



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Thaís da Fonte Faria

**Efeitos da suplementação dietética com óleo de chia (*Salvia
hispanica* L.) sobre as alterações metabólicas decorrentes
da obesidade**

Rio de Janeiro

2016

Thaís da Fonte Faria

**Efeitos da suplementação dietética com óleo de chia (*Salvia hispanica*
L.) sobre as alterações metabólicas decorrentes da obesidade**

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

2016

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

F224 Faria, Thais Fonte.
Efeitos da suplementação dietética com óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) sobre as alterações metabólicas decorrentes da obesidade / Thais Fonte Faria. – 2016.
72 f.

Orientadora: Thereza 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. Síndrome metabólica – Teses. 3. Dieta hiperlipídica. 4. Plantas medicinais - Uso terapêutico – Teses. I. Barja-Fidalgo, Thereza Christina. 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

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

Assinatura

Data

Thaís da Fonte Faria

**Efeitos da suplementação dietética com óleo de chia (*Salvia hispanica*
L.) sobre as alterações metabólicas decorrentes da obesidade**

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 fevereiro de 2016.

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.^a Dra Celly Nascimento Saba
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Rodolfo Mattos Albano
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Clarissa M. Maya-Monteiro
Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Heitor de Paula Neto
Universidade Federal do Rio de Janeiro

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

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, mãe e irmã que me apoiaram e vibraram a cada conquista.
Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Marta Citelli dos Reis, por ter me iniciado no mundo da ciência e ter sido mais que uma orientadora, uma amiga em muitos momentos. Obrigada por acreditar em mim, pelas oportunidades e pelas conversas. Admiro e sigo seu exemplo como profissional e como pessoa.

À Prof.^a Dr.^a Simone Vargas da Silva, pelo apoio durante todo o trabalho, pelos puxões de orelha, pelas boas conversas no fim da tarde e pela criteriosa revisão.

À Prof.^a Dr.^a Thereza Christina Barja-Fidalgo, por ter me recebido em seu laboratório, ter me orientado e pelo exemplo de profissionalismo.

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

Hay, que passou por todo processo comigo, por todas as conversas, as crises e os chocolates divididos.

Thamiris, que chegou no laboratório a pouco tempo mas nossa amizade vem de anos... Obrigada por me ajudar nessa reta final, pelo apoio, pela função agenda e por cuidar de mim e do nosso trabalho.

Agatha, a moleca que chegou e com seu jeito sutil e as tiradas criativas fazendo os dias no laboratório serem mais divertidos. Obrigada pelo apoio ao trabalho, sem você e a Thamiris teria surtado (ainda mais) nessa reta final.

A Gabi, pelos papos fitness, pela farofa, bolos e tudo de gostoso que você trouxe durante todo esse tempo. Obrigada pelo carinho e é claro pelo apoio técnico.

Ao Edward pelas tentativas de me “zuar”, ao Rafael pelas ideias com os macrófagos e a ambos pelo apoio e pelas palavras de incentivo nos momentos em que não consegui esconder a frustração.

A Beta e Natalia que junto com Simone, Marta e Hay fizeram os intervalos no “Hortelã” mais divertidos.

Aos eternos amigos e companheiros de pesquisa Andreza, Clarinha, Crisinha, Daniel, Isadora, João, Mariana, Mariele, Renatinha, Salvador, Vanye Genso, agradeço pelo carinho, ajuda e incentivo nos momentos difíceis.

Aos meus amigos fora do mundo acadêmico que entenderam minha ausência nos momentos complicados Guilherme, Carol, Renata e Rafaela.

As minhas eternas Nutris, Samanta e Rachel que de longe acompanharam cada passo desse trabalho, sempre dando apoio e fazendo meus dias mais divertidos.

Ao Rafael, pelo amor, carinho, cumplicidade e por me fazer acreditar que era capaz.

A minha irmã, Nathalia a pessoa mais importante do mundo, que comemorou a cada conquista e me fez seguir em frente.

Ao Léo, meu cunhado que me trouxe novas possibilidades e me apoiou em todos os momentos.

A minha mãe e meu pai, que mesmo sem entenderem o motivo de tantas horas no laboratório ou em frente ao computador me apoiaram e vibraram a cada etapa. Vocês são uma família maravilhosa. Amo vocês.

A Deus e aos anjos que me guardaram nessa jornada.

E finalmente, a todos que direta ou indiretamente colaboraram nesse trabalho.

