



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Thamiris de Souza

**Efeitos do tratamento com óleo de chia (*Salvia hispanica* L.)
nos diferentes tipos de tecido adiposo de camundongos
Swiss alimentados com dieta obesogênica**

Rio de Janeiro
2017

Thamiris de Souza

Efeito do tratamento com óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) nos diferentes tipos de tecido adiposo de camundongos *Swiss* alimentados com dieta obesogênica

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

Orientadora: Prof.^a Dra Thereza Christina Barja-Fidalgo

Coorientadora: Prof.^a Dra. Marta Citelli dos Reis

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S729 Souza, Thamiris de.
Efeito do tratamento com óleo de chia (*Salvia hispânica L.*) nos diferentes tipos de tecido adiposo de camundongos *Swiss* alimentados com dieta obesogênica / Thamiris de Souza. – 2017.
68 f.

Orientadora: Christina Barja Fidalgo.
Coorientadora: Marta Citelli dos Reis.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Ácidos graxos Omega-3 – Teses. 2. Plantas medicinais – Uso terapêutico - Teses. 3. Obesidade- Teses. 4. Dieta hiperlipídica - Teses. I. Fidalgo, Christina Barja. II. Reis, Marta Citelli dos. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616-056.52

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Thamiris de Souza

**Efeito do tratamento com óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) nos
diferentes tipos de tecido adiposo de camundongos Swiss alimentados
com dieta obesogênica**

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

Aprovada em 26 de Julho de 2017.

Orientadora: _____
Prof.^a Dra. Christina Barja-Fidalgo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientadora: _____
Prof.^a Dra. Marta Citelli dos Reis
Instituto de Nutrição - UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof. Dr. Rodolfo Mattos Albano
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane
Instituto de Nutrição - UERJ

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

Rio de Janeiro

2017

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que me fortaleceram em toda minha caminhada.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Marta Citelli dos Reis, agradeço pela oportunidade, por sua paciência e dedicação, sua atenção e boa vontade. Obrigada por acreditar em mim.

À Prof.^a Dr.^a Thereza Christina Barja-Fidalgo, pela oportunidade de desenvolver a pesquisa em seu laboratório, pela orientação e exemplo de profissionalismo.

Ao Prof. Dr. João Moraes, por revisar esta dissertação.

À Prof.^a Dr.^a Simone Vargas da Silva, pelo apoio durante todo o trabalho.

A UERJ, ao LFCM e as agência de fomento CAPES, FAPERJ e CNPq pela possibilidade de realizar este trabalho.

À Thaís, minha amiga desde o início da graduação e "co-coorientadora". Sem seu apoio não teria chegado até aqui. Obrigada pelos puxões de orelha e por cuidar de mim diariamente.

À Agatha, agradeço pela boa parceria. Obrigada pelo time que formamos sem você e a Thaís tudo ficaria mais difícil.

Ao macrotime: Hay, Natália, Júlia e Rafael, pelos momentos divertidos, pelo incentivo e pela ajuda, principalmente com os macrófagos.

À Gabi, pelos momentos de descontração e além do apoio técnico.

Aos companheiros de pesquisa Roberta, Crisinha, Mariana, Vivi, Renatinha, Isadora, Clarinha, Daniel, Mariele, Salvador, Vany e Genilson, agradeço pelo carinho com que me receberam, pela ajuda e incentivo nos momentos difíceis.

Ao INU e aos amigos, em especial Juliana e Jessyca, que acompanharam parte desse trabalho, agradeço pela ajuda e por me acolherem tão bem.

Aos meus amigos e amigas que entenderam minha ausência, principalmente na reta final. Obrigada por estarem sempre me incentivando e alegrando-me nos momentos difíceis.

Ao Luiz, por toda paciência, compreensão, carinho e amor.

À minha grande família, que mesmo sem entenderem o que faço sempre me incentivaram.

Aos meus pais e irmão que não me deixaram fraquejar em nenhum momento. Amo vocês.

À Deus e aos anjos que me fortaleceram nessa caminhada.

RESUMO

SOUZA, Thamiris de. **Efeito do tratamento com óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) nos diferentes tipos de tecido adiposo de camundongos Swiss alimentados com dieta obesogênica.** 2017. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Alterações funcionais nos diferentes tipos de tecido adiposo estão comumente presentes na obesidade e têm sido referidas como remodelamento. Alguns ácidos graxos, como poliinsaturados ômega-3, foram relacionados às consequências da obesidade. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação dietética com óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) no tecido adiposo subcutâneo e visceral de animais obesos em diferentes fases da vida. Camundongos machos Swiss foram divididos em 4 grupos aos 21 dias de idade, sendo alimentados com as dietas até os 135 dias: EU: dieta controle; H: dieta hiperlipídica(45% Kcal de lipídeos); HC: animais do grupo H com suplementação do óleo de chia a partir dos 90 dias; HCD:dieta hiperlipídica com suplementação desde o desmame. Foram avaliados tolerância à glicose; marcadores inflamatórios; morfometria do tecido adiposo epididimal; expressão de genes e proteínas envolvidos no remodelamento de tecido adiposo por qRT-PCR, *western blotting* e imunohistoquímica. A suplementação com óleo de chia ocasionou alterações em ambos os grupos. No HCD, a ingestão alimentar e a concentração sérica de leptina foram reduzidas. No tecido adiposo epididimal, a suplementação promoveu menor hipertrofia dos adipócitos. Além disso, resultou na melhorada resposta glicêmica e os animais do grupo HCD aumentaram os marcadores de carga mitocondrial no tecido adiposo subcutâneo, sugerindo a ocorrência do processo de *browning*. A obesidade e a suplementação não promoveram mudanças relacionadas à angiogênese ou à presença de macrófagos no tecido adiposo epididimal. Dessa forma, os resultados sugerem que a suplementação com óleo de chia pode minimizar as alterações causadas pela obesidade, principalmente no grupo HCD.

Palavras-chave: Ácido graxo ômega-3. Obesidade. Remodelamento de tecido adiposo.

ABSTRACT

SOUZA, Thamiris de. **Effects of chia (*Salvia hispanica L.*) oil treatment on the different types of adipose tissue of Swiss mice fed with an obesogenic diet.**

2017. 68 f.- Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Functional changes in different types of adipose tissue are commonly present in obesity and have been referred as remodeling. Some fatty acids, such as polyunsaturated omega-3, were related to the consequences of obesity. The objective of the present study was to evaluate the effect of dietary supplementation with chia (*Salvia hispanica L.*) oil on the subcutaneous and visceral adipose tissue of obese animals at different stages of life. Male Swiss mice were divided into 4 groups at 21 days of age, fed diets up to 135 days: EU: control diet; H: high fat diet (45% Kcal of lipids); HC: animals of group H with supplementation of chia oil from 90 days; HCD: high fat diet with chia oil supplementation since weaning. Glucose tolerance; inflammatory markers; morphometry of epididymal adipose tissue; expression of genes and proteins involved in the remodeling of adipose tissue by qRT-PCR, western blotting and immunohistochemistry were evaluated. Chia oil supplementation caused changes in both groups. In HCD, food intake and serum leptin concentrations were reduced. In epididymal adipose tissue, supplementation promoted less adipocyte hypertrophy. In addition, it resulted in improved glycemic response and animals from the HCD group increased the mitochondrial load markers in the subcutaneous adipose tissue, suggesting the browning process. Obesity and supplementation did not promote changes related to angiogenesis or the presence of macrophages in epididymal adipose tissue. Thus, the results suggest that supplementation with chia oil may minimize the changes caused by obesity, mainly in the HCD group.

Keywords: Omega- 3 fatty acid. Obesity. Remodeling of adipose tissue.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Peso corporal e ingestão calórica.	42
Gráfico 2 – Efeito da suplementação com óleo de chia sobre os indicadores glicêmicos.	43
Gráfico 3 – Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a massa do tecido adiposo e seus adipócitos.	44
Gráfico 4 – Circulação de citocinas e adipocinas e sua produção em tecido adiposo visceral.	45
Gráfico 5 – RNAm de adipócitos do tecido adiposo visceral	47
Gráfico 6 – Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a matriz extracelular.....	48
Gráfico 7 – Efeito da suplementação com óleo de chia sobre o browning do tecido adiposo subcutâneo.....	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Localização do tecido adiposo em humanos e camundongos	17
Quadro 2 - Características da hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos.	20
Quadro 3 – Linha do tempo das dietas utilizadas no estudo	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Algumas adipocinas alteradas na obesidade.]	22
Tabela 2 – Composição de ácidos graxos do óleo de chia (<i>Salvia hispanica</i> L.)	30
Tabela 3 – Composição de macro e micronutrientes das dietas (g/100g):.....	35
Tabela 4 – Lista de oligonucleotídeos utilizados:	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico (do inglês: <i>Arachidonic acid</i>)
ADIPO	Adiponectina
AG	Ácido graxo
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
ALA	Ácido α -linolênico (do inglês: <i>α-Linolenic acid</i>)
ATP	Trifosfato de adenosina
ATM	Macrófagos do tecido adiposo
AGL	Ácidos graxos livre
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês: <i>bovine serum albumin</i>)
CCL2	Quimiocina ligante 2 (do inglês: <i>C-C motif chemokine ligand 2</i>)
CXCL5	Quimiona ligando ao motivo 5
DHA	Ácido docosahexaenoico (do inglês: <i>Docosahexaenoic acid</i>)
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético (do inglês: <i>Ethylenediamine tetra acetic acid</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (do inglês: <i>Enzyme Linked immunosorbent assay</i>)
EU	Grupo eutrófico alimentado com dieta controle
EPA	Ácido eicosapentaenoico (do inglês: <i>Eicosapentaenoic acid</i>)
FADH	Dinucleótido de flavina e adenina
FAS	Ácido graxo sintase
GAPDH	Gene constitutivo (do inglês: <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
GPR120	Receptor acoplado a proteína G 120 (do inglês: <i>G protein coupled receptor 120</i>)
H	Grupo alimentado com dieta hiperlipídica
HC	Grupo alimentado com dieta hiperlipídica suplementado com óleo de chia
HCD	Grupo alimentado com dieta hiperlipídica suplementado com óleo de chia desde o desmame

HFD	Dieta hiperlipídica (do inglês: <i>High fat diet</i>)
HOMA-IR	Índice de resistência à insulina (do inglês: <i>homeostatic model assessment</i>)
IL-1	Interleucina -1
IL-6	Interleucina-6
IL-7	Interleucina-7
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
PBS	Tampão salina fosfato (do inglês: <i>Phosphate buffered saline</i>)
PGC1	Coativador de PPAR gama 1 (do inglês: <i>PPAR gamma coactivator 1</i>)
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (do inglês: <i>peroxisome proliferator activated receptor</i>)
PVDF	Polivinilidenodifluorido
RNAm	RNA mensageiro
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SM	Síndrome metabólica
SOC	Suplementação com óleo de chia
TAG	Triacilglicerol (triglicerídeo)
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TGF β	Fator de transformação do crescimento beta (em inglês: <i>transforming growth factor beta</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral
UCP-1	Proteína desacopladora -1 (termogenina; do inglês: <i>uncoupled protein 1</i>)
VDAC2	Canal seletivo aniônico dependente de tensão (do inglês: <i>Voltage-dependent anion-selective channel</i>)

LISTA DE SIMBOLOS

%	Porcentagem
x	Multiplificação
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
ω	Ômega
ng	Nanograma
μL	Microlitro
mL	Mililitro
cm	Centímetro
cm^3	Centímetros cúbicos
g	Gravidade ou RCF (do inglês: <i>Relative Centrifugal Force</i>)

SUMÁRIO

	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
1	PROPOSIÇÃO	33
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1	Modelo experimental de Obesidade.....	34
2.2	Teste de tolerância à glicose	36
2.3	Coleta de sangue	36
2.4	Análise da morfologia do tecido adiposo.....	36
2.5	Quantificação de citocinas plasmáticas.....	37
2.6	Quantificação de RNAm em tecido adiposo.....	38
2.7	Western Blotting	39
2.8	Imunohistoquímica.....	40
2.9	Análise Estatística	41
3	RESULTADOS	42
3.1	Peso corporal e ingestão calórica.....	42
3.2	Efeito da suplementação com óleo de chia sobre os indicadores glicêmicos.....	43
3.3	Efeitos da suplementação do óleo de chia sobre a morfologia do tecido adiposo.....	44
3.4	Citocinas plasmáticas e adipocinas e sua produção no tecido adiposo visceral.....	45
3.5	Efeito da suplementação com óleo de chia sobre o RNAm de adipócitos do tecido adiposo visceral.....	46
3.6	Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a matriz extracelular.....	48
3.7	Efeito da suplementação com óleo de chia sobre o <i>browning</i> do tecido adiposo subcutâneo	49
	DISCUSSÃO	51
	REFERÊNCIAS.....	56

REVISÃO DA LITERATURA

Obesidade

A obesidade é definida como acúmulo de gordura anormal ou excessiva que apresenta um risco para a saúde, sendo o principal fator de risco para uma série de doenças crônicas, incluindo diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (WHO, 2016). É um importante problema de saúde pública nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, devido, não somente, à gravidade das comorbidades associadas, mas também à elevada prevalência dessa condição, que tem aumentado em todo o mundo, tornando-se preocupante, uma vez que as consequências negativas da obesidade têm iniciado na infância.

Em 2014, foram detectados 614 milhões de indivíduos obesos e estima-se que em 2025 aproximadamente 18% dos homens e 21% das mulheres serão obesos (NCD RISK FACTOR COLLABORATION, 2016). No Brasil, a prevalência de adultos obesos é de 18,9%. Em ambos os sexos, a prevalência da obesidade mais que duplicou da faixa de 18 a 24 anos para a faixa de 25 a 34 anos de idade (BRASIL, 2015).

A obesidade tem um impacto claramente mensurável sobre a saúde física e mental, a qualidade de vida relacionada à saúde e gera custos diretos e indiretos consideráveis (DIXON, 2010). Estima-se que obesos geram 30% mais gastos com assistência médica, em comparação aos indivíduos eutróficos (WITHROW; ALTER, 2011). Segundo a WHO (2017), a obesidade atingiu proporções epidêmicas globalmente, com pelo menos 2,8 milhões de pessoas morrendo a cada ano.

A síndrome metabólica (SM) é um transtorno metabólico comum que resulta da crescente prevalência de obesidade (ECKEL et al., 2005). Refere-se a uma série de distúrbios, incluindo intolerância à glicose, obesidade central, dislipidemia e hipertensão arterial (AZEVEDO et al., 2009). A SM também é caracterizada por um estilo de vida de acessibilidade à alimentos com alto teor calórico, baixo teor de nutrientes e inatividade física. Sua prevalência tem aumentado globalmente, particularmente na última década, a ponto de ser considerada como uma epidemia.

Atualmente, nos EUA, estima-se que 34% da população adulta tenha SM. Além disso, o aumento da taxa de SM nos países em desenvolvimento é expressivo (LIM; ECKEL, 2014).

