

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Thaís da Fonte Faria

Efeito da suplementação dietética com óleo de chia (*Salvia hispânica* L.) sobre as alterações metabólicas e vasculares decorrentes da obesidade

Thaís da Fonte Faria

Efeito da suplementação dietética com óleo de chia (*Salvia hispânica* L.) sobre as alterações metabólicas e vasculares decorrentes da obesidade

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Simone Vargas da Silva

CATALOGAÇÃO NA FONTE UERJ/REDE SIRIUS/CBA

F224 Faria, Thaís da Fonte.

Efeito da suplementação dietética com óleo de chia (*Salvia hispânica* L.) sobre as alterações metabólicas e vasculares decorrentes da obesidade / Thaís da Fonte Faria – 2019. 95 f.

Orientadora: Simone Vargas da Silva.

Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Programa de Pósgraduação em Biociências.

1. Obesidade - Teses. 2. Ácidos graxos Ômega-3 - Teses. 3. Tecido adiposo - Teses. 4. Sistema cardiovascular - Doenças - Teses. I. Silva, Simone Vargas da. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616-056.25:613.2.38

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

Autorizo,	apenas	para fins	acadêmicos	е	científicos,	а	reprodução	total	ou	parcial
desta tes	e, desde	que citac	la a fonte.							

Assinatura	Data		

Thaís da Fonte Faria

Efeito da suplementação dietética com óleo de chia (Salvia hispânica L.) sobre as alterações metabólicas e vasculares decorrentes da obesidade

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 25 de novembro de 2019.

Banca Examinadora:

Prof.ª Dra. Simone Vargas da Silva (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.ª Dra. Ângela de Castro Resende
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.ª Dra. Isis Hara Trevenzoli
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.ª Dra. Tatiana El-Bacha Porto
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro 2019

DEDICATÓRIA

À minha irmã, Nathalia, que a cada dia me ensina a ser uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

Ao Papai do Céu e aos anjos que me acompanharam nessa jornada, que junto a minha família e amigos me deram forças para não desistir e acreditar em mim nos momentos mais difíceis.

A minha mãe e meu pai, que mesmo sem entender os motivos de tantos anos na Universidade me deram apoio; A minha irmã, que antes eu explicava e hoje me ensina a entender as nuances da anatomia e fisiologia, minha pequena e meu orgulho.

Ao meu amor, companheiro, que comprou todos os chocolates do mundo e ouviu com paciência os devaneios, as reclamações e as interpretações de cada resultado obtido e ao meu pacotinho por me trazer tantas alegrias.

Aos meus amigos do laboratório, que me salvaram tantas vezes em meio a correria, alguns deles anjos também que não me deixaram desistir e a todos da PPGB que ao longo destes anos sempre foram solícitos e eficientes.

Aos Professores do laboratório, a nossa chefe que me deu oportunidade de desenvolver este trabalho e em especial a minha orientadora que teve resiliência em meio a tantos fatores complicadores, não perdeu a confiança em mim e foi uma companheira na bancada e na elaboração deste trabalho.

Aos amigos que a Marinha do Brasil me deu, deram apoio nos momentos mais cansativos e aos meus comandantes que permitiram as ausências ao trabalho em prol deste trabalho.

A todos os professores que passaram pelo meu caminho, na graduação, na pós, no mestrado e no doutorado, tenho a certeza que cada um colaborou para a conclusão deste trabalho e para a formação da profissional que me tornei.

A todos que direta e indiretamente contribuíram com a elaboração desta tese.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Código de Financiamento 110/2007.



RESUMO

FARIA, Thais Fonte. **Efeito da suplementação dietética com óleo de chia** (Salvia hispânica L.) sobre as alterações metabólicas e vasculares decorrentes da obesidade. 2019. 95f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Na obesidade, o acúmulo excessivo de gordura promove a expansão e a inflamação do tecido adiposo perivascular (TAPV), os quais estão envolvidos no desenvolvimento da resistência à insulina, disfunção endotelial e aterosclerose na obesidade, contudo, ainda não estão claros quais mecanismos envolvidos na expansão do TAPV durante a obesidade contribuem na patogênese das doenças cardiovasculares (DCV). Outro fator determinante na fisiopatologia da obesidade é a qualidade nutricional da dieta. Recentemente, demonstramos que a suplementação dietética com óleo de chia (Salvia hispanica L.), a mais rica fonte de ácidos graxos poli-insaturados ω3, melhora a sensibilidade à insulina e induz o remodelamento do tecido adiposo durante a obesidade. Com base no exposto acima, nosso objetivo nesse trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação dietética com óleo de chia sobre as alterações metabólicas e vasculares decorrentes da obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Camundongos C57BL/6 com 21 dias de vida foram mantidos sob dieta normolipídica (grupo C) ou dieta hiperlipídica (45% de Kcal provenientes de gordura) (Grupo H) por 10 semanas. Após esse período, cada grupo foi subdividido em dois subgrupos (grupo CC e grupo HC) que receberam as respectivas dietas suplementadas com óleo de chia (1,5% m/m) por 6 semanas. Comparados ao grupo H, animais HC apresentaram redução da massa de gordura corporal e, consequente, aumento da massa magra, porém, sem alterações no peso corporal. A suplementação dietética com óleo de chia reduziu os níveis séricos de leptina e insulina nos animais obesos e melhorou a tolerância à glicose e insulina nesses animais, indicando melhora da resposta metabólica. A avaliação da pressão arterial pelo método não invasivo de pletismografia caudal não detectou diferenças significativas nos níveis pressóricos entre os grupos. A avaliação da reatividade do leito arterial (LAM) com TAPV demonstrou um aumento da resposta vasodilatadora à acetilcolina e uma diminuição da resposta à noradrenalina nos animais obesos submetidos a suplementação com óleo de chia. A suplementação com óleo de chia também diminuiu o diâmetro dos adipócitos no TAPV mesentérico dos animais obesos. A análise do perfil endócrino do TAPV mesentérico mostrou que a suplementação com óleo de chia reduziu a secreção de leptina, IL-1\u00a2 e a expressão protéica da iNOS e, por outro lado, aumentou a secreção de IL-10 e a expressão gênica de GPR120. Desta forma concluímos que suplementação dietética com óleo de chia promove efeitos benéficos sobre as alterações vasculares induzidas pela obesidade, apresentando propriedades anti-inflamatória, hipoglicemiante e de melhora na função vascular que contribuem para o seu potencial terapêutico.

Palavras chave: Obesidade. Ácidos graxos w-3. Tecido adiposo perivascular. Doenças cardiovasculares.

ABSTRACT

FARIA, Thais Fonte. **Effect of chia oil supplementation (***Salvia hispânica* **L.) on the metabolic and vascular alterations related to obesity**. 2019. 95f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

The abnormal fat accumulation during obesity leads to expansion and inflammation of perivascular adipose tissue (PVAT), which have been implicated in the development of insulin resistance, endothelial dysfunction and atherosclerosis. Several studies have demonstrated that nutritional quality of diet is associated with obesity and related metabolic diseases, but biological mechanisms supporting these associations remain unknown. Recently, we have shown supplementation with chia seed oil (Salvia hispanica L.), the richest source of ω-3 fatty acids, α-linolenic acid, improves insulin sensitivity in the skeletal muscle and induces remodeling of adipose tissue during obesity. Here, we evaluated the impact of dietary chia oil supplementation on the metabolic and vascular response of PVAT from obese mice. Male C57BL/6 mice were randomly divided into four groups. First, mice were fed with a normal chow diet (C group) or a high-fat diet (45% Kcal from fat, H group). After 10 weeks, the groups were subdivided in a normal chow diet supplemented with Chia oil (1.5% m/m – CC group) and a high-fat diet supplemented with Chia oil (HC group) for 6 weeks. The supplementation with chia oil reduced the body fat mass, increased the lean body mass, reduced the blood levels of glucose, leptin, and insulin and improved the insulin and glucose tolerance. Blood pressure assessment by the noninvasive method of caudal plethysmography did not detect significant differences in pressure levels between the groups. supplementation restored the vasodilator response to acetilcholine and decreased the vasoconstrictor response to noradrenaline in mesenteric vascular bed from obese animals. The supplementation with chia oil also reduced adipocytes diameter in the mesenteric PVAT of obese animals and reduced the secreted levels of leptin, IL-1B and iNOS protein expression. On the other hand, the chia oil supplementation increased the production of IL-10 and GPR120 gene expression in the mesenteric PVAT of obese animals. We concluded that dietary supplementation with chia oil promotes beneficial effects on obesity-induced vascular changes with antiinflammatory, hypoglycaemic and vasorelaxation properties those contribute to its therapeutic potential.

Keywords: Obesity. Fatty acids w-3. Perivascular adipose tissue. Cardiovascular diseases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Avaliação do peso, da composição corporal e da ingestão	
	calórica dos animais	53
Figura 2 -	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a	
	homeostase glicêmica e níveis séricos de insulina e leptina dos	
	animais	55
Figura 3 -	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre os	
	níveis pressóricos e a frequência cardíaca dos animais	56
Figura 4 -	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a	
	resposta vascular vasoconstritora e vasodilatadora	57
Figura 5 -	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a	
	morfologia do tecido adiposo perivascular mesentérico (TAPV)	58
Figura 6 -	Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a produção de	
	adipocinas no TAPV mesentérico	59
Figura 7 -	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a	
	expressão de eNOS e iNOS no TAPV mesentérico	60
Figura 8 -	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre	
	marcadores "browning", adiponectina e leptina no TAPV	
	mesentérico	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Processos fisiológicos e metabólicos regulados pelo tecido	
	adiposo através da secreção de adipocinas	18
Quadro 2 -	Interação do tecido adiposo perivascular com vasos sanguíneos	23
Quadro 3 -	Distribuição dos óbitos no Brasil	25
Quadro 4 -	Mecanismo do efeito da dieta hiperlipídica de longa duração (HFD)	
	na disfunção endotelial	28
Quadro 5 -	Metabolismo dos ácidos graxos essenciais e formação de	
	mediadores lipídicos pró inflamatórios e pró resolutivos	30
Quadro 6 -	Formas de apresentação da Salvia hispânica L. e composição de	
	seu óleo	35
Quadro 7 -	Esquema do modelo experimental de indução de obesidade e	
	posterior suplementação com óleo de chia	43
Quadro 8 -	Esquema representativo para ação da SOC na obesidade	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA Ácido araquidônico (do inglês: *Arachidonicacid*)

AG Ácido graxo

AGPI Ácido graxo poliinsaturado

ALA Ácido α-linolênico (do inglês: α-*Linolenic acid*)

ATP Trifosfato de adenosina

AGL Ácidos graxos livres

BSA Albumina de soro bovino (do inglês: bovine serum albumin)

DHA Ácido docosahexaenoico (do inglês: *Docosahexaenoic acid*)

EDTA Ácido etilenodiamino tetra acético (do inglês: Ethylenediamine tetra

acetic acid)

ELISA Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (do inglês: Enzyme Linked

imunosorbent assay)

C Grupo eutrófico alimentado com dieta controle

EPA Ácido eicosapentaenoico (do inglês: Eicosapentaenoic acid)

GAPDH Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (do inglês: Glyceraldehyde 3-

phosphate dehydrogenase)

GPR120 Receptor acoplado a proteína G 120 (do inglês: G-protein coupled

receptor 120)

H Grupo alimentado com dieta hiperlipídica

HC Grupo alimentado com dieta hiperlipídica suplementado com óleo de

chia

HFD Dieta hiperlipídica (do inglês: *High fat diet*)

HOMA-IR Indice de resistência à insulina (do inglês: homeostatic model

assessment - insulin resistance)

IL-1 Interleucina -1

IL-6 Interleucina-6

PBS Tampão salina fosfato (do inglês: *Phosphate buffered saline*)

PGC1 Coativador de PPAR gama 1 (do inglês: *PPAR gamma coactivator 1*)

PPAR Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (do inglês:

peroxisome proliferator activated receptor)

PVDF Polivinilidenodifluorido

RNAm RNA mensageiro

SDS Dodecil sulfato de sódio (do inglês: *sodium dodecyl sulfate*)

SM Síndrome metabólica

SOC Suplementação com óleo de chia

TAB Tecido adiposo branco
TAM Tecido adiposo marrom

TGF β Fator de transformação do crescimento beta (em inglês: transforming

growth factor beta)

TNF Fator de necrose tumoral (do inglês: tumor necroisis factor)

UCP-1 Proteina desacopladora -1 (termogenina; do inglês: *uncoupledprotein1*)

VDAC2 Canal seletivo aniónico dependente de tensão (do inlgês: Voltage-

dependentanion-selectivechannel)

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL	39
1.1	Objetivo	39
1.2	Objetivos específicos	40
2	METODOLOGIA	41
2.1	Modelo experimental de Obesidade induzida por dieta	
	hiperlipídica	41
2.2	Análise da composição corporal	43
2.3	Mensuração da pressão arterial e da frequência cardíaca	44
2.4	Teste de Tolerância à Glicose	44
2.5	Teste de Tolerância à Insulina	45
2.6	Coleta de Sangue	45
2.7	Ensaio de reatividade vascular	45
2.7.1	Isolamento do leito arterial mesentérico (LAM) de camundongos	45
2.7.2	Medida da reatividade do LAM a substâncias vasoativas	46
2.8	Obtenção do sobrenadante do tecido perivascular mesentérico	
	(TAPV)	47
2.9	Ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA)	47
2.10	Extração de RNA do TAPV e análise da expressão gênica por RT-	
	PCR em tempo real	48
2.11	Análise da expressão proteica por Western Blotting	49
2.12	Análise histológica tecido adiposo	50
2.13	Análise Estatistica	51
3	RESULTADOS	52
3.1	Avaliação do peso, da composição corporal e da ingestão	
	calórica dos animais	52
3.2	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a	
	homeostase glicêmica e níveis séricos de insulina e leptina dos	
	animais	53

3.3	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre os	
	níveis pressóricos e a frequência cardíaca dos animais	56
3.4	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a	
	resposta vascular vasoconstritora e vasodilatadora	57
3.5	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a	
	morfologia do tecido adiposo perivascular mesentérico (TAPV)	58
3.6	Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a produção de	
	adipocinas no TAPV mesentérico	59
3.7	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a	
	expressão de eNOS e iNOS no TAPV mesentérico	60
3.8	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre	
	marcadores "browning", adiponectina e leptina no TAPV	
	mesentérico	60
4	DISCUSSÃO	62
	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO – Aceite do periódico	95

INTRODUÇÃO

Obesidade

A obesidade é uma doença amplamente estudada. Em 2019, segundo a base de dados PUBMED, mais de 21 mil artigos foram publicados com o termo "obesity". O primeiro artigo sobre o tema foi publicado em 1880 e trata de um estudo *post mortem* de um caso de obesidade extrema. Neste artigo, o autor descreve um indivíduo com aproximadamente 190 quilos, letárgico nos últimos anos de vida, que possuía uma espessa camada de tecido adiposo subcutâneo na região abdominal, uma musculatura fina, além de órgãos cobertos por gordura, caracterizando as alterações decorrentes da obesidade (OLIVER, 1880). A definição de obesidade do século XIX se correlaciona com a atual, que é definida como acúmulo de gordura anormal ou excessiva, apresentando risco para a saúde, sendo o principal fator de risco para o desenvolvimento e agravamento de uma série de doenças crônicas, incluindo diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Sendo uma das principais doenças do século 21, a obesidade é considerada uma doença crônica que acomete os indivíduos independentemente de antecedentes culturais, financeiros ou étnicos, afetando a qualidade de vida e impactando a economia (ZANG et al., 2012).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, a obesidade cresceu 60% nos últimos 10 anos, passando de 11,8% em 2006 para 18,9% em 2016. Segundo o portal Brasil, a obesidade é mais prevalente com o avanço da idade, porém mesmo entre os indivíduos de 25 a 44 anos, o índice é alto, em torno de 17%. O aumento da incidência de obesidade parece estar correlacionado com o aumento da prevalência de diabetes e hipertensão (BRASIL, 2016).

A correlação entre obesidade e outras doenças foi descrita, pela primeira vez, em 1965 por Vague et al. Neste artigo, os autores sugerem que a obesidade poderia predispor a diabetes e as doenças cardiovasculares. Aproximadamente 30 anos depois, Reaven propôs o termo "Syndrome X" para classificar indivíduos com resistência à insulina, hipertrigliceridemia, diminuição de HDL-colesterol,

hipertensão, risco de doenças cardiovasculares e obesos (REAVEN et al., 1988). No entanto, somente em 1999 a WHO introduziu o nome de "Síndrome Metabólica" (SM), que pela definição atual, corresponde a um conjunto de doenças cuja base é a resistência à insulina que, em quase sua totalidade, é acompanhada pela obesidade. Seu diagnóstico é dado pela ocorrência de pelo menos três das seguintes condições clínicas: obesidade abdominal, pressão arterial elevada, glicose elevada, triglicerídeos elevados e baixos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL-C) (WHO, 1999).

Epidemiologicamente, hoje, nos EUA, estima-se que 34% da população adulta tenha SM. Concomitantemente, observa-se um aumento expressivo da taxa de SM na população dos países em desenvolvimento (LIM; ECKEL, 2014). Além da SM, a obesidade está associada ao desenvolvimento de outros distúrbios de saúde como câncer, asma, distúrbios do sono, disfunção hepática, disfunção renal e infertilidade (JUNG et al., 1997; PI-SUNYER, 1991). No entanto, o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares são as principais morbidades associadas à obesidade.

Sabe-se que o desenvolvimento das comorbidades na obesidade está diretamente associado ao acúmulo excessivo da gordura corporal total, porém estudos vêm demonstrando que o acúmulo de gordura em compartimentos corporais isoladamente também é de extrema relevância, pois contribui para as alterações metabólicas e funcionais em tecidos e órgãos específicos como a medula óssea, o fígado, músculos e tecido adiposo, que participam do desenvolvimento das enfermidades associadas (POLIN et al., 2008; SILVA et al., 2017; MILIC; LULIC; STIMAC, 2014).

Composição Corporal e Tecido Adiposo

Tanto o excesso de adiposidade quanto a sua distribuição corporal são importantes, pois o acúmulo periférico dessa gordura em adipócitos no compartimento subcutâneo, por exemplo, tem efeitos menos deletérios comparados ao seu acúmulo central no em adipócitos nos compartimentos viscerais, por este ter efeitos diretos na vascularidade e no funcionamento de órgãos, através da lipólise,

da infiltração de células do sistema imune e da secreção de fatores como as adipocinas (IBRAHIM, 2010; LEE et al., 2012).

Concomitante ao aumento da massa de gordura corporal, na obesidade ocorre à perda da massa muscular, uma condição descrita como "obesidade sarcopênica" (LEE et al., 2016; BATSIS et al.,2015), que contribui ainda mais para o aumento do risco de distúrbios metabólicos e com o aumento das doenças cardiovasculares (ZAMBONI et al., 2008). Desta forma, a diminuição da massa magra, mesmo em níveis menores que a sarcopenia, aumenta a probabilidade do desenvolvimento de hipertensão, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e dislipidemias (CHOI, 2016).

Outro aspecto importante relacionado a massa magra, mais especificamente ao musculo esquelético é um novo hormônio que em 2012, Boström et al. descreveram uma nova miocina secretada pelo músculo esquelético de forma exercício dependente, com potencial para aumentar a termogênese adaptativa. Essa miocina denominada irisina age no processo de *browning*, caracterizado pelo aumento do número de mitocôndrias do tecido adiposo subcutâneo, levando a um efeito dissipativo de energia, o qual contribui para um potencial efeito terapêutico antiobesidade ou antidiabético.

Já foi demonstrado em um estudo com 715 homens asiáticos que um baixo nível de irisina circulante é preditivo para fraqueza e atrofia muscular, propondo a irisina como um potencial biomarcador para disfunção muscular que pode prevenir o início da sarcopenia e fornecer novos caminhos para o monitoramento de alterações musculares relacionadas à idade (CHANG, 2017).

Os estudos correlacionando dieta com níveis de irisina não são conclusivos e ainda não foi descrito um mecanismo direto para ação de nutrientes nos níveis de irisina (KO et al., 2016; ANASTASILAKIS et al., 2012; SCHLÖGL et al., 2015; OSELLA et al., 2018).

Como descrito, na obesidade ocorre o aumento do tecido adiposo branco, um tecido conjuntivo derivado do mesoderma embrionário que consiste em um estroma "de apoio" formado por uma população heterogênea de células como adipócitos (50 - 70%), pré-adipócitos, células musculares lisas, células endoteliais, mastócitos, fibroblastos, dentre outras (NAE et al., 2013).

Uma das principais características do tecido adiposo é a sua capacidade de se adaptar e expandir em condições de excesso de energia, através dos processos

de hipertrofia e/ou o recrutamento e proliferação de células precursoras (hiperplasia) que darão origem a novos adipócitos (PELLEGRINELLI; CAROBBIO; VIDAL-PUIG, 2016). Na obesidade, a hipertrofia de adipócitos, a obesidade central e o acúmulo ectópico de gordura estão associados à pré-disposição a DM2 e SM e, o recrutamento de novos adipócitos pode prevenir essas alterações (GUSTAFSON et al., 2015).

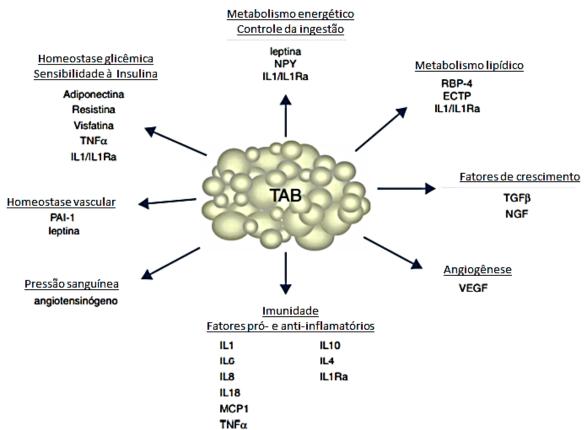
O tecido adiposo branco (TAB) tem um papel chave nas funções endócrinas e metabólicas, pois participa da regulação da homeostase energética e da sensibilidade à insulina, participando ativamente do desenvolvimento das complicações metabólicas associadas a obesidade, assim como do quadro de inflamação sistêmica de baixo grau e o aumento do risco de doenças cardiovasculares (ROSEN; SPIELGEMAN, 2014). O TAB é composto por, aproximadamente, 50% de adipócitos e 50% de células diferentes tipos celulares como células tronco, pré adipócitos, células neurais, células endoteliais e leucócitos (GUSTAFSON; SMITH, 2015). Uma das principais características do tecido adiposo é a sua capacidade de se adaptar e expandir em condições de excesso de energia, através dos processos de hipertrofia e/ou o recrutamento e proliferação de células precursoras que darão origem a novos adipócitos (hiperplasia) (PELLEGRINELLI et al., 2016). Na obesidade, a hipertrofia de adipocitos, a obesidade central e o acúmulo ectópico de gordura estão associados a pré disposição a DM e SM . O recrutamento de novos adipócitos pode prevenir essas alterações (GUSTAFSON et al., 2015).