RESUMO

FARIA, Thaís da Fonte Faria. **Efeitos da suplementação dietética com óleo de chia (*Salvia hispanica L.*) sobre as alterações metabólicas decorrentes da obesidade.** 2016. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

As alterações na sensibilidade à insulina podem ocorrer quando do aumento nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos não esterificados e de mediadores inflamatórios, condições normalmente presentes na obesidade. Por estarem diretamente relacionados à adipogênese e ao metabolismo energético, vários ácidos graxos são correlacionados com as consequências da obesidade. Especialmente alguns dos poliinsaturados ômega-3 (ω -3), podem ser substratos para a síntese de mediadores inflamatórios, como eicosanóides. Dentre as fontes de ácidos graxos ω 3, o óleo de semente de chia, foi descrito como a mais rica fonte vegetal de ácido graxo α -linolênico (ALA, 18: 3 ω -3). O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação dietética com óleo de chia em um modelo animal de síndrome metabólica induzida por dieta rica em gordura. Para os experimentos, camundongos C57-*black* 6 com 21 dias de vida foram mantidos sob dieta hiperlipídica (45% de Kcal provenientes de gordura) até os 90 dias de vida (grupo H). A partir dessa idade, a dieta foi suplementada com 1,5% de óleo de semente de chia (m/m) até os 135 dias de vida (Grupo HC). Um grupo controle de animais de mesma idade recebeu dieta padrão normolipídica durante todo o período. Comparados com o grupo controle, os animais dos grupos H e HC tiveram aumento de 20% do peso corporal, embora, ao final do período, não foram observadas diferenças significativas no peso corporal entre os grupos H e HC. Por outro lado, os níveis séricos de leptina e triglicérides, como também o conteúdo de lipídeos hepáticos, estavam significativamente reduzidos nos animais do grupo suplementado com o óleo de chia (HC), quando comparados ao grupo H. No tecido adiposo epididimal, a suplementação com óleo de chia promoveu uma redução no tamanho dos adipócitos e uma mudança no perfil de ácidos graxos, evidenciada pela diminuição no conteúdo de ácidos graxos saturados. Os animais do grupo HC também apresentaram uma melhora na tolerância à glicose e uma diminuição nos níveis séricos de insulina. A suplementação com óleo chia à dieta hiperlipídica também induziu uma sinalização mais eficiente do receptor de insulina no tecido muscular esquelético que, após o estímulo com o hormônio, apresentou uma menor fosforilação em Ser³⁰⁷ do IRS-1, um aumento da fosforilação de AKT e maior translocação de GLUT4 para a membrana, em comparação com o músculo esquelético de animais do grupo H. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a suplementação com óleo de chia pode atenuar algumas das principais alterações metabólicas decorrentes da obesidade, melhorando especialmente a resistência à insulina, apresentando-se assim como uma opção no tratamento da obesidade e suas consequências.

Palavras chave: Ômega- 3. Dieta hiperlipídica. Síndrome metabólica.

ABSTRACT

FARIA, Thaís da Fonte Faria **Effects of chia (*Salvia hispanica* L.) oil dietary supplementation on the metabolic changes resulting from obesity**. 2016. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Impaired insulin sensitivity has been shown to be associated with an increase in plasma levels of non-esterified fatty acids and inflammatory mediators, two conditions associated with excess weight gain. It has been described that omega 3 polyunsaturated fatty acids, which are substrate for the synthesis of inflammatory mediators as eicosanoids, modulate adipocyte differentiation and energy metabolism, improving the consequences of obesity. Recently, chia seed oil was described as the richest source of omega 3 polyunsaturated fatty acids, mainly alpha linolenic fatty acid (ALA, 18:3 ω -3). In this study, we evaluated the effects of dietary supplementation with chia oil in an animal model of metabolic syndrome induced by high fat diet. C57BL/6 mice with 21 days of age were maintained on a high fat diet (45% kcal from fat) for 10 weeks (H-group). The effects of chia seed oil supplementation were evaluated after 45 days of treatment (135 days of age – HC-group). The control group (C-group) was composed of animals that received standard chow throughout the period. H and HC mice presented a significant increase in the body weight when compared to C-group; however circulating levels of leptin and triglycerides, as well as the content of liver lipids were significantly reduced in HC mice when compared to H mice. In epididymal adipose tissue, supplementation with chia oil reduced adipocyte size and decreased saturated fatty acids contents. Chia oil supplementation also induced a more efficient insulin signaling in skeletal muscle, evidenced by lower IRS-1 Ser³⁰⁷ phosphorylation, increased AKT phosphorylation and increased GLUT4 translocation, when compared to skeletal muscle from H group. Together, our data suggest that supplementation with chia seed oil may mitigate some of major metabolic changes induced by obesity, especially improving insulin resistance, being itself one therapeutic option in treatment of obesity and its consequences.