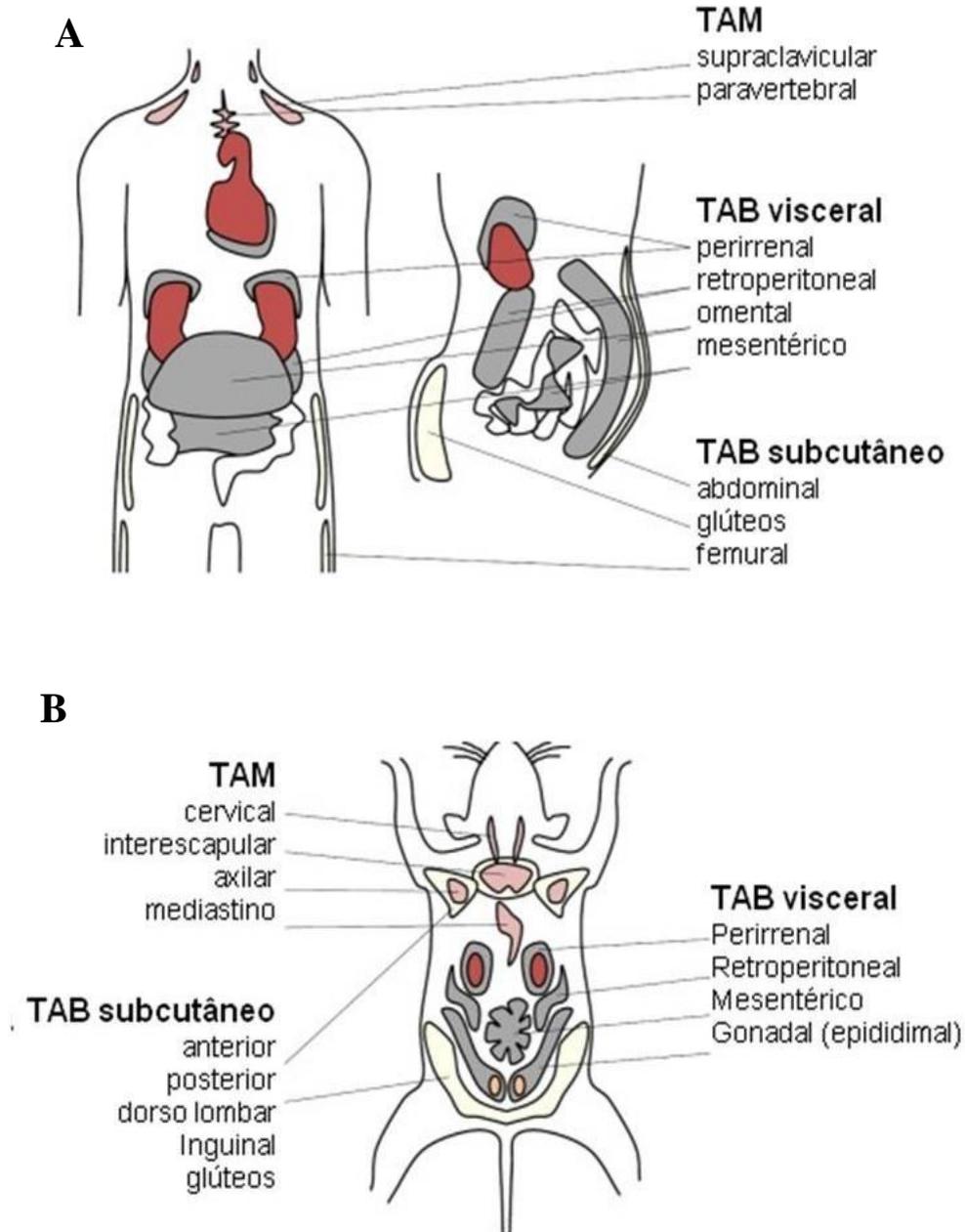
Tecido Adiposo

O tecido adiposo armazena lipídios sob a forma de triglicerídeos (TAG) (BIRSOY et al., 2013). O tecido adiposo é distribuído por todo o corpo e é capaz de se expandir para acomodar o excesso de energia química potencial sob a forma de lipídios acumulados, características que distinguem o tecido adiposo de outros órgãos e tecidos. As principais funções fisiológicas do tecido adiposo são isolamento térmico e armazenamento de energia (GESTA et al., 2007).

Entretanto, Von Gierke em 1906, foi o primeiro a sugerir um papel do tecido adiposo no armazenamento de glicogênio, além de ser reservatório de lipídio. O tecido adiposo 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 à obesidade, e o aumento do risco de doenças cardiovasculares (ROSEN e SPIELGMAN, 2014).

Nos seres humanos, existem dois principais tipos de tecidos adiposos, tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM). O TAM está localizado ao redor dos ombros e costelas e contribui para a geração de calor. Anatomicamente, o TAB compreende dois grandes depósitos: o subcutâneo e o visceral. O TAB visceral e subcutâneo possui capacidade considerável de armazenamento de energia. Sendo o visceral, concentrado no interior da cavidade abdominal, é ainda subdividido em mesentérico, omental, perirrenal, e em depósitos peritoneais. O tecido adiposo subcutâneo armazena aproximadamente 80-90% da gordura corporal total, principalmente na região abdominal, glúteo e femoral. Em camundongos adultos, TAB gonadal similar ao visceral nos humanos e a inguinal similar ao subcutâneo (Quadro 1) (WAJCHENBERG, 2000; ARNER, 1997).

Quadro 1 - Localização do tecido adiposo em humanos e camundongos



Legenda: TAM: tecido adiposo marrom; TAB: tecido adiposo branco

Nota: Nos seres humanos, o TAM localiza-se na região supraclavicular e paravertebral, contribuem para a geração de calor. O TAB divide-se em visceral e subcutâneo. O visceral envolve os órgãos intra-abdominais, enquanto o subcutâneo se espalha por todo o corpo embaixo da pele. **(B)** Em camundongos adultos, TAM é facilmente observada em comparação com a dos humanos adultos. O TAB visceral abrange cavidade abdominal e região gonadal localizados em torno dos ovários nas fêmeas e os testículos nos machos. Porém, esta região não existe em humanos. O TAB subcutâneo são os depósitos de gordura da região inguinal emparelhados na parte anterior da parte superior dos membros traseiros.

Fonte: Modificado de CHOE et al., 2016.

O TAB é composto por, aproximadamente, 50% de adipócitos e 50% de diferentes tipos celulares como células tronco, pré adipócitos, células neurais,

células endoteliais e leucócitos (GUSTAFSON; SMITH, 2015). Os adipócitos brancos maduros armazenam os TAG em uma única e grande gota lipídica que ocupa de 85-90% do citoplasma e empurra o núcleo e uma fina camada de citosol para a periferia da célula. Seu volume e diâmetro aumentam conforme a quantidade de TAG acumulada (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

O TAM tem como principal função manter a temperatura corporal central em resposta ao frio, gerando calor, um processo conhecido como termogênese. O adipócito marrom pode atingir 60 µm de diâmetro, sendo, geralmente, muito menor que o adipócito branco que tem um tamanho médio de 90•100 µm. É uma célula caracterizada pela presença de várias gotículas lipídicas citoplasmáticas de diferentes tamanhos, um grande número de mitocôndrias, citoplasma relativamente abundante e núcleo esférico e ligeiramente excêntrico. Utilizam a energia liberada pela oxidação de metabólitos, principalmente ácidos graxos, para gerar calor (CANNON; NEDERGAARD, 2004).

Esse processo ocorre porque a proteína desacopladora-1 (UCP-1, termogenina), uma proteína da membrana mitocondrial interna do adipócito marrom, atua como um canal de próton dissipa o potencial eletroquímico gerado na cadeia transportadora necessário para a produção de ATP pela ATP sintase resultando na produção de calor. (CANNON; NEDERGAARD, 2004).

Os diferentes tipos de tecido adiposo têm importantes implicações na patogênese e os tratamentos para as complicações metabólicas relacionadas à obesidade. Embora o TAB seja capaz de se adaptar e expandir funcionalmente em resposta ao consumo excessivo de calorias, os indivíduos parecem ter um limite funcional definido além do qual o TAB não funciona corretamente como órgão de armazenamento e endócrino. Podendo resultar na disfunção desse tecido contribuindo para a síndrome metabólica (VIRTUE; VIDAL-PUIG, 2010).

Remodelamento de tecido adiposo

O conceito de remodelamento do tecido adiposo tem sido amplamente aplicado para abranger uma gama de eventos que ocorrem no tecido adiposo em

resposta ao excesso ou a deficiência de nutrientes (LEE et al., 2010; SUGANAMI; OGAWA, 2010; SUN et al., 2011).

Em resposta a alterações no estado energético, o tecido adiposo é remodelado rápido e dinamicamente através de mudanças no número e/ou tamanho de adipócitos. Simultaneamente, várias células vasculares estromáticas no tecido adiposo sofrem alterações numéricas e/ou funcionais, contribuindo para a manutenção da função do tecido adiposo como reservatório de energia e órgão endócrino. No entanto, em condições fisiopatológicas, como a obesidade, o remodelamento do tecido adiposo pode induzir a desregulação de citocinas, hormônios e metabólitos derivados do tecido adiposo, levando a estresses e distúrbios metabólicos (CHAWLA et al., 2011; MAKKI et al., 2013; HUH et al., 2014).

Hipertrofia e Hiperplasia

Na literatura já está bem descrito como ocorre o crescimento do tecido adiposo no desenvolvimento normal e anormal, caracterizando o estado do tecido em termos do tamanho médio e do número de células, denominados hipertrofia e hiperplasia, respectivamente.

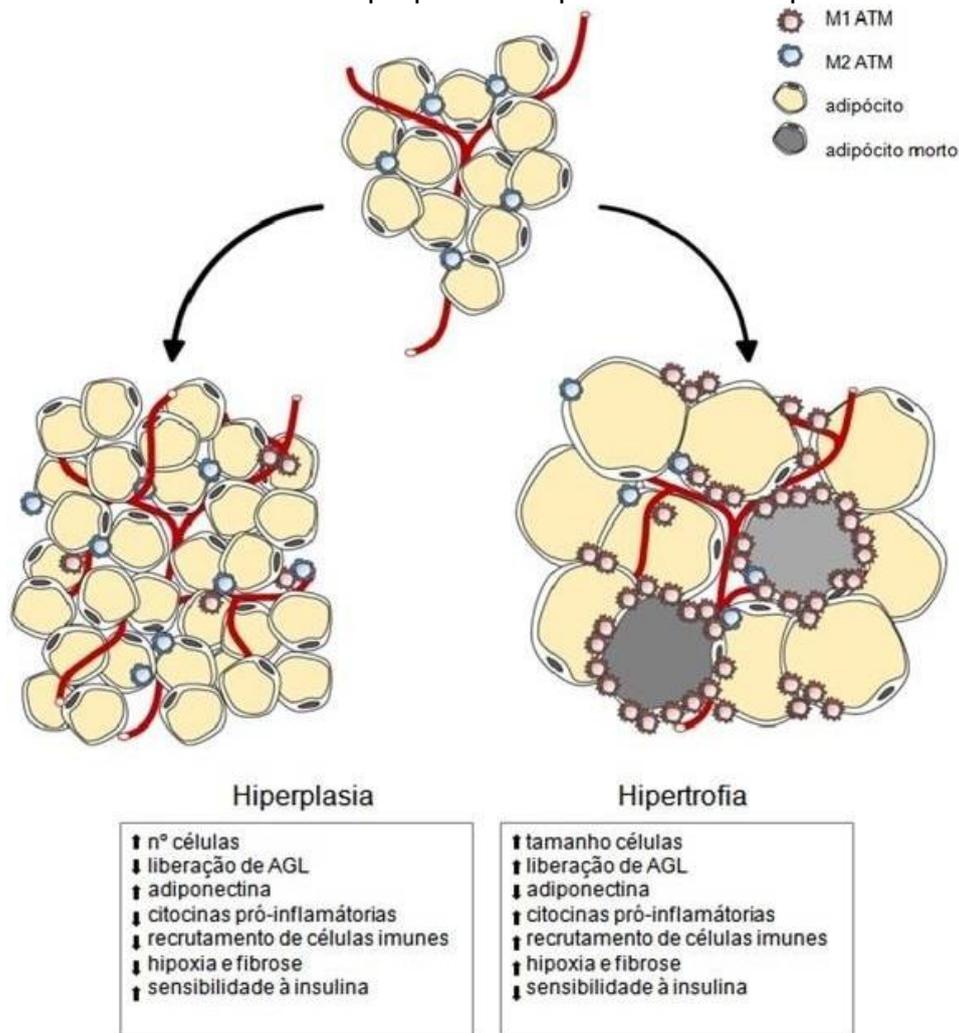
Para conseguir uma transformação bem-sucedida em adipócitos maduros, os préadipócitos sofrem acentuadas modificações na morfologia e na expressão gênica. A adipogênese é um processo onde células com características não especializadas como, por exemplo, fibroblastos, passam adquirir funções específicas de adipócitos. A adipogênese depende da comunicação entre as próprias células e entre as células e seu ambiente circundado (LEFTEROVA; LAZAR, 2009). A hipertrofia e hiperplasia de adipócitos são reguladas por fatores ambientais e genéticos (SPIEGELMAN; FLIER, 2001). A expansão de um determinado depósito de gordura depende da expressão de uma cascata de fatores de transcrição que, em última instância, permitem que as células se desenvolvam em adipócitos maduros com uma única gotícula de gordura (DROLET et al., 2008).

A hipertrofia tem efeitos pleiotrópicos na função adipocitária. A hipóxia pode ocorrer com uma expansão superior a um diâmetro de 100 microns, induzindo genes de resposta hipóxica, estresse oxidativo, inflamação (MUIR et al., 2016). Na

obesidade, a hipertrofia de adipócitos, a obesidade central e o acúmulo ectópico de gordura estão associados à pré-disposição a diabetes mellitus e síndrome metabólica. (GUSTAFON et al., 2015).

A hiperplasia de pré-adipócitos equilibra a hipertrofia para regular a homeostase do tecido adiposo. A diminuição da capacidade proliferativa de pré-adipócitos está associada com a obesidade e a doença metabólica em alguns (ARNER et al., 2010; ERIKSSON-HOGLING et al., 2015; RYDÉN et al., 2014), mas nem todos os estudos, sugerindo que a hiperplasia e a hipertrofia podem ser reguladas reciprocamente (LANDGRAF et al., 2014; TCHOUKALOVA et al., 2010.)

Quadro 2 - Características da hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos



Legenda: ATM: macrófagos do tecido adiposo; AGL: ácidos graxos livres.

Nota: Na obesidade, a expansão do tecido adiposo ocorre por dois mecanismos diferentes. A hipertrofia aumento do tamanho de adipócitos que leva à eventos prejudiciais. Por outro lado, a hiperplásia o aumento do número de adipócitos que leva à eventos benéficos.

Fonte: Modificado de CHOE, et al. 2016

Alterações de citocinas e macrófagos

O tecido adiposo secreta uma série de peptídeos ou proteínas bioativas, coletivamente denominados adipocinas. Elas desempenham um papel central na homeostase energética e vascular, bem como na imunidade e são fundamentais para as alterações observadas na matriz extracelular. As alterações na liberação de citocinas estão relacionadas à infiltração de macrófagos no tecido adiposo que acompanham a secreção de citocinas pró-inflamatória (MAURY; BRICHARD, 2010).

Na década de 1990, Hotamisligil e colaboradores descreveram o aumento da expressão e secreção de TNF- α no tecido adiposo de animais obesos, que estava associado à inflamação, à obesidade e à resistência à insulina. Em seguida, foi realizada a descoberta de leptina, uma adipocina específica de adipócitos que atua como um hormônio para controlar o equilíbrio de energia corporal promovendo controle sobre a saciedade. A partir de então, o tecido adiposo foi realmente reconhecido como órgão endócrino (ZHANG et al., 1994).

O tecido adiposo secreta mais de 50 hormônios e moléculas de sinalização, que exercem seus papéis biológicos de maneira autócrina, parácrina ou sistêmica e influenciam vários processos fisiológicos em relação à energia, metabolismo da glicose e imunidade (WAKI; TONONNOZ, 2007). As adipocinas podem apresentar propriedades pró ou anti-inflamatórias, podendo contribuir para a resistência à insulina.

