulmonary PAF bioactivity in asthmatic rats," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 21, no. 6, pp. 532–537, 2010.
- [13] J. Aikawa, K. D. Moretto, F. Denes et al., "Glucose metabolism by lymphocytes, macrophages, and tumor cells from Walker 256 tumor-bearing rats supplemented with fish oil for one generation," *Cell Biochemistry and Function*, vol. 26, no. 8, pp. 874–880, 2008.
- [14] R. A. J. Challiss, F. J. Lozeman, B. Leighton, and E. A. Newsholme, "Effects of the  $\beta$ -adrenoceptor agonist isoprenaline on insulin-sensitivity in soleus muscle of the rat," *Biochemical Journal*, vol. 233, no. 2, pp. 377–381, 1986.
- [15] J. Espinal, G. L. Dohm, and E. A. Newsholme, "Sensitivity to insulin of glycolysis and glycogen synthesis of isolated soleus-muscle strips from sedentary, exercised and exercise-trained rats," *Biochemical Journal*, vol. 212, no. 2, pp. 453–458, 1983.
- [16] B. Leighton, L. Budohoski, and F. J. Lozeman, "The effect of prostaglandins E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> and F<sub>2</sub>( $\alpha$ ) and indomethacin on the sensitivity of glycolysis and glycogen synthesis to insulin in stripped soleus muscles of the rat," *Biochemical Journal*, vol. 227, no. 1, pp. 337–340, 1985.
- [17] S. Massao Hirabara, C. R. De Oliveira Carvalho, J. R. Mendonça, E. Piltcher Haber, L. C. Fernandes, and R. Curi, "Palmitate acutely raises glycogen synthesis in rat soleus muscle by a mechanism that requires its metabolism (Randle cycle)," *FEBS Letters*, vol. 541, no. 1–3, pp. 109–114, 2003.
- [18] M. A. Carvalho-Filho, M. Ueno, S. M. Hirabara et al., "S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance," *Diabetes*, vol. 54, no. 4, pp. 959–967, 2005.
- [19] S. M. Hirabara, L. R. Silveira, L. C. Alberici et al., "Acute effect of fatty acids on metabolism and mitochondrial coupling in skeletal muscle," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1757, no. 1, pp. 57–66, 2006.
- [20] D. M. L. Tsukumo, M. A. Carvalho-Filho, J. B. C. Carneiro et al., "Loss-of-function mutation in toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance," *Diabetes*, vol. 56, no. 8, pp. 1986–1998, 2007.
- [21] S. M. Hirabara, R. Curi, and P. Maechler, "Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 222, no. 1, pp. 187–194, 2010.
- [22] A. M. Caricilli, P. K. Picardi, L. L. de Abreu et al., "Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice," *PLoS Biology*, vol. 9, no. 12, article e1001212, 2011.
- [23] J. M. Papadimitriou and I. Van Bruggen, "The effects of malnutrition on murine peritoneal macrophages," *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 49, no. 2, pp. 161–170, 1988.
- [24] N. P. Sen and B. Donaldson, "Improved colorimetric method for determining nitrate and nitrite in foods," *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. 61, no. 6, pp. 1389–1394, 1978.
- [25] C. Fernandes-Santos, R. Evangelista Carneiro, L. De Souza Mendonça, M. Barbosa Águila, and C. Alberto Mandarin-De-Lacerda, "Rosiglitazone aggravates nonalcoholic fatty pancreatic disease in C57BL/6 mice fed high-fat and high-sucrose diet," *Pancreas*, vol. 38, no. 3, pp. e80–e86, 2009.
- [26] J. C. Fraulob, R. Ogg-Diamantino, C. Fernandes-Santos, M. B. Aguila, and C. A. Mandarin-de-Lacerda, "A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 mice fed a high fat diet," *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, vol. 46, no. 3, pp. 212–223, 2010.
- [27] G. D. Pimentel, A. P. Dornellas, J. C. Rosa et al., "High-fat diets rich in soy or fish oil distinctly alter hypothalamic insulin signaling in rats," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 23, no. 7, pp. 822–828, 2012.
- [28] B. Zhou, Y. Pan, Z. Hu et al., "All-trans-retinoic acid ameliorated high fat diet-induced atherosclerosis in rabbits by inhibiting platelet activation and inflammation," *Journal of*

- Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2012, Article ID 259693, 9 pages, 2012.
- [29] F. Rivera-Ramirez, G. N. Escalona-Cardoso, L. Garduño-Siciliano et al., "Antiobesity and hypoglycaemic effects of aqueous extract of *Ibervillea sonorae* in mice fed a high-fat diet with fructose," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2011, Article ID 968984, 6 pages, 2011.
- [30] J. B. Driban, A. E. Barr, M. Amin, M. R. Sitler, and M. F. Barbe, "Joint inflammation and early degeneration induced by high-force reaching are attenuated by ibuprofen in an animal model of work-related musculoskeletal disorder," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2011, Article ID 691412, 17 pages, 2011.
- [31] E. J. Yang, J. Y. Moon, J. S. Lee, J. Koh, N. H. Lee, and C. G. Hyun, "Acanthopanax koreanum fruit waste inhibits lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> in RAW 264.7 macrophages," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2010, Article ID 715739, 10 pages, 2010.
- [32] K. R. Kim, C. K. Jeong, K. K. Park et al., "Anti-inflammatory effects of licorice and roasted licorice extracts on TPA-induced acute inflammation and collagen-induced arthritis in mice," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2010, Article ID 709378, 8 pages, 2010.
- [33] T. Klangjareonchai and C. Roongpisuthipong, "The effect of *Tinospora crispa* on serum glucose and insulin levels in patients with type 2 diabetes mellitus," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2012, Article ID 808762, 4 pages, 2012.
- [34] C. Brandt and B. K. Pedersen, "The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2010, Article ID 520258, 6 pages, 2010.
- [35] S. A. Hopkins, J. C. Baldi, W. S. Cutfield, L. McCowan, and P. L. Hofman, "Exercise training in pregnancy reduces offspring size without changes in maternal insulin sensitivity," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 95, no. 5, pp. 2080–2088, 2010.
- [36] M. A. Abdul-Ghani and R. A. DeFronzo, "Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2010, Article ID 476279, 19 pages, 2010.
- [37] M. Peppas, C. Koliaki, P. Nikolopoulos, and S. A. Raptis, "Skeletal muscle insulin resistance in endocrine disease," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2010, Article ID 527850, 13 pages, 2010.
- [38] A. R. Martins, R. T. Nachbar, R. Gorjao et al., "Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function," *Lipids in Health and Disease*, vol. 11, article 30, 2012.
- [39] K. Das, K. Das, P. S. Mukherjee et al., "Nonobese population in a developing country has a high prevalence of nonalcoholic fatty liver and significant liver disease," *Hepatology*, vol. 51, no. 5, pp. 1593–1602, 2010.
- [40] S. Sakuma, Y. Nishioka, R. Imanishi et al., "cis9, trans11-conjugated linoleic acid differentiates mouse 3T3-L1 preadipocytes into mature small adipocytes through induction of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ," *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, vol. 47, no. 2, pp. 167–173, 2010.
- [41] H. Bjerme, D. Iggman, J. Kullberg et al., "Effects of *n* - 6 PUFAs compared with SFAs on liver fat, lipoproteins, and inflammation in abdominal obesity: a randomized controlled trial," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 95, no. 5, pp. 1003–1012, 2012.
- [42] S. Czernichow, D. Thomas, and E. Bruckert, "*N* - 6 fatty acids and cardiovascular health: dietary intake recommendations," *Medicine/Sciences*, vol. 27, no. 6-7, pp. 614–618, 2011.
- [43] G. Ailhaud, F. Massiera, P. Weill, P. Legrand, J. M. Alessandri, and P. Guesnet, "Temporal changes in dietary fats: role of *n* - 6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development and relationship to obesity," *Progress in Lipid Research*, vol. 45, no. 3, pp. 203–236, 2006.
- [44] C. M. Phillips, L. Goumidi, S. Bertrais et al., "Leptin receptor polymorphisms interact with polyunsaturated fatty acids to augment risk of insulin resistance and metabolic syndrome in adults," *Journal of Nutrition*, vol. 140, no. 2, pp. 238–244, 2010.
- [45] R. Stienstra, J. A. van Diepen, C. J. Tack et al., "Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 37, pp. 15324–15329, 2011.
- [46] H. Ghanim, A. Aljada, D. Hofmeyer, T. Syed, P. Mohanty, and P. Dandona, "Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state," *Circulation*, vol. 110, no. 12, pp. 1564–1571, 2004.
- [47] M. Jové, A. Planavila, J. C. Laguna, and M. Vázquez-Carrera, "Palmitate-induced interleukin 6 production is mediated by protein kinase C and nuclear-factor B activation and leads to glucose transporter 4 down-regulation in skeletal muscle cells," *Endocrinology*, vol. 146, no. 7, pp. 3087–3095, 2005.
- [48] M. Tschöp and G. Thomas, "Fat fuels insulin resistance through Toll-like receptors," *Nature Medicine*, vol. 12, no. 12, pp. 1359–1361, 2006.
- [49] H. G. Rodrigues, M. A. R. Vinolo, J. Magdalon et al., "Dietary free oleic and linoleic acid enhances neutrophil function and modulates the inflammatory response in rats," *Lipids*, vol. 45, no. 9, pp. 809–819, 2010.
- [50] M. M. Zaman, C. R. Martin, C. Andersson et al., "Linoleic acid supplementation results in increased arachidonic acid and eicosanoid production in CF airway cells and in cfr/*-*transgenic mice," *American Journal of Physiology*, vol. 299, no. 5, pp. L599–L606, 2010.
- [51] A. P. Simopoulos, "Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 60, no. 9, pp. 502–507, 2006.
- [52] W. E. M. Lands, "Dietary fat and health: the evidence and the politics of prevention: careful use of dietary fats can improve life and prevent disease," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1055, pp. 179–192, 2005.
- [53] K. L. Fritsche, "Too much linoleic acid promotes inflammation-doesn't it?" *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, vol. 79, no. 3–5, pp. 173–175, 2008.



## Fatty acids regulation of inflammatory and metabolic genes

Laureane N. Masi<sup>a</sup>, Alice C. Rodrigues<sup>b</sup>, and Rui Curi<sup>a</sup>

### Purpose of review

Fatty acids influence human health and diseases in various ways. In recent years, much work has been carried out to elucidate the mechanisms by which dietary fatty acids control short-term and long-term cellular functions. We have reviewed herein the most recent studies on modulation of gene expression by fatty acids. A number of genes respond to transcription factors and present a transcription factor response element in their promoter regions. Fatty acids may exert their effects on metabolism by regulating gene transcription via transcription factors. Understanding how fatty acids control expression of metabolic genes is a promising strategy to be investigated by aiming to treat metabolic diseases such as insulin resistance, obesity, and type 2 diabetes mellitus.

### Recent findings

Fatty acids exert many of their biological effects through the modulation of the activity of transcription factors, such as sterol regulatory element-binding proteins, peroxisome proliferator-activated receptors, and liver X receptors.

### Summary

Fatty acid action through transcription factors controls the expression of several inflammatory and metabolic genes.

### Keywords

liver X receptor, metabolic diseases, peroxisome proliferator-activated receptor, sterol regulatory element-binding proteins, transcription factors

## INTRODUCTION

Metabolic syndrome is a cardiometabolic disease, characterized by dyslipidemia, glucose intolerance, hypertension, and visceral obesity. A low-grade chronic inflammatory activity is commonly observed in this disease state. Among the environmental factors involved in the disease, the type of dietary fat intake [saturated fatty acid (SFA), monounsaturated fatty acid (MUFA), or polyunsaturated fatty acids (PUFA)] has received more attention recently. Fatty acids regulate gene expression in various cells and tissues including in the adipose tissue [1], intestinal epithelial cells [2], pancreas [3], liver [4], heart [5], and leukocytes [6].