Dados recentes mostram que fatores relacionados à qualidade nutricional, como a suplementação de vitamina A ou ácidos graxos ômega 3, podem reprogramar o tecido adiposo, induzindo seu remodelamento, favorecendo a hiperplasia de adipócitos e contribuindo para a melhora dos parâmetros metabólicos (GRANADOS et al., 2013; HENSLER et al., 2011).

Em pessoas eutróficas, o tecido adiposo contém principalmente préadipócitos, adipócitos e uma pequena população de leucócitos residentes sem características pró- inflamatórias. Com o avanço do ganho de gordura corporal e o estabelecimento da obesidade, a composição do tecido adiposo muda dramaticamente. Em indivíduos com obesidade severa, além dos adipócitos, ocorre uma infiltração maciça de células do sistema imune, como: monócitos / macrófagos, mastócitos, linfócitos B e T, e neutrófilos que contribuem para a inflamação deste tecido. Em contraste, a quantidade de certos tipos de células no tecido adiposo, como: eosinófilos, linfócitos e células T reguladoras diminuem na obesidade (SCHIPPER et al., 2012).

Além da presença de células do sistema imune, evidências mostram que o tecido adiposo secreta mais de 50 hormônios e moléculas sinalizadoras, coletivamente chamadas adipocinas, que exercem papéis biológicos de forma autócrina, parácrina, ou endócrina, podendo influenciar vários processos fisiológicos (WAKI; TONTONOZ, 2007), como demonstrado do Quadro 1.

Quadro 1 – Processos fisiológicos e metabólicos regulados pelo tecido adiposo através da secreção de adipocinas



Legenda: CETP: proteína transferidora de ésteres de colesterol; IL1: interleucina-1; IL1Ra: antagonista do receptor da interleucina-1; IL4: interleucina-4; IL6: interleucina-6; IL8: interleucina-8; IL10: interleucina-10; IL18: interleucina-18; MCP-1: proteína quimioatraente de monocitos-1; NGF: fator de crescimento nervoso; NPY: neuropeptídio Y; RBP-4: proteína ligadora de retinol-4; TGF: fator de transformação do cresciment; TNFα: fator de necrose tumoral alfa; VEGF: fator de crescimentodo endotélio vascular.

Nota: Processos fisiológicos e metabólicos regulados pelo tecido adiposo através da secreção de adipocinas.

Fonte: Adaptado de Montserrat Esteve Ràfols, 2013.

Como demostrado, o tecido adiposo secreta um número considerável de substância, denominadas adipocinas (TRAYHUR; WOOD, 2004). As adipocinas são muito diversas em termos de estrutura química e função fisiológica (VÁZQUEZ-VELA; TORRES; TOVAR, 2008), e muitas delas estão relacionadas ao sistema imunológico, incluindo citocinas clássicas como Fator de necrose tumoral alfa (TNFα), as Interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-4, IL-13) e Fator quimioatraente de macrófagos 1 (MCP-1), podendo estabelecer um vínculo entre inflamação e obesidade, situação em que a secreção de adipocinas é inflamatória (JUGE-AUBRY; HENRICHOT; MEIR, 2005). As adipocinas também incluem proteínas envolvidas na regulação da ingestão e equilíbrio de energia (leptina), na regulação da pressão arterial (angiotensinogênio), na hemostasia vascular, inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), no metabolismo lipídico, proteína transportadora de retinol (RBP-4) e a proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP), na homeostase glicêmica (Adiponectina, Resistina, Visfatina), na angiogênese, o fator de crescimento endotelial (VEGF), bem como fatores de crescimento, com o fator de transformação do crescimeto (TGF) e proteínas de fase aguda e resposta ao estresse (hepatoglobulina) (RAFOLS, 2013).

Devido a sua relevância, algumas citocinas secretas pelo tecido adiposo requerem atenção especial, como o TNF, inicialmente descrita como um fator induzido por endotoxinas que causa necrose de tumores (RUAN; LODISH, 2003); atualmente sabemos que também é expresso por adipócitos e células do estroma vascular (FAIN et al., 2004); e seus níveis estão diretamente envolvidos com a massa gorda total e sua distribuição (WAJCHENBERG, 2000). Dentre suas ações, o TNF pode influenciar a expressão gênica em tecidos metabolicamente importantes, como tecido adiposo e fígado, levando a supressão de genes envolvidos na captação e armazenamento de ácidos graxos e glicose, fatores envolvidos da adipogênese e lipogênese e de outros fatores secretados pelos adipócitos, incluindo adiponectina e IL-6 (RUAN et al., 2002)

A Interleucina 6 (IL6), uma é citocina associada à obesidade e resistência à insulina (FERNANDEZ-REAL; RICART, 2003), também expressa por adipócitos e pela matriz do tecido adiposo (RUAN; LODISH, 2003) com expressão cerca de três vezes maior no tecido adiposo visceral comparada ao subcutâneo (RUAN; LODISH, 2003; WAJCHENBERG, 2000).

O aumento da expressão da IL-6 no tecido adiposo e plasmáticas estão correlacionadas diretamente com a obesidade, tolerância à glicose e resistência à insulina (FERNANDEZ-REAL; RICART, 2003).

Outra citocina importante, a diponectina, é expressa especificamente em adipócitos diferenciados e circula em altos níveis na corrente sanguínea (CHANDRAN et al., 2003), possui maiores concentrações no tecido adiposo subcutâneo comparado ao visceral, (RUAN; LODISH, 2003) e seus receptores são expressos no músculo e fígado. Associação inversa forte e consistente entre adiponectina e resistência à insulina e estados inflamatórios já foi estabelecida, considerando-a com um papel antidiabético, anti-inflamatório e antiaterogênico (CHANDRAN et al., 2003; DIEZ; IGLESISAS, 2003).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que desempenha um papel importante na regulação do sistema imunológico, levando à diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias. Em indivíduos com DM2, bem como com aumento da massa corporal foram encontrados baixos níveis de IL10 (BLÜHER et al., 2005). Uma recente revisão considerou a IL-10 como citocina mais importante na supressão de respostas pró-inflamatórias em todos os tipos de doenças auto-imunes e na limitação de respostas imunes excessivas (WEI et al., 2019). Outra importante citocina, a IL-β, identificada em 1990 por Eastgate, Symons e Duff, apesar de pouco estuda em comparação as demais citocinas, tem seu papel já estabelecido com uma das principais citocinas secretadas pelo tecido adiposo perivascular obeso, agindo na disfunção vascular (ZHU et al., 2018; MARTINEZ-MICAELO et al., 2016).

Dentre as alterações observadas na obesidade, o aumento nos níveis circulantes de leptina é uma importante alteração hormonal. A leptina é uma proteína não glicosilada, de 16 KDa, codificada pelo gene ob, que inicialmente foi descrita como um hormônio produzido pelo tecido adiposo, com ações antilipogênicas, atuando no hipotálamo para a redução da ingestão alimentar e aumento do gasto calórico. Posteriormente, descobriu-se que as ações da leptina não eram restritas a regulação do peso corporal e do balanço energético, ela também tem efeitos em órgãos e tecidos periféricos, onde atua na homeostase da glicose e lipídeos, na regulação da reprodução, na modulação da resposta imune e inflamatória, dentre outros efeitos (ZHANG et al., 1994; LA CAVA et al., 2004).

Os adipócitos do tecido adiposo branco são, quantitativamente, a principal fonte de leptina no organismo. Em indivíduos eutróficos, os níveis séricos desta adipocina variam de 5 a 15 ng/mL (SINHAET et al., 1996). Uma vez que na obesidade ocorre o aumento na massa de tecido adiposo, os níveis de leptina

circulantes aumentam significativamente, podendo chegar a 50 ng/mL. Contudo, este aumento não se reflete na redução do peso corporal ou em balanço energético negativo, uma vez que indivíduos com obesidade apresentam resistência central à leptina (PAZ FILHO; MASTRONARDI; LICINIO, 2015; GHANTOUS et al., 2015).

A regulação do gene ob também ocorre pela insulina, que se encontra aumentada na obesidade, independentemente da sua ação na redução da glicemia (DEVOS et al., 1995). Mais recentemente, Kim et al. (2015) propuseram que a regulação da síntese de leptina pela insulina poderia estar relacionada à morfologia dos adipócitos, uma vez que a insulina promove a hipertrofia destas células, induzindo a lipogênese, ressaltando que a secreção de leptina está diretamente associada ao volume dos adipócitos.

No quadro de obesidade, adipócitos hipertróficos, pré-adipócitos e células do sistema imune são os responsáveis pela indução do quadro de inflamação crônica e resistência à insulina. A liberação de ácidos graxos livres, o estresse celular e a secreção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (como MCP-1, TNF-α e IL-6) por adipócitos e macrófagos promovem a infiltração de leucócitos no tecido adiposo (ASTERHOLMET et al., 2014). Os monócitos que migram para o tecido assumem o fenótipo de macrófagos do tipo M1 (pró-inflamatórios), capazes de secretar mais mediadores pró-inflamatórios, que induzem a ativação da IKKβ (proteína quinase da IkB) e da Jun-quinase (JNK), que irão fosforilar o IRS (substrato do receptor de insulina) em resíduos de serina, levando a inibição da sinalização da insulina e promovendo a resistência a esse hormônio (HOTAMISLIGIL et al., 1996; KANDA et al., 2006; LUMENG et al., 2007). Como citado anteriormente, o recrutamento de novos adipócitos parece prevenir o surgimento dessas alterações, retardando o aparecimento das complicações relacionadas à obesidade (GUSTAFSON et al., 2015).

Outro aspecto importante do eixo de regulação adipo-insular é que a leptina também pode modular a resposta à insulina, embora os mecanismos envolvidos neste efeito ainda sejam controversos. Foi relatado que a hiperleptinemia está correlacionada à resistência associada ao diabetes tipo 2 e diabetes gestacional (KHAN; FLIER, 2000; KAUTZY-WILLER et al., 2001).

Além disso, a leptina, em concentrações suprafisiológicas, está relacionada a efeitos potencialmente prejudiciais para a saúde cardiovascular, como estimulação do estresse oxidativo, indução de reação inflamatória, estimulação da proliferação de células musculares lisas, hipertrofia miocárdica e agregação plaquetária. A hiperleptinemia contribui para patologias cardiovasculares em pacientes com

síndrome metabólica; evidenciando uma associação independente da obesidade entre hiperleptinemia e hipertensão, aterosclerose e insuficiência cardíaca que já foram observadas em muitos estudos clínicos, transversais e prospectivos (PAYNE; TUNE; KNUDSON, 2014; BETOWSKI; JAMROZ-WISNIEWSKA, 2014; TROVATTI, 2014; KARMAZYN; RAJAPUROHITAM, 2014; DONG; REN, 2015).

Visto que o tecido adiposo se apresenta como um órgão endócrino e metabolicamente ativo, ressaltamos a importância da sua localização na influência dos processos fisiopatológicos na obesidade. Dentre os locais de depósito, o tecido adiposo perivascular (TAPV), localizado ao redor dos vasos sanguíneos, influência diretamente a função vascular e participa do estabelecimento das doenças cardiovasculares associadas à obesidade (GAO et al., 2007).

Tecido Adiposo Perivascular (TAPV)

Um dos primeiros artigos a observar a existência de uma camada de adipócitos envolvendo os vasos, data de 1979. Neste estudo, lyama et al. descrevem que, já nos primeiros dias de vida de ratos, era possível observar muitas células adiposas se desenvolvendo na área imediatamente adjacente aos capilares em crescimento (IYAMA; OHZONO; USUKU,1979).

O número de pesquisas sobre esse tema vem crescendo e, atualmente, sabemos que o TAPV está localizado ao redor dos vasos sanguíneos e encontra-se ao exterior da camada adventícia vascular. Interessantemente, ele não apresenta nenhuma estrutura laminar ou barreira que o separe da camada adventícia vascular, podendo assim influenciar diretamente a função vascular (GAO et al., 2007), como demonstrado no Quadro 2.

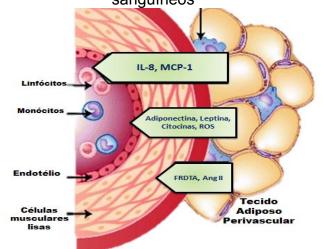
O TAPV é responsável pela liberação de uma grande variedade de substâncias tais como: adipocinas (pro-inflamatórias: leptina, resistina e visfatina; anti-inflamatórias: adiponectina e adrenomedulina), citocinas e quimiocinas (IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α, MCP1, inibidor do ativador de plasminogênio-PAI1) (RAJSHEKER et al., 2010), substâncias do sistema renina-angiotensina (angiotensina II e angiotensina 1-7) (GALVEZPRIETO et al., 2008) e moléculas gasosas óxido nítrico - NO, peróxido de hidrogênio-H₂O₂, ânion superóxido-O⁻2, e sulfeto de hidrogênio-H₂S) (GAO et al., 2007). Adicionalmente, o TAPV pode expressar importantes complexos tais como: receptores de adipocinas, proteína desacopladora 1 (UCP-1), receptor

ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR-γ), receptor β3 adrenérgico, receptor de citocinas, receptor de angiotensina II, enzima NADPH oxidase, óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (DASHWOOD et al., 2007) além de todas as isoformas da superóxido desmutase (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD e Ex-SOD), lipoxigenases e metaloproteases (SZASZ; WEBB, 2012).

Em termos de classificação, o TAPV encontrado na aorta é considerado tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM), porém se assemelha muito mais com o TAM, por possuir células adiposas multiloculares, com um número abundante de mitocôndrias e expressão significativa de UCP-1 (FITZGIBBONS et al., 2011; ARAUJO et al., 2015). Já o TAPV mesentérico, é considerado TAB e pelas suas características, pode influenciar a regulação do tônus da artéria mesentérica e da pressão arterial sistêmica (GALVEZ et al., 2017; LOHN et al., 2002).

Durante muitos anos, o TAPV foi removido das artérias durante estudos in vitro, a fim de simplificar as experiências em vasos sanguíneos isolados. No entanto, devido ao aumento de evidências do papel endócrino do tecido adiposo e da ligação íntima com os vasos sanguíneos, o interesse científico sobre o TAPV vem aumentando exponencialmente (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010).

Quadro 2 – Interação do tecido adiposo perivascular com vasos sanguíneos



Legenda: FRDTA – Fator de relaxamento derivado do tecido adiposo; Ang II – Angiotensina II; ROS – espécies reativas de oxigênio; MCP-1 – Proteina quimioatrante de monócito; IL-8-Interleucina -8;

Nota: Interação do tecido adiposo perivascular com a vasculatura, endotélio, células musculares, células imunes e mediadores envolvidos. O contato direto do TAPV e nos vasos

sanguíneos

Fonte: Adaptado de Rick I. Meijer, et al., 2011

Em 1991, Soltis e Cassis foram os primeiros a testar a hipótese que o TAPV seria importante para à regulação vascular. Eles demonstraram a presença de uma resposta diminuída a noradrenalina em artérias com o TAPV em comparação com vasos onde o mesmo foi removido. Os autores atribuíram este efeito à grande rede de inervação no TAPV. Dez anos depois, o interesse pelo estudo do TAPV foi renovado por Lohn et al. (2001). Eles demonstraram que a resposta vasocontrátil com angiotensina II (Ang II), serotonina, e fenilefrina foi maior, depois da remoção do TAPV. Além disso, esse efeito foi independente da formação de óxido nítrico (NO). Portanto, os autores concluíram que um "Fator de relaxamento derivado do adventício" (FRDA) foi liberado pelo TAPV.

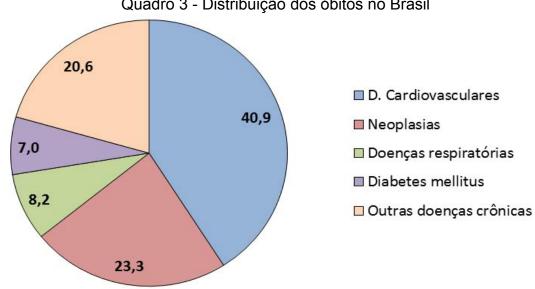
Alguns anos depois, Gao et al. (2005) demostraram que o fator de relaxamento é liberado pelo tecido adiposo e não pela túnica adventícia. Desta forma, o FRDA passou a ser chamado de "Fator de relaxamento derivado do tecido adiposo" (FRDTA). A Liberação do FRDTA mostrou depender do cálcio extracelular podendo ser modulado por mudanças na concentração de cálcio no plasma in vivo, podendo ser regulado por PKA (proteína quinase A), pelo canal de potássio dependente de voltagem do músculo liso ou através de prostaglandinas (DUBROVISKA, 2003). Estudos subsequentes confirmaram o papel de vasorelaxaneto do TAPV em artérias internas torácicas e mamárias humanas (GAO, 2005; ARCHERET et al., 2003).

Os mecanismos de ação do FRDTA ainda estão sendo estudados, no entanto, Gao et al. (2007) descreveram duas possíveis diferentes vias para explicar a ação do TAPV no relaxamento no mesentério de ratos: uma via dependente do endotélio, através da ativação dos canais de K+ e outra via independente do endotélio, atuando através da liberação de óxido nítrico (VERLORHEN, 2004). Vários estudos tanto in vitro como in vivo confirmaram o efeito anticontrátil do TAPV, mas, apesar de vários candidatos, a identidade do FRDTA ainda é desconhecida.

Na obesidade, a perda do efeito anti-contrátil do TAPV já foi bem descrita em diversos modelos e condições (GAO et al., 2005) e esta situação é agravada pela síndrome metabólica (FESUS et al., 2007). Como consequência, esse desequilíbrio que leva a uma predominância de fatores vasoconstritores, juntamente com fatores inflamatórios presentes na obesidade, podem explicar a ligação entre obesidade e função cardiovascular, levando a doenças cardiovasculares (FERNÁNDEZ-ALFONSO et al., 2013).

Doenças cardiovasculares

Doenças cardiovasculares (DCV) são representadas por um grupo de doenças que afetam o coração e os vasos sanguíneos e, na maioria das vezes, têm como ponto em comum a aterosclerose (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2016). As DCV são responsáveis pela morte de 17,5 milhões de pessoas por ano, representando 31% de todas as mortes no mundo. Aproximadamente, 75% dessas mortes ocorrem em países de média e baixa renda, incluindo o Brasil, que tem 40,9% das mortes causadas por este grupo de doenças (QUADRO 3). Essas doenças são classificadas pela WHO como doenças não comunicáveis, ou seja, doenças crônicas, as quais se desenvolvem de forma lenta e apresentam longa duração.



Quadro 3 - Distribuição dos óbitos no Brasil

Nota:

Distribuição dos óbitos corrigidos por grupo de causas dentro do total de óbitos

por doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil, em 2013.

Fonte: SIM/SVS/MS 2015

O número expressivo de acometimentos das DCV se deve ao aumento da expectativa de vida, à mudança de hábitos alimentares e comportamentais da população. Esses fatores são explicados pela mudança socio-econômica mundial, que provocou a chamada "transição epidemiológica", caracterizada pela diminuição da incidência de doenças infecto parasitárias e o aumento de manifestações crônicodegenerativas como câncer, demência e DCV (AVEZUM et al., 2012; MENDOZA; MIRANDA, 2017).

Os principais fatores responsáveis pelo desenvolvimento das DCV são hábitos como tabagismo, sedentarismo e má alimentação (consumo de alimentos hipercalóricos, ricos em sal e pobres em fibras). Estes hábitos podem levar ao desenvolvimento de diabetes mellitus, hipercolesterolemia e hipertensão, que desencadeiam as doenças cerebrovasculares, cardíaca coronária e periférica arterial (CHOI et al., 2016; MCDERMOTT et al., 2016).

Dentre as complicações cardiovasculares, a hipertensão já teve sua relação estabelecida com a obesidade desde 1967 (KANNEL et al., 1967), estudos destacaram que aproximadamente 78% dos homens e 62% das mulheres com obesidade são hipertensos (BRAMLAGE, 2004; GARRISON, 1987). A progressão de um fenótipo normotenso para hipertensivo resulta de uma combinação de fatores genéticos, ambientais, comportamentais e alimentares. A combinação de obesidade e hipertensão leva a consequências importantes; em primeiro lugar, essa combinação é particularmente grave, pois a população com obesidade e hipertensão apresenta alta morbidade e mortalidade por DCV, incluindo doença coronariana, insuficiência cardíaca congestiva, morte súbita cardíaca, doença renal crônica (DRC), doença renal em estágio terminal e acidente vascular cerebral (LANDSBERG et al., 2013). Em segundo lugar, a obesidade aumenta o risco de hipertensão arterial resistente ao tratamento, que requer múltiplos medicamentos (JORDAN et al., 2012). Além disso, em estudos populacionais, o ganho de peso futuro é significativamente maior em pacientes com hipertensão comparado a indivíduos normotensos, indicando que a hipertensão, per se, contribui para o aumento do risco de obesidade (KANNEL et al., 1967).

Disfunção endotelial

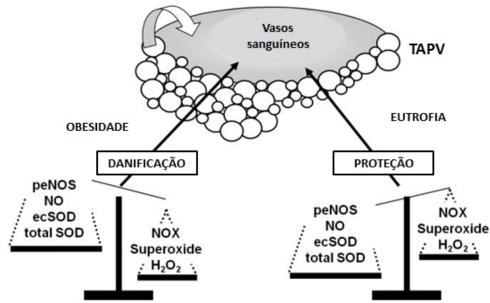
Como já descrito, a obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento de complicações cardiovasculares, dentre elas, a reatividade vascular parece ser diretamente impactada pelo ganho de peso e mudanças no TAPV.

Uma forma de definirmos a disfunção endotelial é como uma alteração funcional reversível da célula endotelial, que leva a prejuízos na disponibilidade de óxido nítrico e a produção de diversos mediadores com atividade biológica (ANDERSSOHN et al., 2010). A obesidade é um fator de risco independente para o desenvolvimento de disfunção endotelial. Em obesos graves, o estresse oxidativo e a produção de marcadores inflamatórios estão relacionados à obesidade abdominal e síntese prejudicada de óxido nítrico (NO) (CODOÑER-FRANCH et al., 2011) como descrito no Quadro 4.

O equilíbrio entre a síntese de NO e de espécies reativas de oxigênio (ROS) é um fator determinante para o relaxamento vascular e o excesso de gordura corporal tem sido fortemente associado ao aumento da síntese de ROS e espécies reativas de nitrogênio (ERN), levando ao prejuízo a essa função. Em indivíduos extremamente obesos, a superexpressão da iNOS pode ser um dos possíveis mecanismos para a formação de NO+O- (peroxinitrito) (LIN et al., 2007), da mesma forma que em situações de sepse, por exemplo, o aumento da expressão de iNOS leva ao excesso de NO, contribuindo para a formação de peroxinitrito (WILLIAMS et al., 2002). Além da produção de ROS, a partir do NOX2 (NADPH oxidase), levando à oxidação de BH4 (tetraidrobiopterina- cofator na síntese de NO) e ao desacoplamento de eNOS (formação de peroxinitrito pela eNOS pela ausência de BH4) (BITAR et al., 2005).