O tecido adiposo de indivíduos eutróficos secreta preferencialmente adipocinas anti-inflamatórias, como a adiponectina, o fator de crescimento transformante beta (TGF β) e a interleucina (IL) -10. Em contraste, o tecido adiposo obeso libera principalmente citocinas pró-inflamatórias dentre as quais TNF- α , IL-6, leptina, visfatina, resistina e angiotensina II (OUCHI et al., 2011). Em eutróficos, as adipocinas anti-inflamatórias modulam funções fisiológicas, enquanto que em estados de doenças metabólicas, as adipocinas pró-inflamatórias modulam a resistência à insulina diretamente afetando a via de sinalização da insulina, ou indiretamente através da estimulação de vias inflamatórias (TILG; MOSCHEN, 2008)

Tabela 1 – Algumas adipocinas alteradas na obesidade (continuação)

Adipocina	Distribuição	Função	Na Obesidade
Adiponectina	Secretada somente pelo tecido adiposo, tem uma baixa produção em homens	Tem efeito na sensibilização da insulina. Melhora a resistência à insulina e o metabolismo da glicose	Diminuída nos modelos de obesidade em ratos e na obesidade humana e correlacionada negativamente com o IMC. Aumentada após a perda de peso.
CXCL5	Secretada por macrófagos dentro da fração vascular do estroma	Interfere na sinalização de insulina no músculo	Os níveis circulantes estão mais elevados nos indivíduos obesos resistentes à insulina do que nos indivíduos obesos sensíveis à insulina e está diminuída após um período de 4 semanas com dieta de hipocalórica
IL-1	Secretada principalmente por adipócitos e macrófagos	Possui papel na quimiotaxia dos macrófagos e termogênese	Aumentada em camundongos obesos
IL-6	Um terço dos níveis circulantes totais é expresso por adipócitos. Também é expresso nos macrófagos, músculo esquelético, células endoteliais e fibroblastos	Possui papel controverso no desenvolvimento da resistência à insulina. Afeta o metabolismo da glicose	Aumentada nos níveis circulantes em indivíduos obesos, correlacionada com a adiposidade e reduzida com perda de peso. Aumento no plasma de pacientes com DM2
IL-7	Secretada pelo estroma e pelas células endoteliais vasculares	Citocina imune homeostática. Também regula o peso corporal, massa e função do tecido adiposo e sinalização de insulina	Aumentada em indivíduos com obesidade mórbida
IL-8	Secretada por adipócitos (TAB visceral > TAB subcutâneo) e macrófagos	Quimiotaxia de neutrófilos	Aumentada em indivíduos obesos e relacionada com a massa gorda e com níveis de TNF- α
IL-10	Secretada por monócitos, macrófagos, células dendríticas e células T e B	Melhora a sensibilidade à insulina e o transporte de glicose	Atenuada em pacientes DM2 e aumentada na perda de peso
Leptina	Secretada predominantemente pelo TAB, e, em menor quantidade, pelo hipotálamo, epitélio gástrico, placenta e gônadas.	Regula a ingestão alimentar, gasto calórico e o comportamento alimentar. Também regula a sinalização da	Aumentada em camundongos nos modelos de obesidade. Aumentada na obesidade humana e correlacionada com o IMC, diminuída após a perda de peso

Tabela 1 – Algumas adipocinas alteradas na obesidade (continuação)

Adipocina	Distribuição	Função	Na Obesidade
MCP-1	Secretada pelo tecido adiposo	Afeta a sensibilidade à insulina e aumenta o recrutamento de macrófagos no tecido adiposo e inflamação	Aumentada em modelo de obesidade em camundongos. Aumentada também nos indivíduos com DM2
PAI-1	Expresso pelo TAB	É um potente inibidor da via fibrinolítica	Aumentada na obesidade humana e nos indivíduos com DM2
TNF- α	Expresso por macrófagos e adipócitos (TAB visceral > TAB subcutâneo)	Afeta o metabolismo da insulina e da glicose. Provoca resistência à insulina e estimula a lipólise	Aumentada em modelos de obesidade nos camundongos. Aumento da obesidade humana e correlacionado com o IMC

Nota: O tecido adiposo branco (TAB) na obesidade, sofre modificações de diversas interleucinas (IL) que podem acarretar em diferentes comorbidades como a diabetes tipo 2 (DM2).

Fonte: Adaptado de MAKKI, et al., 2013.

Remodelamento da Matriz Extracelular

A matriz extracelular (MEC) é um componente crucial do tecido adiposo que é necessário para manter a integridade celular e estrutural. A MEC também é fonte de sinais mecânicos para crescimento adequado e diferenciação e fornece uma comunicação entre célula-MEC e célula-célula. A geração, manutenção e degradação da MEC de tecido adiposo é regulada por diversos componentes, incluindo células inflamatórias e os próprios adipócitos. A MEC que circunda os adipócitos é composta de numerosas proteínas e componentes de carboidratos que incluem colágenos, lamininas, fibronectina, proteoglicanos, entre outros (GIORDANO et al., 2013; SHARMA et al., 2010).

Os componentes da MEC no tecido adiposo são regulados por metaloproteinases de matriz (MMPs), enzimas responsáveis pela degradação das moléculas da matriz e na geração de fatores bioativos (VU; WERB, 2000). As MMPs compreendem uma grande família de proteinases dependentes de zinco que foram classificadas em subgrupos com base em sua estrutura, especificidade do substrato e localização celular. Esses subgrupos são collagenases, gelatinases, MMPs tipo membrana e outras MMPs (VU; WERB, 2000; STERNLICHT e WERB, 2001). Além disso, as MMPs podem mediar a liberação e/ou ativação de fatores de crescimento e a clivagem dos receptores de adesão à superfície celular (STERNLICHT; WERB, 2001). Vale destacar que a atividade das MMPs é regulada ao nível da transcrição de genes, ativação de proenzimas e via inibição de sua atividade por inibidores endógenos (BREW et al., 2000).

O remodelamento da matriz e das vias proteolíticas ocorre durante a adipogênese. A desregulação de MMPs está envolvida na fisiopatologia da obesidade e diabetes em seres humanos. Estudos demonstraram que as concentrações plasmáticas das gelatinases MMP2 e -9, são as maiores na circulação e que elas aumentam em obesos (DEROSA et al., 2008) e em diabéticos (SIGNORELLI et al., 2005; HOPPS et al., 2013). A expressão gênica de MMP9 correlaciona-se positivamente com o índice de avaliação do modelo de homeostase da resistência à insulina (HOMA-IR) em seres humanos obesos (TINAHONES et al., 2012).

O papel específico desempenhado por cada MMP na patogênese da obesidade e da resistência à insulina não foi totalmente definido. Foi observado que a expressão de MMPs no tecido adiposo é regulada diferencialmente em ratos obesos alimentados com HFD (MAQUOI et al., 2002; CHAVEY et al., 2003). O estudo de Van e colaboradores (2008), demonstrou que animais que não possuem MMP2 (gelatinase A), são resistentes à obesidade induzida por dieta hiperlipídica, apresentando adipócitos menores. Entretanto, o mesmo grupo de pesquisadores observou que animais com ausência de MMP9 (gelatinase B), não apresentaram alteração significativa no peso, glicemia em jejum e níveis de insulina após 15 semanas de dieta HFD (VAN HUL et al., 2010). Curiosamente, uma inibição farmacológica de MMPs, com uma especificidade relativa para MMP2 e MMP9, foi capaz de reduzir ganho de peso e de adipócitos de animais ob/ob (VAN HUL; LIJNEN, 2011).

Browning de tecido adiposo branco

Como descrito anteriormente, há dois tipos de adipócitos, os brancos e os marrons. Os adipócitos brancos são especializados para armazenar energia química enquanto os adipócitos marrons dissipam a energia como calor. As respostas termogênicas nos adipócitos marrons dependem da abundância da proteína desacopladora -1 (UCP-1) na mitocôndria (HONDARES et al., 2006).

O *browning* é a indução de marcadores de adipócitos marrons, incluindo UCP-1, em adipócitos do TAB subcutâneo. Quando estes adipócitos apresentam características fenotípicas similares às do TAM, são chamados de adipócitos beges (ENERBACK, 2009; PETROVIC et al., 2010). Em resposta ao estresse de frio, em resposta ao tratamento com agonista do receptor β -adrenérgico ou ao PPAR- γ , o desenvolvimento dos adipócitos beges no tecido adiposo branco é aumentado (HIMMS-HAGEN et al., 2000; XUE et al., 2005). Vale destacar que a origem dos adipócitos beges ainda controversas (ROSENWALD; WOLFRUM, 2014). A abundância dos adipócitos beges em tecido adiposo branco mostra melhora no

metabolismo de glicose e resistência à obesidade induzida pela dieta (TSUKIYAMA-KOHAR et al., 2001; HANSEN et al., 2004; WANG et al., 2008).

A atividade da UCP-1 é regulada, principalmente, pelos ácidos graxos que representam os principais substratos para oxidação durante a termogênese, fornecendo NADH e FADH₂ para suprir a cadeia respiratória e garantir o gradiente de prótons. Embora se saiba que os ácidos graxos possam atuar diretamente na atividade da UCP-1 para promover o desacoplamento de prótons, o mecanismo relacionado a este efeito ainda não está bem definido (KRAUSS et al., 2005). Há apenas teorias que tentam explicá-lo. Por exemplo, Klingenbeg, considera o ácido graxo como cofator, no qual o mesmo tem papel integral na UCP-1. Desse modo, grupamentos carboxil dos ácidos graxos atuam como pontos de carreamento no canal de UCP-1 permitindo a passagem de prótons (KLINGENBEG; HUANG, 1999).

Independentemente do mecanismo de ativação do UCP-1 pelos ácidos graxos, sabe-se que a primeira etapa do processo intracelular da termogênese é iniciada com a ativação do sistema nervoso simpático e de seus receptores adrenérgicos no TAM (NEDERGAARD et al., 2001). A noraepinefrina, nos adipócitos maduros, exerce um papel no controle funcional e de proliferação celular. A noraepinefrina interage com dois tipos de receptores (β e α), os quais estão associados com diferentes vias de sinalização. A via da estimulação β -adrenérgica da termogênese é a via mais comumente estudada (CANNON; NEDERGAARD, 2004).

A via β_3 adrenérgica e a exposição ao frio aumentam a expressão do co-ativador -1 do receptor- α ativado pelo proliferador de peroxissomo (PGC-1 α) no TAM e músculo esquelético (PUIGSERVER et al., 1998). O PGC-1 α é um co-ativador transcricional de vários receptores nucleares (VEGA et al., 2000) e que parece coordenar a transcrição de genes envolvidos na termogênese, tais como aqueles que codificam enzimas mitocondriais da oxidação de ácidos graxos, subunidades da citocromo c oxidase e ATP sintase da cadeia respiratória, a UCP-1 e os envolvidos com a biogênese mitocondrial (CROWLEY et al., 2002).

Ácido graxos poliinsaturados da dieta

A 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 poliinsaturados (AGPIs), incluem um grupo de ácidos graxos essenciais. Esses compostos são denominados "essenciais" porque o organismo humano precisa deles, e não é capaz de produzi-los sendo assim necessários na dieta humana (BARABINO et al., 2017).

Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPIs) são moléculas de ácido graxo com mais de 16 carbonos e mais de uma dupla ligação. A localização da dupla ligação define o ácido graxo. O ácido graxo será denominado ômega-3 quando a dupla ligação se localiza no terceiro carbono, iniciando-se a contagem pelo lado ômega, ou seja, contando-se a partir da extremidade oposta à carboxila (WOLFE, 1982).

AGPIs constituem um grupo de nutrientes críticos que modulam o desenvolvimento do cérebro e da cognição, assim como 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 linoléico e α -linolênico são precursores dos AGPIs pertencentes às famílias ômega-6 e ômega-3, respectivamente, através dos processos de alongação (enzimas elongases) e dessaturação (enzimas dessaturases) da cadeia carbônica.

As dessaturases atuam oxidando dois carbonos da cadeia com formação de duplas ligações e as elongases atuam adicionando dois átomos de carbono à cadeia (PERINI, 2010). Após a ingestão de ácido linoleico (LA, 18:2 ω -6) e ácido α -linolênico (ALA, 18:3 ω -3), a enzima delta-6 desaturase converte LA em ácido araquidônico (AA, 20:0) ou ALA em ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 ω -3) e ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 ω -3), responsáveis pela produção de intermediários lipídicos da inflamação.

Os AGPIs contribuem para a regulação de propriedades da membrana como fluidez, flexibilidade, permeabilidade e modulação de proteínas ligadas à membrana. Quando são incorporados nos fosfolípidos das membranas celulares, tornam-os mais fluidos e, portanto, aumentam o número de receptores e a afinidade por seus respectivos hormônios e fatores de crescimento. Além disso, os ácidos graxos essenciais são precursores de mediadores lipídicos envolvidos na inflamação, quimiotaxia, permeabilidade vascular, vasoconstrição (TENG et al., 2014). Esses mediadores podem ter propriedades pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e pró-resolutivas. (SERHAN, 2014).

Os produtos de eicosanóides derivados de ω -6 (como prostaglandina E2 e leucotrieno B4 sintetizados a partir de AA) são mediadores mais potentes de trombose e inflamação do que produtos similares derivados de ω -3 (prostaglandina E3 e leucotrieno B5 sintetizado a partir do EPA). Sendo assim, o ω -6 é altamente pró-trombótica e pró-inflamatória do que ω -3 o que contribui para a prevalência de aterosclerose, obesidade e diabetes (SIMOPOULOS, 2013; DONAHUE, et al., 2011; KROMHOUT, et al., 2014).

Foi proposto recentemente que os seres humanos evoluíssem com uma dieta em que a proporção ω -6: ω -3 de aproximadamente 1:1 (SIMOPOULOS, 2016). Infelizmente, a dieta ocidental tende a ser deficiente em ω -3 e as últimas recomendações são de uma relação 4:1 (MOLENDI-COSTE; LEGRY; LECLERCQ, 2011). No entanto, essa relação atualmente situa-se em torno de 20:1 (SIMOPOULOS, 2008). Altas proporções de ω -6: ω -3 promovem a inflamação e a ocorrência de muitas doenças, incluindo doenças cardiovasculares, câncer e doenças auto-imunes (BARABINO et al., 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, de origem animal é essencial para o crescimento e o desenvolvimento normais e pode desempenhar um importante papel 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 demonstram o aumento principalmente de DHA 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 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 e colaboradores 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).

Entretanto, relatos recentes mostraram a proteína GPR120, um receptor acoplado a proteína G (GPCR) sensível a lipídeos, pode funcionar como o receptor de AGPI ω 3 que mediará seus efeitos anti-inflamatórios e sensibilizadores à insulina. Camundongos deficientes em GPR120 alimentados com dieta hiperlipídica foram resistentes aos efeitos do AGPI ω 3, que não reduziu a inflamação e a infiltração de macrófagos no tecido adiposo (OH et al., 2010). Além disso, Ghafoorunissa e Natarajan (2005) mostraram que a substituição de um terço de 18:2 *n*-6 dietéticos com 18:3 *n*-3 em animais alimentados com sacarose resultou em níveis baixos de lipídios no sangue e aumento da sensibilidade à insulina periférica.

Salvia hispanica L. – chia

A chia (*Salvia hispanica* L.) pertence à família Labiatae, é originada do México e da Guatemala e compõe a alimentação humana desde 1500 aC (CAHILL et al., 2003; AYERZA; COATES, 2008). Tradicionalmente, as sementes foram utilizadas por astecas e maias na preparação de medicamentos populares e alimentos. Nos tempos pré-históricos das sociedades colombianas, acredita-se que tenha sido o segundo alimento mais cultivado, após o feijão (CRAIG; SONS, 2004). A chia é uma oleaginosa, fonte de ácidos graxos ômega-3, apresenta ainda em sua composição proteínas fibras, vitaminas, minerais e antioxidantes (CAHILL, 2003). A semente de chia é amplamente utilizada em muitos países desde milhares de anos devido ao seu enorme potencial nutricional e terapêutico (FERNANDEZ et al., 2006). Atualmente, as sementes de chia são amplamente utilizadas para a extração de

compostos bioativos para o desenvolvimento de alimentos funcionais. A maior parte do óleo é utilizada na formulação de suplementos de ômega-3 (AHMED et al., 2006; BELTRAN-OROZCO; ROMERO 2003).

A presença de alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados no óleo de chia aumentou sua popularidade. Entre todas as fontes de alimento conhecidas, a chia contém a maior concentração desses ácidos graxos. Em média, contém cerca de 64% de ω -3 e 19% de ácidos graxos ω -6 (tabela 2) (MOHD ALI et al., 2012).

Atualmente, o óleo de semente de chia não é amplamente utilizado comercialmente, embora tenha características adequadas para aplicações industriais e pode contribuir para uma dieta saudável (IXTAINA et al., 2010). Um estudo de Muhammad Nadeem (2017) adicionou diferentes concentrações de óleo de chia na margarina, visando melhorar o valor funcional, observou-se que o óleo de Chia em todas as concentrações aumentou a quantidade de ácidos graxos ω -3.

Devido à importância biológica dos ácidos graxos ômega-3, a busca por fontes alimentares acessíveis à população assume um importante papel à manutenção da saúde. Neste aspecto, os trabalhos desenvolvidos com a chia são recentes e ainda escassos, o que permite uma revisão mais detalhada desta literatura.

Tabela 2 – Composição de ácidos graxos do óleo de chia (*Salvia hispanica* L.)

Ácidos Graxos	Ciftci et al. (2012)	Ayerza R. & Coates W. (2001)	Álvarez-Chávez et al. (2008)	Ixtaina et al. (2011)	Coelho & Salas-Mellado (2014)	Sargi et al. (2013)
Ácido Palmítico 16:0	7.10	9.66	6.30	7.2	6.69	5.85
Ácido Esteárico 18:0	3.24	4.34	3.10	3.8	2.67	2.49
Ácido Oleico 18:1	10.53	6.84	7.50	15.2	10.55	6.16
Ácido α -linoleico ω -6 18:2	20.37	17.65	19.90	19.1	17.36	17.47
Ácido α -linolênico ω -3 18:3	59.76	64.08	63.4	64.7	62.02	54.49

Fonte: Modificado de Marcinek & Krejpcio, 2017.