Keywords: Omega-3. High fatty diet. Metabolic syndrome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	A via de sinalização da insulina.....	16
Figura 2 -	Metabolismo dos ácidos graxos essenciais e formação de mediadores lipídicos pró- inflamatórios e pró resolutivos.....	22
Figura 3 -	<i>Salvia Hispânica</i> L. (chia).....	27
Figura 4 -	Esquema de suplementação dos animais.....	32
Figura 5 -	Representação esquemática dos efeitos da suplementação com óleo de chia sobre a via de sinalização de insulina no músculo esquelético.....	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Peso corporal e ingestão calórica.....	42
Gráfico 2 -	Alterações plasmáticas ocasionadas pela suplementação com óleo de chia (SOC).....	42
Gráfico 3 -	Efeito da suplementação com óleo de chia sobre o conteúdo de lipídeos hepáticos.....	46
Gráfico 4 -	Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a massa do tecido adiposo epididimal e seus adipócitos.....	48
Gráfico 5 -	Efeitos da suplementação com óleo de chia na composição lipídica do tecido adiposo epididimal.....	50
Gráfico 6 -	Efeito da suplementação com óleo de chia sobre os indicadores da homeostase glicêmica.....	52
Gráfico 7 -	Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a via de sinalização da insulina no músculo esquelético.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Ácido graxo
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
AKT	Proteína quinase B (do inglês: <i>Protein kinase B</i>)
ALA	Ácido α -linolênico (do inglês: <i>α-Linolenic acid</i>)
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP (do inglês: <i>AMP-activated protein kinase</i>)
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês: <i>bovine serum albumin</i>)
C	Grupo com dieta controle
CPT-1	Carnitinapalmitoiltransferase 1
DHA	Ácido docosahexaenoico (do inglês: <i>Docosahexaenoic acid</i>)
EBF-1	Fator 1 de ativação das células B (do inglês: <i>Early B cell factor 1</i>)
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>)
EPA	Ácido eicosapentaenoico (do inglês: <i>Eicosapentaenoic acid</i>)
FAT-1	Dessaturase de ácido graxo n 3 (do inglês: <i>n 3 fatty acid desaturase</i>)
GLUT-4	Transportador de glicose 4 (do inglês: <i>Glucose transporter type 4</i>)
GPR40/20	Receptor acoplado a proteína G 40/20 (do inglês: <i>G protein coupled receptor 40/20</i>)
H	Grupo com dieta hiperlipídica
HC	Grupo com dieta hiperlipídica suplementado com óleo de chia
HDL	HDL C – Lipoproteína de alta intensidade (do inglês: <i>high density lipoprotein cholesterol</i>)
H	Dieta hiperlipídica (do inglês: <i>High fat diet</i>)
IRS-1	Substrato do receptor de insulina (do inglês: <i>Insulin receptor substrate 1</i>)
IR β	cadeia β do receptor de insulina (do inglês: <i>Insulin receptor β</i>)
LA	Ácido graxo linoleico (do inglês: <i>Linoleic acid</i>)
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>)
POF	Pesquisa de orçamento familiar
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (do inglês: <i>peroxisome proliferator activated receptor</i>)
PVDF	Polivinilidenodifluorido
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SM	Síndrome metabólica
SOC	Suplementação com óleo de chia
TG	Triglicerídeos

LISTA DE SIMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
β	Beta
H ₂ O	Molécula da água
mL	Mililitro
cm	Centímetro
cm ³	Centímetros cúbicos
rpm	Rotações por minute
α	Alfa

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	14
1	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	30
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.1	Modelo experimental de obesidade.....	31
2.2	Teste de tolerância à Glicose.....	34
2.3	Coleta de sangue.....	34
2.4	Quantificação de lipídeos.....	35
2.5	Análise da morfologia dos adipócitos.....	36
2.6	Dosagem Leptina e insulina.....	37
2.7	Ensaio de PCR – Tecido adiposo.....	37
2.8	Ensaio de incubação do músculo esquelético com insulina e Separação das frações de citoplasma do músculo.....	38
2.9	Western Blotting.....	39
2.10	Análise estatística.....	40
3	RESULTADOS.....	41
3.1	Peso corporal e ingestão calórica.....	41
3.2	Alterações plasmáticas ocasionadas pela suplementação com óleo de chia (SOC).....	43
3.3	Efeito da suplementação com óleo de chia sobre o conteúdo de lipídeos hepáticos.....	45
3.4	Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a massa do tecido adiposo epididimal e seus adipócitos.....	47
3.5	Efeitos da suplementação com óleo de chia na composição lipídica do tecido adiposo epididimal.....	49
3.6	Efeito da suplementação com óleo de chia sobre os indicadores da homeostase glicêmica.....	51
3.7	Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a via de sinalização da insulina no músculo esquelético.....	53
4	DISCUSSÃO	56
	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS.....	62