Visto que alterações na reatividade vascular, como a vasodilatação endotelial, é reduzida em 40% em indivíduos obesos (STEINBERGET et al., 1996), diversos grupos de pesquisa buscam compreender melhor a fisiopatologia da obesidade e sua relação com a disfunção endotelial e doenças cardiovasculares, buscam estratégias para a prevenção e/ou tratamento dessa enfermidade e suas comorbidades. Uma das linhas de estudo que tem crescido e se tornado promissora nesse sentido é a utilização de ácidos graxos nesse contexto.

Quadro 4 – Mecanismo do efeito da dieta hiperlipídica de longa duração (HFD) na disfunção endotelial



Legenda: TAPV – Tecido adiposo perivascular; NO - óxido nítrico; SOD – superóxido desmutase; peNOS- eNOS óxido nitrico sintetase endotelial fosforilada;

Nota: Diagrama representativo com um possível mecanismo que explica o efeito da dieta hiperlipídica de longa duração (HFD) na disfunção endotelial. A desregulação de adipocinas no TAPV (aumento da liberação de leptina juntamente com níveis reduzidos de adiponectina) leva a um aumento na atividade de NOX, mas uma redução na atividade total da SOD e na expressão da e-SOD. Portanto, a obesidade induz um aumento dos níveis de superóxido no TAPV. Adipocinas circulantes e derivadas de TAPV também podem levar a um aumento da atividade de NOX e, consequentemente, aumentar os níveis de superóxido e H2O2 na parede vascular. As adipocinas derivadas de TAPV também podem contribuir para a redução da fosforilação da eNOS e, consequentemente, para a redução da disponibilidade de NO, responsável pela disfunção endotelial agravada pelo superóxido derivado do TAPV.

Fonte: Adaptado de GIL-ORTEGA et al., 2014.

Ácidos graxos

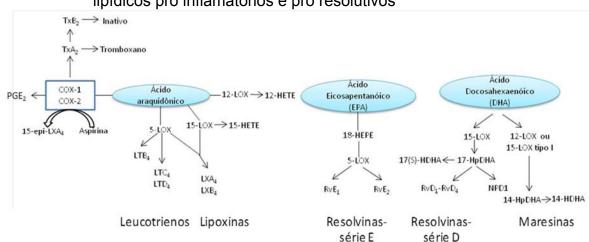
Lipídios (gorduras e óleos) são essenciais para mamíferos, incluindo humanos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2010). A natureza essencial dos lipídeos foi identificada no início dos anos 1930 (BORR; BORR, 1930) e na década de 1960, foi estabelecido que os seres humanos não podem biossintetizar dois ácidos graxos poli-insaturados que foram considerados essenciais, o ácido linoleico (LA, 18:2 ω-6) e ácido α-linolênico (ALA, 18:3 ω-3)(HANSEN et al.,1963), ou seja, o organismo humano precisa deles, mas não é capaz de produzi-los. De forma mais abrangente, os ácidos graxos podem ser

divididos em ácidos graxos saturados e insaturados, este último, pode apresentar uma ou mais duplas ligações na cadeia de carbonos. Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPIs) são moléculas com mais de 16 carbonos e mais de uma dupla ligação. A localização da dupla ligação define o tipo de ácido graxo: Será denominado ômega-3, quando a dupla ligação localizar-se no terceiro carbono, iniciando-se a contagem pelo lado ômega, ou seja, a partir da extremidade oposta à carboxila (WOLFE,1982).

AGPIs, como o ácido linoleico (LA) e ácido α-linolênico (ALA) são importantes para a fisiologia adequada em mamíferos (TVRDIK et al., 2000), sendo um grupo de nutrientes críticos que modulam o desenvolvimento do cérebro e da cognição, assim como seu excesso ou falta estão ligados a muitas doenças, como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares. Eles possuem essa função por serem precursores de eicosanoides, moduladores de base lipídica que regulam as respostas inflamatórias e imunes através de atividades pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (SIMOPOULOS, 2010).

Os ácidos graxos essenciais contribuem para a regulação de propriedades da membrana como fluidez, flexibilidade, permeabilidade e modulação de proteínas ligadas à membrana. Quando são incorporados aos fosfolipídios das membranas celulares, torna-as mais fluidas, o que pode levar ao, aumento do número de receptores e, consequentemente, a afinidade por seus respectivos ligantes. Além disso, os ácidos graxos essenciais são precursores de mediadores lipídicos envolvidos na inflamação, quimiotaxia, permeabilidade vascular e vasoconstrição (TENG et al., 2014). Esses mediadores podem ter propriedades pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e pró-resolutivos (SERHAN, 2014).

Em humanos, a síntese de AGPI não essenciais é realizada por dessaturases, enzimas responsáveis pelo metabolismo de ácidos graxos (MARQUARDT et al., 2000). Após a ingestão de ácido linoleico (LA, 18:2 ω-6) e ácido α-linolênico (ALA, 18:3ω-3), a enzima delta-6 dessaturase converte LA em ácido araquidônico (AA, 20:0) ou ALA em ácido docosaexaenoico (DHA, 22:6n-3) e ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3), responsáveis pela produção dos intermediários lipídicos da inflamação (Quadro 5).



Quadro 5 – Metabolismo dos ácidos graxos essenciais e formação de mediadores lipídicos pró inflamatórios e pró resolutivos

Legenda: TX: tromboxano; COX: ciclooxigenase, PG: prostaglandinas; LOX: lipoxigenase; LX:

lipoxinas; LT: leucotrienos; HETE: ácido hidroxiicosatetraenóico; Rv: resolvinas; HDHA:

ácido hidroxidocosahexaenóico; NPD1: neuroprotectina D1.

Nota: Síntese de mediadores lipídicos pró-inflamatórios e pró-resolutivos, à partir do ácido

araquidônico, ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenóico

Fonte: Adaptado de PILLAI et al., 2012

A absorção de ALA no intestino e sua liberação na corrente sanguínea parece ser eficiente em pessoas saudáveis. Em um estudo, após a ingestão de uma única refeição contendo ácidos graxos marcados, as concentrações dentro da fração triacilglicerol (TAG) dos quilomícrons foram medidas e os resultados indicaram absorção e liberação de ácido oleico (18:1ω-9), LA e ALA (EMKEN; ADLOF; GULLEY, 1994), sugerindo que a biodisponibilidade de ALA de uma refeição é comparável a de outros ácidos graxos insaturados. Em outro estudo, pacientes com ileostomia foram alimentados com 100 g óleo de linhaça, o ALA foi absorvido com 98% de eficiência (SAUNDERS; SILLERY, 1988).

Dentre os AGPI (a) 3, o ALA é o mais abundante no tecido adiposo humano, sendo responsável por aproximadamente 1% do total de ácidos graxos, enquanto há apenas vestígios de DHA e EPA (ANDERSEN et al., 1999; HOUWELINGEN; STOCKBRÜGGER; BRUMMER, 1999), demonstrando que não necessariamente o ALA deve ser utilizado para a síntese de EPA e DHA, podendo ser oxidado ou armazenado no tecido adiposo (BAKER et al., 2016).

Esta conversão de ALA em EPA e DHA é controversa, várias questões ainda não estão resolvidas em relação aos estudos de rastreamento, incluindo: padronização, quantificação e qual *pool* lipídico deve ser usado como uma medida

do metabolismo dos ácidos graxos (BAKER et al., 2016). A competição metabólica existente entre LA e ALA pode influenciar a conversão de ALA em EPA e DHA e outros intermediários (CHAN et al., 1993).

Alguns estudos sugerem que apenas 4% do ALA ingerido seja convertido em DHA (EMKEN; ADLOF; GULLEY, 1994), outros que essa taxa de conversão seria bem inferior, em torno de 0,13% para EPA e 0,05% para DHA (PAWLOSKY et al., 2001). Já Burdge et al. (2002) afirmam que essa taxa de conversão pode ser influenciada pelo gênero, sendo de 21% para mulheres e 8% em homens para EPA e 9% e 6% para DHA, respectivamente (BURDGE; WOOTTON, 2002; BURDGE; JONES; WOOTTON, 2002). Já Goyens et al. (2006) afirmam que a conversão de ALA em EPA é de aproximadamente 12% e 1% para DHA (GOYENS et al., 2006). Vale ressaltar que independente da taxa de conversão, após a ingestão de ALA, ocorre um aumento de aproximadamente 23% de EPA no plasma (LIN et al., 2010).

Devemos enfatizar que a relação ω 6/ ω 3 é o fator determinante para a síntese e a ação desses mediadores, portanto a ação do ALA no organismo não depende exclusivamente de sua conversão para EPA ou DHA (POUDYAL et al., 2013).

Ao longo das últimas três décadas, o consumo de dietas com proporção de $\omega 6/\omega$ 3 passou de 1:1 para 20:1 (SIMOPOULOS, 2016). Infelizmente, a dieta ocidental tende a ser deficiente em ω -3 e, as últimas recomendações são de uma relação 1:4 (MOLENDI-COSTE; LEGRY; LECLERCQ, 2011). Altas proporções de $\omega 6:\omega 3$ promovem a inflamação e a ocorrência de muitas doenças, incluindo doenças cardiovasculares, câncer e doenças autoimunes (VERGROESEN, 1972; KREMER, 1996; SAINI; KEUM, 2018; SCAIOLI; LIVERANI; BELLUZZ, 2017).

O EPA e o DHA podem ser obtidos exclusivamente de alimentos de origem animal, sendo os frutos do mar a principal fonte alimentar destes ácidos graxos. Por sua vez, o ALA é encontrado em fontes vegetais, como óleo e as sementes de chia e linhaça. O ALA, é essencial para o crescimento e o desenvolvimento normais e pode desempenhar um papel importante na prevenção e tratamento da doença arterial coronariana, hipertensão, diabetes, artrite e outras doenças inflamatórias e imunes (BREANNE; DAVID, 2009).

Os estudos de suplementação com ALA desmonstram o aumento principalmente de EPA em vários tecidos, mas as respostas fisiológicas induzidas

por ALA, são diferentes das induzidas diretamente por EPA e DHA, em especial nos casos de obesidade. Um estudo utilizando a suplementação com EPA, DHA e ALA em animais com síndrome metabólica induzida por dieta rica em gorduras e carboidratos, observou que o ALA não alterou a gordura corporal total, mas promoveu uma redistribuição lipídica da área abdominal, melhorou a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina, atenuou a dislipidemia e melhorou parâmetros cardiovasculares. A suplementação com EPA e DHA apresentou resultados similares, no entanto, não melhorou a tolerância à glicose. Poudyal et al. concluem em seu estudo que as respostas de ALA na síndrome metabólica são independentes da sua conversão em EPA e DHA (POUDYAL et al., 2013).

Além disso, Ibrahim et al. (2005) mostraram que a substituição de um terço de $18:2\ \omega$ -6 por $18:3\ \omega$ -3 na dieta de animais alimentados com sacarose resultou em níveis baixos de lipídios no sangue e aumento da sensibilidade à insulina periférica.

Outros estudos já demonstraram que após a suplementação de ALA, foram observados altos níveis de EPA e DHA no cérebro, retina, coração e fígado de roedores (ABEDIN et al., 1999). Inclusive, a suplementação de ALA na dieta materna, levou ao aumento de conteúdo de ALA no leite materno, levando ao aumento do conteúdo de ALA na pele e na gordura epididimal dos filhotes (BOWEN et al., 2000).

Mecanismos de ação dos ácidos graxos

Um dos principais mecanismos para ação dos ácidos graxos ω 3 é através da proteína GPR120 (FFAR 4), um receptor acoplado a proteína G (GPCR) sensível a lipídeos não saturados de cadeia longa descrito por Fredriksson et al. (2003). Desde então, vários trabalhos já demonstraram que o GPR120 possui um papel crítico em vários mecanismos fisiológicos da homeostase, como adipogênese, regulação do apetite e preferência alimentar (HIRASAWA et al., 2005; STENBERG et al., 2005; GOTOH et al., 2007; MIYAUCHI et al., 2009; YAMADA et al., 2017).

Em relação aos mecanismos de ação, já foi descrito que GPR120 acoplado a Gαq / 11 (subunidade da proteína G) induz um aumento na concentração intracelular de cálcio [Ca2 +] e a fosforilação da cascata ERK1 / 2 (HUDSON et al.,

2013; HIRASAWA et al., 2005). Outro trabalho demonstrou que no tecido adiposo branco de camundongos GPR120^{- /-} não ocorre a fosforilação de AKT (p-AKT) (ICHIMURA et al., 2012). O GPR120 também desempenha um papel na melhora da resistência a insulina, tanto em 3T3-L1, quanto no tecido adiposo primário, onde, através do acoplamento a proteína Gαq / 11, promove a ativação da via PI3K / Akt, desencadeando a translocação de GLUT4 para a membrana celular (OH DY et al., 2010). Em outro estudo, um agonista GPR120, "composto A" (cpdA), melhorou a intolerância à glicose e reduziu a hiperinsulinemia em camundongos obesos (OH DY et al., 2014).

Por outro lado, níveis elevados de GPR120 também são observados em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica (GOTOH et al., 2007). Neste contexto, outro trabalho demonstrou que apesar de existir uma maior expressão de GPR120 no tecido adiposo de obesos comparados a eutróficos, foi observada uma mutação deletéria (p.R270H), que inibe a sinalização do GPR120 impedindo seus efeitos na sensibilização da insulina e na diminuição da inflamação (ICHIMURA et al., 2012).

Já foi descrito uma relação entre a inflamação e a expressão de GPR120. Em um estudo *in vitro* com adipócitos humanos incubados com TNF-α ou IL1-β foi observada uma diminuição na expressão gênica de GPR120 (MUREDDA, 2018). Em outro estudo, o silenciamento do gene GPR120 em adipócitos humanos isolados de indivíduos obesos e eutróficos e, o posterior tratamento dessas células com diferentes tipos de ômega 3 não promoveu uma resposta anti-inflamatória como esperado (RODRIGUES-PACHECO et al., 2016). Corroborando esses dados, camundongos deficientes em GPR120 alimentados com dieta hiperlipídica foram resistentes aos efeitos do AGPI ω3 logo, não apresentaram redução da inflamação e da infiltração de macrófagos no tecido adiposo (OH et al., 2011). De acordo com esses achados, o GPR120 é considerado um importante ponto de integração entre o metabolismo e a inflamação.

Um outro parâmetro inflamatório foi estudo por Cintra et al., 2012, em um estudo onde demonstraram que o GPR120 ativa a transdução de sinal através da β-arrestina 2 / TAB1 (mediador da dessensibilização e endocitose do receptor acoplado à proteína G), que desliga as vias inflamatórias TLR4 e TNF, esses efeitos foram reproduzidos no hipotálamo de ratos obesos. Este mesmo estudo demonstrou que o GRP120 é expresso em neurônios (NPY neuropepídeo Y – envolvido na

sinalização de fome/saciedade) e como o NPY é inibido em resposta à leptina e, é possível que com a estimulação de ácidos graxos não saturados, o GPR120 presente nos neurônios do NPY possa desempenhar um papel no restabelecimento da ação da leptina.

Salvia Hispanica L. - CHIA

A Chia (*Salvia hispanica* L.) é uma semente pertencente à família Labiate, que compõe a alimentação humana desde 1500 a.C (CAHILL, 2003; AYERZA; COATES, 2008). Originária do México e da Quatemala, a chia era, incialmente, muito utilizada pelos astecas e maias. Para os astecas, a chia era oferecida aos deuses durante as cerimônias religiosas (AYERZA; COATES, 2005). Já no período pré-colombiano era um dos principais alimentos básicos utilizados pelas civilizações que habitavam a América Central, ficando atrás apenas do milho e do feijão (AYERZA; COATES, 2004). Em 1552, a semente de chia é relatada em um manual de plantas Asteca, como tendo propriedades medicinais (DE LA CRUZ, 1940).

Atualmente, o cultivo comercial da chia se dá na Austrália, Bolívia, Colômbia, Guatemala, México, Peru e Argentina (BUSILACCHIET et al., 2013) e, apesar de limitada, a chia já é cultivada no Brasil (MIGLIAVACCA et al., 2014).

Com o aumento no número de estudos, a ciência classificou a chia como uma oleaginosa, fonte de ácidos graxos ω-3, proteínas, fibras, vitaminas, minerais e antioxidantes (CAHILL, 2003) e as sementes de chia são amplamente utilizadas para a extração de compostos bioativos utilizados para o desenvolvimento de alimentos funcionais. O óleo da semente de chia possui um alto teor de AGPI ω3 (ALA), que representa cerca de 67% do seu total de ácidos graxos. Por isso a chia é considerada a mais rica fonte alimentar vegetal deste ácido graxo, mostrando - se uma excelente alternativa desses lipídeos, como demonstrado no QUADRO 6 (AYERZA et al., 2008; IXTAINA, 2011).

Atualmente, o óleo de chia é utilizado na formulação da maioria dos suplementos de AGPI ω-3 (AHMED et al., 2006; BELTRAN-OROZCO; ROMERO, 2003).

Apresentações da Salvia hispanica L. (Chia)

Composição do Óleo de Chia

4%
5%
C16: 0 - Ac. Palmítico
C18: 0 - Ac. Esteárico
C18: 1 - Ac. Oleico (ω9)
C18: 2 - Ac. Linoleico (ω6)
C18: 3 - Ac. Linolênico (ω3)

Quadro 6 – Formas de apresentação da Salvia hispânica L. e composição de seu óleo

Legenda: Apresentações da Salvia hispanica L: relativas a planta (esquerda superior), semente (direita superior), semente em maior aumento (esquerda inferior) e cápsulas (direita inferior). Composição do óleo de chia: 67% de Ac. Linolênico (ALA – ω3); 18% de Ac. Linoleico (LA- ω6); 5% de Ac. Oleico (ω9); 4% de Ac. Esteárico (saturado); 6% de

Ac. Palmítico (saturado).

Fonte: Adaptado de IXTAINA et al., 2011.

Os primeiros artigos sobre a utilização da chia foram publicados no início dos anos 2000 e estudavam o uso da semente de chia na ração animal como uma alternativa para melhorar o perfil lipídico de ovos (AYERZA; COATES, 2002), a carne de galinhas (AYERZA; LAURIA, 2002) e no crescimento e no perfil de ácidos graxos na carcaça de coelhos (PEIRETTI; MEINERI, 2008). Nestes estudos, a suplementação com a semente de chia foi capaz de melhorar o perfil lipídico (dos ovos e carcaças), com o aumento de ALA, EPA e DHA.

Recentemente, foi mostrado que o consumo de óleo de chia por mulheres durante o último trimestre de gravidez e os primeiros três meses de lactação aumenta o teor de DHA no leite materno (VALENZUELAET et al., 2015). Outro estudo demonstrou o efeito inibitório do extrato da semente da chia sobre a produção de melanina por melanócitos *in vitro* (DIWAKARET et al., 2014). Além disso, o uso do óleo de chia como um agente hidratante aliviou o prurido em pacientes com doença renal terminal e em pessoas saudáveis. (JEONGET et al., 2010). Também já foi descrito que o tratamento com óleo de chia em animais com adenocarcinoma mamário reduziu a produção de mediadores lipídicos pró-inflamatórios, diminuiu o peso do tumor e o número de metástases (ESPADA et al., 2007).

No quadro de obesidade e de Síndrome metabólica, os estudos com a chia vem buscando associar o seu uso com possíveis melhorias dos quadros clínicos.

A grande maioria desses estudos foram realizados com a semente da chia que, apesar de rica em ALA, possui um alto teor de fibras, o que reduz a absorção dos ácidos graxos presentes na semente. Já foi observado que a introdução de sementes de chia na dieta reduziu o índice glicêmico, atenuou dislipidemias e ainda auxiliou na perda de peso (WANG et al., 2016). Dentre os estudos com a semente da chia que avaliaram o metabolismo de glicose, Oliva et al. (2013) mostraram que ratos Wistar alimentados com dieta rica em gordura e açúcar, ao receberem tratamento com sementes de chia obtiveram melhora na secreção de insulina, ativação da glicogênio sintase, aumento da glicose-6-fosfato, indução da expressão de GLUT4 no músculo e melhora da dislipidemia.

Outro estudo demonstrou, através de clampeamento euglicêmico, uma melhora da resistência à insulina após a suplementação com a semente de chia em ratos com dislipidemia provocada por dieta rica em açúcar e gordura (CHICCO et al., 2009). A suplementação com a semente de chia em camundongos induziu um aumento da expressão de enzimas chave na lipogênese *de novo*, de PPARα e da enzima carnitinapalmitol transferase1 (CPT1), que transporta ácidos graxos livres, levando a redução da dislipidemia e da esteatose hepática (ROSSI et al., 2013).

Poucos estudos avaliaram os efeitos da semente da chia em humanos. Destacam-se os estudos de Nieman et al. (2009, 2012) que mostraram que o consumo de semente de chia não promoveu perda de peso ou alterou fatores de risco em adultos com sobrepeso (NIEMAN et al., 2009). Além disso, demonstraram

ainda que a ingestão de 25 g de semente de chia durante 10 semanas por mulheres com sobrepeso, levou ao aumento dos níveis plasmáticos de ALA e EPA, não influenciando porém, parâmetros inflamatórios ou metabólicos. Em concordância, foi mostrado que o consumo da semente de chia por mulheres em pós-menopausa aumentou os níveis plasmáticos de ALA e EPA (JIN et al., 2012).

A farinha da semente de chia também tem sido utilizada como suplemento alimentar e, um estudo recente mostrou sua eficácia na redução da pressão arterial em indivíduos hipertensos (TOSCANO et al., 2014).

Os estudos com o óleo da semente de chia são mais escassos, porém promissores. Já foi demonstrado em roedores eutróficos que a suplementação com óleo de chia aumentou a conversão de AGPI ω3 em diversos tecidos (VALENZUELA et al., 2014).

Em camundongos obesos, a suplementação com óleo de chia promoveu um aumento da expressão de *heatshockproteins* (HSP) e do Co-ativador do receptor ativado por peroxissoma alfa (PGC-1α) no músculo esquelético, além de melhorar a tolerância à glicose (MARINELI et al., 2014). Os autores relatam uma melhora do metabolismo da glicose, porém os mecanismos moleculares envolvidos nessa melhora ainda não haviam sido elucidados.

Recentemente, nosso grupo demonstrou que camundongos obesos suplementados com óleo de chia por 45 dias obtiveram melhora significativa da resistência à insulina, devido ao restabelecimento da sinalização e da captação de glicose no músculo esquelético, através do aumento da fosforilação Substrato do receptor de insulina (IRS-1) e proteína quinase B (AKT) e da translocação do Transportador de glicose 4 (GLUT4) do citosol para a membrana; além da diminuição nos níveis séricos de triglicerídeos e aumento de HDL-colesterol (FONTE-FARIA et al., 2019).