***Salvia hispanica* L. e Obesidade**

Diante do panorama atual de obesidade e das modificações ocasionadas pela mesma, diversos estudos têm sido desenvolvidos com objetivo de minimizar as alterações no tecido adiposo além das complicações ocasionadas pela obesidade. A maioria dos estudos realizados com a chia concentra - se no uso da semente, que apesar de conter ALA, possui alto teor de fibras, que também podem reduzir o índice glicêmico, atenuar dislipidemias e ainda auxiliar na perda de peso (WANG et al. 2016). Revisões sobre os efeitos terapêuticos da chia mostram a ação anti-inflamatória associada aos ácidos graxos. Algumas evidências sugerem uma possível ação anticoagulante, antioxidante e ainda efeitos antivirais pelo uso de *Salvia hispanica* L. (ULBRICHT, 2009; FERREIRA et al. 2015).

Dentre os estudos com semente e/ou óleo de chia nota-se que ainda não foram avaliadas todos os parâmetros de remodelamento de tecido adiposo, na literatura o que há descrito em sua maioria são aspectos voltados para resistência insulínica, ganho ou perda de peso ponderal e modificação de concentrações plasmática de marcadores lipídicos com enfoque nas comorbidades da geral da obesidade. Como o estudo de Chicco e colaboradores (2009) que observaram 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. Em outro estudo animais alimentados com uma dieta contendo 16% de semente de chia apresentaram aumento das concentrações plasmáticas de ALA, EPA e DHA e diminuição do teor de triglicerídeos no plasma (AYERZA; COATES, 2007)

Ainda assim, há poucos estudos com o óleo da semente da chia que avaliem o contexto geral de obesidade. Foi demonstrado em roedores que a suplementação com óleo de chia aumentou a conversão de AGPI ω 3 em diversos tecidos (Valenzuela et al. 2014). Marineli e colaboradores (2014) mostraram que o consumo de semente de chia ou óleo de chia não reduziu o ganho de peso corporal nem a massa de tecido adiposo visceral em animais obesos induzidos por dieta rica em carboidratos e lipídios. No entanto, ambos os tratamentos, com as sementes ou o óleo de chia, melhoraram a tolerância à glicose e à insulina. Além disso, restauraram a expressão de PGC-1 α , no tratamento prolongado com sementes de chia e no tratamento curto com o óleo de chia.

Poucos estudos avaliaram os efeitos da semente da chia em humanos. Vuksan e colaboradores (2007) concluíram que humanos em terapia convencional para diabetes e que consumiram a semente de chia obtiveram redução da pressão arterial sistólica, aumento das concentrações séricas de ALA e EPA sem afetar o peso corporal. Em concordância com estes dados, foi demonstrado que o consumo de semente aumentou os níveis plasmáticos de ALA e EPA em mulheres pós-menopausas (JIN et al.,2012).

Com base no que foi descrito sobre os efeitos dos AGPI ω 3 e a escassez de estudos que abordem todos os aspectos o remodelamento do tecido adiposo decorrente da obesidade, o incentivo ao aumento de sua ingestão através do consumo de alimentos fonte deste ácido graxo parece uma estratégia para prevenção e controle da obesidade.

1 PROPOSIÇÃO

A obesidade pode promover alterações funcionais nos tecidos adiposos subcutâneo e visceral, tais como hiperplasia, hipertrofia, *browning* de adipócitos, produção de moléculas inflamatórias e reorganização da matriz extracelular. Estas alterações, também denominadas de remodelamento de tecido adiposo, podem constituir-se como uma resposta adaptativa ao processo de aumento de adiposidade. Entretanto, dependendo do grau e dos fatores que possam estar envolvidos no incremento de adiposidade, estas alterações no tecido adiposo branco podem ocasionar desequilíbrios sistêmicos e doenças como diabetes do tipo 2.

Considerando-se o conhecimento a respeito dos efeitos benéficos da utilização de ácidos graxos ω -3 sobre a homeostase glicêmica; a riqueza de ALA presente no óleo de chia e a escassez de estudos que relacionem AGPI proveniente do óleo de chia com o remodelamento de tecido adiposo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos sobre o remodelamento dos tecidos adiposos subcutâneo e visceral ocasionados pela suplementação com óleo de chia realizada durante o processo de estabelecimento de obesidade e realizada depois de sua instauração.

2 MATERIAL E MÉTODOS

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° CEA/047/2013).

2.1 Modelo experimental de Obesidade

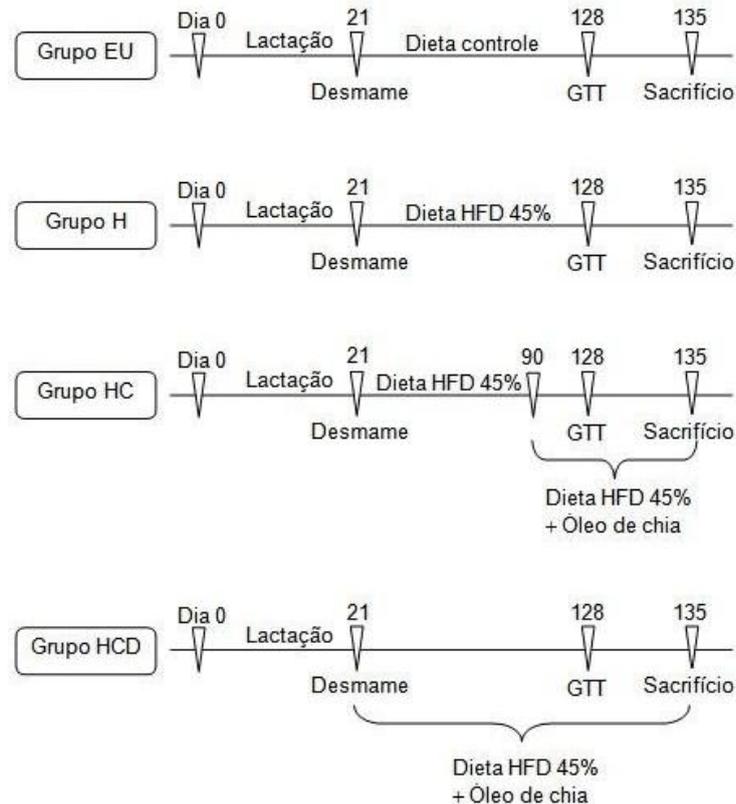
Vinte e oito camundongos *swiss* machos com 21 dias de vida, provenientes da Universidade Federal de Minas Gerais, foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia da UERJ, sob condições controladas de ciclos claro/escuro de 12 por 12 horas, 60% de umidade, temperatura ambiente de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e livre acesso à ração e água.

Os animais foram divididos na proporção de 1:1, totalizando 7 animais por grupo. Os animais do grupo controle (**Grupo EU**) foram mantidos em dieta normocalórica durante todo o experimento, dos 21 aos 135 dias. Os animais dos grupos H e HC foram mantidos em dieta hiperlipídica com 45% de Kcal provenientes de lipídeos até 90 dias de vida. Neste momento, os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentavam peso significativamente superior ao grupo controle. Após os 90 dias, os animais do **Grupo H** foram mantidos em dieta hiperlipídica e, os do **Grupo HC**, receberam a mesma dieta hiperlipídica, porém com suplementação de óleo de chia (1,5% m/m). No **Grupo HCD**, os animais foram mantidos em dieta hiperlipídica com suplementação de óleo de chia (1,5% m/m) durante todo o período de experimento, dos 21 (desmame) aos 135 dias. Todos os animais foram sacrificados aos 135 dias. As dietas foram trocadas a cada 2 dias para evitar a oxidação dos lipídeos. Para as análises, foi utilizado um número amostral de 5 a 10 animais por grupo.

Desde a primeira semana de dieta, o peso e a ingestão de todos os animais foram aferidos uma vez por semana. A descrição da composição da dieta encontra-

se na tabela 3. O esquema de dietas e suplementação dos animais está apresentado no QUADRO 3.

Quadro 3 – Linha do tempo das dietas utilizadas no estudo



Legenda: Após 21 dias de lactação, os animais foram agrupados em EU (dieta normocalórica até 135 dias), H (dieta hiperlipídica até 135 dias), HC (dieta hiperlipídica até os 90 dias de vida, quando foi iniciada a suplementação com óleo de chia até os 135 dias de vida, totalizando 45 dias de suplementação) e HCD (dieta hiperlipídica e suplementação com óleo de chia do desmame até os 135 dias de vida, totalizando 114 dias de suplementação). O teste de tolerância à glicose foi realizado 7 dias antes do sacrifício, aos 128 dias de vida.

Tabela 3 – Composição de macro e micronutrientes das dietas (g/100g)

Ingredientes	EU	H	HC e HCD
Caseína	20,0	23,5	23,2
Colina	0,2	0,3	0,3
Cistina	0,3	0,4	0,3
Amido de milho	53,0	28,9	28,4
Sacarose	10,0	11,7	11,6
Óleo de soja	7,0	8,2	8,1
Banha	0,0	15,6	15,3
Óleo de Chia	0,0	0,0	1,7
Minerais	3,5	4,1	4,1
Vitaminas	1,0	1,2	1,2
Fibras	5,0	5,9	5,8

Energia (Kcal/g)	4,0	4,7	4,8
Legenda: EU: Dieta controle normocalórica; H: Dieta hiperlipídica; HC e HCD: Dieta hiperlipídica suplementada com óleo de chia.			
Nota: A composição da dieta controle foi baseada na AIN-93 (REEVES et al., 1993). As dietas experimentais e o valor de suplementação de ácidos graxos ω 3 foram baseados no artigo de OH et al.(2011).			

2.2 Teste de tolerância à glicose

Para avaliar a tolerância à glicose, o teste de tolerância (TTG) foi realizado ao final da tarde 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, 120 e 150 minutos após a administração da glicose. Todas as alíquotas foram analisadas pelo glicosímetro e glicosímetro Accu-Check Active, Roche®.

2.3 Coleta de sangue

Aos 135 dias, os animais foram mantidos em jejum por aproximadamente 12 horas e anestesiados com quetamina (50 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg); o sangue 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 1008 g por 10 minutos e o plasma foi coletado, aliquoteado e estocado em freezer -80°C para dosagem de leptina, TNF- α e interleucinas.

2.4 Análise da morfologia do tecido adiposo

Para análise histológica da morfologia e morfometria de adipócitos, os tecidos adiposos 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. Para a fixação do tecido, as amostras foram embebidas em parafina. Para obtenção das lâminas, os tecidos foram fixados na lâmina para posteriormente serem corados com HE (hematoxilina e eosina).

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. Foi utilizado um número amostral de quatro animais por grupo e três lâminas de cada animal foram analisadas.

2.5 Quantificação de citocinas plasmáticas

As dosagens séricas de leptina, TNF- α , IL6 e IL10 foram realizadas por ELISA utilizando kits comercialmente disponíveis (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, EUA). As dosagens foram realizadas conforme as instruções do fabricante.

Uma placa de 96 poços foi coberta com anticorpo de captura na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e incubada overnight em temperatura ambiente. Após este período, a placa foi lavada por 6 vezes (0,05% de Tween-20 em PBS) e em seguida, bloqueada (BSA 1% em PBS) por 2 horas. Após novas lavagens, a curva padrão (de 2ng/ml a 0,0125 ng/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 (100 $\mu\text{g/mL}$) por 2 horas. Após novas lavagens, adicionou-se à placa 100 μL /poço de Avidina-HRP diluída 1:2000 em solução diluente (0,5% Tween-20, 0,1% BSA em PBS). Após 30 minutos, o substrato 2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolina-6-

ácido sulfônico - ABTS) (Sigma, St Louis, MO) 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.

2.6 Quantificação de RNAm em tecido adiposo

Para quantificação de RNAm foi utilizada a técnica de qRT-PCR e foram utilizados os oligonucleotídeos apresentados na tabela 4. O RNA total do tecido adiposo foi extraído com o kit de extração de RNA da Qiagen, seguindo-se as recomendações do fabricante. A quantificação das amostras de RNA total foi realizada inicialmente no espectrofotômetro BioDrop μ LITE por análise da absorbância a 260nm. A pureza do RNA extraído foi avaliada através da razão A260/A280, apresentada pelo software do equipamento e que indica possíveis contaminações da amostra por proteínas e compostos fenólicos.

A síntese do cDNA foi realizada a partir de 1 μ g de RNA total tratado, utilizando o *High Capacity RNA-to-cDNATM Kit* (Applied Biosystems, nº catálogo: 4387406), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram incubadas a 37°C, por 60 minutos e a 95°C por 5 minutos. A reação de síntese de cDNA foi realizada no Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems).

O PCR em tempo real foi realizado utilizando-se o equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando-se um sistema de quantificação de fluorescência verde emitida por SYBR (Applied Biosystems) para quantificação dos 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 de dissociação para identificação do número de amplicons.

Tabela 4 – Lista de oligonucleotídeos utilizados

Gene	Primer senso 5'-3'	Primer antisenso 5'-3'
Adipoq	GGTCTTCTTGGTCCTAAGGGTGAG	GCGGCTTCTCCAGGCTCTC
Leptin	CTCCAAGGTTGTCCAGGGTT	AAAAC TCCCCACAGAATGGG
TNF- α	GCAGGTCTACTTTAGAGTCATTGC	TCCCTTTGCAGAACTCAGGAATGG
PPAR α	GGCACCTCACATCATCAAAGT	TGGAACAGACGGCGGCTTTC
PPAR γ	GAGTGTGACGACAAGATTTG	GGTGGGCCAGAATGGCATCT
FAS	GCTGCGGAAACTTCAGGAAAT	AGAGACGTGTCACTCCTGGACTT
CCL2	AAGAAGATCACCAGCAGCAG	TCTGGACCCATTCTTCTTG
PGC1- α	AAGTGTGGAAGTCTCTGGAAGT	GGGTTATCTTGGTTGGCTTTATG
UCP1	AGATCTTCTCAGCCGGAGTTT	CTGTACAGTTTCGGCAATCCT
GAPDH	ACAATGAATACGGCTACAGCAACAG	GGTGGTCCAGGGTTTCTTACTCC

2.7 Western Blotting

A avaliação das proteínas marcadores de *browning* e de matriz extracelular foi realizada com amostras de tecido adiposo subcutâneo e visceral, respectivamente. A quantidade de proteína foi determinada pelo método de BCA (Thermo Scientific). Em seguida, as amostras foram tratadas com tampão de amostra 5 vezes concentrado (Tris HCl 50 mM, pH 6,8; SDS 1%; β mercaptoetanol 5%; glicerol 20%; azul de bromofenol 0,001%) por 5 minutos a 95°C e, em seguida congeladas para serem submetidas ao SDS PAGE.

Amostras contendo 20 μ g de proteínas foram separadas por eletroforese em gel a 10% e 15% de poliacrilamida contendo SDS (SDS PAGE). Um padrão de diferentes pesos moleculares foi utilizado em todas as eletroforeses por SDS PAGE (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 (PVDF Hybond P, Amersham Pharmacia Biotech) por 30 minutos, utilizando-se o sistema Semi Dry (BIO RAD). Em seguida, as membranas foram incubadas, durante 1 hora, com solução de bloqueio contendo 5% de albumina de soro bovino (BSA; Sigma) e T-TBS (Tween 20 0,1% em TBS), seguidas de incubação *overnight* com os anticorpos primários específicos. Os seguintes anticorpos primários (Abcam, Santa Cruz Biotechnology e Cell Signaling Technology) foram utilizados: rabbit anti VDAC2 (Abcam 47104; 1:500), rabbit anti UCP1 (Cell Signalling 14670 1:500), rabbit anti ppar gamma (SC

7196; 1:1000), mouse anti MMP2 (Abcam 3158; 1:1000), mouse anti MMP9 (Abcam 119906; 1:1000), mouse anti actina (Abcam 101173; 1:1000). Em seguida, as membranas foram lavadas com T-TBS 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-TBS e incubadas com estreptavidina conjugada com peroxidase (1:5000 - 1:10000, Zymed, S. San Francisco, California, USA), por 1 hora. As proteínas imunorreativas foram visualizadas pela marcação com ECL, utilizando-se o kit ECL Plus (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA) e analisados pelo ChemiDoc – Bio Rad. As bandas foram quantificadas por densitometria, utilizando o software Image J (NIH, USA). Os extratos totais foram normalizados pelos níveis de actina.