Fatty acids exert much of their effects acting as natural ligands of a number of key transcription factors, including peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), liver X receptors (LXRs), sterol-regulatory element-binding proteins (SREBPs), and carbohydrate response element-binding protein (ChREBP). These nuclear receptors respond either directly or indirectly to nutrients and metabolic cues

such as cholesterol, fatty acids, glucose, and insulin to rapidly alter metabolic gene expression programmes. In this review, we will highlight the recent advances in the understanding on how fatty acids ameliorate metabolic diseases and the molecular mechanisms involved.

## REGULATION OF GENE EXPRESSION BY FATTY ACIDS

The mechanism by which fatty acids regulates gene expression remains largely unresolved. Several lines of evidence suggest that transcription factors such as

<sup>a</sup>Department of Physiology and Biophysics and <sup>b</sup>Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence to Rui Curi, Institute of Biomedical Sciences, Av. Professor Lineu Prestes, 1524, 05508-900 São Paulo, Brazil. Tel: +55 11 3091 7245; e-mail: ruicuri@icb.usp.br

**Curr Opin Clin Nutr Metab Care** 2013, 16:418-424

DOI:10.1097/MCO.0b013e32836236df

**KEY POINTS**

- We reviewed the most recent studies concerning fatty acids regulation of inflammatory and metabolic genes.
- Fatty acids control gene expression via transcription factors, including SREBPs or nuclear receptors (PPARs and LXRs).
- Understanding how fatty acids control expression of metabolic genes is a promising strategy to be investigated by aiming to treat metabolic diseases such as insulin resistance, obesity, and type 2 diabetes mellitus.

PPARs, LXRs, SREBPs, and ChREB could mediate effect of fatty acids. In this section, we will focus on transcription factors involved in gene expression by fatty acids. For instance, PUFA inhibition of lipogenic genes are related to a reduction of SREBP activity by the fatty acid, which reduces expression of sterol response elements-containing genes, such as fatty acids synthase (*FAS*), or steroyl-CoA desaturase 1 (*SCD1*).

**Fatty acid and peroxisome proliferator-activated receptors**

PPARs were the first nuclear receptors to be identified as possible mediators of fatty acid regulation of gene expression. Isseman and Green [7] first characterized these nuclear receptors as transcription factors that belong to the superfamily of steroid nuclear receptors and include three different isoforms: PPAR $\alpha$  (NR1C1), PPAR $\beta/\delta$  (NR1C2), and PPAR $\gamma$  (NR1C3). The subtypes of the PPAR subfamily were found to be highly expressed in tissues relevant to energy homeostasis and have been described as important regulators of lipid metabolism [8].

The three subtypes do not show strict ligand specificity. Certain ligands are able to activate all subtypes with different efficiencies. Molecules that were found to bind to PPAR include PUFAs such as n-3 PUFA [e.g.,  $\alpha$ -linolenic acid C18:3 and docosahexaenoic acid (DHA) C22:6] [9], and n-6 PUFA (such as linoleic acid C18:2 and arachidonic acid C20:4) [10]. Hajjar *et al.* [11] demonstrated that diets with low n-6:n-3 PUFA ratios led to improved spatial memory and upregulated the hippocampal PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  gene expression. SFAs (such as palmitic acid C16:0 and stearic acid C18:0) were also found to bind to PPAR $\alpha$  [12]. Another group of PPAR ligands comprises the conversion products of essential fatty acids through lipoxygenases or cyclooxygenases [13].

Unoda *et al.* [14] investigated the therapeutic effects of ultrapurified eicosapentaenoic acid (EPA) on the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in an animal model for multiple sclerosis. They showed that administration of EPA 7 days after immunization induced expression of all three PPARs types and almost completely blocked the production of inflammatory cytokines in the central nervous system.

The PPAR isoforms alter intracellular and extracellular fatty acids homeostasis in distinct ways. PPAR $\alpha$  when activated, plays a crucial role in fatty acid (FA) oxidation, which provides energy during starvation [15]. PPAR $\gamma$  is activated in the fed state and regulates the synthesis of fatty acids and related lipids in the heart [16], whereas PPAR $\beta/\delta$  ensures, among other effects, that fatty acids can provide energy for working muscles [17].

The PPAR $\alpha$  isotype is mainly expressed in brown adipose tissue and liver as well as in the heart, skeletal muscle, kidney, and enterocytes, and is a key regulator of energy balance [18<sup>¶</sup>]. PPAR $\alpha$  has been shown to regulate expression of various genes involved in FA oxidation [19], ketogenesis [20], gluconeogenesis [21], cholesterol catabolism [22], and lipoprotein metabolism [23]. Devarshi *et al.* [23] investigated the effects of dietary flaxseed oil and fish oil for 35 days in streptozotocin-nicotinamide diabetic Wistar rats. They observed that dietary flaxseed oil upregulates hepatic PPAR $\alpha$  along with an increase in plasma high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and a decrease in triglycerides levels, whereas fish oil does not show any effect on PPAR $\alpha$  expression, but decreases plasma triglycerides and increases HDL-C levels in diabetic rats [23].