Apesar dos estudos escassos com óleo de chia, a literatura vem demonstrando um papel positivo da utilização do ômega- 3 na prevenção e controle de doenças cardiovasculares. Em 1970, os primeiros estudos epidemiológicos associaram seu consumo com a diminuição de infarto do miocárdio (BANG; DYERBERG; NIELSEN, 1971; BANG; DYERBERG, 1972; DYERBERG; BANG; HJORNE, 1975; O'KEEFE; HARRIS, 2000; HARRIS et al., 2009) e hoje, seu consumo é recomendado pelo *National Institute of Health* (NIH), dentre outras instituições, que consideram a ingestão de ALA importante em todas as fases da

vida, devido os seus benefícios sobre a saúde cardiovascular, com indicação de consumo de 1,1g para mulheres e 1,6 g para homens em idade adulta. Salientamos que não são consideradas recomendações de EPA ou DHA, visto que o ALA é o único essencial e os demais podem ser formados endogenamente através dele (INSTITUTE OF MEDICINE, FOOD AND NUTRITION BOARD, 2005).

Considerando que a obesidade é o principal fator de risco para o desenvolvimento de DCV e que o tratamento da obesidade é baseado na modificação dos hábitos de vida, relacionados com orientações nutricionais para diminuir o consumo de calorias na alimentação e exercícios para aumentar o gasto calórico, e o tratamento farmacológico é apenas um adjuvante neste cenário a Associação Brasileira de Estudos da Obesidade (ABESO, 2016) são necessárias alternativas mais eficazes para o controle e tratamento da doença.

Assim, consideramos que o estímulo à ingestão de ômega 3 através do consumo de alimentos fonte deste nutriente e de suplementos parece uma estratégia promissora para prevenção e controle de agravos à saúde causados por doenças metabólicas.

1 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL

A obesidade está altamente associada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), uma vez que os principais fatores de risco para o estabelecimento dessas doenças incluem: aumento da adiposidade visceral, hipertensão, hiperglicemia, dislipidemia e resistência à insulina, características comuns à obesidade. Sabe-se que a expansão anormal do tecido adiposo durante a obesidade é consequência de um desbalanço entre a hiperplasia e a hipertrofia de adipócitos, levando ao acúmulo ectópico de gordura, o qual contribui para o estabelecimento de um quadro inflamatório no tecido adiposo. Dentre os locais onde esse excesso de calorias sob a forma de gordura se acumula, destaca-se o tecido adiposo perivascular (TAPV). A expansão e a inflamação do TAPV têm sido implicadas no desenvolvimento da disfunção endotelial, aterosclerose e resistência à insulina na obesidade, contudo, apesar de diversas evidências clínicas e epidemiológicas, ainda não estão claros quais os mecanismos envolvidos na expansão do TAPV durante a obesidade que contribuem na patogênese das DCV. Destacamos ainda, o papel positivo dos ácidos graxos poli-insaturados ω3 nas alterações metabólicas associadas à obesidade.

1.1 Objetivo

Com base na experiência do nosso grupo no estudo dos mecanismos moleculares e funcionais que regulam a adipogênese e no papel da suplementação com ÓLEO DE CHIA na melhora da sensibilidade à insulina e no remodelamento do tecido adiposo durante a obesidade, tendo em vista o papel da expansão do tecido adiposo perivascular para o desenvolvimento das DCV, nosso objetivo nesse estudo é: avaliar os efeitos da suplementação dietética com óleo de chia sobre as alterações metabólicas e vasculares decorrentes da obesidade induzida por dieta hiperlipídica em modelo animal.

1.2 Objetivos específicos

Em animais submetidos a um modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e, posteriormente, submetidos a suplementação dietética com óleo de chia, pretendemos:

- a) avaliar a pressão arterial sistólica e diastólica e a frequência cardíaca dos animais, ao longo do período experimental;
- b) avaliar a reatividade vascular (resposta vasodilatadora e vasoconstritora) no leito arterial mesentérico isolado dos animais;
- c) identificar o papel da suplementação dietética com óleo de chia nas alterações morfológicas e funcionais do TAPV mesentérico induzidas pela obesidade;

2 METODOLOGIA

Todos os procedimentos animais utilizados neste estudo foram realizados de acordo com o Comitê de utilização e tratamento animal do Instituto de Biologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Protocolo n° CEUA24/2017).

2.1 Modelo experimental de Obesidade induzida por dieta hiperlipídica:

Oitenta camundongos C57Bl/6J machos com 21 dias de vida, provenientes da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, Belo Horizonte, MG), foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia da UERJ, sob condições controladas de ciclos claro/escuro de 12 por 12 horas, 60% de umidade, temperatura ambiente de 23 ± 1°C e livre acesso à ração e água.

Inicialmente, os animais foram divididos em dois grupos (40 animais por grupo): grupo controle (grupo C) que recebeu dieta normocalórica e grupo obeso (grupo H) que recebeu dieta hiperlipídica (45% Kcal provenientes de lipídeos), do 21° ao 90° dia de vida. Aos 90 dias, esses grupos foram subdivididos em quatro grupos (20 animais por grupo): grupo controle (**grupo C**), os animais continuaram recebendo a dieta normocalórica do 90° ao 135° dia de vida; grupo controle com suplementação de óleo de chia (**grupo CC**): Os animais receberam a dieta normocalórica suplementada com óleo de chia (1,5% m/m) do 90° ao 135° dia de vida; grupo obeso (**grupo H**), os animais continuaram recebendo a dieta hiperlipídica do 90° ao 135° dia de vida e; grupo obeso com suplementação de óleo de chia (**grupo HC**), os animais receberam a dieta hiperlipídica suplementada com óleo de chia (1,5% m/m) do 90° ao 135° dia de vida. A composição das dietas está descrita na Tabela 1 e 2. O peso corporal e a ingestão alimentar dos animais foram aferidos semanalmente. O esquema de dietas e suplementação dos animais está demonstrado no Quadro 7.

Tabela 1 – Composição das dietas (g/100g)

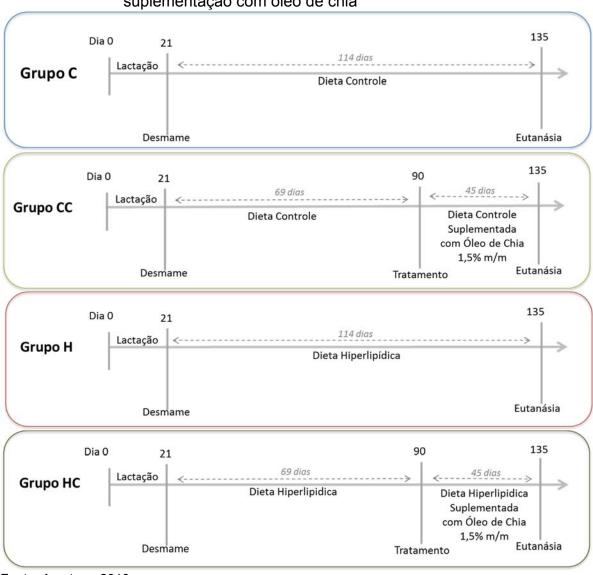
INGREDIENTES	С	CC	Н	HC
Amido de Milho	39	39	18,5	18,5
Dextrose	13,2	13,2	6,1	6,1
Caseína	20	20	20	20
Sacarose	10	10	10	10
Óleo de Soja	7	7	7	7
Celulose	5	5	5	5
Minerais	3,5	3,5	3,5	3,5
Vitaminas	1	1	1	1
Cistina	0,3	0,3	0,3	0,3
Colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Banha	0	0	13,3	13,3
Óleo de Chia	0	1,5	0	1,5
Carboidratos	63	63	34	34
Proteínas	20	20	20	20
Lipídeos	7	8,5	20,2	21,7
Energia (kcal/g)	3,96	4,09	4,73	4,81

Nota: Ingredientes: caseína, amido, amido dextrinizado, sacarose, óleo de soja, celulose, mix de minerais, mix de vitaminas, cistina e colina (banha e óleo de soja).

Fonte: A autora, 2019.

Tabela 2- Composição de ácidos graxos da dieta (g/100g de dieta)

ÁOIDOO ODAYOO		OO	<u> </u>	110
ÁCIDOS GRAXOS	С	CC	Н	HC
Palmítico (16:0)	0,75	0,84	3,46	3,55
Esteárico (18:0)	0,23	0,28	1,67	1,72
Oléico (18:1- ω9)	1,6	1,69	6,76	6,85
Linoléico (18:2-ω6)	3,76	4,05	6,34	6,63
Linolênico (18:3-ω3)	0,4	1,37	0,55	1,52
AGS	1,06	1,2	6,31	6,45
AGPI	4,2	5,42	12,14	13,36
ω-6:ω3	9,4	2,95	11,52	4,36



Quadro 7 – Modelo experimental de indução de obesidade e posterior suplementação com óleo de chia

Fonte: A autora, 2019.

2.2 Análise da composição corporal:

A análise da composição corporal foi realizada por ressonância nuclear magnética (RNM). Os camundongos foram analisados utilizando o analisador de composição corporal para animais de pequeno porte (Minuspec LF90 TD-NMR de Bruker's, Massachusetts, EUA). O instrumento foi calibrado para esses estudos usando varreduras de RNM e dados de composição química de 10 camundongos (faixa de peso corporal entre 25 e 35 g). No dia do teste, uma verificação de controle

de qualidade de tensões internas, temperatura, magnetos e parâmetros do aparelho de RMN foi realizada usando um padrão fornecido pelo fabricante.

Os dados de idade (em dias) e peso (em gramas) do animal foram inseridos no *Software* e, imediatamente, os animais foram colocados num cilindro de plástico transparente (50 mm de diâmetro) e mantidos imóveis por inserção de um êmbolo de encaixe no cilindro (sem necessidade de anestesiá-los). O tubo foi então baixado para a câmara de amostra do instrumento por aproximadamente 2 minutos, a duração do exame. O Software do equipamento fornece os dados de fluídos, massa magra e massa gorda, já calculados em função do peso individual do animal.

2.3 Mensuração da pressão arterial e da frequência cardíaca

Os animais foram treinados por duas semanas antes do período experimental, para minimizar o estresse durante a medida da pressão arterial. Posteriormente, a pressão arterial sistólica, diastólica e a frequência cardíaca foram mensurados semanalmente, através do método não invasivo de pletismografia da artéria caudal, utilizando o sistema de pressão para camundongos e ratos CODA (KENT Scientific CO., Connecticut, USA). Os dados representam a média de três aferições em cada momento

2.4 Teste de Tolerância à Glicose

Para avaliar a tolerância à glicose, o teste de tolerância à glicose (TTG) foi realizado após, aproximadamente, 6h de jejum. A glicemia de jejum foi avaliada pela coleta de uma gota de sangue após secção caudal. A seguir, foi realizada a injeção intraperitoneal de glicose na proporção de 2 g/kg de peso/animal. Foram realizadas subsequentes verificações da glicemia, aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração da glicose. Todas as alíquotas foram analisadas pelo aparato e glicofitas AccuCheck Active, Roche®.

2.5 Teste de Tolerância à Insulina

Para avaliar a resposta à insulina, o teste de tolerância à insulina (TTI) foi realizado após, aproximadamente, 6h de jejum, aos 128 dias de vida. A glicemia de jejum foi avaliada pela coleta de uma gota de sangue após secção caudal. A seguir, foi realizada a injeção intraperitoneal de insulina 0,5U por kg de peso/animal. Foram realizadas subsequentes verificações da glicemia, aos 15, 30, 45, 60 e 120 minutos após a administração da glicose. Todas as alíquotas foram analisadas pelo aparato e glicofitas AccuCheck Active, Roche®.

2.6 Coleta de Sangue

Aos 135 dias, os animais foram mantidos em jejum por aproximadamente 8 horas e anestesiados com quetamina (50 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg). O sangue arterial foi coletado através de punção cardíaca com o auxílio de seringa e agulha contendo anticoagulante (EDTA 5% em PBS estéril). Após a coleta, o sangue foi centrifugado em tubos de ensaio a 3000 rpm por 10 minutos e o plasma foi coletado, aliquotado e estocado em freezer -80°C para futuras análises.

2.7 Ensaio de reatividade vascular

2.7.1 Isolamento do leito arterial mesentérico (LAM) de camundongos:

Aos 135 dias de vida, os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente com tiopental (50 mg/kg) para a coleta de sangue arterial através da punção cardíaca e, em seguida submetidos à laparotomia. O LAM foi estendido para o exterior da cavidade abdominal e envolto em gaze umedecida com solução nutriente de Krebs modificada (g/L), NaCl 1 M, KCl 0,5 M, CaCl2.2H2O 0,5

M, MgSO4 0,1 M, KH2PO4 0,1 M, NaHCO3 1,86 g, C6H12O6 1,42 g (Resende *et al.*, 1997). Os ramos pancreático-duodenal, íleo-cólico e cólico direito da artéria mesentérica superior foram ligados e seccionados. O intestino delgado foi ligado e seccionado à altura do jejuno proximal e do íleo distal. A artéria mesentérica superior foi isolada na sua origem, à altura da artéria aorta abdominal e canulada com um tubo de polietileno (PE 10; Clay-Adams), de aproximadamente 1 cm de comprimento, preenchida com solução de Krebs heparinizada. Em seguida, o intestino delgado foi separado do leito vascular, cortando-se rente à borda intestinal, e a preparação lavada com solução de Krebs modificada.

2.7.2 Medida da reatividade do LAM a substâncias vasoativas

Após o isolamento, a preparação vascular foi colocada em uma cuba (volume de 10 mL) e constantemente perfundida por meio da cânula inserida na artéria mesentérica superior que foi conectada a uma bomba peristáltica (Model MINIPULS 3, Gilson®). A solução de Krebs, mantida à 37°C e aerada com mistura carbogênica (95% O2 e 5% CO2) foi infundida à velocidade constante de 4 mL/min e a pressão de perfusão registrada continuamente em um computador através do programa (PowerLab 4/30)

Os experimentos foram precedidos de um período de trinta minutos de estabilização da preparação, durante o qual a pressão de perfusão basal foi mantida entre 20 e 40 mmHg (RESENDE et al., 1997) e então foram administradas injeções de 120 µmol de KCl de dez em dez minutos até obter uma resposta consistente. Em seguida, iniciou-se o período de sensibilização vascular, no qual a noradrenalina (NE) foi adicionada à solução de perfusão, em concentração suficiente (30 µM) para que a pressão de perfusão se mantivesse estável em torno de 80-100 mmHg.

Logo após a obtenção de uma resposta pressora induzida pela NE, testamos a viabilidade do endotélio vascular, com a injeção de acetilcolina (ACh; 1-1000 pmol), a qual produz um efeito vasodilatador que é dependente da liberação de NO pelas células endoteliais.

Estudamos também no leito arterial mesentérico de camundongos em pressão de perfusão basal, a resposta pressora de doses crescentes de NE (1-300

nmol) para atingir a contração máxima. A resposta vasodilatadora foi expressa em termos de percentual de queda da resposta pressora induzida pela NE e a resposta pressora foi expressa pelo percentual de contração subtraído da pressão basal.

As injeções "in bolus" das substâncias utilizadas nos experimentos foram realizadas por meio de um injetor acoplado ao sistema de perfusão, por meio de microsseringas Hamilton de 10 e 100 μ l. O intervalo entre as injeções foi de aproximadamente cinco minutos, permitindo sempre o retorno e estabilização da pressão de perfusão aos níveis anteriores e as injeções foram administradas em volumes que variam de 5 a 50 μ L.

2.8 Obtenção do sobrenadante do tecido perivascular mesentérico (TAPV)

Cerca de 50 mg do tecido adiposo perivascular mesentérico foi extraído dos grupos, em seguida, picotados com auxílio de uma tesoura cirúrgica em uma solução com DMEM (Sigma) e M199 (Sigma) (1:1) em ambiente estéril. Após esta etapa os tecidos foram deixados em placas de 24 poços por 24 horas em estufa à 37°C em atmosfera de 5% CO2. Após este período, as soluções contendo os tecidos foram tranferidas para microtubos (Axygen, Corning, EUA), centrifugadas a 5000 x g por 10 minutos à 4°C e, imediatamente, alíquotadas e estocadas a -80°C até o momento do uso.

2.9 Ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA):

A dosagem dos níveis plasmáticos de leptina e insulina e dos níveis de , TNF-α, IL1β, leptina e IL-10 no sobrenadante do TAPV foram realizadas por ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA), utilizando-se kits comercialmente disponíveis (PeproTech). As dosagens foram realizadas conforme as instruções do fabricante.

Uma placa de 96 poços foi coberta com anticorpo de captura na concentração de 100 µg/mL e incubada *overnight* em temperatura ambiente. Após este período, a placa foi lavada por 4 vezes com a solução de lavagem (0,05% de Tween 20 em

PBS) e, em seguida, bloqueada com BSA 1% em PBS por 2 horas. Após novas lavagens, a curva padrão diluída em solução diluente (0,05% de Tween 20, 0,1% BSA em PBS, na faixa de 2ng/ml a 12,5 pg/ml) e as amostras foram incubadas por 2 horas em um volume de 100 μL/poço. Em seguida, a placa foi lavada novamente e incubada com anticorpo de detecção diluído em tampão diluente (100 μg/mL) por 2 horas. Após novas lavagens, adicionou se à placa 100 μL de Avidina conjugada a HRP/ poço, diluída em solução diluente na concentração de 1:2000.

Após 30 minutos, o substrato 2,2' azino bis (3 etilbenzotiazolina 6 ácido sulfônico - ABTS) (Sigma) foi adicionado e a placa foi mantida protegida da luz.

A leitura da placa foi realizada a cada 5 minutos, em leitor de placas (*Invision*), no comprimento de onda de 405 nm com correção a 650 nm. Todas as dosagens foram feitas em triplicatas.

2.10 Extração de RNA do TAPV e análise da expressão gênica por RT-PCR em tempo real

Para análise da expressão gênica, o RNA total do TAPV foi extraído com o kit de extração de RNA da Qiagen seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação das amostras de RNA total foi realizada no espectrofotômetro NanoVue® (GE Healthcare Life Sciences) por análise da absorbância a 260nm. A pureza do RNA extraído foi avaliada através do cálculo das razões A260/A280 e A260/A230, apresentadas pelo software do equipamento e que indicam possíveis contaminações da amostra por proteínas e compostos fenólicos. Após o tratamento com DNase (RQ1 RNaseFreeDNase; Promega) a síntese do cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA total tratado, utilizando o High Capacity DNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, 1 μg de RNA total tratado foi adicionado a 10 μL do seguinte mix: tampão da enzima transcriptase reversa, 4 mM de dNTPs, 25 nM primers randômicos, 50 U de transcriptase reversa e 20 U de RNAse Inhibitor, em um volume final de 20 µL. As amostras foram incubadas a 25°C, por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos. A reação foi realizada no Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems). O PCR em tempo real foi realizado em termociclador

Rotor Gene Q (Qiagen) utilizando-se um sistema de quantificação de fluorescência verde emitida por SYBR (Qiagen) para quantificar amplicons. As condições padrões de PCR foram 95°C por 5 minutos e, 30 ciclos a 95°C (5 s) e 60°C (10 s), seguido pela curva padrão de dissociação para identificação do número de amplicons. Os números de referência ou a sequência dos primers utilizados estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Primers utilizados no RT-PCR

Primer	Nº de acesso no Gene Bank	Nº de catálogo/ Sequência
GAPDH	NM_008084.3	QT00199388
Adiponectina	NM_009605.5	QT01048047
PPARγ	NM_001127330.2	QT00156303
PGC1α	NM_008904.2	QT00104776
FFAR4 (GPR120)	NM_181748.2	QT00257033
IL1-β	NM_008361.4	QT01048355
Leptina	NM_008493.3	QT00164360
Fndc5 (Irisina)	NM_027402.4	(5'-3')CACGCGAGGCTGAAAAGATG (3'-5')AGCTATAACACCTGCCCACA5

Fonte: A autora, 2019.

2.11 Análise da expressão proteica por Western Blotting

O extração de proteínas do TAPV foi realizada com tampão RIPA (Tris HCI 50 mM, NaCI 150 mM, EDTA 5 mM, Pirofosfato de sódio 30 mM, NaF 50 mM, Ácido deoxicólico 0,5%, SDS 0,1%, Triton X-100 1%, H2O q.s.p). A quantificação do extrato total das BM-MSC foi determinada pelo método de BCA (ThermoScientific). A quantificação das proteínas nas amostras de tecido adiposo perivascular mesentérico foram determinadas pelo ensaio colorimétrico do kit *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific). Em seguida, as amostras foram desnaturadas em tampão de amostras (Tris-HCI 50 mM, pH 6,8; SDS 1%; ß-mercaptoetanol 5%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,001%) por 5 minutos a 95°C e, congeladas para serem submetidas eletroforese.

A eletroforese foi realizada em condições desnaturantes em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Em cada poço do gel, foram aplicadas 10 µg de proteínas das amostras. Um padrão de diferentes pesos moleculares foi utilizado em todas as eletroforeses (Rainbow Molecular Weight Marker, Amersham Biosciences) para estimar o peso molecular das proteínas. Após a separação eletroforética, foi realizada a transferência das proteínas para membranas de PVDF (Difluoreto de polivinilideno) Hybond P, Amersham Pharmacia Biotech) por 1 hora, utilizando se o sistema Semidry (BIORAD). Em seguida, as membranas foram incubadas, durante 1 hora, com solução de bloqueio contendo 5% de albumina de soro bovino (BSA; Sigma) e T-PBS (Tween 20 0,1% em PBS), seguidas de incubação overnight com os anticorpos primários específicos. Os seguintes anticorpos primários (Santa Cruz Biotechnology) foram utilizados: iNOS – (ab 129372; 1:500), eNOS (sc 17200; 1:500), actina (sc 8432; 1:1000), Em seguida, as membranas foram lavadas com T-PBS e então incubadas com o anticorpo secundário específico conjugado com biotina (1:5000-1:10000, Santa Cruz Biotechnology) por 1 hora. Após essa incubação, as membranas foram lavadas com T-PBS e incubadas com estreptavidina conjugada com peroxidase (1:5000/1:10000 Zymed), por 1 hora.

As proteínas imunorreativas foram visualizadas pela marcação com o kit de quimioluminescência ECL Plus (Amersham Biosciences) e as imagens das bandas foram capturadas pelo sistema pelo ChemiDoc XRS de imagens moleculares (Bio Rad). As bandas foram analisadas e quantificadas por densitometria, utilizando-se o programa *Image J Software*.

2.12 Análise histológica tecido adiposo

Para análise histológica da morfologia e morfometria de adipócitos, TAPV dos animais suplementados ou não com óleo de chia foram fixados em solução de paraformaldeído (4% m/v); e paraformaldeído (4% m/v) adicionado de sacarose (10% m/v); durante 30 minutos em cada solução. A seguir, os tecidos foram armazenados em tampão fosfato com 20% (m/v) de sacarose a 4°C até o uso. Em seguida, os tecidos foram embebidos em parafina para obtenção dos cortes não seriados de 5 μm. os cortes foram alocados em lâminas histológicas para posterior

coloração com hematoxilina e eosina (HE), a fim de identificar a arquitetura do tecido. Para a coloração, as lâminas foram desparafinizadas em Xilol por 15 minutos, hidratadas em concentrações decrescentes de álcool etílico absoluto, 90%, 80% e 70% (v/v) por 3 minutos, lavadas em água corrente por 5 minutos, coradas com hematoxilina (VETEC) por 1 minuto e 30 segundos, lavadas em água corrente e coradas com eosina (VETEC) por 30 segundos. A seguir, foram lavadas e desidratadas com concentrações crescentes de álcool absoluto por 3 minutos. A análise das imagens foi realizada no microscópio Olympus BX40, nos aumentos de 20X e 40X. As imagens obtidas foram analisadas com o software Adiposoft para mensuração das áreas dos adipócitos. Foram utilizados quatro animais por grupo e três lâminas de cada animal foram analisadas.