2.8 Imunohistoquímica

Para imunohistoquímica dos tecidos adiposos dos animais suplementados ou não com óleo de chia foram fixados e armazenados conforme descrito no item 3.1.4. Para a inclusão do tecido, as amostras foram embebidas em parafina e depois foram cortadas em micrótomo, sendo posicionadas nas lâminas ao longo do processo dos cortes histológicos. A seguir, as lâminas foram desparafinizadas em Xilol, realizando-se dois banhos de três minutos cada (xilol e etanol, 1:1) e hidratadas em concentrações decrescentes de álcool etílico (95%, 70% e 50%), realizando-se dois banhos por três minutos cada. Em seguida, foram lavadas 4 vezes em PBS. Após, foram bloqueadas e permeabilizadas com a solução PBS/BSA 5%/Triton-X 0,3% por 1 hora. Em seguida, incubadas com anticorpos primários específicos anti- F4/80-FITC (Biolegend) e anti-CD 105-PE (Biolegend) e anti-UCP1(Cell Signalling 14670) overnight a 4°C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas por seis vezes com PBS e incubadas com anticorpos secundários específicos por 1 hora. Em seguida, foram novamente lavadas por seis vezes em PBS.

A montagem das lâminas foi feita com DAPI, para marcação do núcleo. As imagens foram capturadas nos aumentos de 20 e 40 vezes em microscópio de fluorescência Olympus BX40. Os anticorpos secundários dos respectivos anticorpos

primários foram usados como controles negativos. As imagens foram digitalizadas e processadas através dos softwares ImageJ e Adobe Photoshop.

2.9 Análise Estatística

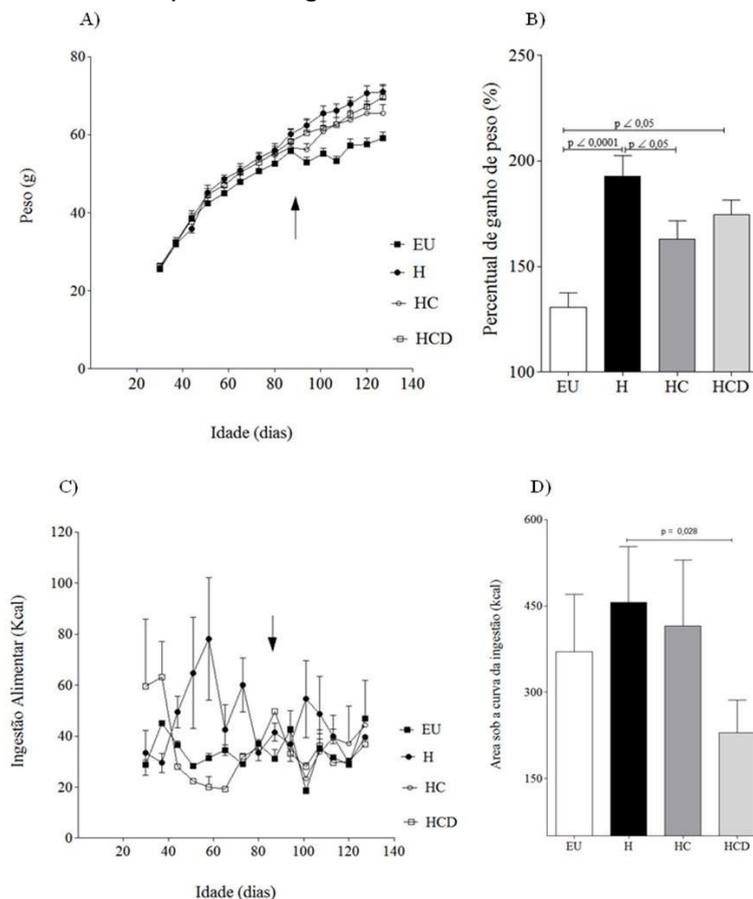
Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os resultados obtidos para cada grupo experimental foram analisados estatisticamente utilizando-se teste t e ANOVA com análise de varância de Bonferroni. A significância foi considerada para valores de $p < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando se GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software,USA).

3 RESULTADOS

3.1 Peso corporal e ingestão calórica

O peso corporal e a ingestão das dietas foram cuidadosamente monitorados em todos os grupos (Fig. 1A e 1C). A dieta hiperlipídica promoveu um aumento no percentual de ganho de peso corporal dos animais (grupo H) quando comparados com o grupo EU. A suplementação com o óleo de chia reduziu o percentual de ganho peso corporal dos animais apenas quando ofertada após a instauração da obesidade (grupo HC) (Fig. 1B). Com relação à ingestão calórica foi observada uma redução do ganho de peso ponderal do grupo HCD quando comparado com o grupo EU, identificada pela área sob a curva (Fig. 1D).

Gráfico 1 – Peso corporal e ingestão calórica



Legenda: Evolução do peso corporal ao longo do desenvolvimento (A). Percentual de ganho de peso ao final do experimento (B). Ingestão calórica, expressa em quilocalorias por animal por dia (C). Área sob a curva da ingestão calórica (D). EU: dieta controle; H: dieta hiperlipídica; HC: animais do grupo H que receberam a suplementação com o óleo de chia aos 90 dias e HCD: animais do grupo H que receberam a suplementação com o óleo de chia desde o desmame. A seta indica o início da suplementação com óleo de chia no grupo HC, aos 90 dias. Os gráficos apresentam média \pm E.P.M, n = 7 por grupo e foram

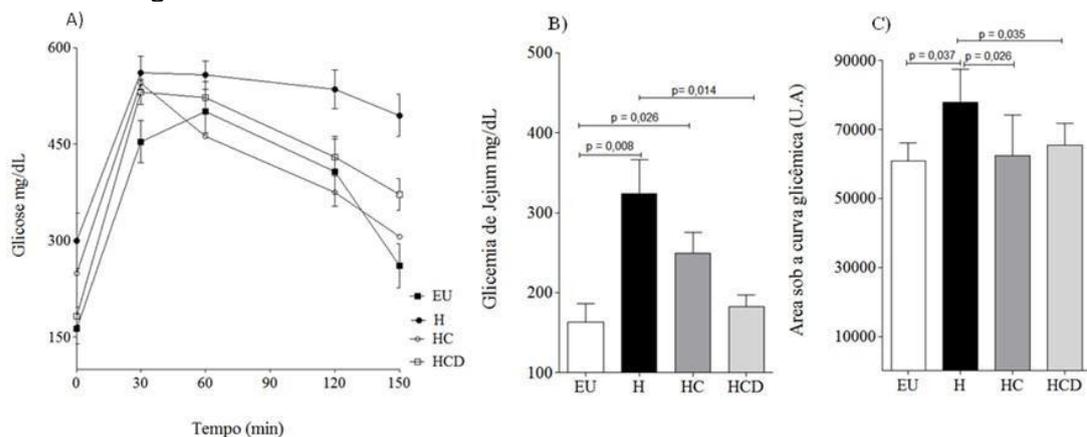
analisados estatisticamente utilizando-se teste *t* e ANOVA com análise de variância de Bonferroni. A significância foi considerada para valores de $p < 0,05$.

3.2 Efeito da suplementação com óleo de chia sobre os indicadores glicêmicos

A glicemia dos animais foi avaliada após um jejum de seis horas (Fig.2A). A dieta hiperlipídica (H) acarretou um aumento da glicemia em jejum. Por outro lado, o tratamento com óleo de chia, realizado a partir do desmame (HCD), fez com que os animais apresentassem menores concentrações plasmáticas de glicose ao jejum. Contudo, o mesmo não ocorreu quando o tratamento com óleo de chia iniciou-se posteriormente (90 dias de vida), quando o quadro de obesidade já estava estabelecido (grupo HC) (Fig.2A).

Após aferição da glicemia de jejum, os animais foram submetidos ao teste de tolerância à glicose (TTG). Os grupos tratados com óleo de chia (HC e HCD) alcançaram maior eficiência na captação de glicose pelos tecidos: apresentaram menor glicemia ao longo do TTG, aproximando-se da curva glicêmica dos animais controle (Fig. 2B). Este resultado pode ser mais bem expresso pelo gráfico da área sob a curva (Fig. 2C).

Gráfico 2 – Efeito da suplementação com óleo de chia sobre os indicadores glicêmicos



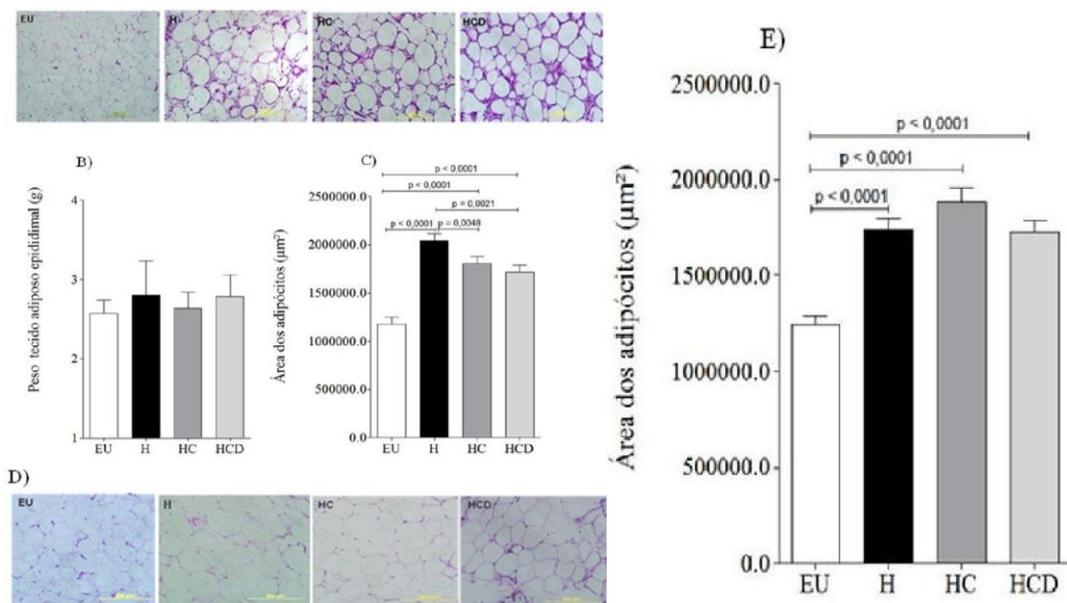
Legenda: Efeito da suplementação com óleo de chia sobre os indicadores glicêmicos. Glicemia de jejum após 6h (A). Teste de tolerância à glicose (TTG) após infusão peritoneal de 2 g/kg de peso corporal por animal (B). Cálculo da área sob a curva glicêmica (C). EU: dieta controle; H: dieta hiperlipídica; HC: animais do grupo H que receberam a suplementação com o óleo de chia a partir dos 90 dias; e HCD: animais do grupo H que receberam a suplementação com o óleo de chia desde o desmame. Os gráficos apresentam média \pm E.P.M, $n = 7$ animais por grupo e foram analisados estatisticamente utilizando-se teste *t* e ANOVA com análise de variância de Bonferroni. A significância foi considerada para valores de $p < 0,05$.

3.3 Efeitos da suplementação do óleo de chia sobre a morfologia do tecido adiposo

Os presentes resultados mostraram que a suplementação com óleo de chia não modificou a massa de tecido adiposo epididimal (Fig. 3B). No entanto, a análise morfométrica do tecido adiposo epididimal (Fig. 3A) aponta a existência de diferenças no tamanho dos adipócitos, em que os grupos tratados com óleo de chia apresentaram menor grau de hipertrofia (Fig. 3C).

No tecido adiposo subcutâneo, a dieta hiperlipídica provocou aumento da hipertrofia dos adipócitos, a qual não foi evitada ou reduzida pela suplementação com óleo de chia (Fig. 3D, E), diferentemente do que ocorreu no tecido adiposo epididimal.

Gráfico 3 – Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a massa do tecido adiposo e seus adipócitos



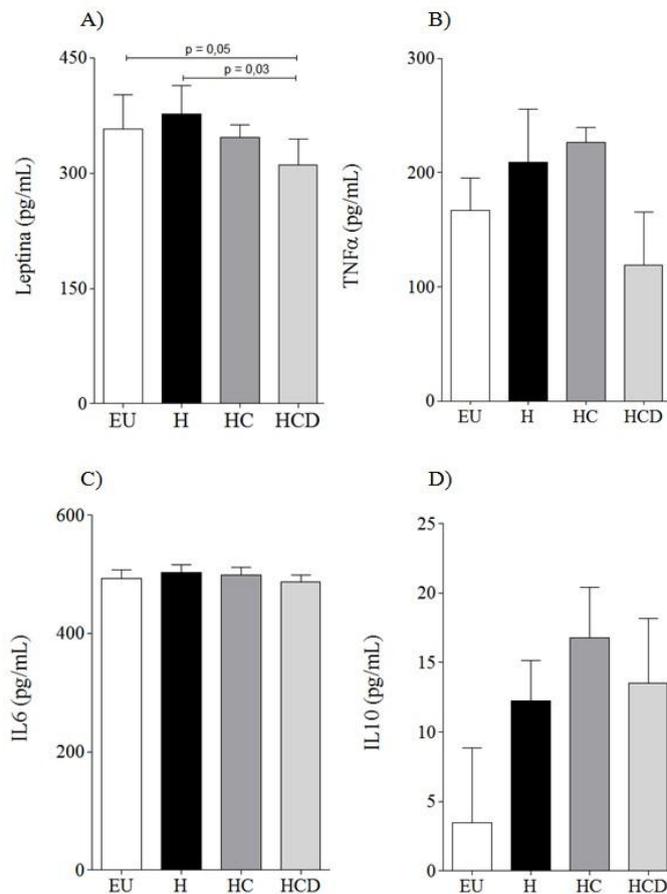
Legenda: Imagem dos adipócitos do tecido adiposo epididimal (A). Peso do tecido adiposo epididimal (B). Área dos adipócitos do tecido adiposo epididimal (C). Imagem dos adipócitos do tecido adiposo subcutâneo (D). Área dos adipócitos do tecido adiposo subcutâneo (E). EU: dieta controle; H: dieta hiperlipídica; HC: animais do grupo H que receberam a suplementação com o óleo de chia a partir de 90 dias; HCD: animais do grupo H que receberam a suplementação com o óleo de chia desde o desmame. Os gráficos apresentam média \pm E.P.M, $n = 4$ animais por grupo; 3 lâminas de cada animal. Foram analisados estatisticamente utilizando-se teste t e ANOVA com análise de variância de Bonferroni. A significância foi considerada para valores de $p < 0,05$.

3.4 Citocinas plasmáticas e adipocinas e sua produção no tecido adiposo visceral

Os tecidos adiposos secretam vários hormônios, citocinas e adipocinas que controlam o balanço energético, regulando os sinais do sistema nervoso central e a atividade metabólica nos tecidos periféricos.

Embora o modelo de obesidade utilizado neste estudo não tenha ocasionado aumento na concentração de leptina circulante, observamos menores concentrações plasmáticas de leptina no grupo suplementado com óleo de chia desde o desmame (HCD) quando comparado ao grupo H (Fig. 4A). Entretanto, as concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-6 e IL-10 não foram diferentes entre os grupos (Fig. 4, B, C e D).