PPAR $\gamma$  is mainly expressed in the adipose tissue being a key regulator of adipocyte differentiation, energy storage, and energy dissipation in white and brown adipose tissues. PPAR $\gamma$  is also expressed in monocytes/macrophages, endothelial cells, and vascular smooth muscle cells, wherein its activation is associated with decreased production of inflammatory cytokines [24]. PPAR $\gamma$  activation also results in improved insulin sensitivity. This transcription factor is the target of the thiazolidinedione class of drugs used in the clinical management of type 2 diabetes [25]. Yang *et al.* [26<sup>¶¶</sup>] demonstrated that PPAR $\gamma$  mRNA level is increased in the adipose tissue of KK-A<sup>Y</sup> mice, an experimental model for obesity and type 2 diabetes mellitus, fed with long chain MUFAs. Increased expression of lipoprotein lipase (*Lpl*), fatty acids transport protein (*Fatp*), and Cd36 mRNAs was observed concomitantly, suggesting that the reduction in adipocyte size was partly attributed to the upregulation of PPAR $\gamma$  and its target genes.

PPAR $\beta/\delta$ , which remains as the least characterized of the three isoforms, is ubiquitously expressed and binds fatty acids and eicosanoids without much specificity. Recently, Lee and Chung [27] (2011) demonstrated that PPAR $\beta/\delta$ -agonist GW0742 (10 mg/kg per day) given by gavage to rats from 26 to 36 weeks old, attenuates hyperglycemia and fatty accumulation in the liver. These changes were possibly due to suppression of production of inflammatory cytokines and can be partially explained by the reduction in PGC-1 $\alpha$  expression and an improvement in insulin signaling.

#### Fatty acid and liver X receptors

LXRs are members of the nuclear receptor family. The two subtypes  $\alpha$  and  $\beta$  are classified in a homology-based nomenclature system as NR1H3 and NR1H2, respectively [28]. LXR $\alpha$  is highly expressed in the liver, but it is also found in the kidney, intestine, adipose tissue, and macrophages. LXR $\beta$  is ubiquitously expressed [29]. Their endogenous activators are the oxysterols and other derivatives of cholesterol metabolism, for example, [22(R)-hydroxycholesterol, 24(S)-hydroxycholesterol, 24(S), 25-epoxycholesterol] and the synthetic agonists are T0901317 and GW3965 both non-steroid LXR activators.

The physiological impact of LXRs is associated with the communicative interface of lipid metabolism and inflammation. LXR activation leads to the binding of LXR/RXR heterodimers to LXRE sequences within the promoters of genes whose products are involved in hepatic bile acid synthesis and hence, the main route for elimination of cholesterol from the body is activated [30]. LXRs are important regulators of cholesterol and fatty acid metabolism and glucose homeostasis and have been shown to induce expression of genes such as *CYP7 $\alpha$* , *FAS*, acetyl-CoA carboxylase (*ACC*), *SCD1*, *LPL*, and *SREBP-1c* [22].

Liver-specific deletion of LXR $\alpha$  in mice substantially decreased reverse cholesterol transport, cholesterol catabolism, and cholesterol excretion, revealing the essential importance of hepatic LXR $\alpha$  for whole body cholesterol homeostasis [31].

High saturated fat intake induces hepatic steatosis [32]. In contrast, n-3 fatty acids have been shown to improve hepatic steatosis by inhibiting hepatic lipogenesis [33], via downregulation of *SREBP-1c* gene expression, and by stimulating FA oxidation, as a competitive inhibitor of LXR ligands [34]. Jung *et al.* [35] demonstrated that an n-3 PUFA-rich diet markedly decreases triglycerides content and lipid droplet accumulation induced by a SFA-

rich diet in the liver of C57Bl/6 mice treated with LXR agonist T0901317.

#### Fatty acid and sterol regulatory binding proteins

SREBPs are transcription factors of the helix-loop-helix family that activate the synthesis of fatty acids, triglycerides, and cholesterol in all organs [29]. SREBPs are encoded by two genes, *SREBP-1* and *SREBP-2*, resulting in three proteins *SREBP-1a*, *SREBP-1c*, and *SREBP-2*. *SREBP-1a* activates cholesterol and FAS. *SREBP-1c* primarily activates FAS and *SREBP-2* activates cholesterol production, both are abundant in the liver [36].

SREBPs are synthesized as membrane-bound in the endoplasmic reticulum. Immediately after synthesis, SREBPs form complexes with Scap, an endoplasmic reticulum-to-Golgi transport protein. In the Golgi, SREBPs are sequentially processed by two proteases that release the transcriptionally active fragment of SREBPs. The released SREBP fragments enter the nucleus wherein they activate the transcription of every gene involved in the conversion of acetyl-CoA to fatty acids and cholesterol [37].

In the liver, the primary activator of SREBPs is insulin, which increases the synthesis and proteolytic processing of *SREBP-1c* [38]. High plasma insulin levels as observed in obesity and type 2 diabetes mellitus hyperactivate *SREBP-1c* and hepatic steatosis ensues. Moon *et al.* [39] showed that elimination of nuclear SREBPs in the liver ameliorates pathologic triglycerides accumulation in three models: *ob/ob* mice, high fat diet (HFD)-induced insulin resistance, and sucrose-fed hamsters [39].

Fatty acids can also modulate the activity of SREBPs. n-3 PUFA are nutritional suppressors of nuclear SREBPs activity and expression of genes involved in lipogenesis. Chen *et al.* [40] (2012) showed in Golden hamsters that oral supplementation of docosapentaenoic acid, omega-6 docosapentaenoic acid, and DHA for 6 weeks favorably modified plasma lipoprotein profile accompanied by downregulation of expression of *SREBP-2* and HMG-CoA reductase genes. Similarly, the consumption of a diet containing low levels of n-3 PUFA for 3 months induced the activation of *SREBP-1c* in C57Bl/6J male mice [41]. In accordance with these observations, Pettinelli *et al.* [42] demonstrated that human biopsies of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) patients show increased expression of *SREBP-1c* associated with n-3 PUFA depletion.

Apart from n-3 fatty acids, Yang *et al.* [43] demonstrated that palmitoleic acid (n-7 FA) orally administered in male KK-A<sup>y</sup> mice, a model for

type 2 diabetes, for 4 weeks, suppresses lipid accumulation in the liver with markedly downregulated expressions of SREBP-1, FAS, and SCD-1 mRNA.