2.13 Análise Estatistica

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). O programa GraphPadPrism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software) foi utilizado para a obtenção dos gráficos e análise dos dados. Os dados foram analisados utilizando-se *One way analysis of variance* (ANOVA) para comparar as diferenças entre os grupos experimentais, com posterior uso do pós teste Tukey, sendo considerados significativos quando p<0,05.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação do peso, da composição corporal e da ingestão calórica dos animais

A avaliação do peso corporal (Figura 1A) demonstrou que os animais submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram um aumento significativo do peso corporal a partir dos 60 dias de vida (p<0,05), quando comparados ao grupo controle. A suplementação com óleo de chia (SOC), a partir do 90° dia de vida, não alterou o peso corporal dos animais. Em conjunto, avaliamos a composição corporal ao final do período de SOC e, como esperado, observamos um aumento significativo do percentual de gordura corporal nos animais submetidos à dieta hiperlipídica, com consequente diminuição da massa livre de gordura (Figura 1B e C, respectivamente). A SOC diminuiu o percentual de gordura corporal nos animais submetidos à dieta hiperlipídica, com consequente aumento da massa livre de gordura. Nenhuma alteração foi observada na composição corporal do grupo controle submetido à suplementação com óleo de chia (Figura 1 B e C). O consumo calórico foi avaliado, contudo não observamos diferenças significativas na ingestão calórica, conforme mostra a Figura 1D.

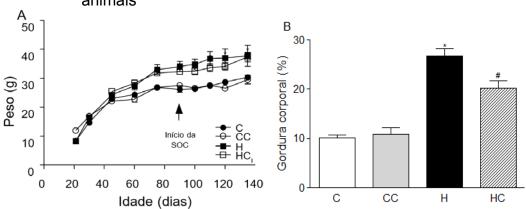
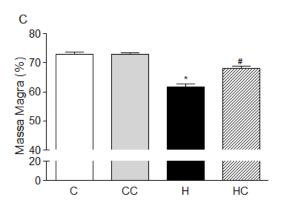
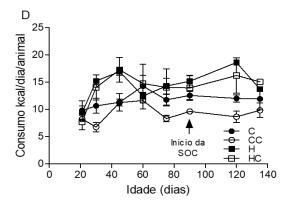


Figura 1 - Avaliação do peso, da composição corporal e da ingestão calórica dos animais





Legenda: O peso corporal dos animais foi aferido do 21° ao 135° dia de vida (A). A análise da composição corporal foi realizada por ressonância magnética aos 135 dias de vida (B e C). O consumo calórico foi aferido ao longo dos 21 aos 135 dias de vida (D). A seta indica o inicio da suplementação dietética com óleo de chia. Os dados representam a média ± EPM, n=6 -10 animais por grupo. *p≤0,05 comparado ao grupo C;*p≤0,05 comparado ao grupo H.

Fonte: A autora, 2019.

3.2 Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a homeostase glicêmica e níveis séricos de insulina e leptina dos animais

Avaliamos a glicemia de jejum, a insulinemia, a leptinemia, tolerância à glicose e a insulina dos animais submetidos a dieta hiperlipídica e, posteriormente, submetidos à SOC. Conforme demonstrado na Figura 2A, observamos que os animais do grupo H e HC apresentaram um aumento significativo da glicemia de jejum, quando comparados aos seus respectivos controles (C e CC) (tempo zero).

Observamos ainda, que os animais do grupo H apresentam um aumento significativo dos níveis séricos de insulina, quando comparados ao grupo controle (Figura 2B). A suplementação com óleo de chia reduziu significativamente a insulinemia dos animais obesos (grupo HC), contudo, não afetou os níveis deste hormônio nos animais do grupo CC (Figura 2B). A partir desses resultados, avaliamos a tolerância à glicose e à insulina dos animais e observamos que os animais do grupo H apresentam uma menor eficiência tanto na captação de glicose, quanto na sensibilidade à insulina, quando comparados ao grupo controle (Figura 2C e D, respectivamente). A suplementação dietética com óleo de chia melhorou a captação de glicose e a sensibilidade à insulina nos animais obesos. Salientamos o efeito da SOC na sensibilidade à insulina nos animais do grupo CC. Nesse grupo, a SOC reduziu drasticamente os níveis glicêmicos após 30 minutos da injeção intraperitoneal de insulina (0,5 UI/Kg), indicando um aumento expressivo da sensibilidade à insulina (Figura 2D).

Como esperado, os níveis séricos de leptina estavam aumentados nos animais obesos (Grupo H), comparados ao grupo controle. A SOC reduziu significativamente a leptinemia dos animais HC, quando comparados ao grupo H (Figura 2E), não sendo observado nenhum efeito da sobre a leptinemia nos animais do grupo CC.

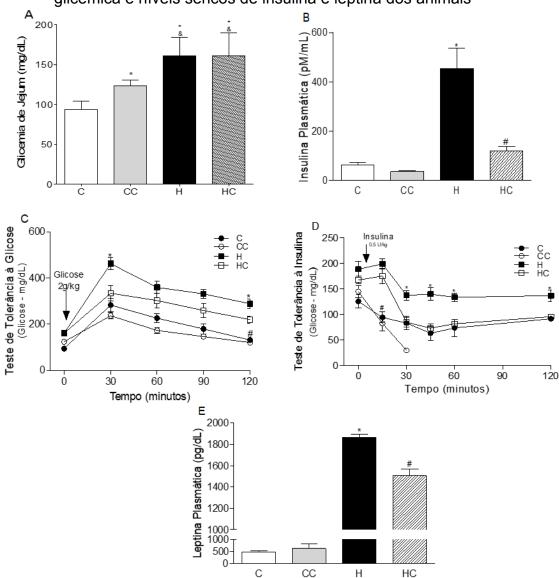


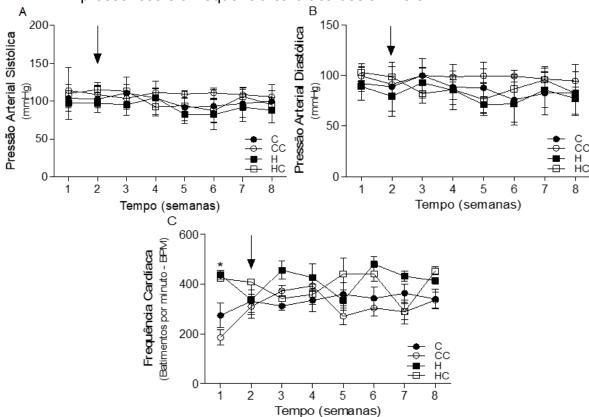
Figura 2 - Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a homeostase glicêmica e níveis séricos de insulina e leptina dos animais

Legenda: Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a homeostase glicêmica e níveis séricos de insulina e leptina dos animais. (A) Glicemia de Jejum; (B) Níveis séricos de insulina analisados por ELISA; (C) Teste de tolerância peritoneal à glicose (TTG) após infusão peritoneal de 2g de glicose por kg de peso por animal; (D) Teste de tolerância à insulina (TTI) após infusão peritoneal de 0,5UI de insulina por Kg de peso por animal; Níveis plasmáticos de leptina (E) foram analisados por ELISA. Os gráficos representam média ± E.P.M), n = 8 animais por grupo. *p<0,05 comparado ao grupo H.

3.3 Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre os níveis pressóricos e a frequência cardíaca dos animais

Os níveis pressóricos e a frequência cardíaca foram avaliados pelo método não invasivo de pletismografia caudal. A Figura 3 mostra os níveis pressóricos sistólico e diastólico dos animais (Figura 3A e B, respectivamente). Nenhuma diferença significativa foi observada nos níveis pressóricos entre os grupos. Em relação à frequência cardíaca (FC), observamos um aumento significativo na FC nos animais do grupo H, quando comparados ao grupo controle na primeira verificação, no entanto, essa diferença não foi observada nas demais semanas. Podemos observar ainda que suplementação com óleo de chia não alterou a FC em nenhum dos grupos avaliados (Figura 3C).





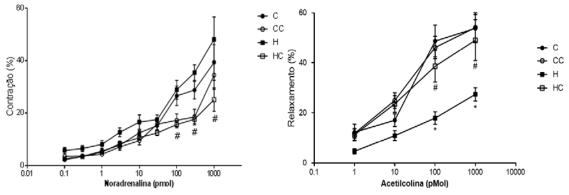
Legenda: Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre os níveis pressóricos e a frequência cardíaca dos animais. Os níveis pressóricos sistólico (A), diastólico (B) em mmHg e a frequência cardíaca (C) em BPM foram avaliados pelo método não invasivo de pletismografia caudal. As setas indicam o início da suplementação. Os gráficos representam a média ± EPM, n = 5 animais por grupo. *p≤0,05 comparado ao grupo C.

3.4 Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a resposta vascular vasoconstritora e vasodilatadora

A avaliação da resposta vascular dos animais foi realizada no leito arterial mesentérico (LAM). Inicialmente, avaliamos a resposta vasoconstritora do LAM após concentrações crescentes de noradrenalina (NA: 1 – 1000 pMol). Como demonstrado na Figura 4A, não observamos diferenças significativas na resposta vasoconstritora do LAM entre os grupos C e H em nenhuma das doses de NA ou NE. A suplementação com óleo de chia foi capaz de diminuir a resposta vasoconstritora a NA (100, 500 e 1000 pMol) somente dos animais obesos (Figura 4A).

Posteriormente, avaliamos a resposta vasodilatadora do LVM após doses crescentes de acetilcolina (Ach: 1 - 1000 pMol). Observamos que os animais do grupo H apresentaram prejuízo na resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina (100 e 1000 pMol), quando comparados ao grupo controle. A SOC reverteu esse quadro recuperando a resposta vasodilatadora à acetilcolina (100 e 1000 pMol) nos animais HC. Nenhum efeito da SOC sobre a resposta vasodilatadora foi observada nos animais do grupo CC (Figura 4B).

Figura 4 - Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a resposta vascular vasoconstritora e vasodilatadora

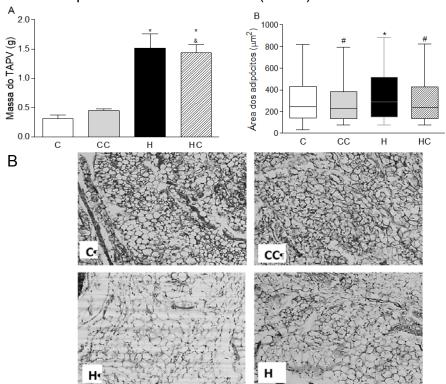


Legenda: Efeito da SOC sobre a resposta vascular do leito arterial mesentérico. (A) Resposta vasoconstritora induzida por noradrenalina (0,1 -1000 pMol). (B) Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina (1 - 1000 pMol). Os gráficos representam a média ± EPM, n = 7 - 9 animais por grupo.*p<0,05, comparado ao grupo controle; #p<0,05, comparado ao grupo H.

3.5 Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a morfologia do tecido adiposo perivascular mesentérico (TAPV)

A fim de investigar um possível papel do TAPV mesentérico na reatividade vascular do LAM, foram realizadas análises morfológicas neste tecido. Conforme esperado, observamos um aumento significativo da massa do TAPV mesentérico nos animais submetidos à dieta hiperlipídica (Figura 5A) comparado aos animais eutróficos. A SOC não afetou a massa do TAPV mesentérico nos grupos CC e HC. A análise morfológica do TAPV mesentérico demonstrou que os animais do grupo H apresentam adipócitos caracteristicamente hipertróficos, quando comparados ao grupo C (Figura 5B e C). A SOC reduziu significativamente o diâmetro dos adipócitos no TAPV mesentérico dos animais HC, contudo não foi capaz de alterar o diâmetro dos adipócitos do grupo CC (Figura 5B e C).

Figura 5 - Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a morfologia do tecido adiposo perivascular mesentérico (TAPV)

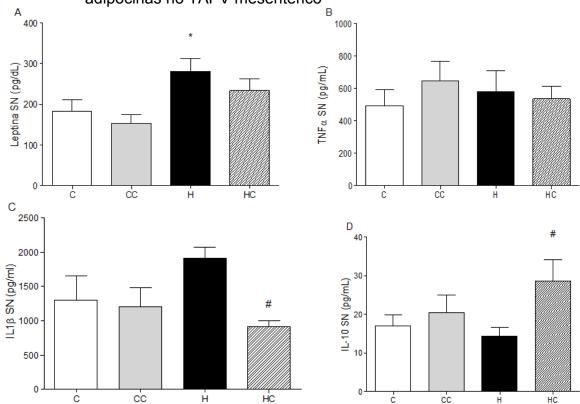


Legenda: Efeito da SOC sobre a morfologia do TAPV mesentérico. (A) Peso do tecido adiposo mesentérico (B) Diâmetro dos adipócitos (C) Histologia do Tecido adiposo mesentérico no aumento de 20X.Os gráficos representam a média ± EPM, n = 5 animais por grupo. *p<0,05 comparado ao grupo C;# p<0,05 comparado ao grupo CC.

3.6 Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a produção de adipocinas no TAPV mesentérico

A dosagem de citocinas no sobrenadante do TAPV mesentérico foi avaliada por ELISA. Como esperado, a obesidade induziu um aumento na secreção de leptina pelo TAPV mesentérico. A suplementação com óleo de chia não induziu alterações na produção de leptina nos grupos CC e HC (Figura 6A). Em relação a secreção de TNF-α, não observamos nenhuma alteração significativa entre os grupos (Figura 6B). Embora a obesidade não tenha induzido um aumento significativo na produção IL-1β pelo TAPV mesentérico, a SOC foi capaz de reduzir significativamente a secreção desta citocina no grupo HC (Figura 6C). Além disso, observamos um aumento nos níveis de IL-10 no sobrenadante do TAPV mesentérico dos animais obesos suplementados com óleo de chia (Figura 6D).

Figura 6 - Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a produção de adipocinas no TAPV mesentérico

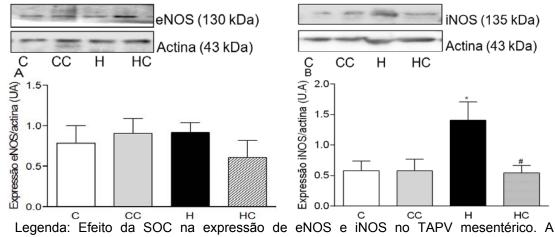


Legenda: Efeito da SOC sobre a produção de adipocinas pelo TAPV mesentérico. Os níveis de leptina (A), TNF-α (B), IL-1β (C) e IL-10 (D) no sobrenadante do TAPV mesentérico foram dosados por ELISA, após 48 horas de incubação a 37°C, 5% CO₂. Os gráficos representam a média ± EPM, n = 6-10 animais por grupo. *p≤0,05 comparado ao grupo C;*p<0,05 comparado ao grupo H.

3.7 Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a expressão de eNOS e iNOS no TAPV mesentérico

A expressão proteica de eNOS e iNOS foi avaliada no TAPV mesentérico dos animais por Western Blotting. Como mostrado na Figura 7A, não observamos alterações significativas na expressão de eNOS no TAPV mesentérico entre os grupos (Figura 7A), contudo observamos um aumento significativo da expressão de iNOS nos animais obesos (grupo H). A suplementação com óleo de chia parece proteger os animais obesos (grupo HC) do aumento da expressão de iNOS induzida pela obesidade (Figura 7B).

Figura 7 - Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a expressão de eNOS e iNOS no TAPV mesentérico



expressão proteica de eNOS (A) e iNOS (B) foi avaliada por Western Blotting. Os gráficos representam a média ± EPM, n = 5 animais por grupo.* p<0,05,

comparado ao grupo C; #p<0,05, comparado ao grupo H.

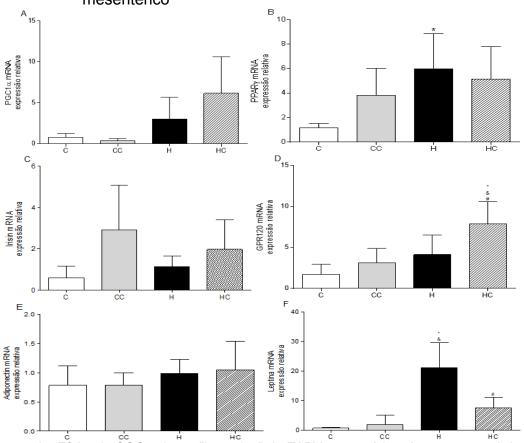
Fonte: A autora, 2019.

3.8 Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre marcadores "browning", adiponectina e leptina no TAPV mesentérico:

A fim de investigar se a suplementação dietética com óleo de chia induz o "browning" do TAPV mesentérico, avaliamos a expressão gênica dos seguintes marcadores: PGC1α, PPAR-γ, Irisina, e GPR120. Não observamos diferenças significativas na expressão do RNAm de PGC1α entre os grupos (Figura 8A). A obesidade induziu um aumento na expressão gênica de PPAR-γ no TAPV

mesentérico, contudo a suplementação com óleo de chia não promoveu nenhuma alteração na expressão de PPAR-y nos grupos CC e HC (Figura 8B). Observamos ainda que nem a obesidade, nem a suplementação com óleo de chia alteraram significativamente a expressão de Irisina (Figura 8C). A obesidade não promoveu nenhuma alteração na expressão gênica do receptor de ácido graxo polinsaturado GPR120, entretanto a suplementação com óleo de chia aumentou significativamente a expressão gênica deste receptor no grupo HC, quando comparado aos grupos C, CC e H (Figura 8D). Ao avaliarmos a expressão gênica de adiponectina no TAPV, observamos que a obesidade não induziu alterações na sua expressão, bem como a suplementação com óleo de chia (Figura 8E). Entretanto, ao avaliarmos a expressão gênica de leptina podemos observar um aumento no grupo H, comparado aos demais grupos e a suplementação com óleo de chia reduziu sua expressão no grupo HC (Figura 8F).

Figura 8 - Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre marcadores "browning", adiponectina e leptina no TAPV mesentérico



Legenda: Efeito da SOC sobre o "browning" do TAPV mesentérico. A expressão gênica de PGC1α (A), PPARγ (B), Irisina (C), GPR120 (D), Adiponectina (E) e Leptina (F) no TAPV mesentérico, foi avaliada por RT-PCR. Os gráficos representam a média ± EPM, n = 5 animais por grupo. *p≤0,05 comparado ao grupo C;*p≤0,05 comparado ao grupo H; *p≤0,05 comparado ao grupo CC.

DISCUSSÃO

Vários estudos têm demonstrado o potencial benéfico dos ácidos graxos polinsaturados ω-3 de origem animal, como EPA (ácido eicosapentaenóico) e DHA (ácido docosahexaenóico), na prevenção e tratamento das comorbidades da obesidade, tais como: dislipidemia, resistência à insulina, e doenças cardiovasculares (CAPEL et al., 2015; MARINELI et al., 2015; HUBER et al., 2007; FLACHS; ROSSMEISL; KOPECKY, 2014, KUDA et al., 2009; LI et al., 2015; Liu et al., 2014; OELRICH; DEWELL; GARDNER 2013; SPENCER et al., 2013; WILT et al., 1989; ZHAO; CHEN, 2014; VERVENIOTIS, 2018).

Além do EPA e do DHA, o ALA (ácido alfa-linolênico), uma fonte de ácido graxo ω 3 vegetal, também tem sido estudada pelos seus efeitos benéficos sobre as doenças cardiovasculares (DJOUSSE et al., 2005, ULLAH et al., 2016; MOHD et al., 2012) e o seu uso vem sendo estimulado, principalmente, devido à ausência de contaminação por metais pesados (KRÖGER; LAFORCE, 2016) e a ausência do sabor de peixe (JENKINS et al., 2009). No entanto, os estudos com esse tipo de ácido graxo ω 3 ainda são escassos.

Neste trabalho, mostramos que a suplementação com óleo de chia (SOC), uma fonte vegetal de ALA, não alterou o peso corporal nem modificou a ingestão calórica dos animais submetidos à dieta hiperlipídica. Esses resultados estão de acordo com outros estudos que também utilizaram a suplementação com óleo de chia em animais obesos (MARINELI et al., 2014, GALLEGOS et al., 2018, FONTE-FARIA et al., 2019) e com estudos que utilizaram a semente de chia (AYERZA et al., 2002; CHICCO et al., 2009; ESPADA et al., 2007; GUEVARA CRUZ et al., 2012; NIEMAN et al., 2009; OLIVA et al., 2013; ROSSI et al., 2013).

Apesar de não promover mudanças no peso corporal, a SOC induziu mudanças na composição corporal dos animais obesos, aumentando a massa magra e reduzindo a massa gorda. Esses dados corroboram um estudo publicado recentemente pelo nosso grupo, onde também demonstramos que a SOC modifica a composição corporal dos animais obesos, aumentando a massa livrre de gordura, em detrimento da massa de gordura corporal (FONTE-FARIA et al., 2019). Em humanos, entre 60-85 anos, já foi observado que a suplementação com EPA e DHA durante 26 semanas aumentou a massa muscular da coxa, sugerindo que o uso

desses ácidos graxos pode sevir como estratégia terapêutica para a sarcopenia associada ao envelhecimento (SMITH et al., 2015). Além disso, numa revisão recente, Ochi e Tsuchiya (2018) discutem que a ingestão de EPA e DHA parece inibir a perda da massa muscular em animais (GINGRAS et al., 2007; WEI et al., 2013; WEI et al., 2016; YOU et al., 2010). No entanto, nosso grupo foi o primeiro a demonstrar o papel da suplementação com o óleo de chia sobre a composição corporal na obesidade (FONTE-FARIA et al. 2019).

É sabido que o aumento da massa magra está correlacionado com uma melhora da captação de glicose, o que contribui para a reversão do quadro de resistência à insulina. Nossos dados mostram que a suplementação com óleo de chia foi capaz de reverter o quadro de resistência à insulina observado nos animais obesos, pois melhorou a captação de glicose e a tolerância à insulina. Ressaltamos ainda, o efeito benéfico da suplementação com óleo de chia sobre os níveis séricos de insulina dos animais obesos. Entretanto, em animais controle suplementados, observamos uma queda excessiva da glicemia após a injeção intraperitoneal de insulina. Essa diminuição expressiva nos levou a interromper o teste de tolerância à insulina neste grupo e levantou a hipótese que o óleo de chia poderia agir como um insulino-mimético.

Observamos ainda que os animais controle suplementados com óleo de chia apresentaram glicemia de jejum superior aos animais controle. Na literatura, poucos estudos utilizaram o protocolo de suplementação com óleo de chia em animais eutróficos. Nós sugerimos que nesses animais, a gliconeogênese (associada ao jejum) possa estar contribuindo para o aumento da glicemia observado. Estudos adicionais estão sendo conduzidos pelo nosso grupo a fim de esclarecer esses achados.