Gráfico 4 - Circulação de citocinas e adipocinas e sua produção em tecido adiposo visceral

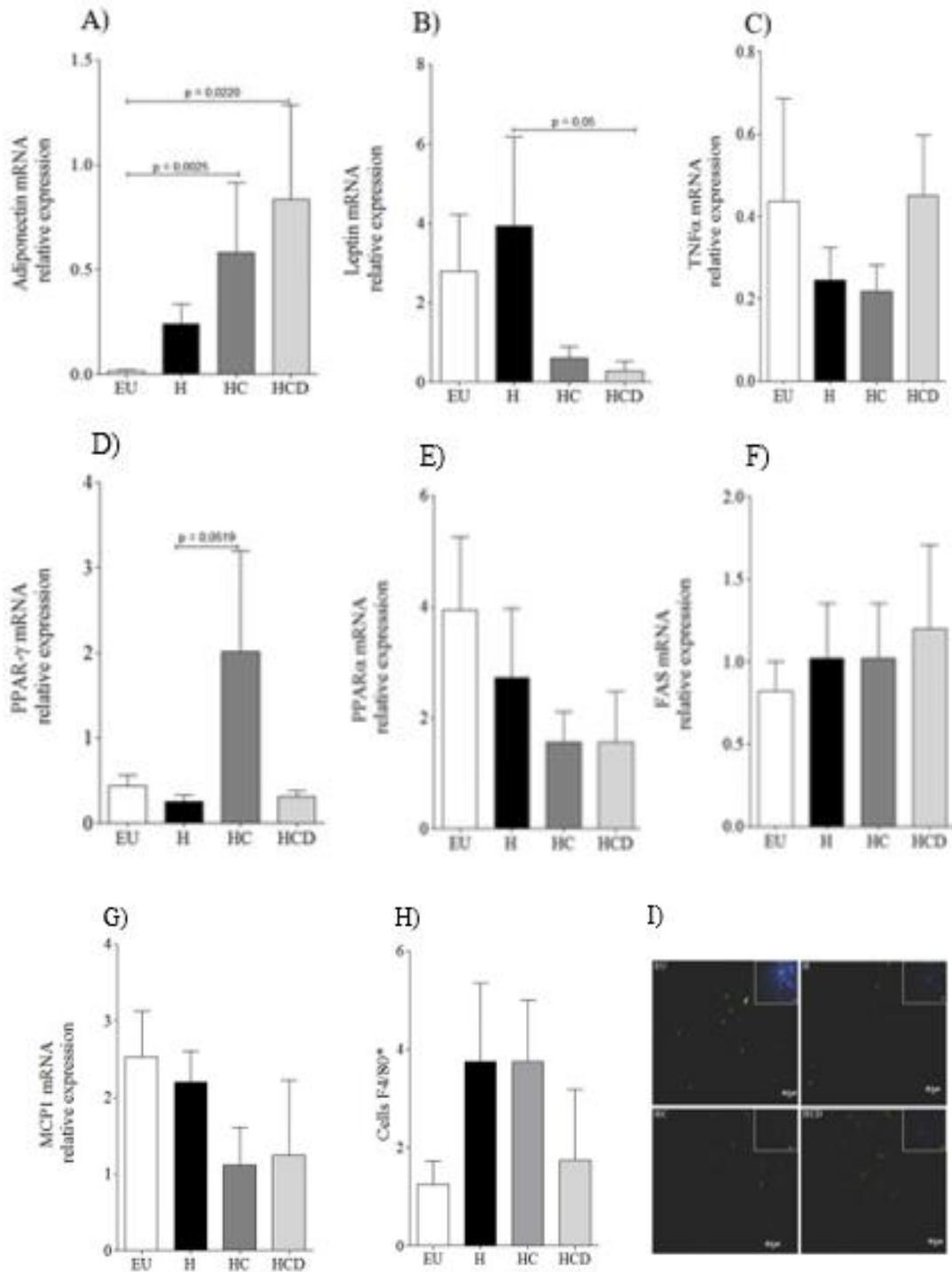


Legenda: Alterações de adipocinas e citocinas após suplementação com óleo de chia. Os níveis plasmáticos de Leptina (A), TNF- alfa (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) foram analisados por ELISA nos camundongos (135 dias de vida). Foram utilizados para análise estatística teste *t* e ANOVA com análise de variância de Bonferroni. A significância foi considerada para valores de $p < 0,05$.

3.5 Efeito da suplementação com óleo de chia sobre o RNAm de adipócitos do tecido adiposo visceral

Com relação à quantificação de RNAm produzido pelo tecido adiposo epididimal, identificamos aumento de RNAm codificante para adiponectina (Fig. 5A), uma adipocina anti-inflamatória, em ambos os grupos suplementados com óleo de chia em relação ao grupo EU. Além disso, neste tecido, a suplementação reduziu a quantidade de RNAm de leptina nos grupos obesos (Fig. 5B). A expressão gênica de TNF- α (Fig. 5C) não foi diferente entre os grupos, corroborando com o resultado revelado pelo ELISA (Fig. 4B). Quando avaliamos os PPARs (receptores ativados por proliferadores de peroxissoma), observamos que houve um aumento na expressão de PPAR- γ (Fig. 5D) no grupo HC em relação ao grupo H e não houve diferença entre os grupos para expressão do PPAR- α (Figura 5E). Da mesma forma, também não foi observada modificação na alteração da expressão de FAS (ácido graxo sintase) (Fig. 5F) e MCP-1 (quimiocina atraente de macrófagos) (Fig. 5G). Os macrófagos também foram avaliados por meio de imunohistoquímica, através da marcação de células para F4/80, não tendo sido identificada diferença entre os grupos quanto ao número de macrófagos presentes no tecido adiposo visceral (Fig. 5H e I).

Gráfico 5 – RNAm de adipócitos do tecido adiposo visceral



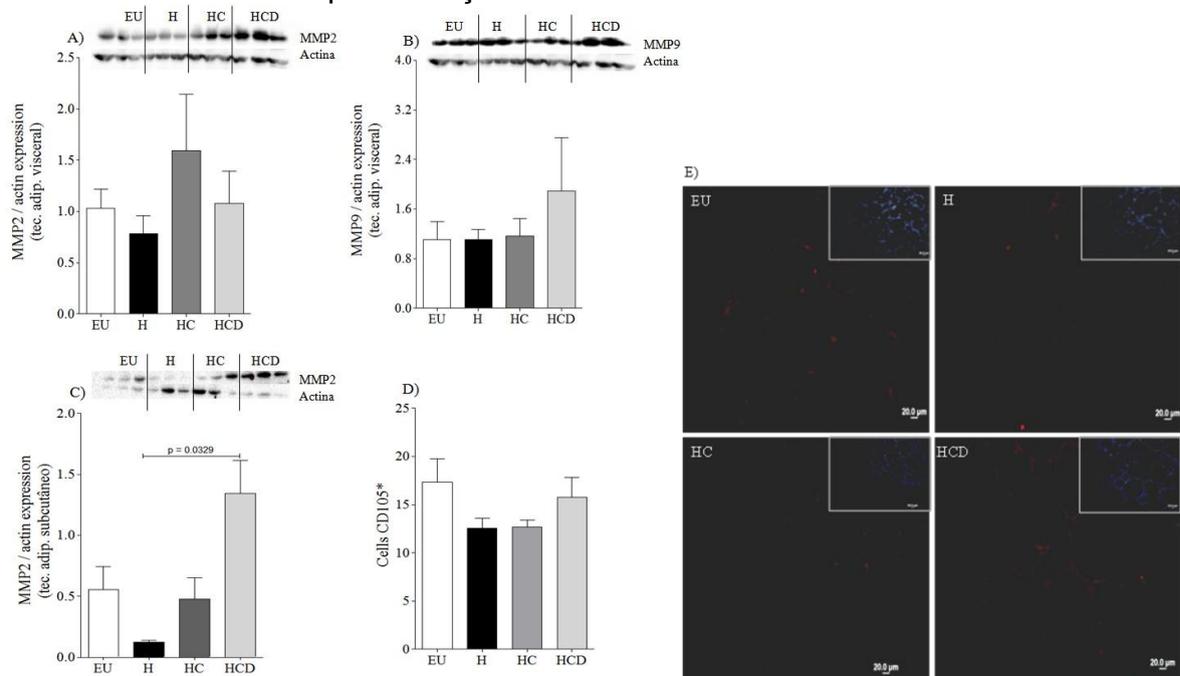
Legenda: RNAm de adipócitos do tecido adiposo visceral. Expressão gênica de Adiponectina (A), leptina (B), TNF- α (C), PPAR- γ (D), PPAR- α (E), FAS (F), MCP-1 (G), Representação gráfica do F4/80 (H) Imagem de imunofluorescência F4/80 (I), no tecido adiposo visceral. EU: dieta controle; H: dieta hiperlipídica; HC: animais do grupo H que receberam a suplementação com o óleo de chia a partir dos 90 dias; HCD: animais do grupo H que receberam a suplementação com o óleo de chia desde o desmame. Os gráficos apresentam média \pm E.P.M, $n = 5$ animais por grupo e foram analisados estatisticamente utilizando-se teste t e ANOVA com análise de variância de Bonferroni. A significância foi considerada para valores de $p < 0,05$.

3.6 Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) é um componente essencial do tecido adiposo que é necessário para a manutenção integridade celular e estrutural. Durante as fases iniciais da hipertrofia dos adipócitos e o desenvolvimento da obesidade, há um aumento na deposição de MEC. Como a hipertrofia do tecido continua, a deposição e maturação dos componentes da MEC acumula e é dinamicamente modificada (NAKAJIMA et al.,2002). As MMPs 2 e 9, são duas enzimas envolvidas na modulação da MEC (BOULOUMIÉ et al., 2001).

Ao avaliar as MMPs 2 e 9 no tecido adiposo visceral, observamos que não houve diferença entre os grupos (Fig. 6A e B). No entanto, quando avaliamos a MMP2 no tecido adiposo subcutâneo observamos que a expressão proteica nos animais suplementados com a chia desde o desmame foi maior que a observada no grupo HC (Fig. 6C). Além disso, não foi observado modificação ao avaliar marcador de angiogênese (Fig. 6D e 6E).

Gráfico 6 - Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a matriz extracelular



Legenda: Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a matriz extracelular. O extrato total proteico foi obtido conforme descrito em Material e Métodos. A expressão de actina foi utilizada para normalizar os resultados. Expressão de MMP2 (A) e MMP9 no tecido adiposo epididimal (B). Expressão de MMP2 no tecido adiposo subcutâneo (C) Representação gráfica do CD105 (D), Imagem de imunofluorescência CD105 (E), no tecido adiposo visceral. Os gráficos apresentam média \pm EPM, n= 5 animais por grupo e

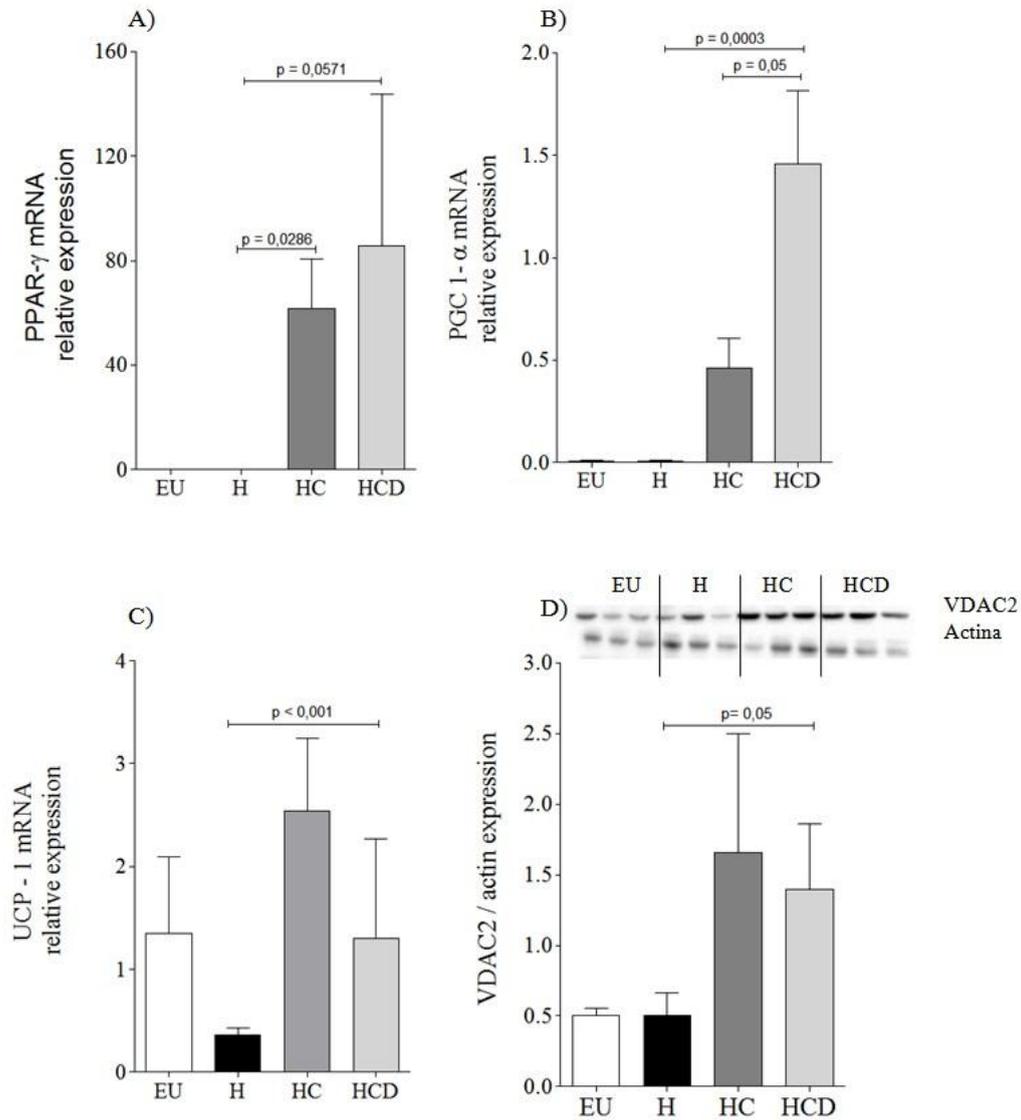
foram analisados estatisticamente utilizando-se teste *t* e ANOVA com análise de variância de Bonferroni. A significância foi considerada para valores de $p < 0,05$.

3.7 Efeito da suplementação com óleo de chia sobre o *browning* do tecido adiposo subcutâneo

Tendo em vista as modificações observadas no tecido adiposo dos animais tratados com chia, avaliamos alguns marcadores mitocondriais, buscando observar alterações que indicassem o *browning* desse tecido adiposo. A expressão de RNAm para PPAR- γ apresentou-se maior nos grupos que receberam óleo de chia (Fig. 7A). PGC 1- α é um fator de regulação da transcrição que co-induz a biogênese mitocondrial por ativação de diferentes fatores de transcrição. Observamos aumento de PGC 1- α nos grupos que receberam óleo de chia (Fig. 7B). A UCP-1 é uma proteína encontrada principalmente em mitocôndrias do tecido adiposo marrom e em tecidos adiposos em processo de *browning*. No grupo HCD, a expressão de seu RNAm apresentou-se maior quando comparada ao grupo H (Fig. 7C). Adicionalmente, VDAC 2, que é uma proteína mitocondrial formadora de canais (porina) e está envolvida no metabolismo de energia celular, foi mais expressa no grupo HCD (Fig.7D).

Estes dados indicam que a suplementação com óleo de chia à dieta hiperlipídica aumentou a carga mitocondrial no tecido adiposo subcutâneo, sugerindo a indução do processo de *browning* deste tecido.

Gráfico 7 - Efeito da suplementação com óleo de chia sobre o *browning* do tecido adiposo subcutâneo



Legenda: Efeito da suplementação com óleo de chia sobre o *browning* do tecido adiposo subcutâneo. Avaliação da expressão do RNAm para PPAR- γ (A), PGC-1 α (B) e UCP-1 (C). Expressão de VDAC2. A expressão de actina foi utilizada para normalizar o resultado (D). Foram analisados estatisticamente utilizando-se teste *t* e ANOVA com análise de variância de Bonferroni. A significância foi considerada para valores de $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

Alguns benefícios à saúde em decorrência do consumo de ácidos graxos ômega-3 de origem animal (EPA e DHA) tem sido identificados (CAPEL et al., 2015; LI et al., 2015; FLACHS et al., 2014; LIU et al., 2014; ZHAO; CHEN, 2014), especialmente no que diz respeito ao aumento da sensibilidade à insulina. Visto que o óleo de semente de chia é uma importante fonte alimentar de origem vegetal de ácido graxo ômega-3 (ALA) (IXTAINA et al., 2010), o presente estudo fornece novas informações a respeito de efeitos no tecido adiposo branco ocasionados pela suplementação dietética do óleo de chia na obesidade.

Inicialmente, mostramos que a suplementação com óleo de chia, realizada após o estabelecimento da obesidade, diminuiu o percentual de ganho de peso corporal dos animais (Fig. 1B). Corroborando com esse resultado, o estudo de Simopoulos (2016) mostrou que uma alta ingestão de ácidos graxos ômega-6, está associada ao aumento de peso, em estudos realizados com animais e humanos. Nesse sentido, este estudo mostrou também que uma elevada ingestão de ácidos graxos ômega-3 diminui o risco de aumento de peso corporal.