### Fatty acids and molecular control of lipid metabolism

Diets rich in SFAs have a deleterious effect on blood lipid and lipoprotein profile; they raise total cholesterol (TC) and LDL cholesterol (LDL-C). When SFAs are isocalorically replaced by PUFA or MUFA, a reduction in TC, LDL-C, and apolipoprotein B is observed, thus, a healthier lipid profile is achieved [44].

The benefits of SFA nutrient substitutions are influenced by the genetics of the individual. In a randomized controlled trial of individuals in high risk of cardiometabolic disease, after 4 weeks of a SFA diet, the diet was replaced by a MUFA or a carbohydrate (low fat) in isoenergetic diet for 24 weeks, and the effects on lipid profile were associated with single nucleotide polymorphisms on adiponectin (*ADIPOQ*), *PPAR $\alpha$* , and *PPAR $\gamma$*  genes. Carriers of both *PPAR $\gamma$*  12Ala (mutant allele) and *PPAR $\alpha$*  162Val, had a greater reduction in LDL-C and a proportion as small dense LDL after a high MUFA diet than after a low fat diet. In *ADIPOQ-10066GG* homozygotes, a high-MUFA diet was associated to higher *ADIPOQ* levels in people over 40 years of age [45].

The benefits of n-3 PUFA, especially of  $\alpha$ -linolenic acid (ALA), EPA, and DHA, on blood lipid profile have been defined by epidemiological, human, animal, and cell culture studies [46]. ALA exerts most of its effects by reducing LDL-C, whereas EPA and DHA may reduce triacylglycerol synthesis and adiposity [46]. Despite the fact that ALA, EPA, and DHA are normally grouped together, individual fatty acids have a selective and independent effect on metabolic syndrome. Poudyal *et al.* [47] have compared the cardiovascular, hepatic, and metabolic responses to individual dietary n-3 fatty acids in a high carbohydrate, HFD-induced model of metabolic syndrome in rats. The same dosages of ALA and EPA/DHA produced different physiological responses to decrease the risk factors for metabolic syndrome. ALA did not reduce total body fat but induced lipid redistribution away from the abdominal area and favorably improved glucose tolerance, insulin sensitivity, dyslipidemia, hypertension and left ventricular dimensions, contractility, volumes, and stiffness. EPA and DHA increased sympathetic activation, reduced the abdominal adiposity and total body fat and attenuated insulin sensitivity, dyslipidemia, hypertension, and left ventricular stiffness but not glucose tolerance. As ALA induced

different physiological responses to EPA and DHA, this result strongly suggests that ALA has independent effects in metabolic syndrome, not relying on its metabolism to DHA [47].

The effect of DHA supplementation on lipid and lipoprotein profile has also been studied in humans. DHA produced potentially beneficial changes in total, very low-density lipoprotein (VLDL) and triglycerides concentrations as well as in VLDL, LDL, and HDL particle size in overweight or obese adults treated with 2 g per day of algal DHA for 4.5 months in comparison with individuals receiving placebo [48]. These beneficial effects of the n-3 PUFA are likely mediated through changes in gene expression, which result in metabolome alterations. Metabolomic and transcriptomic studies carried out to investigate molecular and metabolic alterations following n-3 PUFA supplementation in healthy individuals revealed changes in gene expression of the nuclear receptor *PPAR $\alpha$* , nuclear factor- $\kappa$ B, and activation of the oxidative stress response mediated by nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2. After n-3 PUFA supplementation, an increase in acylcarnitines, hexose, and leucine in men only and a decrease in the saturation of glycerophosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine concentrations was observed in all individuals [49].

### Fatty acids and insulin resistance

Observations from animal studies, especially murine models of metabolic syndrome, have shown that n-3 PUFAs strongly reduce insulin resistance and improve glucose tolerance. Hirabara *et al.* [50] have studied the effect of fish oil supplementation for two generations in rats. Rats from the second generation presented a reduction in glycemia and lipidemia and improvement in in-vivo insulin sensitivity. This effect was associated with increased insulin-stimulated p38 MAP kinase phosphorylation and lower n-6/n-3 fatty acid ratio. Treatment of C57BL/6J mice with a HFD supplemented with 10% saury oil (containing 18% n-3 PUFA and 35% MUFA) for 6 weeks significantly decreased glucose, insulin and lipids levels in plasma, and improved insulin sensitivity. These favorable changes were attributed to the increased *ADIPOQ* and decreased tumor necrosis factor  $\alpha$  and resistin levels in plasma, as well as to the downregulation of lipogenic genes (*SREBP-1*, *SCD-1*, *FAS*, and *ACC*), and the upregulation of the fatty acid oxidative gene, *CPT-1*, and the energy expenditure-related genes (*PGC1 $\alpha$*  and *PGC1 $\beta$* ) in white adipose tissue [51].

Impairment of insulin sensitivity represents a key defect in type 2 diabetes, being associated with a metabolic inflexibility, that is, a low capacity to

match fuel oxidation to fuel availability [52]. Combined use of n-3 PUFA and rosiglitazone in mice fed an obesogenic HFD preserves metabolic flexibility to carbohydrates compared with single interventions. Gene expression analyses in the skeletal muscle identified several candidates involved in carbohydrate and lipid metabolism, namely pyruvate dehydrogenase kinase 4, fructose-1,6-bisphosphatase 2, and carnitine palmitoyltransferase 1b, which could be involved in the additive effects of the combined intervention [53].

On the contrary, myotubes from T2D patients when challenged with high concentrations of palmitate show a defect in palmitate  $\beta$ -oxidation, and this impaired response could be the result of a lack of inhibition of ACC activity by the fatty acid [54].

### Fatty acids and hepatosteatosis

Excessive fat storage resulting from a sedentary lifestyle and overfeeding of fast food is manifested in obesity and NAFLD.