A suplementação com óleo de chia em animais obesos reduziu significativamente os níveis plasmáticos de leptina. Considerando que os níveis séricos de leptina correlacionam-se positivamente com a massa de gordura corporal e a insulinemia, assim como os três parâmetros são inversamente proporcionais aos níveis plasmáticos de ALA e adiponectina (GRAY et al., 2014).

Até o momento, nossos dados mostram que a suplementação dietética com óleo de chia na obesidade modifica a composição corporal, melhora a resposta glicêmica dos animais e diminui os níveis circulantes de leptina. A partir desses achados, avaliamos o papel da suplementação com óleo de chia sobre as alterações

cardiovasculares associadas à obesidade. Dentre os parâmetros avaliados, não observamos alterações significativas na pressão arterial, nem na frequência cardíaca entre os grupos. Nossos dados corroboram com o estudo de Bruder-Nascimento et al. (2017) no qual, após 21 semanas de dieta hiperlipídica, camundongos C57/BL6 não apresentaram aumento de pressão arterial, comparados ao grupo controle. A ausência destas alterações pode ser devido ao modelo animal utilizado, pois, embora modelos animais possam recapitular algumas das características do fenótipo humano de uma doença cardíaca, eles tipicamente não recapitulam todos os aspectos da doença cardiovascular humana (MILANI-NEJAD, 2014; HALL, 2000).

No entanto, estudos em humanos demonstraram que a mudança no perfil de ácidos graxos da dieta pode reverter o quadro hipertensivo associado a obesidade. Dentre os mecanismos envolvidos nesse efeito, destaca-se o papel estrutural desses ácidos graxos, que atuam aumentando a fluidez e melhorando a permeabilidade da membrana (CALDER, 2012; JUMP, 2012). Acredita-se também, que a ação do EPA e do DHA na diminuição da pressão arterial seja devido a competição com o ácido araquidônico (AA) pela via da cicloxigenase, o que levaria a menor produção de metabólitos com efeitos pró-hipertensivos (ZEC et al., 2019; SACERDOTI et al., 2015; SMITH et al., 2006)

Outro achado interessante do nosso estudo foi que a suplementação dietética com óleo de chia diminuiu a resposta vasoconstritora à noradrenalina e aumentou a resposta vasodilatadora a acetilcolina no leito vascular mesentérico dos animais obesos. Este achado é de grande relevância visto que alterações na reatividade vascular, como a vasodilatação endotelial, é reduzida em 40% em indivíduos obesos (STEINBERGET et al., 1996), devido a distribuição de gordura corporal, a inflamação localizada e ainda devido a resistência à insulina (PERTICONE et al., 2001; CHANTEMELE; STEPP, 2012) e um dado interessante é que em humanos obesos sem resistência a insulina, a função endotelial é preservada (EL-ASSAR et al., 2013).

Alterações morfológicas, estruturais e funcionais do TAPV já foram observadas nas principais patologias cardiovasculares associadas a obesidade, tais como: aterosclerose, hipertensão, e diabetes. Desta forma, avaliamos o papel do TAPV nas alterações vasculares induzidas pelo óleo de chia na obesidade. Inicialmente, observamos que a SOC foi capaz de reduzir o diâmetro dos adipócitos

no TAPV, sem alteração da massa deste compartimento de tecido adiposo. Na obesidade, a hipertrofia dos adipócitos no TAPV contribui para um fenótipo mais inflamatório, aumentando o número de macrófagos nesse tecido e alterando o perfil das adipocinas secretadas. A função do TAPV é significativamente alterada quando a produção de adipocinas protetoras, como a adiponectina é desregulada, enquanto fatores pró-inflamatórios, como a leptina e a IL-1β, são significativamente aumentados (ZHU et al., 2018).

Nesse sentido, observamos um aumento na produção de leptina pelo TAPV de animais obesos. Embora a suplementação com óleo de chia tenha induzido uma diminuição na expressão gênica desta adipocina, não foi capaz de reduzir significativamente seus níveis secretados. Níveis elevados de leptina no sobrenadante do TAPV já foram observados anteriormente e associados à síndrome metabólica e a disfunção na resposta vascular (PAYNE et al., 2010). Em relação a adiponectina, não observamos alterações na expressão gênica desta adipocina no TAPV entre os grupos.

Além disso, observamos que a SOC foi capaz de reduzir os níveis de IL-1β secretados pelo TAPV de animais obesos. Como dito anteriormente, a IL-1β é uma das principais citocinas secretadas pelo TAPV obeso com um papel importante na disfunção vascular e, um dos mecanismos associados ao aumento da sua produção pelo TAPV é a ativação do inflamassoma induzido por NLRP3 (ZHU et al., 2018; MARTINEZ-MICAELO et al., 2016). Adicionalmente, já foi demonstrado um efeito dos AGPI na inibição da ativação do inflamassoma induzido por NLRP3, principalmente em macrófagos e hepatócitos (LEE; MIDGETTE; SHAH, 2018; KUMAR et al., 2016; MARTINEZ-MICAELO et al., 2016; DE BOER et al., 2016; SUI et al., 2016). Com base nesses estudos, acreditamos que no nosso modelo experimental, a SOC atue prevenindo a ativação do inflamassoma no TAPV promovendo uma redução nos níveis de IL-1β secretados, contudo mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Outra citocina relacionada ao aumento da adiposidade corporal é a IL-10, uma citocina anti-inflamatória. Na obesidade, já foi descrito um aumento na secreção de IL-10 em adipócitos isolados de humanos, bem como a partir da fração vascular estromal e da matriz tecidual de tecido adiposo humano (ESPOSITO et al., 2003; FAIN et al., 2004). Entretanto, nossos resultados mostram que somente nos animais obesos suplementados com óleo de chia houve um aumento na produção de IL-10

pelo TAPV. Em um estudo recente, Dagdeviren et al. (2017) demonstraram uma associação entre a IL-10 e a prevenção da resistência à insulina no músculo esquelético de indivíduos idosos. Além disso, já foi observado que a maresina 1, um mediador lipídico pró resolutivo, induz um aumento na secreção de IL-10, melhorando a sensibilidade à insulina e atenuando a inflamação no tecido adiposo de animais geneticamente obesos (ob/ob) ou induzidos por dieta (MARTÍNEZ-FERNANDEZ et al., 2017).

Até aqui, mostramos que a suplementação com óleo de chia altera o perfil morfológico e funcional do TAPV dos animais obesos, tornando seus adipócitos menores, mais hiperplásicos, inibindo a secreção de IL-1β e induzindo a secreção de IL-10.

A partir desses resultados e, tendo em vista o papel chave do NO na regulação do peso corporal, do metabolismo energético e na função vascular (ATAWIA et al., 2019) avaliamos a expressão proteica de eNOS e iNOS no TAPV. No entanto, não observamos diferença na expressão de eNOS no TAPV entre os grupos. Cabe ressaltar que o NO produzido à partir da eNOS (em concentrações nM) induz o relaxamento de células musculares lisas vasculares, prevenindo sua proliferação excessiva, aumentando o fluxo sanguíneo e suprimindo a agregação plaquetária, além disso, inibe a ativação das células endoteliais por inibir a liberação de fatores quimiotáticos de leucócitos, impedindo a adesão de monócitos e reduzindo a infiltração de macrófagos, contribuindo dessa forma para a saúde vascular (TSAO et al.,1994; TSAO et al.,1997; LI; XIA; FÖRSTERMANN, 2015)

Em contrapartida, na obesidade, a produção de NO pela eNOS é suprimida e a iNOS expressa por adipócitos hipertróficos e macrófagos inflamatórios presentes no tecido adiposo produz concentrações elevadas (μΜ) e tóxicas de NO (SANSBURY et al., 2012; HUANG et al., 2011; JANG et al., 2016). Em nosso estudo, observamos que a obesidade induziu um aumento na expressão de iNOS no TAPV e que a SOC inibiu esse efeito. Com base no exposto acima, acreditamos que a SOC melhore a resposta vasodilatadora na obesidade por diminuir a inflamação no TAPV, inibindo a produção excessiva e deletéria do NO a partir da iNOS.

Já foi descrito que o NO produzido em baixas concentrações pela eNOS é capaz de estimular a oxidação de glicose e ácidos graxos e, inibir a gliconeogênese, a síntese de triglicerídeos e de LDL colesterol. Estes efeitos benéficos parecem estar associados ao aumento da biogênese mitocondrial, assim como ao

desenvolvimento e ativação do tecido adiposo marrom (DAI et al., 2013). Além disso, já foi observado que o NO estimula a adipogênese, por aumentar a expressão de PPAR-y (NISOLI et al., 1998).

Em nosso modelo experimental, observamos que a obesidade promoveu um aumento da expressão gênica de PPAR-y no TAPV, contudo a SOC não afetou a expressão gênica desse marcador adipogênico. Em outro trabalho publicado pelo nosso grupo, já demonstramos que a obesidade induzida por dieta hiperlipidica induz um aumento na expressão proteica de PPAR-y nas células tronco mesenquimais da medula óssea, precursoras de adipócitos (SILVA et al., 2016).

A análise dos marcadores de *browning* no TAPV, não mostrou nenhuma alteração na expressão gênica de PGC1-α (Coativador 1-α do PPAR-y), um regulador transcricional que induz a biogênese mitocondrial ao ativar diferentes fatores de transcrição, nem na expressão da irisina, uma adipomiocina secretada, principalmente, pelos músculos esqueléticos, bem como pelo tecido adiposo subcutâneo e visceral (AYDIN et al., 2014), capaz de promover o *browning*. De acordo com esses resultados, refutamos a hipótese de que a suplementação com óleo de chia na obesidade induz o *browning* do TAPV. No entanto, é importante destacar que em outro trabalho do nosso grupo observamos que a suplementação com o óleo de chia desde o desmame foi capaz de promover o *browning* (aumento da expressão de UCP-1) no TA epididimal de camundongos suíços obesos (SOUZA et al., submetido).

Uma das questões mais relevantes no que diz respeito ao mecanismo de ação dos AGPI é se eles atuam através da sua incorporação nas membranas biológicas, promovendo a síntese de mediadores lipídicos ou se atuam através de receptores celulares. Neste contexto, destacamos o GPR120, um receptor acoplado a proteína G (GPCR) sensível a AGPI-w3 (QUESADA-LÓPEZ et al., 2016). Em nosso modelo, observamos que a suplementação dietética com óleo de chia foi capaz de aumentar a expressão gênica de GPR120 no TAPV obeso. Embora não tenhamos avaliado a ativação, nem a via de sinalização downstream deste receptor, outros estudos já demonstraram que a ativação de GPR120 por AGPI-w3 está envolvida na inibição de NOX (KAZUFUMI-NAKAMURA et al., 2017) e na atenuação da inflamação vascular, formação de trombo arterial e hiperplasia da camada íntima de artérias (LI et al., 2015).

Outro ponto a ser discutido é que nosso grupo já demonstrou que a SOC aumenta a captação de glicose no músculo esquelético de animais obesos e que esse efeito é mediado pelo aumento da fosforilação de IRS-1, da ativação da via da PI3K-AKT e o aumento da translocação do GLUT4 para a membrana das células musculares (FONTE-FARIA et al., 2019). Neste estudo, corroboramos o papel da SOC na melhora da captação de glicose e na tolerância à insulina na obesidade. Outros estudos já demonstraram o papel da ativação do GPR120 na ativação da via PI3K / Akt, desencadeando a translocação de GLUT4 para a membrana celular (OH DY et al., 2010) e na melhora da tolerância à glicose e redução da hiperinsulinemia em animais obesos (OH DY et al., 2014). Tendo em vista esses achados, acreditamos que o óleo de chia induz seus efeitos à partir da ativação de GPR120 presente nas células do TAPV.

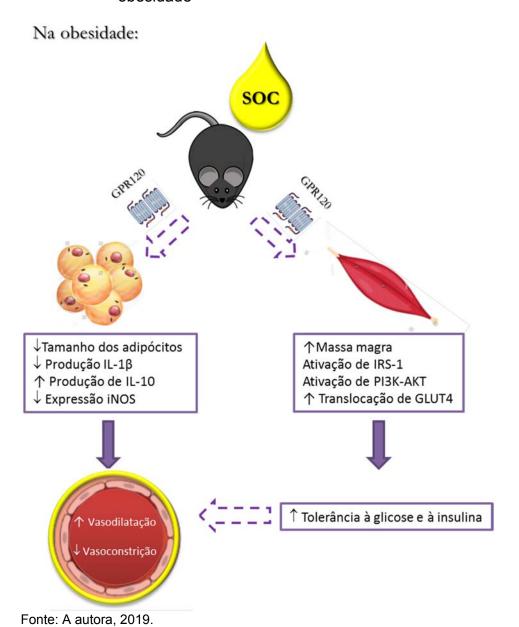
CONCLUSÃO

A correlação entre diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares é bem estabelecida na literatura. É sabido que e indivíduos diabéticos apresentam resposta vascular a noradrenalina aumentada (SOWERS, 1990; WEIDMANN et al., 1985), assim como observado em nosso trabalho nos animais obesos. As complicações macro e microvasculares induzidas pela diabetes são devidas, principalmente, à exposição prolongada à hiperglicemia, agrupada com outros fatores de risco (DEFRONZO; FERRANNINI 1991; PANENI et al., 2013). No contexto da hiperinsulinemia, as paredes vasculares tem perfil pró-inflamatório e pró-aterogênico, ao contrário do que ocorre em condições fisiológicas (LI et al., 2014).

Nesse ponto, vale ressaltar que a resistência vascular ocorre antes da resistência muscular a insulina em ratos alimentados com dieta hiperlipídica (KIM et al., 2008), sugerindo fortemente que a resistência à insulina microvascular é um evento precoce da obesidade induzida pela dieta, podendo contribuir para o desenvolvimento da resistência metabólica à insulina no músculo. Sobre o endotélio, a insulina em concentrações fisiológicas reduz a senescência endotelial induzida por glicose, que está associada à redução na produção de ROS e aumento da produção de NO (MATSUI-HIRAI et al., 2011). Podemos assim concluir que a ação da suplementação com o óleo de chia sobre a resistência a insulina tem efeito direto sobre a reatividade vascular.

Desta forma, concluímos de forma inédita que a melhora da resposta vascular observada em nosso modelo experimental de obesidade se deve a melhora do conjunto de parâmetros metabólicos e inflamatórios modificados pela SOC, possivelmente através da ativação de GPR120.

Quadro 8 - Esquema representativo para ação da SOC na obesidade



REFERÊNCIAS

A PAYNE, Gregory; D TUNE, Johnathan; D KNUDSON, Jarrod. Leptin-induced endothelial dysfunction: a target for therapeutic interventions. **Current pharmaceutical design**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 603-608, 2014.

ABEDIN, L. et al. The effects of dietary α -linolenic acid compared with docosahexaenoic acid on brain, retina, liver, and heart in the guinea pig. **Lipids**, [s. I.], v. 34, n. 5, p. 475-482, 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA. **Diretrizes brasileiras de obesidade 2016**. 4. ed. São Paulo: ABESO, 2016.

ADEVA-ANDANY, María M. et al. Subclinical vascular disease in patients with diabetes is associated with insulin resistance. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 2198-2206, May/June 2019.

AHMED, Syed U. et al. Effects of various process parameters on the production of γ -linolenic acid. In: ANDERSEN, Lene Frost et al. Evaluation of a food frequency questionnaire with weighed records, fatty acids, and alpha-tocopherol in adipose tissue and serum. **American journal of epidemiology**, [s. l.], v. 150, n. 1, p. 75-87, 1999.

ALMABROUK, Tarek A. M. et al. High fat diet attenuates the anticontractile activity of aortic PVAT via a mechanism involving AMPK and reduced adiponectin secretion. **Frontiers in physiology**, [s. I.], v. 9, p. 51, 2018.

AL-SHORMAN, Alaa; AL-DOMI, Hayder; FAQIH, Ahmad. Markers of subclinical atherosclerosis in schoolchildren with obesity and metabolic syndrome. **Swiss medical weekly**, [s. l.], v. 147, n. 2122, 2017.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. **What is cardiovascular disease?** 2017. Disponível em: http://www.heart.org/HEARTORG/Caregiver/Resources/WhatisCardiovascularDisease/What-is-Cardiovascular-Disease_UCM_301852_Article.jsp#.WKXyOTsrLcc Acesso em: 2 maio 2018.

ANASTASILAKIS, Athanasios D. et al. Circulating irisin in healthy, young individuals: day-night rhythm, effects of food intake and exercise, and associations with gender, physical activity, diet, and body composition. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s. I.], v. 99, n. 9, p. 3247-3255, 2014.

ANDERSSOHN, Maike et al. Asymmetric dimethylarginine as a mediator of vascular dysfunction and a marker of cardiovascular disease and mortality: an intriguing interaction with diabetes mellitus. **Diabetes and Vascular Disease Research**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 105-118, 2010.

ANTUNA-PUENTE, B. et al. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. **Diabetes & metabolism**, v. 34, n. 1, p. 2-11, 2008.

ARAUJO, Hygor Nunes. Papel do tecido adiposo perivascular em aorta de ratos treinados e alimentados com dieta hiperlipídica. 2015. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Motricidade) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquista Filho, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2015.

ARCHER, Stephen L. et al. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in human internal mammary artery is 11, 12-epoxyeicosatrienoic acid and causes relaxation by activating smooth muscle BKCa channels. **Circulation**, [s. l.], v. 107, n. 5, p. 769-776, 2003.

ASTERHOLM, Ingrid Wernstedt et al. Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. **Cell metabolism**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 103-118, 2014.

ATAWIA, Reem T. et al. Mechanisms of obesity-induced metabolic and vascular dysfunctions. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, [s. I.], v. 24, p. 890, 2019.

AVEZUM, A.; MAIA, Lilia Nigro; NAKAZONE, Marcelo. Cenário das doenças cardiovasculares no mundo moderno. In: AVEZUM, A.; MAIA, Lilia Nigro; NAKAZONE, Marcelo. **Manual de cardiologia.** São Paulo: Atheneu, 2012. p. 1-5.

AYDIN, Suleyman et al. A comprehensive immunohistochemical examination of the distribution of the fat-burning protein irisin in biological tissues. **Peptides**, [s. l.], v. 61, p. 130-136, 2014.

AYERZA, R.; COATES, W. Composition of chia (Salvia hispanica) grown in six tropical and subtropical ecosystems of South America. **Tropical Science**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 131-135, 2004.

AYERZA, R.; COATES, Wayne. Dietary levels of chia: influence on hen weight, egg production and sensory quality, for two strains of hens. **British Poultry Science**, [s. I.], v. 43, n. 2, p. 283-290, 2002.

AYERZA, Ricard; COATES, Wayne; LAURIA, M. Chia seed (Salvia hispanica L.) as an omega-3 fatty acid source for broilers: influence on fatty acid composition, cholesterol and fat content of white and dark meats, growth performance, and sensory characteristics. **Poultry Science**, [s. I.], v. 81, n. 6, p. 826-837, 2002.

AYERZA, Ricardo. The seed's protein and oil content, fatty acid composition, and growing cycle length of a single genotype of chia (Salvia hispanica L.) as affected by environmental factors. **Journal of Oleo Science**, [s. I.], v. 58, n. 7, p. 347-354, 2009.

AYERZA, Ricardo; COATES, Wayne E. Chia seeds and the Columbus concept. In: DEMEESTER, Fabien (Ed.) **Wild-Type Food in Health Promotion and Disease Prevention**. Totowa: Humana, 2008. p. 377-392.

AYERZA, Ricardo; COATES, Wayne.Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. **Nutrition Research**, [s. l.], v. 25, n. 11, p. 995-1003, 2005.

BAKER, Ella J. et al. Metabolism and functional effects of plant-derived omega-3 fatty acids in humans. **Progress in lipid research**, [s. l.], v. 64, p. 30-56, 2016.

BANG, H. O.; DYERBERG, J.; NIELSEN, AaseBrondum. Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos. **The Lancet**, [s. l.], v. 297, n. 7710, p. 1143-1146, 1971.

BANG, H. O.; DYERBERG, Jørn. Plasma lipids and lipoproteins in Greenlandic west coast Eskimos. **Journal of Internal Medicine**, [s. I.], v. 192, n. 1-6, p. 85-94, 1972.

BATSIS, John A. et al. Dynapenic obesity and the effect on long-term physical function and quality of life: data from the osteoarthritis initiative. **BMC geriatrics**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 118, 2015.

BAUER, M. et al. Carotid intimamedia thickness as a biomarker of subclinical atherosclerosis. **Swiss Med Wkly**, [s. l.], v.142, 13705-13754, 2012

BELTOWSKI, Jerzy; JAZMROZ-WISNIEWSKA, Anna. Transactivation of ErbB receptors by leptin in the cardiovascular system: mechanisms, consequences and target for therapy. **Currentpharmaceutical design**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 616-624, 2014.

BELTRÁN-OROZCO, M. C.; ROMERO, M. R. Chía, alimento milenario. **Revista Industria Alimentaria.**, p. 20-29, Sept./Oct. 2003.

BITAR, Milad S. et al. Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. **Europeanjournal of pharmacology**, [s. l.], v. 511, n. 1, p. 53-64, 2005.

BLÜHER, M. et al. Association of interleukin-6, C-reactive protein, interleukin-10 and adiponectin plasma concentrations with measures of obesity, insulin sensitivity and glucose metabolism. **Experimental and clinical endocrinology & diabetes**, [s. l.], v. 113, n. 09, p. 534-537, 2005.

BOSTRÖM, Pontus et al. A PGC1-α-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature**, [s. l.], v. 481, n. 7382, p. 463, 2012.

BOUSSEROUEL, Souad et al. Different effects of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on the activation of rat smooth muscle cells by interleukin-1β. **Journal of lipid research**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 601-611, 2003.

BOWEN, Raffick AR; CLANDININ, Michael T. High dietary 18: 3n-3 increases the 18: 3n-3 but not the 22: 6n-3 content in the whole body, brain, skin, epididymal fat pads, and muscles of suckling rat pups. **Lipids**, [s. I.], v. 35, n. 4, p. 389-394, 2000.

BRAMLAGE, Peter et al. Hypertension in overweight and obese primary care patients is highly prevalent and poorly controlled. **American journal of hypertension**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 904-910, 2004.

BREANNE, Anderson, M.; MA, David WL. Are all n 3 polyunsaturated fatty acids created equal? **Lipids in Health and Disease**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1, 2009.

BRUDER-NASCIMENTO, Thiago et al. Long term high fat diet treatment: an appropriate approach to study the sex-specificity of the autonomic and cardiovascular responses to obesity in mice. **Frontiers in physiology**, [s. l.], v. 8, p. 32, 2017.

BURDGE, Graham C.; JONES, Amanda E.; WOOTTON, Stephen A. Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of α -linolenic acid metabolism in young men. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 4, p. 355-363, 2002.

BURDGE, Graham C.; WOOTTON, Stephen A. Conversion of α-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 88, n. 4, p. 411-420, 2002.

BURR, George O.; BURR, Mildred M. On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 86, n. 2, p. 587-621, 1930.

BUSILACCHI, Héctor et al. Evaluación de Salvia hispanica L. cultivada enelsur de Santa Fe (República Argentina). **Cultivos tropicales**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 55-59, 2013.