INTRODUÇÃO

Obesidade

O primeiro artigo publicado e disponível na base de dados MEDLINE sobre obesidade data de 1880 e trata de um estudo *post mortem* de um caso de obesidade extrema. Os relatos do autor descrevem um indivíduo com aproximadamente 190 quilos, letárgico nos últimos anos de vida, que possuía uma espessa camada de tecido adiposo subcutâneo na região abdominal, uma musculatura fina, além de órgãos cobertos por gordura (Oliver, 1880). Desde então, a obesidade deixou de ser considerada como um sinal de prestígio social e passou a ser uma das doenças mais estudadas no mundo (Georges, 2012). Hoje, a Organização Mundial de Saúde define a obesidade como um acúmulo de gordura anormal ou excessivo, com elevado risco para a saúde, sendo o principal fator de risco para uma série de doenças crônicas, incluindo diabetes, doenças cardiovasculares e câncer.

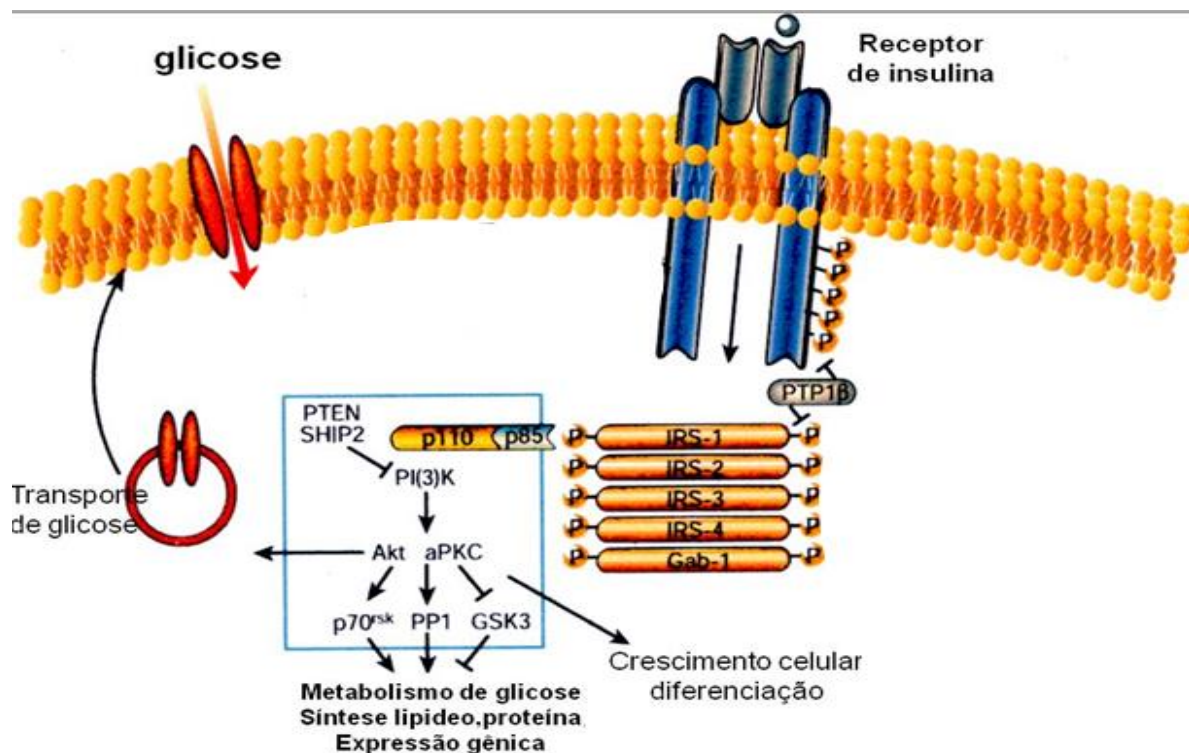
A síndrome metabólica (SM) corresponde a um conjunto de doenças cuja base é a resistência à insulina que, em quase sua totalidade, é acompanhada pela obesidade. Seu diagnóstico é dado pela ocorrência de pelo menos três das seguintes condições clínicas: obesidade abdominal, pressão arterial elevada, glicose elevada, triglicerídeos elevados e baixos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL C). O desenvolvimento de diabetes tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares estão fortemente associados à SM, cuja ocorrência vem aumentando globalmente, particularmente na última década, ao ponto de ser considerada uma epidemia. Nos EUA, estima-se que atualmente 34% da população adulta tenha SM. Concomitantemente observa-se também um aumento expressivo da taxa de SM na população nos países em desenvolvimento (Lim e Eckel, 2014).