As compared with SFAs, increasing evidence has indicated favorable effects of MUFAs on obesity. As pointed out before, PPAR $\gamma$  is a regulator of adipogenesis and its activation results in improved insulin sensitivity. Dietary treatment of KK-A $^y$  mice with low chain-MUFAs reduced fat pad weight as well as adipocyte size, hyperlipidemia, hyperinsulinemia, and hyperleptinemia, most likely partly attributable to the upregulation of *Pparg* and its target genes *Lpl*, *Fatp*, and *Cd36* [20].

Defective hypothalamic activity plays an important role in the development of obesity [55]. SFAs induce hypothalamic inflammation by

activating signal transduction through Toll-like receptor 4, which leads to endoplasmic reticulum stress [56]. On the contrary, the nutritional substitution of saturated by unsaturated fatty acids in the diet of male Swiss mice, corrects hypothalamic inflammation, hypothalamic and whole body insulin resistance, and body adiposity, an effect which seems to be mediated by the GPR120 receptor [57].

In individuals with NAFLD, hepatic de-novo lipogenesis and the activity of enzyme SCD1 are increased, whereas the percentage of long-chain PUFA is decreased in the liver of these individuals compared with individuals without NAFLD. In addition, hepatic gene expression of *SREBP-1c*, *ACC*, and *FAS* are increased [58].

Dietary n-3 PUFA supplementation (200 mg/kg per day) restores liver n-3 PUFA levels in mice subjected to HFD and prevents the accumulation of fat in the liver, with concomitant normalization of insulin resistance [59]. As discussed previously, n-3 PUFAs regulate hepatic lipid metabolism by downregulating *SREBP-1c* and lipogenic genes (*FAS*, *ACC*, and *SCD-1*), thus, reduction in de-novo lipogenesis, whereas activation of PPAR- $\alpha$  triggers FA oxidation.

In spite of the widely accepted association between hepatic steatosis and insulin resistance, Benhamed *et al.* [60\*\*] have described in patients and animals with NASH that hepatic steatosis occurs independently of the insulin resistance. They have demonstrated that ChREBP overexpression in mouse liver leads to a significant increase in hepatic triglycerides content and hepatic steatosis development. Interestingly, ChREBP overexpression in the livers of HFD mice, induces hepatic lipid overload,

**Table 1. Summary of the actions of fatty acids through transcription factors**

Fatty Acids	Expression	Transcription factors	Regulated genes	Effects	References
N-3 PUFA (EPA; DHA; $\alpha$ -linolenic)	↑	PPAR $\alpha$	–	↓ Inflammatory cytokines ↑ HDL ↓ TG	[14,23,48]
N-3 PUFA (EPA)	↑	PPAR $\gamma$	–	↓ Inflammatory cytokines	[14]
N-3 PUFA (omegaven); EPA	↓	LXR	<i>SREBP-1c</i>	↓ Hepatic steatosis ↓ TG content and lipid accumulation	[33,35]
DPA N-3; DPA N-6; DHA	↓	<i>SREBP-2</i>	<i>HMG-CoA</i> ; <i>LDLR</i> ; <i>LXR<math>\alpha</math></i> ; <i>CYP7A1</i>	↓ non-HDLc	[40]
Monounsaturated FA (oleic acid)	↑	PPAR $\gamma$	<i>Lpl</i> , <i>Fatp</i> and <i>Cd36</i> .	↓ Adipocyte size	[26**]
N-7 PUFA (palmitoleic acid)	↓	<i>SREBP</i>	<i>FAS</i> , <i>SCD-1</i>	↓ Lipid accumulation	[43]

CYP7A1, cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase; Cd36, cluster of differentiation 36; DHA, docosahexaenoic acid; DPA N-3, omega 3 docosapentaenoic acid; DPA N-6, omega 6 docosapentaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; Omegaven, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany; FA, fatty acid; Fatp, fatty acid transport protein; FAS, fatty acid synthase; HDL, high-density lipoprotein; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase; LDLR, low-density lipoprotein receptor; Lpl, lipoprotein lipase; LXR, liver X receptors; N-3 PUFA, omega-3 polyunsaturated fatty acids; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptors; SREBP, sterol-regulatory element-binding proteins; SCD-1, stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase); TG, triglycerides. not described in the studies. ↑, increased; ↓ decreased.

but protects against liver insulin resistance. This effect was correlated with beneficial accumulation of MUFA and decreased percentage of SFA in the liver. In addition, in patients with NASH, hepatic ChREBP expression was positively correlated with the degree of steatosis and inversely correlated with insulin resistance [60<sup>11</sup>].

## CONCLUSION

Fatty acids control gene expression of inflammatory and metabolic genes through modulation of activity of transcription factors (Table 1). However, each type of fatty acid (SFA, MUFA, or PUFA) acts differently in the regulation of gene expression. We have pointed out here recent advances in the regulation of expression of several inflammatory and metabolic genes by fatty acids. This is a promising strategy to be investigated on how to treat metabolic diseases such as insulin resistance, obesity, and type 2 diabetes mellitus.

## Acknowledgements

*L.M. is a recipient from fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). R.C. is recipient of fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The research of the group is supported by grants from FAPESP, CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Guggenheim Foundation.*

## Conflicts of interest

*There are no conflicts of interest.*

## REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

Additional references related to this topic can also be found in the Current World Literature section in this issue (pp. 488–489).