CAHILL, Joseph P. Ethnobotany of chia, Salvia hispanica L. (Lamiaceae). **EconomicBotany**, [s. l.], v. 57, n. 4, p. 604-618, 2003.

CAHILL, Joseph P. Ethnobotany of chia, Salvia hispanica L.(Lamiaceae). **Economic Botany**, [s. I.], v. 57, n. 4, p. 604-618, 2003.

CAPEL, Frédéric et al. DHA at nutritional doses restores insulin sensitivity in skeletal muscle by preventing lipotoxicity and inflammation. **The Journal of nutritional biochemistry**, [s. l.], v. 26, n. 9, p. 949-959, 2015.

CERMENATI, Gaia et al. Lack of sterol regulatory element binding factor-1c imposes glial Fatty Acid utilization leading to peripheral neuropathy. **Cell metabolism**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 571-583, 2015.

CHAN, Joanna K. et al. Effect of dietary α -linolenic acid and its ratio to linoleic acid on platelet and plasma fatty acids and thrombogenesis. **Lipids**, [s. l.], v. 28, n. 9, p. 811-817, 1993.

CHANDRAN, Manju et al. Adiponectin: more than just another fat cell hormone?. **Diabetes care**, [s. l.], v. 26, n. 8, p. 2442-2450, 2003.

DIEZ, Juan J.; IGLESIAS, Pedro. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. **European Journal of endocrinology**, [s. l.], v. 148, n. 3, p. 293-300, 2003.

CHANG, Jae Seung et al. Circulating irisin levels as a predictive biomarker for sarcopenia: A cross-sectional community-based study. **Geriatrics & gerontology international**, [s. l.], v. 17, n. 11, p. 2266-2273, 2017.

CHEN, Kun et al. Transcription factor C/EBP β promotes the transcription of the porcine GPR120 gene. **Journal of molecular endocrinology**, [s. l.], v. 56, n. 2, p. 91-100, 2016.

CHICCO, Adriana G. et al. Dietary chia seed (Salvia hispanica L.) rich in α linolenic acid improves adiposity and normaliseshypertriacylglycerolaemia and insulin resistance in dyslipaemic rats. **British journal of nutrition**, [s. l.], v. 101, n. 01, p. 41-50, 2009.

CHOI, Kyung Mook. Sarcopenia and sarcopenic obesity. **Endocrinology and Metabolism**, [s. I.], v. 28, n. 2, p. 86-89, 2013.

CHOI, Kyung Mook. The impact of organokines on insulin resistance, inflammation, and atherosclerosis. **Endocrinology and Metabolism**, [s. I.], v. 31, n. 1, p. 1-6, 2016.

CINTRA, Dennys E. et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. **PloS one**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. e30571, 2012.

CODOÑER-FRANCH, Pilar et al. Nitric oxide production is increased in severely obese children and related to markers of oxidative stress and inflammation. **Atherosclerosis**, [s. l.], v. 215, n. 2, p. 475-480, 2011.

COTMAN, Carl W.; MCGAUGH, James L. **Behavioral neuroscience:** An introduction. Cambridge: Academic Press, 2014.

DA SILVA MARINELI, Rafaela et al. Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (Salvia hispanica L.). **LWT-Food Science and Technology**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 1304-1310, 2014.

DAGDEVIREN, Sezin et al. IL-10 prevents aging-associated inflammation and insulin resistance in skeletal muscle. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 701-710, 2016.

DASHWOOD, Michael R. et al. Does periadventitial fat-derived nitric oxide play a role in improved saphenous vein graft patency in patients undergoing coronary artery bypass surgery?. **Journal of vascular research**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 175-181, 2007.

DE CHANTEMELE, Eric J. Belin; STEPP, David W. Influence of obesity and metabolic dysfunction on the endothelial control in the coronary circulation. **Journal of molecular and cellular cardiology**, [s. I.], v. 52, n. 4, p. 840-847, 2012.

PERTICONE, Francesco et al. Obesity and body fat distribution induce endothelial dysfunction by oxidative stress: protective effect of vitamin C. **Diabetes**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 159-165, 2001.

DE VOS, Piet et al. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. **Nature**, [s. l.], v. 377, n. 6549, p. 527-529, Oct. 1995.

DEFRONZO, Ralph A.; FERRANNINI, Eleuterio. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. **Diabetes care**, v. 14, n. 3, p. 173-194, 1991.

DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL; EPIDEMIOLOGY OF DIABETES INTERVENTIONS AND COMPLICATIONS RESEARCH GROUP. Intensive diabetes therapy and carotid intima—media thickness in type 1 diabetes mellitus. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 348, n. 23, p. 2294-2303, 2003.

DIWAKAR, Ganesh et al. Inhibitory effect of a novel combination of Salvia hispanica (chia) seed and Punicagranatum (pomegranate) fruit extracts on melanin production. **Fitoterapia**, [s. I.], v. 97, p. 164-171, 2014.

DONATO, Anthony J. et al. TNF-α impairs endothelial function in adipose tissue resistance arteries of mice with diet-induced obesity. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, [s. l.], v. 303, n. 6, p. H672-H679, 2012.

DONG, Maolong; REN, Jun. What fans the fire: insights into mechanisms of leptin in metabolic syndrome-associated heart diseases. **Current pharmaceutical design**, [s. I.], v. 20, n. 4, p. 652-658, 2014.

DUBROVSKA, Galyna et al. Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, [s. I.], v. 286, n. 3, p. H1107-H1113, 2004.

DYERBERG, J.; BANG, H. O.; HJORNE, N. Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. **The American journal of clinical nutrition**, [s. l.], v. 28, n. 9, p. 958-966, 1975.

EASTGATE, J. A.; SYMONS, J. A.; DUFF, G. W. Identification of an interleukin-1 beta binding protein in human plasma. **FEBS letters**, [s. I.], v. 260, n. 2, p. 213-216, 1990.

EL ASSAR, Mariam et al. Preserved endothelial function in human obesity in the absence of insulin resistance. **Journal of translational medicine**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 263, 2013.

EMKEN, Edward A.; ADLOF, Richard O.; GULLEY, R. Michael. Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. **BiochimicaetBiophysicaActa (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, [s. l.], v. 1213, n. 3, p. 277-288, 1994.

ESPADA, C. E. et al. Effect of Chia oil (Salvia Hispanica) rich in ω 3 fatty acids on the eicosanoid release, apoptosis and T-lymphocyte tumor infiltration in a murine mammary gland adenocarcinoma. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, [s. I.], v. 77, n. 1, p. 21-28, 2007.

FAIN, John N. et al. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. **Endocrinology**, [s. l.], v. 145, n. 5, p. 2273-2282, 2004.

FERNÁNDEZ-ALFONSO, Maria S. et al. Mechanisms of perivascular adipose tissue dysfunction in obesity. **International journal of endocrinology**, [s. l.], 2013. DOI: 10.1155/2013/402053.

FERNÁNDEZ-REAL, José Manuel; RICART, Wifredo. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. **Endocrine reviews**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 278-301, 2003.

FÉSÜS, Gábor et al. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. **Cardiovascular research**, [s. l.], v. 75, n. 4, p. 719-727, 2007.

FITZGIBBONS, Timothy P. et al. Similarity of mouse perivascular and brown adipose tissues and their resistance to diet-induced inflammation. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, [s. l.], v. 301, n. 4, p. H1425-H1437, 2011.

FLACHS, P.; ROSSMEISL, M.; KOPECKY, J.The effect of n3 fatty acids on glucose homeostasis and insulin sensitivity. **Physiological Research**, [s. l.], v. 63, p. S93, 2014

FONTE-FARIA, Thaís et al. Chia oil supplementation changes body composition and activates insulin signaling cascade in skeletal muscle tissue of obese animals. **Nutrition**, [s. l.], v. 58, p. 167-174, 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Fats and fatty acids in human nutrition: Report of an expert consultation. **FAO Food Nutr Pap.**, [s. l.], v. 91, p. 1-166, 2010. Disponível em: http://www.fao.org/3/a-i1953e.pdf

FRAYN, K. N.; KARPE, F. Regulation of human subcutaneous adipose tissue blood flow. **International journal of obesity**, [s. l.], v. 38, n. 8, p. 1019, 2014.

FREDRIKSSON, Robert et al. Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. **FEBS letters**, [s. l.], v. 554, n. 3, p. 381-388, 2003.

GALIC, Sandra; OAKHILL, Jon S.; STEINBERG, Gregory R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Molecular and cellular endocrinology**, [s. I.], v. 316, n. 2, p. 129-139, 2010.

GALLEGOS, Sixto Reyna et al. Adding a purple corn extract in rats supplemented with chia oil decreases gene expression of SREBP-1c and retains $\Delta 5$ and $\Delta 6$ hepatic desaturase activity, unmodified the hepatic lipid profile. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, [s. l.], v. 132, p. 1-7, 2018.

GÁLVEZ, Beatriz et al. Perivascular adipose tissue and mesenteric vascular function in spontaneously hypertensive rats. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 1297-1302, 2006.

GALVEZ-PRIETO, B. et al. Comparative expression analysis of the renin—angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue. **Journal of Endocrinology**, [s. l.], v. 197, n. 1, p. 55-64, 2008.

GÁLVEZ-PRIETO, Beatriz et al. Anticontractile effect of perivascular adipose tissue and leptin are reduced in hypertension. **Frontiers in pharmacology**, [s. l.], v. 3, p. 103, 2012.

GAO, Yu-Jing et al. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. **British journal of pharmacology**, v. 151, n. 3, p. 323-331, 2007.

GAO, Yu-Jing et al. Perivascular adipose tissue modulates vascular function in the human internal thoracic artery. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**, [s. l.], v. 130, n. 4, p. 1130-1136, 2005.

GARRISON, Robert J. et al. Incidence and precursors of hypertension in young adults: the Framingham Offspring Study. **Preventive medicine**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 235-251, 1987.

GHANTOUS, C. M. et al. Differential role of leptin and adiponectin in cardiovascular system. **International journal of endocrinology**, [s. l.], v. 2015, 2015.

GIL-ORTEGA, Marta et al. Imbalance between pro and anti-oxidant mechanisms in perivascular adipose tissue aggravates long-term high-fat diet-derived endothelial dysfunction. **PLoS One**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. e95312, 2014.

GINGRAS, Andrée-Anne et al. Long-chain omega-3 fatty acids regulate bovine whole-body protein metabolism by promoting muscle insulin signalling to the Akt–mTOR–S6K1 pathway and insulin sensitivity. **The Journal of physiology**, [s. l.], v. 579, n. 1, p. 269-284, 2007.

GOTOH, Chizu et al. The regulation of adipogenesis through GPR120. **Biochemical and biophysical research communications**, [s. l.], v. 354, n. 2, p. 591-597, 2007.

GOYENS, Petra LL et al. Conversion of α -linolenic acid in humans is influenced by the absolute amounts of α -linolenic acid and linoleic acid in the diet and not by their ratio—. **The American journal of clinical nutrition**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 44-53, 2006.

GRAY, Belinda et al. Liver function parameters, cholesterol, and phospholipid α linoleic acid are associated with adipokine levels in overweight and obese adults. **Nutrition Research**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 375-382, 2014.

GRUZDEVA, Olga et al. Relationship between epicardial and perivascular fatty tissue and adipokine-cytokine level in coronary artery disease patients. **PloS one**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. e0208156, 2019.

GUEVARA CRUZ, Martha et al.A dietary pattern including nopal, chia seed, soy protein, and oat reduces serum triglycerides and glucose intolerance in patients with metabolic syndrome. **The Journal of nutrition**, v. 142, n. 1, p. 64-69, 2012.

GUSTAFSON, Birgit et al. Insulin resistance and impaired adipogenesis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 193-200, 2015.

HALL, J. E. et al. Role of sympathetic nervous system and neuropeptides in obesity hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 605-618, 2000.

HANSEN, Arild E. et al. Role of linoleic acid in infant nutrition: clinical and chemical study of 428 infants fed on milk mixtures varying in kind and amount of fat. **Pediatrics**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 171-192, 1963.

HARRIS, William S. et al. Towards establishing dietary reference intakes for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. **The Journal of nutrition**, [s. l.], v. 139, n. 4, p. 804S-819S, 2009.

HAZRA, Sugata et al. Impact of high-fat diet on vasoconstrictor reactivity of white and brown adipose tissue resistance arteries. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, [s. l.], v. 316, n. 3, p. H485-H494, 2018.

HENRY, Ronald MA et al. Arterial stiffness increases with deteriorating glucose tolerance status: the Hoorn Study. **Circulation**, [s. l.], v. 107, n. 16, p. 2089-2095, 2003.

HIRAFUJI, Masahiko et al. Cardiovascular protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids with special emphasis on docosahexaenoic acid. **Journal of pharmacological sciences**, [s. l.], v. 92, n. 4, p. 308-316, 2003.

HIRASAWA, Akira et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. **Nature medicine**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 90, 2005.

HOTAMISLIGIL, Gökhan S. et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-α-and obesity-induced insulin resistance. **Science**, [s. l.], v. 271, n. 5249, p. 665-670, 1996.

HOUWELINGEN, A. C.; STOCKBRÜGGER, R. W.; BRUMMER, R.-JM. Fat intake and fatty acid profile in plasma phospholipids and adipose tissue in patients with Crohn's disease, compared with controls. **The American journal of gastroenterology**, [s. I.], v. 94, n. 2, p. 410-417, 1999.

HUANG, Kan et al. The short-term consumption of a moderately high-fat diet alters nitric oxide bioavailability in lean female Zucker rats. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, [s. l.], v. 89, n. 4, p. 245-257, 2011.

HUBER, J. et al. Prevention of high fat diet induced adipose tissue remodeling in obese diabetic mice by n 3 polyunsaturated fatty acids. **International journal of obesity**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 1004-1013, 2007.

HUDSON, Brian D. et al. The pharmacology of TUG-891, a potent and selective agonist of the free fatty acid receptor 4 (FFA4/GPR120), demonstrates both potential opportunity and possible challenges to therapeutic agonism. **Molecular pharmacology**, [s. l.], v. 84, n. 5, p. 710-725, 2013.

IBRAHIM, Ahamed et al. Substituting dietary linoleic acid with α-linolenic acid improves insulin sensitivity in sucrose fed rats. **BiochimicaetBiophysicaActa** (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, [s. l.], v. 1733, n. 1, p. 67-75, 2005.

IBRAHIM, M. Mohsen. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obesity reviews**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 11-18, 2010.

ICHIMURA, Atsuhiko et al. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. **Nature**, [s. l.], v. 483, n. 7389, p. 350, 2012.

INSTITUTE OF MEDICINE, FOOD AND NUTRITION BOARD. **Dietary reference** intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (macronutrients). Washington, DC: National Academy Press, 2005.

IXTAINA, V. Y. et al. Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 166-174, 2011.

IYAMA, Kenichi; OHZONO, Kenji; USUKU, Gentaro. Electron microscopical studies on the genesis of white adipocytes: differentiation of immature pericytes into adipocytes in transplanted preadipose tissue. **VirchowsArchiv B**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 143, 1979.

JANG, Jung Eun et al. Nitric oxide produced by macrophages inhibits adipocyte differentiation and promotes profibrogenic responses in preadipocytes to induce adipose tissue fibrosis. **Diabetes**, [s. l.], v. 65, n. 9, p. 2516-2528, 2016.

JENKINS, David JA et al. Are dietary recommendations for the use of fish oils sustainable? **Canadian Medical Association Journal**, [s. l.], v. 180, n. 6, p. 633-637, 2009.

JEONG, Se Kyoo et al. Effectiveness of topical chia seed oil on pruritus of end stage renal disease (ESRD) patients and healthy volunteers. **Annals of dermatology**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 143-148, 2010.

JIN, Fuxia et al. Supplementation of milled chia seeds increases plasma ALA and EPA in postmenopausal women. **Plant Foods For Human Nutrition**, [s. l.], v. 67, n. 2, p. 105-110, 2012.

JORDAN, Jens et al. Joint statement of the European Association for the Study of Obesity and the European Society of Hypertension: obesity and difficult to treat arterial hypertension. **Journal of hypertension**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 1047-1055, 2012.

JUGE-AUBRY, Cristiana E.; HENRICHOT, Elvire; MEIER, Christoph A. Adipose tissue: a regulator of inflammation. **Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism**, [s. I.], v. 19, n. 4, p. 547-566, 2005.

JUNG, R. T. Obesity as a disease. **British medical bulletin**, [s. l.], v. 53, n.2, p.307-321, 1997

KAHN, Barbara B.; FLIER, Jeffrey S. Obesity and insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 106, n. 4, p. 473-481, 2000.

KAJBAF, Mohammad Hossein et al. Does Omega-3 supplementation decrease carotid intima-media thickening in hemodialysis patients? **Journal of research in pharmacy practice,** [s. l.], v. 5, n. 4, p. 252, 2016.

KANDA, Hajime et al. MCP 1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **The Journal of clinical investigation**, [s. I.], v. 116, n. 6, p. 1494-1505, 2006

KANNEL, William B. et al. The relation of adiposity to blood pressure and development of hypertension: the Framingham study. **Annals of internal medicine**, [s. l.], v. 67, n. 1, p. 48-59, 1967.

KARMAZYN, Morris; RAJAPUROHITAM, Venkatesh. Leptin as a cardiac prohypertrophic factor and its potential role in the development of heart failure. **Current pharmaceutical design**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 646-651, 2014.

KATSIKI, Niki; MIKHAILIDIS, Dimitri P.; BANACH, Maciej. Leptin, cardiovascular diseases and type 2 diabetes mellitus. **Acta Pharmacologica Sinica**, [s. l.], v. 39, n. 7, p. 1176, 2018.

KAUTZKY-WILLER, A. et al. Increased plasma leptin in gestational diabetes. **Diabetologia**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 164-172, 2001.

KIM, Francis et al. Vascular inflammation, insulin resistance, and reduced nitric oxide production precede the onset of peripheral insulin resistance. **Arteriosclerosis**, **thrombosis**, **and vascular biology**, [s. l.], v. 28, n. 11, p. 1982-1988, 2008.

KIM, Jong In et al. Lipid overloaded enlarged adipocytes provoke insulin resistance independent of inflammation. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 35, n. 10, p. 1686-1699, 2015

KIM, Jong In et al. Lipid overloaded enlarged adipocytes provoke insulin resistance independent of inflammation. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 35, n. 10, p. 1686-1699, 2015.

KO, Byung-Joon et al. Diet quality and diet patterns in relation to circulating cardiometabolic biomarkers. **Clinical nutrition**, [s. I.], v. 35, n. 2, p. 484-490, 2016.

KREMER, Joel M. Effects of modulation of inflammatory and immune parameters in patients with rheumatic and inflammatory disease receiving dietary supplementation of n-3 and n-6 fatty acids. **Lipids**, [s. I.], v. 31, n. 1, p. S243-S247, 1996.

KRÖGER, Edeltraut; LAFORCE, Robert. Fish consumption, brain mercury, and neuropathology in patients with Alzheimer disease and dementia. **Jama**, [s. l.], v. 315, n. 5, p. 465-466, 2016.

KUDA, Ondrej et al. n 3 fatty acids and rosiglitazone improve insulin sensitivity through additive stimulatory effects on muscle glycogen synthesis in mice fed a high fat diet. **Diabetologia**, [s. l.], v. 52, n. 5, p. 941-951, 2009

KUSTERS, Dorothé M. et al. Carotid intima-media thickness in children with familial hypercholesterolemia. **Circulation research**, [s. l.], v. 114, n. 2, p. 307-310, 2014.

LA CAVA, Antonio; ALVIGGI, Carlo; MATARESE, Giuseppe. Unraveling the multiple roles of leptin in inflammation and autoimmunity. **Journal of molecular medicine**, [s. I.], v. 82, n. 1, p. 4-11, 2004

LANDSBERG, Lewis et al. Obesity-related hypertension: Pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment—A position paper of the The Obesity Society and the American Society of Hypertension. **Obesity**, [s. I.], v. 21, n. 1, p. 8-24, 2013.

LAVIE, Carl J.; MILANI, Richard V.; VENTURA, Hector O. Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss. **Journal of the American college of cardiology**, [s. l.], v. 53, n. 21, p. 1925-1932, 2009.

LEE, Duck-chul et al. Physical activity and sarcopenic obesity: definition, assessment, prevalence and mechanism. **Future science OA**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. FSO127, 2016.

LEE, Mi-Jeong; WU, Yuanyuan; FRIED, Susan K. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. **Molecular aspects of medicine**, [s. I.], v. 34, n. 1, p. 1-11, 2013.

LEE, Yun Sok et al. Inflammation is necessary for long term but not short term high fat diet—induced insulin resistance. **Diabetes**, [s. l.], v. 60, n. 10, p. 2474-2483, 2011.

- LEFTEROVA, Martina I. et al. Cell-specific determinants of peroxisome proliferatoractivated receptor γ function in adipocytes and macrophages. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 30, n. 9, p. 2078-2089, 2010.
- LESNIEWSKI, Lisa A. et al. Dietary rapamycin supplementation reverses age-related vascular dysfunction and oxidative stress, while modulating nutrient-sensing, cell cycle, and senescence pathways. **Aging cell**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 17-26, 2017.
- LI, Guolian et al. Insulin and insulin-like growth factor-I receptors differentially mediate insulin-stimulated adhesion molecule production by endothelial cells. **Endocrinology**, [s. I.], v. 150, n. 8, p. 3475-3482, 2009.
- LI, Huige; XIA, Ning; FÖRSTERMANN, Ulrich. Nitric Oxide Synthesis in Vascular Physiology and Pathophysiology. In: SCHMIDT, Mirko; LIEBNER, Stefan (ed.). **Endothelial Signaling in Development and Disease**. New YorK: Springer, 2015. p. 381-397.
- LI, Meng-Ying et al. Dietary fish oil inhibits mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in diabetic rats by blocking nuclear factor κB mediated inflammatory pathways. **The Journal of nutritional biochemistry**, [s. l.], v. 26, n. 11, p. 1147-1155, 2015.
- LI, Xinzhi et al. Endogenously Generated Omega-3 Fatty Acids Attenuate Vascular Inflammation and Neointimal Hyperplasia by Interaction With Free Fatty Acid Receptor 4 in Mice. **Journal of the American Heart Association**, [s. I.], v. 4, n. 4, p. e001856, 2015.
- LIM, Soo; ECKEL, Robert H. Pharmacological treatment and therapeutic perspectives of metabolic syndrome. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, [s. I.], v. 15, n. 4, p. 329-341, 2014.
- LIN, Lian-Yu et al. Nitric oxide production is paradoxically decreased after weight reduction surgery in morbid obesity patients. **Atherosclerosis**, [s. l.], v. 190, n. 2, p. 436-442, 2007.
- LIN, Yu Hong et al. Compartmental analyses of 2H5-α-linolenic acid and CU-eicosapentaenoic acid toward synthesis of plasma labeled 22: 6n- 3 in newborn term infants—. **The American journal of clinical nutrition**, v. 92, n. 2, p. 284-293, 2010.
- LIU, Menghan et al. PPAR α independent actions of omega 3 PUFAs contribute to their beneficial effects on adiposity and glucose homeostasis. **Scientific reports**, [s. l.], v. 4, 2014. DOI: 10.1038/srep05538.
- LÖHN, Matthias et al. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 1057-1063, 2002.