Insulina: mecanismo de ação e resistência

A insulina é um hormônio anabólico, de natureza proteica que atua na homeostase da glicose, através da redução da produção hepática de glicose, o aumento da captação periférica de glicose no músculo e nos adipócitos, a indução da lipogênese hepática e em adipócitos e a inibição da lipólise. Além disso, ela também promove a síntese e inibe a degradação de proteínas (Khan e Flier, 2000).

A insulina age através do seu receptor específico, o IR (do inglês, *Insulin Receptor*), uma proteína heterodimérica transmembrana que pertence a superfamília dos receptores tirosina quinase. Após a ligação do hormônio ao domínio extracelular do receptor (subunidade α), ocorre a dimerização deste receptor e a ativação da tirosina quinase em seu domínio citoplasmático (subunidade β), levando a subsequente fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS) em múltiplos resíduos de tirosina. Estes resíduos de fosfotirosina atuam como sítios de ancoragem para diversas proteínas com domínio SH2, incluindo a subunidade regulatória p85 da PI3K (do inglês: *phosphoinositide 3' kinase*). O estímulo da PI3K catalisa a fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3, produzindo fosfatidilinositol 3 fosfato (PI3P). O PI3P ativa a proteína quinase dependente de fosfoinosítídeo (PDK1), a qual pode fosforilar e ativar a AKT (também conhecida como proteína quinase B – PKB). No músculo esquelético e em adipócitos, a ativação desta serina treonina quinase está associada à translocação do transportador de glicose, GLUT4, para a membrana plasmática, promovendo a captação de glicose para o meio intracelular (Quadro 1) (Czech e Corvera, 1999; Wang et al., 1999).

Figura 1 - A via de sinalização da insulina



Legenda: p = fosforilação; IRS=substrato do receptor de insulina; PI3K= phosphoinositide 3-kinase ; AKT= Proteína kinase B; aPKC = proteína kinase C atípica; P70= p70-ribossomal S6 quinase; PP1= proteína fosfatase 1; GSK3= glicogênio sintase quinase 3; SHIP2= gene SH2-contém 5'-inositol fosfatase; p110= subunidade catalítica do IRS1; P85= subunidade regulatória

Nota: A insulina se liga a subunidade α (extracelular) do IR induzindo uma cascata de eventos regulados por fosforilação que culminam com a translocação das vesículas de GLUT do pool intracelular para a membrana plasmática, promovendo assim a captação de glicose

Fonte: Modificado de Zecchin et al., 2004

A resistência à insulina é definida como a resistência das células em responder à insulina para induzir a captação, o metabolismo e a estocagem de glicose (Reaven, 1995), sendo considerada a base para o desenvolvimento da DM2 e da SM. Na DM2 e na SM, a resistência à insulina se manifesta pela diminuição do transporte de glicose estimulado pela insulina nos adipócitos e no músculo esquelético e pela não supressão da produção de glicose hepática. Estes prejuízos funcionais são resultantes, em parte, de defeitos na via de sinalização da insulina nesses tecidos alvo. A perda de função, porém, pode também estar associada a alterações específicas em determinados tipos celulares, como nos adipócitos, onde a redução da expressão de IRS1 resulta na diminuição da associação IRS1-PI3K, tornando a IRS2 a principal proteína de ancoragem da PI3K (Rondinome et al., 1997).

Outro mecanismo que contribui para os defeitos da via de sinalização da insulina é o aumento da expressão e ativação de proteínas fosfatases (PTPs) que desfosforilam e interrompem a propagação do sinal. Pelo menos três proteínas fosfatases, a PTP1B, a LAR (do inglês: *leukocyte antigen –related phosphatase*) e a SHP2 (do inglês: *src homology phosphatase 2*), já foram descritas por terem sua expressão e atividade aumentadas no músculo esquelético e em adipócitos de humanos e roedores com obesidade (Goldstein et al., 1998). Já foi demonstrado que camundongos *knock out* para PTP1B apresentam um aumento na sensibilidade à insulina e resistência à dieta hiperlipídica (Elchebly et al., 1998).

Por outro lado, o aumento de ácidos graxos livres circulantes, na obesidade, favorece a fosforilação do IRS1 em serina (Copps e White, 2012 ; Guo, 2014), levando a diminuição da fosforilação em tirosina deste substrato (Kim et al, 2001 e Yu et al., 2002) contribuindo assim para resistência à insulina.

O aumento nos níveis circulantes de leptina é uma importante alteração hormonal encontrada na obesidade. A leptina é uma proteína não glicosilada, de 16 KDa, codificada pelo gene *ob*, que inicialmente foi descrita como um hormônio produzido pelo tecido adiposo, com ações antilipogênicas, atuando no hipotálamo para a redução da ingestão alimentar e aumento do gasto calórico. Posteriormente, descobriu-se que as ações da leptina não eram restritas a regulação do peso corporal e do balanço energético, ela também tem efeitos em órgãos e tecidos periféricos, onde atua na homeostase da glicose e lipídeos, na regulação da

reprodução, na modulação da resposta imune e inflamatória, dentre outros efeitos (Zhang et al., 1994; La Cava et al., 2004).