1. Kaminska D, Kuulasmaa T, Venesmaa S, *et al.* Adipose tissue TCF7L2 splicing is regulated by weight loss and associates with glucose and fatty acid metabolism. *Diabetes* 2012; 61:2807–2813.
  2. Nepelska M, Cultrone A, Beguet-Crespel F, *et al.* Butyrate produced by commensal bacteria potentiates phorbol esters induced AP-1 response in human intestinal epithelial cells. *PLoS One* 2012; 7:e52869.
  3. Wu L, Zhou L, Lu Y, *et al.* Activation of SIRT1 protects pancreatic beta-cells against palmitate-induced dysfunction. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822: 1815–1825.
  4. Li H, Gao Z, Zhang J, *et al.* Sodium butyrate stimulates expression of fibroblast growth factor 21 in liver by inhibition of histone deacetylase 3. *Diabetes* 2012; 61:797–806.
  5. Inamori T, Goda T, Kasezawa N, Yamakawa-Kobayashi K. The combined effects of genetic variation in the SIRT1 gene and dietary intake of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on serum LDL-C and HDL-C levels: a population based study. *Lipids Health Dis* 2013; 12:4.
  6. Adolph S, Schoeniger A, Fuhrmann H, Schumann J. Unsaturated fatty acids as modulators of macrophage respiratory burst in the immune response against *Rhodococcus equi* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Free Radic Biol Med* 2012; 52 (11–12):2246–2253.
  7. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990; 347:645–650.
  8. Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812:1007–1022.
  9. Di Minno MN, Russolillo A, Lupoli R, *et al.* Omega-3 fatty acids for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2012; 18:5839–5847.
  10. Fei J, Cook C, Santanam N. Omega-6 lipids regulate PPAR turnover via reciprocal switch between PGC-1 alpha and ubiquitination. *Atherosclerosis* 2012; 222:395–401.
  11. Hajjar T, Meng GY, Rajion MA, *et al.* Omega 3 polyunsaturated fatty acid improves spatial learning and hippocampal peroxisome proliferator activated receptors (PPARalpha and PPARgamma) gene expression in rats. *BMC Neurosci* 2012; 13:109.
  12. Di Paola R, Impellizzeri D, Torre A, *et al.* Effects of palmitoylethanolamide on intestinal injury and inflammation caused by ischemia-reperfusion in mice. *J Leukoc Biol* 2012; 91:911–920.
  13. Rosenson RS, Wright RS, Farkouh M, Plutzky J. Modulating peroxisome proliferator-activated receptors for therapeutic benefit? Biology, clinical experience, and future prospects. *Am Heart J* 2012; 164:672–680.
  14. Unoda K, Doi Y, Nakajima H, *et al.* Eicosapentaenoic acid (EPA) induces peroxisome proliferator-activated receptors and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2013; 256:7–12.
  15. Tyagi S, Gupta P, Saini AS, *et al.* The peroxisome proliferator-activated receptor: a family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res* 2011; 2:236–240.
  16. Huang JV, Greyson CR, Schwartz GG. PPAR-gamma as a therapeutic target in cardiovascular disease: evidence and uncertainty. *J Lipid Res* 2012; 53:1738–1754.
  17. Salvado L, Serrano-Marco L, Barroso E, *et al.* Targeting PPARbeta/delta for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opin Ther Targets* 2012; 16:209–223.
  18. Kidani Y, Bensinger SJ. Liver X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor as integrators of lipid homeostasis and immunity. *Immunol Rev* 2012; 249:72–83.
- This review showed recent discoveries of PPAR and LXR signaling in the modulation of normal and pathologic states of immunity.
19. Videla LA, Pettinelli P. Misregulation of PPAR functioning and its pathogenic consequences associated with nonalcoholic fatty liver disease in human obesity. *PPAR Res* 2012; 2012:107434.
  20. Sunny NE, Satapati S, Fu X, *et al.* Progressive adaptation of hepatic ketogenesis in mice fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298:E1226–E1235.
  21. Im SS, Kim MY, Kwon SK, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor (alpha) is responsible for the up-regulation of hepatic glucose-6-phosphatase gene expression in fasting and db/db Mice. *J Biol Chem* 2011; 286:1157–1164.
  22. Chamouton J, Latruffe N. PPARalpha/HNF4alpha interplay on diversified responsive elements. Relevance in the regulation of liver peroxisomal fatty acid catabolism. *Curr Drug Metab* 2012; 13:1436–1453.
  23. Devarshi PP, Jangale NM, Ghule AE, *et al.* Beneficial effects of flaxseed oil and fish oil diet are through modulation of different hepatic genes involved in lipid metabolism in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Genes Nutr* 2013; 8:329–342.
  24. Wang Y, Jacome-Sosa MM, Ruth MR, *et al.* The intestinal bioavailability of vaccenic acid and activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma in a rodent model of dyslipidemia and the metabolic syndrome. *Mol Nutr Food Res* 2012; 56:1234–1246.
  25. Cariou B, Charbonnel B, Staels B. Thiazolidinediones and PPARgamma agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23: 205–215.
  26. Yang ZH, Miyahara H, Iwasaki Y, *et al.* Dietary supplementation with long-chain monounsaturated fatty acids attenuates obesity-related metabolic dysfunction and increases expression of PPAR gamma in adipose tissue in type 2 diabetic KK-Ay mice. *Nutr Metab* 2013; 10:16.
- This study demonstrated that MUFA may ameliorate metabolic dysfunction through increased expression of PPARγ as well as its target genes. This is the connection that we purpose to describe in this review.
27. Lee J, Chung WY. The role played by the peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) activator, GW501516, in control of fatty acid metabolism: a new potential therapeutic target for treating metabolic syndrome. *Endocrinology* 2011; 152:1742–1744.
  28. von Grafenstein S, Mihaly-Bison J, Wolber G, *et al.* Identification of novel liver X receptor activators by structure-based modeling. *J Chem Inf Model* 2012; 52:1391–1400.
  29. Nagy L, Szanto A, Szatmari I, Szeles L. Nuclear hormone receptors enable macrophages and dendritic cells to sense their lipid environment and shape their immune response. *Physiol Rev* 2012; 92:739–789.
  30. Salehipour M, Javadi E, Reza JZ, *et al.* Polyunsaturated fatty acids and modulation of cholesterol homeostasis in THP-1 macrophage-derived foam cells. *Int J Mol Sci* 2010; 11:4660–4672.