LÖHN, Matthias et al. Regulation of calcium sparks and spontaneous transient outward currents by RyR3 in arterial vascular smooth muscle cells. **Circulation research**, [s. I.], v. 89, n. 11, p. 1051-1057, 2001.

LUMENG, Carey N. et al. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet induced obesity. **Diabetes**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 16-23, 2007

MARINELI, Rafaela et al. Chia (Salvia hispanica L.) enhances HSP, PGC 1α expressions and improves glucose tolerance in diet induced obese rats. **Nutrition**, [s. I.], v. 31, n. 5, p. 740-748, 2015

MARQUARDT, Andreas et al. cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. **Genomics**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 175183, 2000

MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, Leyre et al. Maresin 1 improves insulin sensitivity and attenuates adipose tissue inflammation in ob/ob and diet-induced obese mice. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 2135-2145, 2017.

MATHIEU, Patrick et al. Visceral obesity: the link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease. **Hypertension**, [s. l.], v. 53, n. 4, p. 577-584, 2009.

MATSUI-HIRAI, Hisako et al. Dose-dependent modulatory effects of insulin on glucose-induced endothelial senescence in vitro and in vivo: a relationship between telomeres and nitric oxide. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 337, n. 3, p. 591-599, 2011.

MCDERMOTT, Mary M. et al. Community walking speed, sedentary or lying down time, and mortality in peripheral artery disease. **Vascular Medicine**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 120-129, 2016.

MEIJER, Rick I. et al. Perivascular adipose tissue and its role in type 2 diabetes and cardiovascular disease. **Current diabetes reports**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 211-217, 2011.

MENDOZA, Walter; MIRANDA, J. Jaime.Global shifts in cardiovascular disease, the epidemiologic transition, and other contributing factors: toward a new practice of global health cardiology. **Cardiologyclinics**, [s. I.], v. 35, n. 1, p. 1-12, 2017.

MIGLIAVACCA, R. A. et al. O cultivo da chia no Brasil: futuro e perspectivas. **Journal of Agronomic sciences**, [s. l.], v. 3, p. 161-179, 2014.

MILANI-NEJAD, Nima; JANSSEN, Paul ML. Small and large animal models in cardiac contraction research: advantages and disadvantages. **Pharmacology & therapeutics**, [s. I.], v. 141, n. 3, p. 235-249, 2014.

MILIĆ, Sandra; LULIĆ, Davorka; ŠTIMAC, Davor. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. **World journal of gastroenterology: WJG**, [s. l.], v. 20, n. 28, p. 9330, 2014.

MIYAUCHI, Satoshi et al. Distribution and regulation of protein expression of the free fatty acid receptor GPR120. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, [s. l.], v. 379, n. 4, p. 427-434, 2009.

MOLENDI-COSTE, Olivier; LEGRY, Vanessa; LECLERCQ, Isabelle A. Why and how meet n-3 PUFA dietary recommendations?. **Gastroenterology research and practice**, [s. l.], v. 2011, p. 1-11, 2011.

MUREDDA, Laura et al. IL-1 β and TNF α inhibit GPR120 (FFAR4) and stimulate GPR84 (EX33) and GPR41 (FFAR3) fatty acid receptor expression in human adipocytes: implications for the anti-inflammatory action of n-3 fatty acids. **Archives of physiology and biochemistry**, [s. I.], v. 124, n. 2, p. 97-108, 2018.

NAE, S. et al. Human adipose-derived stem cells: definition, isolation, tissue-engineering applications. **Rom J MorpholEmbryol**, [s. l.], v. 54, n. 4, p. 919-924, 2013.

NAKAMURA, Kazufumi et al. Eicosapentaenoic acid prevents arterial calcification in klotho mutant mice. **PloS one**, [s. I.], v. 12, n. 8, p. e0181009, 2017.

NAVA, Eduardo; LLORENS, Silvia. The local regulation of vascular function: from an inside-outside to an outside-inside model. **Frontiers in Physiology**, [s. I.], v. 10, p. 729, 2019.

DONATO, Anthony J. et al. TNF-α impairs endothelial function in adipose tissue resistance arteries of mice with diet-induced obesity. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, [s. l.], v. 303, n. 6, p. H672-H679, 2012.

NIEMAN, David C. et al. Chia seed does not promote weight loss or alter disease risk factors in overweight adults. **Nutrition Research**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 414-418, 2009.

NIEMAN, David C. et al. Chia seed supplementation and disease risk factors in overweight women: a metabolomics investigation. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 700-708, 2012.

OCHI, E.; TSUCHIYA, Y. Eicosahexanoic Acid (EPA) and Docosahexanoic Acid (DHA) in Muscle Damage and Function. **Nutrients**, [s. I.], v. 10, n. 5, 2018.

OELRICH, B.; DEWELL, A.; GARDNER, C. D. Effect of fish oil supplementation on serum triglycerides, LDL cholesterol and LDL subfractions in hypertriglyceridemic adults. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 350-357, 2013

OH, D.Y. et al. A Gpr120 Selective Agonist Improves Insulin Resistance and Chronic Inflammation. **Nature Medicine**, [s. I.], v. 20, n. 8, p. 942-947, 2014.

OH, Da Young; WALENTA, Evelyn. Omega-3 fatty acids and FFAR4. **Frontiers in endocrinology**, [s. I.], v. 5, p. 115, 2014.

O'KEEFE, James H.; HARRIS, William S. From Inuit to implementation: omega-3 fatty acids come of age. Mayo Clinic Proceedings, [s. l.], v. 75, n. 6, p. 607-614, July 2000.

OLIVA, M. E. et al. Dietary Salba (Salvia hispanica L) seed rich in α linolenic acid improves adipose tissue dysfunction and the altered skeletal muscle glucose and lipid metabolism in dyslipidemic insulinresistant rats. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, [s. l.], v. 89, n. 5, p. 279-289, 2013.

OLIVER, Thomas. Post mortem in a case of extreme obesity. **Journal of anatomy and physiology**, [s. l.], v. 14, n. Pt 3, p. 345, 1880.

OMURA, M. Matsuzaki. Eicosapentaenoic acid (EPA) induces Ca^< 2+> independent activation and translocation of endothelial nitric oxide synthase and endothelial dependent vasorelaxation. **FEBS letters**, [s. l.], v. 487, p. 361-366, 2001.

OSELLA, Alberto et al. Irisin Serum Levels in Metabolic Syndrome Patients Treated with Three Different Diets: A Post-Hoc Analysis from a Randomized Controlled Clinical Trial. **Nutrients**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 844, 2018.

PACIFICO, L. et al. Association of serum triglyceride-to-HDL cholesterol ratio with carotid artery intima-media thickness, insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, [s. l.], v. 24, n. 7, p. 737-743, 2014.

PANENI, Francesco et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. **European heart journal**, [s. I.], v. 34, n. 31, p. 2436-2443, 2013.

PAWLOSKY, Robert J. et al. Physiological compartmental analysis of α -linolenic acid metabolism in adult humans. **Journal of lipidresearch**, [s. l.], v. 42, n. 8, p. 1257-1265, 2001.

PAYNE, Gregory A. et al. Epicardial perivascular adipose-derived leptin exacerbates coronary endothelial dysfunction in metabolic syndrome via a protein kinase C-β pathway. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, [s. l.], v. 30, n. 9, p. 1711-1717, 2010.

PAZFILHO, Gilberto; MASTRONARDI, Claudio A.; LICINIO, Julio. Leptin treatment: facts and expectations. **Metabolism**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 146-156, 2015.

PEIRETTI, P. G.; MEINERI, G. Effects on growth performance, carcass characteristics, and the fat and meat fatty acid profile of rabbits fed diets with chia (Salvia hispanica L.) seed supplements. **Meat Science**, [s. I.], v. 80, n. 4, p. 1116-1121, 2008.

PELLEGRINELLI, Vanessa; CAROBBIO, Stefania; VIDAL-PUIG, Antonio.Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. **Diabetologia**, [s. l.], v. 59, n. 6, p. 1075-1088, 2016.

PEPYS, Mark B.; HIRSCHFIELD, Gideon M. C-reactive protein: a critical update. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 111, n. 12, p. 1805-1812, 2003.

PI-SUNYER, F. Xavier. Health implications of obesity. **The American journal of clinical nutrition**, [s. I.], v. 53, n. 6, p. 1595S-1603S, 1991.

POLLIN, Irene S. et al. High prevalence of cardiometabolic risk factors in women considered low risk by traditional risk assessment. **Journal of Women's Health**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 947-953, 2008.

POUDYAL, Hemant et al. Effects of ALA, EPA and DHA in high carbohydrate, high fat diet induced metabolic syndrome in rats. **The Journal of nutritional biochemistry**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 1041-1052, 2013.

POUDYAL, Hemant et al. Lipid redistribution by α linolenic acid rich chia seed inhibits stearoyl CoA desaturase 1 and induces cardiac and hepatic protection in diet induced obese rats. **The Journal of nutritional biochemistry**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 153-162, 2012.

PUATO, Massimo et al. Increase in carotid intima-media thickness in grade I hypertensive subjects: white-coat versus sustained hypertension. **Hypertension**, [s. I.], v. 51, n. 5, p. 1300-1305, 2008.

QUESADA-LÓPEZ, Tania et al. The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes. **Nature communications**, [s. l.], v. 7, p. 13479, 2016.

RÀFOLS, Montserrat Esteve. Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. **Endocrinología y Nutrición**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 100-112, 2014.

RAJSHEKER, Srinivas et al. Crosstalk between perivascular adipose tissue and blood vessels. **Current opinion in pharmacology**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 191-196, 2010.

REAVEN, Gerald M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, [s. l.], v. 37, n. 12, p. 1595-1607, 1988.

RHEE, Eun-Jung et al. Increased risk for development of coronary artery calcification in insulin-resistant subjects who developed diabetes: 4-year longitudinal study. **Atherosclerosis**, [s. l.], v. 245, p. 132-138, 2016.

RODRIGUEZ-PACHECO, Francisca et al. The pro-/anti-inflammatory effects of different fatty acids on visceral adipocytes are partially mediated by GPR120. **European journal of nutrition**, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 1743-1752, 2017.

ROSSI, Andrea S. et al. Dietary chia seed induced changes in hepatic transcription factors and their target lipogenic and oxidative enzyme activities in dyslipidaemic insulin resistant rats. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 109, n. 09, p. 1617-1627, 2013

RUAN, Hong et al. Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-α: implications for insulin resistance. **Diabetes**, [s. l.], v. 51, n. 11, p. 3176-3188, 2002.

RUAN, Hong; LODISH, Harvey F. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-α. **Cytokine & growth factor reviews**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 447-455, 2003.

SACERDOTI, David et al. Arachidonic acid metabolites and endothelial dysfunction of portal hypertension. **Prostaglandins & other lipid mediators**, [s. l.], v. 120, p. 80-90, 2015.

SAINI, Ramesh Kumar; KEUM, Young-Soo.omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance—A review. **Life sciences**, 2018.

SANSBURY, Brian E. et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase prevents diet-induced obesity and regulates adipocyte phenotype. **Circulation research**, [s. l.], v. 111, n. 9, p. 1176-1189, 2012.

SAUNDERS, David R.; SILLERY, James K. Absorption of triglyceride by human small intestine: dose-response relationships. **The American journal of clinical nutrition**, [s. I.], v. 48, n. 4, p. 988-991, 1988.

SCAIOLI, Eleonora; LIVERANI, Elisa; BELLUZZI, Andrea. The Imbalance between n-6/n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review and Future Therapeutic Perspectives. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 18, n. 12, p. 2619, 2017.

SCHIPPER, Henk S. et al. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 407-415, 2012.

SCHLÖGL, Mathias et al. Increased 24-hour ad libitum food intake is associated with lower plasma irisin concentrations the following morning in adult humans. **Appetite**, [s. l.], v. 90, p. 154-159, 2015.

SERHAN, Charles N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature**, [s. I.], v. 510, n. 7503, p. 92, 2014.

SHIMOBAYASHI, Mitsugu et al. Insulin resistance causes inflammation in adipose tissue. **The Journal of clinical investigation**, v. 128, n. 4, 2018. DOI: 10.1172/JCI96139.

SIERRA, Liliana et al. Dietary intervention with Salvia hispanica (Chia) oil improves vascular function in rabbits under hypercholesterolaemic conditions. **Journal of functionalfoods**, [s. l.], v. 14, p. 641-649, 2015.

SILVA, Simone Vargas et al. Obesity modifies bone marrow microenvironment and directs bone marrow mesenchymal cells to adipogenesis. **Obesity**, [s. l.], v. 24, n. 12, p. 2522-2532, 2016.

SIMOPOULOS, Artemis P. An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. **Nutrients**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 128, 2016.

SIMOPOULOS, Artemis P. Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk. **Experimental biology and medicine**, [s. l.], v. 235, n. 7, p. 785-795, 2010.

SINHA, Madhur K. et al. Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short term fasting. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 98, n. 6, p. 1277, 1996.

SKURK, Thomas et al. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s. l.], v. 92, n. 3, p. 1023-1033, 2007.

SLYPER, A. H. et al. Early atherogenesis and visceral fat in obese adolescents. **International Journal of Obesity**, [s. l.], v. 38, n. 7, p. 954, 2014.

SMITH, Anita D.; DORRANCE, Anne M. Arachidonic acid induces augmented vasoconstriction via cyclooxygenase 1 in the aorta from rats fed a high-fat diet. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 43-49, 2006.

SMITH, Gordon I. et al. Fish oil—derived n— 3 PUFA therapy increases muscle mass and function in healthy older adults. **The American journal of clinical nutrition**, [s. I.], v. 102, n. 1, p. 115-122, 2015.

SOLTIS, Edward E.; CASSIS, Lisa A. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. **Clinical and Experimental Hypertension. Part A: Theory and Practice**, [s. I.], v. 13, n. 2, p. 277-296, 1991.

SONG, Tongxing et al. GPR120: a critical role in adipogenesis, inflammation, and energy metabolism in adipose tissue. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 74, n. 15, p. 2723-2733, 2017.

SOWERS, J. R. Relationship between hypertension and subtle and overt abnormalities of carbohydrate metabolism. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, [s. l.], v. 1, n. 3 Suppl 1, p. S39-47, 1990.

SPENCER, Michael et al. Omega 3 fatty acids reduce adipose tissue macrophages in human subjects with insulin resistance. **Diabetes**, [s. I.], v. 62, n. 5, p. 1709-1717, 2013.

STEBBINS, Charles L. et al. Effects of dietary decosahexaenoic acid (DHA) on eNOS in human coronary artery endothelial cells. **Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 261-268, 2008.

STEINBERG, Helmut O. et al. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 97, n. 11, p. 2601-2610, 1996.

STENEBERG, Pär et al. The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. **Cell metabolism**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 245-258, 2005.

SUKUMAR, Piruthivi et al. Constitutively active TRPC channels of adipocytes confer a mechanism for sensing dietary fatty acids and regulating adiponectin. **Circulation research**, [s. l.], v. 111, n. 2, p. 191-200, Jul. 2012.

SZASZ, Theodora; WEBB, R. Clinton. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. **Clinical science**, [s. I.], v. 122, n. 1, p. 1-12, 2012.

TENG, Kim-Tiu et al. Modulation of obesity induced inflammation by dietary fats: mechanisms and clinical evidence. **Nutrition journal**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1, 2014.

TOSCANO, Luciana Tavares et al. Chia flour supplementation reduces blood pressure in hypertensive subjects. **Plant Foods for Human Nutrition**, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 392-398, 2014.

TRAYHURN, Paul; WOOD, I. Stuart. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **British journal of nutrition**, v. 92, n. 3, p. 347-355, 2004.

TROVATI, Mariella et al. Leptin and vascular smooth muscle cells. **Current pharmaceutical design**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 625-634, 2014.

TSAO, Philip S. et al. Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. **Circulation**, [s. l.], v. 89, n. 5, p. 2176-2182, 1994.

TSAO, Philip S. et al. Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1. **Circulation**, [s. I.], v. 96, n. 3, p. 934-940, 1997.

TVRDIK, Petr et al. Role of a new mammalian gene family in the biosynthesis of very long chain fatty acids and sphingolipids. **The Journal of cell biology**, [s. l.], v. 149, n. 3, p. 707-718, 2000.

ULLAH, Rahman et al. Nutritional and therapeutic perspectives of Chia (Salvia hispanica L.): a review. **Journal of food science and technology**, [s. l.], v. 53, n. 4, p. 1750-1758, 2016.

VAGUE, Jean. The degree of masculine differentiation of obesities a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. **The American journal of clinical nutrition**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 20-34, 1956.

VALENZUELA, Rodrigo et al. Alpha linolenic acid (ALA) from Rosa canina, sachainchi and chia oils may increase ALA accretion and its conversion into n 3 LCPUFA in diverse tissues of the rat. **Food & function**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. 1564-1572, 2014.

VALENZUELA, Rodrigo et al. Modification of Docosahexaenoic Acid Composition of Milk from Nursing Women Who Received Alpha Linolenic Acid from Chia Oil during Gestation and Nursing. **Nutrients**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 6405-6424, 2015.

VÁZQUEZ-VELA, Maria Eugenia Frigolet; TORRES, Nimbe; TOVAR, Armando R. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. **Archives of medical research**, [s. I.], v. 39, n. 8, p. 715-728, 2008.

VECCHIONE, Carmine et al. Cooperation between insulin and leptin in the modulation of vascular tone. **Hypertension**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 166-170, 2003.

VERGROESEN, A. J. Dietary fat and cardiovascular disease: possible modes of action of linoleic acid. **Proceedings of the Nutrition Society**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 323-329, 1972.

VERLOHREN, Stefan et al. Visceral periadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. **Hypertension**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 271-276, 2004.

VERVENIOTIS, A. et al. The impact of omega 3 fatty acids in atherosclerosis and arterial stiffness: An overview of their actions. **Current pharmaceutical design**, [s. l.], v. 24, n. 17, p. 1865-1872, 2018.

WAJCHENBERG, Bernardo Leo. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocrine reviews**, [s. l.], v. 21, n. 6, p.697-738, 2000.

WAKI, Hironori; TONTONOZ, Peter. Endocrine functions of adipose tissue. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, [s. l.], v. 2, p. 31-56, 2007.

WALENTA, Evelyn et al. A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice. **Nature medicine**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 942, 2014.

WANG, Ping-Yu et al. Higher intake of fruits, vegetables or their fiber reduces the risk of type 2 diabetes: A meta-analysis. **Journal of Diabetes Investigation**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 56-69, 2016.

WEI, Hong-Kui et al. Eicosapentaenoic acid abolishes inhibition of insulin-induced mTOR phosphorylation by LPS via PTP1B downregulation in skeletal muscle. **Molecular and cellular endocrinology**, [s. l.], v. 439, p. 116-125, 2017.

WEI, Huaxing et al. Interleukin-10 Family Cytokines Immunobiology and Structure. **Adv Exp Med Biol.**, [s. I.], v. 1172, p. 79-96, 2019.

WEISS, Ram et al. Prediabetes in obese youth: a syndrome of impaired glucose tolerance, severe insulin resistance, and altered myocellular and abdominal fat partitioning. **The Lancet**, [s. l.], v. 362, n. 9388, p. 951-957, 2003.

WILLIAMS, I. L. et al. Obesity, atherosclerosis and the vascular endothelium: mechanisms of reduced nitric oxide bioavailability in obese humans. **Internationaljournal of obesity**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 754, 2002.

WILT, Timothy J. et al. Fish oil supplementation does not lower plasma cholesterol in men with hypercholesterolemia: Results of a randomized, placebo controlled crossover study. **Annals of internal medicine**, [s. l.], v. 111, n. 11, p. 900-905, 1989.

WOLFE, Leonhard S. Eicosanoids: Prostaglandins, Thromboxanes, Leukotrienes, and Other Derivatives of Carbon-20 Unsaturated Fatty Acids. **Journal of neurochemistry**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 1-14, 1982.

WOLFE, Leonhard S. Eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, and other derivatives of carbon-20 unsaturated fatty acids. **Journal of neurochemistry**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 1-14, 1982.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Part 1, Diagnosis and classification of diabetes mellitus. 1999.

YAMADA, Hodaka et al. Eicosapentaenoic acid shows anti-inflammatory effect via GPR120 in 3T3-L1 adipocytes and attenuates adipose tissue inflammation in dietinduced obese mice. **Nutrition & metabolism**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 33, 2017.

YAMASAKI, Y. et al. Asymptomatic hyperglycaemia is associated with increased intimal plus medial thickness of the carotid artery. **Diabetologia**, [s. l.], v. 38, n. 5, p. 585-591, 1995.

YE, Jianping. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. **International journal of obesity**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 54, 2009.

YUAN, Chengfu et al. Chikusetsu saponin IVa ameliorates high fat diet-induced inflammation in adipose tissue of mice through inhibition of NLRP3 inflammasome activation and NF-κB signaling. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 19, p. 31023, 2017.

ZAMBONI, Mauro et al. Sarcopenic obesity: a new category of obesity in the elderly. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 388-395, 2008.

ZEC, Manja M. et al. Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids Are Associated with Blood Pressure and Hypertension over 10-Years in Black South African Adults Undergoing Nutritional Transition. **Foods**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 394, 2019.

ZEYDA, Maximilian; STULNIG, Thomas M. Adipose tissue macrophages. **Immunology letters**, [s. I.], v. 112, n. 2, p. 61-67, 2007.

ZHANG, Yiying et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, [s. I.], v. 372, n. 6505, p. 425-432, 1994.

ZHANG, Zhi-yun; WANG, Ming-wei. Obesity, a health burden of a global nature. **Acta Pharmacol Sin.**, [s. I.], v. 33, n. 2, p. 145–147, Feb. 2012.

ZHAO, Ming; CHEN, Xiaoli.Eicosapentaenoic acid promotes thermogenic and fatty acid storage capacity in mouse subcutaneous adipocytes.**Biochemical and biophysical research communications**, [s. I.], v. 450, n. 4, p. 1446-1451, 2014.

ZHU, Xiao et al. Perivascular adipose tissue dysfunction aggravates adventitial remodeling in obese mini pigs via NLRP3 inflammasome/IL-1 signaling pathway. **Acta pharmacologica Sinica**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 46, 2019.

ANEXO – Aceite do periódico

Accepted Manuscript

Chia oil supplementation changes body composition and activates insulin signaling cascade in skeletal muscle tissue of obese animals

Thaís Fonte-Faria, Marta Citelli, Georgia C. Atella, Helena Fonseca Raposo, Lilia Zago, Thamiris de Souza, Simone Vargas da Silva, Christina Barja-Fidalgo

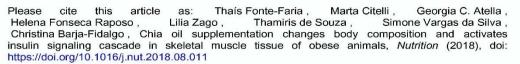
PII: \$0899-9007(18)30917-1

DOI: https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.08.011

Reference: NUT 10308

To appear in: Nutrition

Received date: 17 February 2018
Revised date: 20 June 2018
Accepted date: 2 August 2018



This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