Os adipócitos do tecido adiposo branco são, quantitativamente, a principal fonte de leptina no organismo. Em indivíduos eutróficos, os níveis séricos desta adipocina variam de 5 a 15 ng/mL (Sinha et al., 1996). Uma vez que na obesidade ocorre o aumento na massa de tecido adiposo, os níveis de leptina circulantes aumentam significativamente, podendo chegar a 50 ng/mL. Contudo, este aumento não se reflete na redução do peso corporal ou em balanço energético negativo, uma vez que indivíduos com obesidade apresentam resistência central à leptina (Paz Filho, Mastronardi e Licinio, 2015; Ghantous et al. 2015). A regulação do gene *ob* também ocorre pela insulina, que encontra-se aumentada na obesidade, independentemente da sua ação na redução da glicemia. (De Vos et al., 1995). Mais recentemente, Kim e colaboradores (2015) propuseram que a regulação da síntese de leptina pela insulina poderia estar relacionada à morfologia dos adipócitos, uma vez que a insulina promove a hipertrofia destas células, induzindo a lipogênese. Ressaltando que a secreção de leptina está diretamente associada ao volume dos adipócitos.

Outro aspecto importante do eixo de regulação adipo-insular é que a leptina pode também modular a resposta à insulina, embora os mecanismos envolvidos neste efeito sejam ainda controversos. Foi relatado que a hiperleptinemia está correlacionada à resistência à insulina associada ao diabetes tipo 2 e diabetes gestacional (Khan e Flier, 2000; Kautzky-Willer et al., 2001). Altas concentrações de leptina (10 e 100 nM) inibiram a captação *in vitro* de glicose induzida por insulina em células musculares esqueléticas. Os mecanismos que participam deste efeito envolvem tanto a inibição da ativação da MAPK p38, quanto do GLUT 4 (Sweeney et al., 2001). Em outro estudo, foi observado que a leptina inibe a ação da insulina no músculo esquelético de camundongos através da fosforilação em serina 318 do IRS1, um evento mediado pela proteína quinase C (PKC) (Hennige et al., 2006)

O tecido adiposo branco (TAB) tem um papel chave nas funções endócrinas e metabólicas, pois participa da regulação da homeostase energética e da sensibilidade à insulina, participando ativamente do desenvolvimento das complicações metabólicas associadas a obesidade, assim como do quadro de inflamação sistêmica de baixo grau e o aumento do risco de doenças cardiovasculares (Rosen e Spielgeman, 2014). O TAB é composto por,

aproximadamente, 50% de adipócitos e 50% de células diferentes tipos celulares como células tronco, pré adipócitos, células neurais, células endoteliais e leucócitos (Gustafson e Smith, 2015). Uma das principais características do tecido adiposo é a sua capacidade de se adaptar e expandir em condições de excesso de energia, através dos processos de hipertrofia e /ou o recrutamento e proliferação de células precursoras (hiperplasia) que darão origem a novos adipócitos (Pellegrinelli et al., 2016) Na obesidade, a hipertrofia de adipocitos, a obesidade central e o acúmulo ectópico de gordura estão associados a pré disposição a DM e SM . O recrutamento de novos adipócitos pode prevenir essas alterações (Gustafson et al., 2015).

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

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

Atualmente, diversos grupos de pesquisa buscam compreender melhor a fisiopatologia da obesidade e, principalmente, buscam estratégias para a prevenção e/ou tratamento dessa enfermidade e suas comorbidades. Ultimamente, uma das linhas de estudo que tem crescido e se tornado promissora nesse sentido é a utilização de ácidos graxos.

Ácidos graxos na dieta: O papel dos ácidos graxos poliinsaturados ω 3

Os ácidos graxos são hidrocarbonetos que podem diferir quanto ao número de átomos de carbono e o grau de saturação. A classificação dos ácidos graxos leva em consideração o tamanho, a saturação, o número e a posição das duplas ligações em sua estrutura. De acordo com seu tamanho, os ácidos graxos são classificados como: ácidos graxos de cadeia curta (AGC), que apresentam de 4 a 10 átomos de carbono; ácidos graxos de cadeia média (AGM), que apresentam de 12 a 14 átomos de carbono; ácidos graxos de cadeia longa (AGL), que apresentam de 16 a 18 átomos de carbono e ácidos graxos de cadeia muito longa (AGML), com mais de 20 átomos de carbono. Além disso, de acordo com a presença ou ausência de dupla ligação na sua estrutura podem ser classificados como ácidos graxos saturados (AGS), que não apresentam dupla ligação; ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), que apresentam uma dupla ligação; e ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), aqueles que apresentam mais de uma dupla ligação (Wolfe, 1982; Breanne e Ma, 2009 ; Lopategi et al., 2015)