Por outro lado, em nosso estudo, quando a suplementação foi feita desde o desmame (HCD), não observamos redução no percentual de ganho de peso corporal (Fig. 1B). Embora não tenha sido avaliada a composição corporal destes animais, é possível que a realização da suplementação a partir do desmame tenha favorecido a hiperplasia do tecido adiposo subcutâneo e por isso não tenha havido diferença no peso corporal total. Esta suposição baseia-se no resultado apresentado na (Fig. 1B) e na observação de que, no tecido adiposo epididimal, a suplementação ocasionou redução da hipertrofia e aumento da hiperplasia dos adipócitos (Fig. 3A), uma vez que a massa de tecido adiposo epididimal foi igual entre os grupos, apesar dos animais suplementados terem apresentado adipócitos menores.

A ingestão alimentar de animais do grupo HCD foi menor do que no grupo H (Fig. 1B, 1D), mas quando a suplementação foi feita posteriormente à implantação da obesidade (HC), não houve diferença em relação ao grupo H. Diferentemente, no estudo de Marineli e colaboradores (2015), o peso corporal e a ingestão

alimentar de animais obesos não foram atenuados pela suplementação com chia (semente ou óleo), independentemente do tempo de tratamento. O mesmo ocorreu nos estudos que utilizaram a semente (NIEMAN et al., 2009; ROSSI et al., 2013; GUEVARA-CRUZ et al., 2014).

Os dados evidenciam que ambos os grupos de animais suplementados com óleo de chia obtiveram menor glicemia de jejum e melhor resposta glicêmica (Fig. 2A, 2B e 2C). Estes resultados estão de acordo com o observado no estudo de Marineli et al. (2014), em que tanto a semente de chia como o óleo de chia melhoraram a tolerância à glicose. Além disso, diversos trabalhos que utilizaram a semente da chia, encontraram resultados semelhantes (CHICCO et al., 2009; MATRAVADIA et al., 2014). Este achado é relevante visto que a resistência insulínica e a DM são uma das principais comorbidades de indivíduos obesos tanto adultos como crianças. Reforçando o benefício do óleo da semente de chia como prevenção desta comorbidade que atinge cerca de 8,9% da população brasileira segundo o Vigitel, 2016.

O consumo de dietas hiperlipídicas induz a hipertrofia dos adipócitos (BOSQUE et al., 2009; SELENSCIG et al., 2010; ROSSI et al., 2010; OLIVA et al., 2013). Como dito anteriormente, o presente trabalho mostra que a suplementação com óleo de chia levou à redução do tamanho dos adipócitos sem alterar a massa de tecido adiposo epididimal (Fig. 3B e 3C). Entretanto, este efeito do óleo de chia sobre a hipertrofia dos adipócitos não foi observado no tecido adiposo subcutâneo (Fig. 3D e 3E). O estudo de LeMieux e colaboradores (2015) mostrou que a suplementação de EPA em uma dieta hiperlipídica reduziu a hipertrofia dos adipócitos viscerais e melhorou o estado inflamatório, embora ambos os eventos tenham ocorrido de forma independente.

O tecido adiposo visceral secreta vários peptídeos bioativos coletivamente conhecidos como adipocinas. Estas incluem hormônios como leptina, adiponectina, resistina, apelina e visfatina; quimiocinas, tais como MCP -1 e IL-8; outras citocinas pró-inflamatórias tais como IL-6, IL-1, angiotensina-II e TNF- α ; e citocinas anti-inflamatórias tais como IL-10 (OLEFSKY et al., 2010). Além de alterações da morfológicas, a suplementação com óleo de chia causou modificação em algumas adipocinas e citocinas produzidas pelo tecido adiposo. A suplementação com chia à dieta hiperlipídica desde o desmame reduziu significativamente a leptina plasmática e sua expressão gênica no tecido adiposo epididimal (Fig. 4A e 5B). Em humanos,

a suplementação dietética com EPA/DHA apresentou uma correlação negativa com as concentrações plasmáticas de leptina (RESELAND et al., 2001).

O estudo de Sundaram et. al. (2015) comparou dietas HFD com diferentes quantidades e fontes de lipídios e observou que a dieta com óleo de peixe reduziu a concentração plasmática de leptina. Também constatou que a dieta com óleo de linhaça aumentou as concentrações de adiponectina no tecido adiposo. Estes resultados corroboram com os resultados do presente trabalho, em que foi verificado aumento da expressão de RNAm de adiponectina no tecido adiposo epididimal dos animais suplementados com o óleo da chia (Fig 5A), o que pode ter contribuído para diminuição da resistência à insulina, uma vez que a adiponectina regula o metabolismo de lipídios e glicose e aumenta a sensibilidade à insulina (PAJVANI et al., 2004). O consumo de uma dieta enriquecida com EPA/DHA aumentou as concentrações plasmáticas de adiponectina em animais C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica (FLACHS et al., 2006) bem como em animais ob/ob (GONZALEZ-PERIZ et al., 2009). Apesar disso, quando investigamos as concentrações de IL-10, que é uma citocina anti-inflamatória, não identificamos nenhuma diferença ocasionada pela suplementação com óleo de chia (Fig.4D).

No presente trabalho, não foram observadas modificações nas concentrações plasmáticas e quantificação de RNAm de marcadores inflamatórios avaliados anteriormente (Fig. 4B, 4C e 5C), como também, não houve presença de macrófagos no tecido adiposo epididimal (Fig.5G, 5H e 5I), diferentemente da maioria dos estudos que associam a inflamação do tecido adiposo com complicações da obesidade. Todavia, esses dados corroboram com novos trabalhos que vêm questionando a associação entre inflamação e obesidade. No estudo publicado por Kim et al. (2015) demonstrou-se que o aumento do tamanho dos adipócitos pode levar a resistência à insulina, independentemente de inflamação. E, em camundongos tratados com clodronato (para depleção de macrófagos), a dieta HFD induziu a hipertrofia de adipócitos e ocasionou a resistência à insulina independentemente da ativação de resposta inflamatória (LEE et al., 2011). A ausência de inflamação observada nestes animais sugere também um conceito que vem sendo discutido recentemente na literatura que são dos obesos metabolicamente saudáveis, pode existir na ausência de anormalidades metabólicas.

Tanto o PPAR- α quanto o PPAR- γ , são alguns dos principais mediadores dos efeitos do metabolismo lipídico do EPA (Fig. 4H e 4I) (FLACHS et al., 2009; GONZÁLEZ-PÉRIZ et al., 2009; FLACHS et al., 2005). No trabalho, observou-se aumento da expressão de RNAm de PPAR- γ (Fig. 5D) após suplementação com o óleo de chia e não houve modificação na expressão de PPAR- α (Fig. 5E). Estudos mostram que o PPAR- γ medeia os efeitos do EPA e do DHA na regulação positiva da adiponectina (KALUPAHANA et al., 2011; NESCHEN et al., 2006).

Na obesidade, o tecido adiposo sofre remodelamento da MEC, devido à hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos. A composição da MEC reflete um equilíbrio entre síntese e degradação da matriz. E pode ser alterada pela proteólise através dos sistemas fibrinolíticos e MMPs (CATALAN et al., 2012). A desregulação de MMP tem sido implicada na fisiopatologia da obesidade e diabetes (WILLIAMS et al., 2016).

Neste trabalho, investigamos a expressão protéica das MMP-2 e 9 no tecido adiposo epididimal (Fig 6A e 6B), e não foram observadas modificações entre os grupos. Adicionalmente, também avaliamos a MMP-2 no tecido adiposo subcutâneo, que apresentou aumento no grupo HCD (Fig. 6C). Estes resultados, diferem dos estudos encontrados na literatura que mostraram que, em seres humanos, as concentrações plasmáticas circulantes de MMP-2 e 9 aumentaram em obesos (DEROSA, et al. 2008) e diabéticos (SIGNORELLI et al., 2005; HOPPS et al., 2013). Contudo, o papel específico desempenhado por cada MMP na patogênese da obesidade e resistência à insulina não foi totalmente definido. Vale destacar que a expressão das MMPs no tecido adiposo de animais com dieta HFD é regulada diferentemente (MAQUOI et al., 2002; CHAVEY et al., 2003).

O estudo de Trayhurn e colaboradores (2004) mostrou que a hipertrofia de adipócitos cria áreas de micro-hipóxia local nos primeiros estágios de expansão do tecido adiposo. Isso foi verificado por observações clínicas recentes em seres humanos, o que sugere que tecido adiposo é pouco oxigenado no estado obeso (KABON et al., 2004). Entretanto, não houve diferença entre os grupos quando avaliado CD105, um marcador de angiogênese, como observado na fig. 6D e 6E.

O *browning* do tecido adiposo subcutâneo tem sido estudado e entendido como um processo capaz de atenuar alguns dos efeitos da obesidade (LANGIN, 2010) por potencializarem o aumento do gasto energético basal. Os AGPI ω -3 foram associados com aumento do grau de expressão de UCPs em múltiplos

tecidos, como tecido adiposo marrom, fígado e músculo (SADURSKIS et al., 1995; OUDART et al., 1997; BAILLIE et al., 1999; ARMSTRONG et al., 2001).

Estudo de Zhao e Chen (2014) mostraram que o tratamento com EPA aumentou a expressão gênica de UCP1-3 dos adipócitos brancos durante o processo de diferenciação, além do aumento do conteúdo de DNA mitocondrial e de expressão de genes mitocondriais como PGC-1 α . Os resultados observados no presente trabalho identificaram aumento das concentrações de marcadores de *browning* no tecido adiposo subcutâneo, como aumento da expressão dos RNAm codificantes para PPAR- γ , PGC- 1 α , UCP1 e expressão protéica de VDAC2 (Fig 7A, 7B, 7C e 7D). Semelhantemente aos resultados do presente trabalho, o estudo Marineli e colaboradores (2014) mostrou que o tratamento prolongado com sementes de chia e o tratamento curto com o óleo de chia em animais obesos restauraram a expressão de PGC-1 α .

Em conclusão, alguns dos aspectos do remodelamento do tecido adiposo branco, comumente observados na obesidade, foram atenuados pelos tratamentos com óleo de chia. O benefício mais evidente, e observado também em outros estudos, refere-se ao aumento da sensibilidade à insulina, que foi acompanhada por redução da hipertrofia no tecido adiposo visceral e aumento da síntese de adiponectina neste tecido. A suplementação realizada a partir do desmame (HCD), antes da implementação da obesidade, foi a que apresentou resultados mais expressivos. Este grupo apresentou menor concentração sérica de leptina e menor ingestão alimentar. O tecido adiposo subcutâneo deste grupo apresentou aumento dos marcadores de *browning*. Em conjunto, os dados deste estudo indicam que a suplementação com óleo de chia é benéfica à saúde quando realizada em animais obesos e é ainda mais eficaz quando feita desde o início da oferta de uma dieta obesogênica.

REFERÊNCIAS

- AHMED, Majed B. et al. Proximate composition, antinutritional factors and protein fractions of guar gum seeds as influenced by processing treatments. **Pak. J. Nutr**, v. 5, n. 5, p. 481-484, 2006.
- ARNER, P. Regional adiposity in man. **Journal of Endocrinology**, v. 155, n. 2, p. 191- 192, 1997.
- ARNER, E. et al. Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. **Diabetes**, v. 59, n. 1, p. 105-109, 2010.
- ARMSTRONG, M. B.; TOWLE, H. C. Polyunsaturated fatty acids stimulate hepatic UCP-2 expression via a PPAR α -mediated pathway. **American Journal of Physiology- Endocrinology and Metabolism**, v. 281, n. 6, p. E1197-E1204, 2001.
- ASTERHOLM, I. W. et al. Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. **Cell metabolism**, v. 20, n. 1, p. 103 - 118, 2014.
- AYERZA, R. ; COATES, W. Effect of dietary α linolenic fatty acid derived from chia when fed as ground seed, whole seed and oil on lipid content and fatty acid composition of rat plasma. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 51, n. 1, p. 27-34, 2007.
- AYERZA, R.; COATES, W. Dietary levels of chia: influence on yolk cholesterol, lipid content and fatty acid composition for two strains of hens. **Poultry Science**, v. 79, n. 5, p. 724-739, 2000.
- AYERZA, R; COATES, W.; 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**, v. 81, n. 6, p. 826 - 837, 2002.
- AYERZA, R; COATES, W. E. Chia seeds and the Columbus concept. In: _____. **Wild Type Food in Health Promotion and Disease Prevention**. Humana Press, 2008. p. 377 - 392.
- AZEVEDO, A. et al. A síndrome metabólica. In: SOARES, R.; COSTA, C.; (ed.). **Estresse oxidativo, inflamação e angiogênese na síndrome metabólica** . Nerw York, NY, EUA: Springer Science; pp. 1-19. 2009.
- BAILEY, N. Current choices in omega 3 supplementation. **Nutrition Bulletin**, v. 34, n. 1, p. 85-91, 2009.
- BAILLIE, R. A. et al. Coordinate induction of peroxisomal acyl-CoA oxidase and UCP- 3 by dietary fish oil: a mechanism for decreased body fat deposition.

Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids, v. 60, n. 5-6, p. 351-356, 1999.

BARABINO, S. et al. The role of systemic and topical fatty acids for dry eye treatment. **Progress in Retinal and Eye Research**, 2017.

BARTELT, A.; HEEREN, J. Adipose tissue browning and metabolic health. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 1, p. 24-36, 2014.

BELZUNG, F.; RACLOT, T.; GROSCOLAS, R. Fish oil n-3 fatty acids selectively limit the hypertrophy of abdominal fat depots in growing rats fed high-fat diets. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 264, n. 6, p. R1111-R1118, 1993.

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

BIRSOY K, FESTUCCIA, WT, LAPLANTE M. A comparative perspective on lipid storage in animals. **J Cell Sci** 126:1541–52, 2013.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BREANNE, A., M.; MA, DAVID WL. Are all n 3 polyunsaturated fatty acids created equal?. **Lipids in Health and Disease**, v. 8, n. 1, p. 1, 2009.

BREW, K.; DINAKARPANDIAN, D; NAGASE, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1477, n. 1, p. 267-283, 2000.

BOULOUMIÉ, A. et al. Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9. **Diabetes**, v. 50, n. 9, p. 2080-2086, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. **Vigitel Brasil 2015: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. – Brasília : Ministério da Saúde, 2016

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

CAPEL, F. et al. “DHA at Nutritional Doses Restores Insulin Sensitivity in Skeletal Muscle by Preventing Lipotoxicity and Inflammation.” **The Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 26, n. 9, p. 949–59, 2015.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. A. N. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological reviews**, v. 84, n. 1, p. 277-359, 2004.

CATALÁN, V. et al. Role of extracellular matrix remodelling in adipose tissue pathophysiology: relevance in the development of obesity. **Histology and histopathology**, v. 27, n. 12, p. 1515-1528, 2012.

CHAVEY, C. et al. Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 14, p. 11888-11896, 2003.

CHAWLA, A.; NGUYEN, K. D.; GOH, YP S. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 738-749, 2011.

CHICCO, A. G. et al. Dietary chia seed (*Salvia hispanica* L.) rich in α -linolenic acid improves adiposity and normalises hypertriacylglycerolaemia and insulin resistance in dyslipaemic rats. **British journal of nutrition**, v. 101, n. 1, p. 41-50, 2008.

CHICCO, A.G. et al. Dietary Chia Seed (*Salvia Hispanica* L.) Rich in α -Linolenic Acid Improves Adiposity and Normalises Hypertriacylglycerolaemia and Insulin Resistance in Dyslipaemic Rats. **British Journal of Nutrition**, v.101, n. 01, p. 41, 2009.

CHOE, S. S. et al. Adipose tissue remodeling: its role in energy metabolism and metabolic disorders. **Frontiers in endocrinology**, v. 7, 2016.

CIFTCI, O .N; PRZYBYLSKI, Roman; RUDZIŃSKA, Magdalena. Lipid components of flax, perilla, and chia seeds. **European journal of lipid science and technology**, v. 114, n. 7, p. 794-800, 2012.

CRAIG, R.; SONS, M. Application for approval of whole chia (*Salvia hispanica* L.) seed and ground whole chia as novel food ingredients. **Advisory committee for novel foods and processes**. Ireland: Company David Armstrong, 2004. v. 1, p. 1-29,

CROWLEY, V. EF; YEO, G. SH; O'RAHILLY, S.. Obesity therapy: altering the energy intake-and-expenditure balance sheet. **Nature reviews Drug discovery**, v. 1, n. 4, p. 276-286, 2002.