31. Zhang Y, Breevoort SR, Angdisen J, *et al.* Liver LXRalpha expression is crucial for whole body cholesterol homeostasis and reverse cholesterol transport in mice. *J Clin Invest* 2012; 122:1688–1699.
32. Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, *et al.* A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in C57BL/6 mice fed a high fat diet. *J Clin Biochem Nutr* 2010; 46:212–223.
33. Marsman HA, Heger M, Kloek JJ, *et al.* Omega-3 fatty acids reduce hepatic steatosis and consequently attenuate ischemia-reperfusion injury following partial hepatectomy in rats. *Dig Liver Dis* 2011; 43:984–990.
34. Tanaka N, Zhang X, Sugiyama E, *et al.* Eicosapentaenoic acid improves hepatic steatosis independent of PPARalpha activation through inhibition of SREBP-1 maturation in mice. *Biochem Pharmacol* 2010; 80:1601–1612.
35. Jung UJ, Millman PN, Tall AR, Deckelbaum RJ. n-3 fatty acids ameliorate hepatic steatosis and dysfunction after LXR agonist ingestion in mice. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1811:491–497.
36. Xiao X, Song BL. SREBP: a novel therapeutic target. *Acta Biochim Biophys Sin* 2013; 45:2–10.
37. Brown MS, Goldstein JL. Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J Lipid Res* 2009; 50:S15–S27.
38. Wong RH, Sul HS. Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective. *Curr Opin Pharmacol* 2010; 10:684–691.
39. Moon YA, Liang G, Xie X, *et al.* The Scap/SREBP pathway is essential for developing diabetic fatty liver and carbohydrate-induced hypertriglyceridemia in animals. *Cell Metab* 2012; 15:240–246.
40. Chen J, Jiang Y, Liang Y, *et al.* DPA n-3, DPA n-6 and DHA improve lipoprotein profiles and aortic function in hamsters fed a high cholesterol diet. *Atherosclerosis* 2012; 221:397–404.
41. Pachikian BD, Essaghir A, Demoulin JB, *et al.* Hepatic n-3 polyunsaturated fatty acid depletion promotes steatosis and insulin resistance in mice: genomic analysis of cellular targets. *PLoS One* 2011; 6:e23365.
42. Pettinelli P, Del Pozo T, Araya J, *et al.* Enhancement in liver SREBP-1c/PPAR-alpha ratio and steatosis in obese patients: correlations with insulin resistance and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid depletion. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792:1080–1086.
43. Yang ZH, Miyahara H, Hatanaka A. Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-Ay Mice with genetic type 2 diabetes. *Lipids Health Dis* 2011; 10:120.
44. Micha R, Mozaffarian D. Saturated fat and cardiometabolic risk factors, coronary heart disease, stroke, and diabetes: a fresh look at the evidence. *Lipids* 2010; 45:893–905.
45. AlSaleh A, Sanders TA, O'Dell SD. Effect of interaction between PPARG, PPARA and ADIPOQ gene variants and dietary fatty acids on plasma lipid profile and adiponectin concentration in a large intervention study. *Proc Nutr Soc* 2012; 71:141–153.
46. Poudyal H, Panchal SK, Diwan V, Brown L. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: effects and emerging mechanisms of action. *Prog Lipid Res* 2011; 50:372–387.
47. Poudyal H, Panchal SK, Ward LC, *et al.* Chronic high-carbohydrate, high-fat feeding in rats induces reversible metabolic, cardiovascular, and liver changes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302:E1472–E1482.
48. Neff LM, Culiner J, Cunningham-Rundles S, *et al.* Algal docosahexaenoic acid affects plasma lipoprotein particle size distribution in overweight and obese adults. *J Nutr* 2011; 141:207–213.
49. Rudkowska I, Paradis AM, Thifault E, *et al.* Transcriptomic and metabolomic signatures of an n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in a normolipidemic/normocholesterolemic Caucasian population. *J Nutr Biochem* 2013; 24:54–61.
50. Hirabara SM, Folador A, Fiamoncini J, *et al.* Fish oil supplementation for two generations increases insulin sensitivity in rats. *J Nutr Biochem* 2012. doi:10.1016/j.jnrb.2011.03.031. [Epub ahead of print].
51. Yang ZH, Miyahara H, Takeo J, *et al.* Pollock oil supplementation modulates hyperlipidemia and ameliorates hepatic steatosis in mice fed a high-fat diet. *Lipids Health Dis* 2011; 10:189.
52. Kelley DE, Mandarino LJ. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes* 2000; 49:677–683.
53. Horakova O, Medrikova D, van Schothorst EM, *et al.* Preservation of metabolic flexibility in skeletal muscle by a combined use of n-3 PUFA and rosiglitazone in dietary obese mice. *PLoS One* 2012; 7:e43764.
54. Kitzmann M, Lantier L, Hebrard S, *et al.* Abnormal metabolism flexibility in response to high palmitate concentrations in myotubes derived from obese type 2 diabetic patients. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812:423–430.
55. Velloso LA, Araujo EP, de Souza CT. Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15:189–193.
56. Milanski M, Degasperi G, Coope A, *et al.* Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signalling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci* 2009; 29:359–370.
57. Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, *et al.* Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One* 2012; 7:e30571.
58. Vanni E, Bugianesi E, Kotronen A, *et al.* From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Dig Liver Dis* 2010; 42:320–330.
59. Valenzuela R, Espinosa A, Gonzalez-Manan D, *et al.* N-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation significantly reduces liver oxidative stress in high fat induced steatosis. *PLoS One* 2012; 7:e46400.
60. Benhamed F, Denechaud PD, Lemoine M, *et al.* The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J Clin Invest* 2012; 122:2176–2194.

This study has first described in patients and animals with NASH that hepatic steatosis may occur independently of insulin resistance.