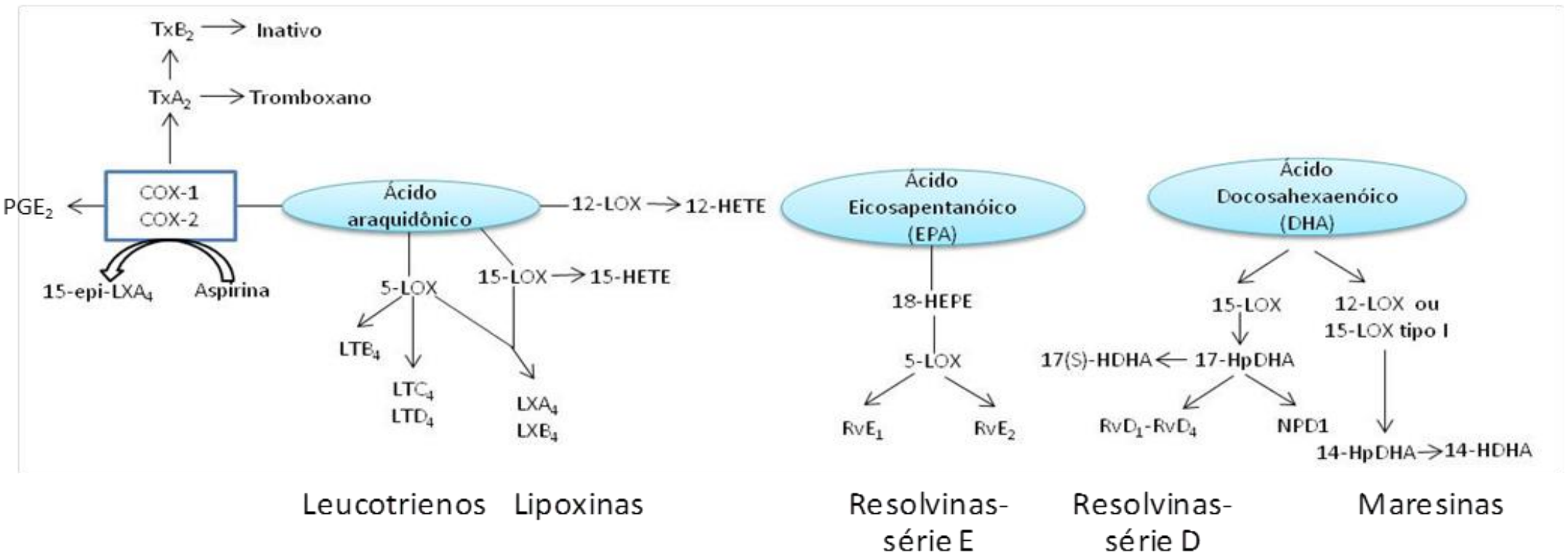
Nos AGPI, a posição da dupla ligação determina se este ácido graxo é ômega 3 (ω 3), ômega 6 (ω 6) ou ômega 9 (ω 9), onde o ω indica a extremidade carboxila do ácido graxo e o número (3, 6 ou 9) indica o carbono à partir desta extremidade que contém a dupla ligação (Wolfe, 1982). Os ácidos graxos ω 3 e alguns ω 6 não são sintetizados *de novo* por mamíferos e, por isso são considerados ácidos graxos essenciais. Em mamíferos, os precursores para a síntese de AG ω 3 e ω 6 são os ácidos graxos α linolênico (ALA, 18:3 n 3) e linoléico (LA, 18:2 n 6), respectivamente. Embora o ALA e o LA deem origem a diferentes metabólitos, ambos competem pelas mesmas enzimas que participam da síntese desses produtos. Assim, após a ingestão de LA e ALA, a enzima Δ 6 dessaturase converte LA em ácido araquidônico (AA, 20:4 n 6) ou o ALA em ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n 3) e ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n 3) (Quadro 2). Esses metabólitos são precursores de mediadores lipídicos com atividade pró ou anti inflamatória. Interessantemente, observou-se que o aumento do consumo de ALA inibe o metabolismo de LA e, conseqüentemente, a sua conversão em ácido araquidônico e vice-versa (Calder, 2003).