DA SILVA MARINELI, R. et al. Antioxidant potential of dietary chia seed and oil (*Salvia hispanica* L.) in diet-induced obese rats. **Food Research International**, 76, p. 666-674, 2015.

DEROSA, G. et al. Matrix metalloproteinase-2 and 9 levels in obese patients. **Endothelium**, v. 15, n. 4, p. 219-224, 2008.

DIXON, J. B. The effect of obesity on health outcomes. **Mol Cell Endocrinol**. V. 316, n. 2, p. 104-8, 2010.

DROLET, R. et al. Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. **International journal of obesity**, v. 32, n. 2, p. 283-291, 2008.

DONAHUE, S. MA et al. Prenatal fatty acid status and child adiposity at age 3 y: results from a US pregnancy cohort. **The American journal of clinical nutrition**, v. 93, n. 4, p. 780-788, 2011.

ECKEL, R. H; et al. The metabolic syndrome. **The Lancet**, v. 365, n. 9468, p1415–1428, 2005.

ENERBACK, S. The origins of brown adipose tissue. **The New England Journal of medicine**, v. 360, n. 19, p. 2021-2023, 2009.

ERIKSSON-HOGLING, D. et al. Adipose tissue morphology predicts improved insulin sensitivity following moderate or pronounced weight loss. **International journal of obesity**, v. 39, n. 6, p. 893, 2015.

FAUST, I. M. et al. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 235, n. 3, p. E279, 1978.

FERNANDEZ, I. et al. Impact of chia (*Salvia hispanica* L.) on the immune system: preliminary study. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 67, n. OCE, 2008.

FERREIRA, C. et al. Effect of Chia Seed (*Salvia Hispanica* L .) Consumption on Cardiovascular Risk Factors in Humans : **A Systematic Review**, v. 32, n. 5, p. 1909–18, 2015.

FLACHS, P. et al. Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce β -oxidation in white fat. **Diabetologia**, v. 48, n. 11, p. 2365-2375, 2005.

FLACHS, P. et al. Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. **Diabetologia**, v. 49, n. 2, p. 394-397, 2006.

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

FLACHS, P. et al. Synergistic induction of lipid catabolism and anti-inflammatory lipids in white fat of dietary obese mice in response to calorie restriction and n-3 fatty acids. **Diabetologia**, v. 54, n. 10, p. 2626-2638, 2011.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.

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

GIORDANO, A. et al. Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis. **Journal of lipid research**, v. 54, n. 9, p. 2423-2436, 2013.

GONZÁLEZ-PÉRIZ, A. et al. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by ω -3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 6, p. 1946-1957, 2009.

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

HAINAULT, I. et al. Fish oil in a high lard diet prevents obesity, hyperlipemia, and adipocyte insulin resistance in rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 683, n. 1, p. 98-101, 1993.

HANSEN, J. B. et al. Retinoblastoma protein functions as a molecular switch determining white versus brown adipocyte differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 12, p. 4112-4117, 2004.

HASSANALI, Z. et al. Dietary supplementation of n-3 PUFA reduces weight gain and improves postprandial lipaemia and the associated inflammatory response in the obese JCR: LA-cp rat. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 12, n. 2, p. 139-147, 2010.

HIMMS-HAGEN, J. et al. Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 279, n. 3, p. C670-C681, 2000.

HOPPS, E. et al. Gelatinases and their tissue inhibitors in a group of subjects with metabolic syndrome. **Journal of Investigative Medicine**, v. 61, n. 6, p. 978-983, 2013.

HONDARES, E. et al. Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1 α gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1 α expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivation. **Endocrinology**, v. 147, n. 6, p. 2829-2838, 2006.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 5, p. 2409, 1995.

- HUH, J. Y. et al. Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue inflammation and metabolic dysregulation in obesity. **Molecules and cells**, v. 37, n. 5, p. 365, 2014.
- IBRAHIM, A. et al. Substituting dietary linoleic acid with α -linolenic acid improves insulin sensitivity in sucrose fed rats. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1733, n. 1, p. 67-75, 2005.
- IXTAINA, V. Y. et al. Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 2, p. 166-174, 2011.
- ITEM F, KONRAD D. Visceral fat and metabolic inflammation: the portal theory revisited. **Obes Rev.**, v. 13, Suppl2, p. 30–39, 2012.
- JIN, F. et al. Supplementation of milled chia seeds increases plasma ALA and EPA in postmenopausal women. **Plant Foods For Human Nutrition**, v. 67, n. 2, p. 105-110, 2012.
- KABON, B. et al. Obesity decreases perioperative tissue oxygenation. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 100, n. 2, p. 274-280, 2004.
- KALUPAHANA, N. S.; CLAYCOMBE, K. J.; MOUSTAID-MOUSSA, N. (n-3) Fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: mechanistic insights. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 2, n. 4, p. 304- 316, 2011.
- KIM, J. In et al. Lipid overloaded enlarged adipocytes provoke insulin resistance independent of inflammation. **Molecular and cellular biology**, v. 35, n. 10, p. 1686-1699, 2015.
- KLINGENBERG, M.; HUANG, S. Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1415, n. 2, p. 271-296, 1999.
- KRAUSS, S.; ZHANG, C.-Y.; LOWELL, B. B. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 6, n. 3, p. 248-261, 2005.
- KROMHOUT, D.; DE GOEDE, J. Update on cardiometabolic health effects of ω -3 fatty acids. **Current opinion in lipidology**, v. 25, n. 1, p. 85-90, 2014.
- KUSMINSKI, C. M.; SCHERER, Philipp E. Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 9, p. 435-443, 2012.

LANDGRAF, K. et al. Evidence of early alterations in adipose tissue biology and function and its association with obesity-related inflammation and insulin resistance in children. **Diabetes**, v. 64, n. 4, p. 1249-1261, 2015.

LANGIN, D. Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity?. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 3, p. 372-376, 2010.

LEE, M.J.; WU, Y.; FRIED, S. K. Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 13, n. 4, p. 371, 2010.

LEE, Y. S. et al. Inflammation is necessary for long term but not short term high fat diet-induced insulin resistance. **Diabetes**, v. 60, n. 10, p. 2474-2483, 2011.

LEHMANN, J. M. et al. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 22, p. 12953-12956, 1995.

LEFTEROVA, M. I.; LAZAR, M. A. New developments in adipogenesis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 3, p. 107-114, 2009.

LIM, S; ECKEL, R. H. Pharmacological treatment and therapeutic perspectives of metabolic syndrome. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 15, n. 4, p. 329-341, 2014.

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

MATRAVADIA, S. et al. "Both Linoleic and α -Linolenic Acid Prevent Insulin Resistance but Have Divergent Impacts on Skeletal Muscle Mitochondrial Bioenergetics in Obese Zucker Rats." **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 307, n. 1, p. E102-114, 2014

MAQUOI, E. et al. Modulation of adipose tissue expression of murine matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors with obesity. **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 1093-1101, 2002.

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

MARQUARDT, A. et al. cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. **Genomics**, v. 66, n. 2, p. 175-183, 2000.

MAURY, E.; BRICHARD, S. M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 314, n. 1, p. 1-16, 2010.

MOHD ALI, N. et al. The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.

MOLENDI COSTE, O.; LEGRY, V.; LECLERCQ, I. A. Why and how meet n 3 PUFA dietary recommendations?. **Gastroenterology research and practice**, v. 2011, 2010.

MUIR, L. A. et al. Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: correlations with diabetes in human obesity. **Obesity**, v. 24, n. 3, p. 597-605, 2016.

NADEEM, M. et al. Omega-3 fatty acids, phenolic compounds and antioxidant characteristics of chia oil supplemented margarine. **Lipids in health and disease**, v. 16, n. 1, p. 102, 2017.

NAKAJIMA, I. et al. Extracellular matrix development during differentiation into adipocytes with a unique increase in type V and VI collagen. **Biology of the Cell**, v. 94, n. 3, p. 197-203, 2002.

NCD RISK FACTOR COLLABORATION. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. **The Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1377–1396, 2016.

NESCHEN, S. et al. Fish oil regulates adiponectin secretion by a peroxisome proliferator–activated receptor- γ –dependent mechanism in mice. **Diabetes**, v. 55, n. 4, p. 924-928, 2006.

NEDERGAARD, J. et al. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1504, n. 1, p. 82-106, 2001.

NIEMAN, D. C. et al. “Chia Seed Does Not Promote Weight Loss or Alter Disease Risk Factors in Overweight Adults.” **Nutrition Research**, v. 29, n. 6, p. 414–418, 2009.

OH, D. Y. et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. **Cell**, v. 142, n. 5, p. 687-698, 2010.

OUDART, H. et al. Brown fat thermogenesis in rats fed high-fat diets enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids. **International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders**, v. 21, n. 11, 1997.

OLEFSKY, J. M.; GLASS, C. K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance.

Annual review of physiology, v.72, p.219-246, 2010.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 2, p. 85-97, 2011.

PARRISH, C. C.; PATHY, D. A.; ANGEL, A. Dietary fish oils limit adipose tissue hypertrophy in rats. **Metabolism**, v. 39, n. 3, p. 217-219, 1990.

PAJVANI, U. B. et al. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, p. 12152-12162, 2004.

PAL, A. et al. PTEN mutations as a cause of constitutive insulin sensitivity and obesity. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 11, p. 1002-1011, 2012.

PÉREZ-MATUTE, P. et al. Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor- α . **The British Journal of Nutrition**, v.97, n.2, p.389-398, 2007.

PERINI, J. et al. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: metabolism in mammals and immune response. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 6, p. 1075-1086, 2010.

PETROVIC, N. et al. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 10, p. 7153-7164, 2010.

POUDYAL, H. et al. Responses to oleic, linoleic and α -linolenic acids in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 24, n. 7, p. 1381-1392, 2013.

PUIGSERVER, P. et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 829-839, 1998.

REEVES, P. G. et al. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

RESELAND, J. E. et al. Reduction of leptin gene expression by dietary polyunsaturated fatty acids. **Journal of Lipid Research**, v. 42, n. 5, p. 743-750, 2001.

ROSEN, E.D.; SPIEGELMAN, B. M. What we talk about when we talk about fat. **Cell**, v. 156, n. 1, p. 20-44, 2014.

ROSENWALD, M.; WOLFRUM, C. The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. **Adipocyte**, v. 3, n. 1, p. 4-9, 2014.

RUZICKOVA, J. et al. Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. **Lipids**, v. 39, n. 12, p. 1177-1185, 2004.

RYDÉN, M. et al. Adipose tissue and metabolic alterations: regional differences in fat cell size and number matter, but differently: a cross-sectional study. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 99, n. 10, p. E1870-E1876, 2014.

SADURSKIS, A. I. J. A. et al. Polyunsaturated fatty acids recruit brown adipose tissue: increased UCP content and NST capacity. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 269, n. 2, p. E351-E360, 1995.

SERHAN, Charles N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 92-101, 2014.

SHARMA, N. S.; NAGRATH, D.; YARMUSH, M. L. Adipocyte-derived basement membrane extract with biological activity: applications in hepatocyte functional augmentation in vitro. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 7, p. 2364-2374, 2010.

SIGNORELLI, S. S. et al. Plasma levels and zymographic activities of matrix metalloproteinases 2 and 9 in type II diabetics with peripheral arterial disease. **Vascular Medicine**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2005.

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**, v. 235, n. 7, p. 785-795, 2010.

SIMOPOULOS, A. P. Dietary omega-3 fatty acid deficiency and high fructose intake in the development of metabolic syndrome, brain metabolic abnormalities, and non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrients**, v. 5, n. 8, p. 2901-2923, 2013.

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

SPALDING, K. L. et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. **Nature**, v. 453, n. 7196, p. 783-787, 2008.

SPIEGELMAN, B. M.; FLIER, J. S. Obesity and the regulation of energy balance. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 531-543, 2001.

SUGANAMI, T.; OGAWA, Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. **Journal of leukocyte biology**, v. 88, n. 1, p. 33-39, 2010.

SUN, K.; KUSMINSKI, C. M.; SCHERER, P. E. Adipose tissue remodeling and obesity. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 6, p. 2094, 2011.

SUNDARAM, S. et al. High-fat diets containing different amounts of n3 and n6 polyunsaturated fatty acids modulate inflammatory cytokine production in mice. **Lipids**, v. 51, n. 5, p. 571, 2016.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 17, n. 1, p. 463-516, 2001.

TENG, K. T. et al. Modulation of obesity induced inflammation by dietary fats: mechanisms and clinical evidence. **Nutrition journal**, v. 13, n. 1, p. 1, 2014.

TILG, H.; MOSCHEN, A.R. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. **Molecular medicine**, v. 14, n. 3-4, p. 222, 2008.

TINAHONES, F. J. et al. Obesity-associated insulin resistance is correlated to adipose tissue vascular endothelial growth factors and metalloproteinase levels. **BMC physiology**, v. 12, n. 1, p. 4, 2012.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **British Journal of Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 347-355, 2004.

TSUKIYAMA-KOHARA, K. et al. Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4E-BP1. **Nature medicine**, v. 7, n. 10, p. 1128-1132, 2001.

ULBRICHT, C. et al. Chia (*Salvia hispanica*): a systematic review by the natural standard research collaboration. **Reviews on recent clinical trials**, v. 4, n. 3, p. 168-174, 2009.

ULLAH, R. et al. Nutritional and therapeutic perspectives of Chia (*Salvia hispanica* L.): a review. **Journal of food science and technology**, v. 53, n. 4, p. 1750, 2016.

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

VAN HUL, M.; LIJNEN, H. R. A functional role of gelatinase A in the development of nutritionally induced obesity in mice. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 6, n. 7, p. 1198-1206, 2008.

VAN HUL, M. et al. Gelatinase B (MMP-9) deficiency does not affect murine adipose tissue development. **Thrombosis and haemostasis**, v. 104, n. 1, p. 165-171, 2010.

- VAN HUL, M.; LIJNEN, H. R. Matrix metalloproteinase inhibition impairs murine adipose tissue development independently of leptin. **Endocrine journal**, v. 58, n. 2, p. 101-107, 2011.
- VEGA, R. B.; HUSS, J. M.; KELLY, D. P. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor α in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 5, p. 1868-1876, 2000.
- VIRTUE, S.; VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the metabolic syndrome—an allostatic perspective. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 3, p. 338-349, 2010.
- VON G. E. Ueber Fett Metabolism. **Der Deutsch Ges Path**, v. 10, p. 182–185, 1906.
- VU, T. H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes & development**, v. 14, n. 17, p. 2123-2133, 2000.
- VUKSAN, V. et al. Supplementation of conventional therapy with the novel grain Salba (*Salvia hispanica* L.) improves major and emerging cardiovascular risk factors in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 30, n. 11, p. 2804-2810, 2007.
- WAJCHENBERG, B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocrine reviews**, v. 21, n. 6, p. 697-738, 2000.
- WAKI, H.; TONTONOZ, P. Endocrine functions of adipose tissue. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 2, p. 31-56, 2007.
- WANG, H. et al. Liver X receptor α is a transcriptional repressor of the uncoupling protein 1 gene and the brown fat phenotype. **Molecular and cellular biology**, v. 28, n. 7, p. 2187-2200, 2008.
- WANG, PY et al. Higher intake of fruits, vegetables or their fiber reduces the risk of type 2 diabetes: A meta-analysis. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 7, n. 1, p. 56-69, 2016.
- WILLIAMS, A. S.; KANG, Li; WASSERMAN, D. H. The extracellular matrix and insulin resistance. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 26, n. 7, p. 357-366, 2015.
- WITHROW, D; ALTER, D. A. The economic burden of obesity worldwide: A systematic review of the direct costs of obesity. **Obesity Reviews**, v. 12, n. 2, p. 131–141, 2011.
- WOLFE, Leonhard S. Eicosanoids: Prostaglandins, Thromboxanes, Leukotrienes, and Other Derivatives of Carbon-20 Unsaturated Fatty Acids. **Journal of neurochemistry**, v. 38, n. 1, p. 1-14, 1982.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight. Fact sheet n. 311.** 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> Acesso em: 31 de maio de 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fact sheet: obesity and overweight.** 2017. Disponível em: <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/en/> Acesso em: 31 de maio de 2017.

XUE, B. et al. Transcriptional synergy and the regulation of Ucp1 during brown adipocyte induction in white fat depots. **Molecular and cellular biology**, v. 25, n. 18, p. 8311-8322, 2005.

YAMAUCHI, T. et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. **Nature medicine**, v. 7, n. 8, p. 941-946, 2001.

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

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