As principais fontes de AGPI para os mamíferos são os peixes marinhos selvagens e alguns vegetais. A fonte mais relevante de ω 3 são os peixes de água

fria como o salmão, anchova e a sardinha, todos ricos em EPA e DHA. As fontes vegetais são ricas em ALA que, como citado, pode ser convertido em EPA e DHA. (Breanne e David, 2009).

Os AGPI ω 3 e ω 6 são os principais componentes dos fosfolípidos da membrana celular, cuja oxidação pode levar à geração de mediadores lipídicos de caráter pró inflamatório ou pró resolutivo. Durante uma resposta inflamatória, por exemplo, a ação da fosfolipase A2 (PLA2) sobre os fosfolípidos de membrana leva à liberação de ácido araquidônico, cuja metabolização pela ciclooxigenase e/ou lipoxigenases induz inicialmente a produção prostaglandinas e leucotrienos, mediadores lipídicos pró inflamatórios. A ação conjunta dessas enzimas sobre os diferentes metabólitos derivados do ácido araquidônico, pode também levar à síntese de lipoxinas, que são mediadores pró resolutivos (Simopoulos, 2010). Adicionalmente, a resolução do processo inflamatório pode contar com a formação de outros mediadores lipídicos pró resolutivos, como as resolvinas e maresinas, estes sintetizados partir de AGPI ω 3 que atuam na restauração da homeostase tecidual (Teng et al., 2014).

Figura 2 – Metabolismo dos ácidos graxos essenciais e formação de mediadores lipídicos pró inflamatórios e pró resolutivos



Legenda: TX: tromboxano; COX: ciclooxigenase, PG: prostaglandinas; LOX: lipoxigenase; LX: lipoxinas; LT: leucotrienos; HETE: ácido hidroxiicosatetraenóico; Rv: resolvinas; HDHA: ácido hidroxi docosahexaenóico; NPD₁: neuroprotectina D₁.

Nota: Síntese de mediadores lipídicos pró inflamatórios e pró resolutivos, à partir do ácido araquidônico, ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenóico

Fonte: Adaptado de Pillai et al., 2012

Diversos estudos tem avaliado o efeito da suplementação dietética com AGPI ω 3 sobre a resposta metabólica na obesidade e a resistência à insulina. Evidências mostram que o tratamento com EPA, DHA ou uma mistura de ambos levam a uma melhora em parâmetros bioquímicos alterados durante a obesidade. Em modelos murinos de obesidade, a inclusão desses lipídeos na dieta reduz a tolerância à glicose ou à insulina (Oliva et al., 2013) Em humanos, a suplementação com AGPI ω 3 de origem marinha levou a uma redução significativa dos níveis de glicose plasmática (Spencer M et al., 2013) e triglicerídeos plasmáticos (Kris–Etherton et al., 2003; Weintraub . 2013) Com base nestes e outros estudos, a *American Heart Association* (AHA) recomenda o consumo de 2 a 4 g/dia de AGPI ω 3 como uma terapia complementar efetiva no tratamento da hipertrigliceridemia (AHA, 2015).

Os AGPI ω 3 também parecem ter efeito sobre a proliferação e a diferenciação de adipócitos. Kim e colaboradores (2006) demonstraram que a incubação de 3T3 L1 com DHA inibiu, de maneira concentração dependente, a diferenciação de adipócitos, reduzindo o número de gotas de lipídeos nessas células. Corroborando estes dados, foi mostrado que tanto o DHA quanto o EPA reduziram o acúmulo de lipídeos e inibiram a expressão gênica de PPAR γ durante a diferenciação adipocitária (Tanabe et al., 2008; Mirickam et al., 2010). Por outro lado, foi relatado que em comparação ao EPA, o DHA induz uma maior diferenciação de adipócitos, aumentando a expressão gênica de CEBP α , PPAR γ e aP2 em células 3T3 L1 (Murali et al., 2014).

Estudos em modelos animais tem mostrado que os AGPI ω 3 podem induzir um efeito sensibilizador à insulina. Contudo, os mecanismos envolvidos nessa resposta ainda não estão claros. Evidências mostram que os AGPI ω 3 de origem marinha melhoram a captação de glicose induzida pela insulina em adipócitos por aumentar a expressão e a translocação do GLUT4. Neste estudo, os autores demonstraram que a suplementação dietética com óleo de peixe em ratos obesos por ingestão de dieta hiperlipídica, promoveu um aumento na expressão do GLUT 4 no tecido adiposo, acompanhado de uma menor glicemia e insulinemia (González Périz et al., 2009).

Trabalhos recentes mostram que os AGPI ω 3 regulam a produção de leptina tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Em cultura de células 3T3 L1 e em adipócitos de ratos, observou-se que o EPA, mas não o DHA, induziu a expressão de leptina.

(Prostek et al., 2014). Em modelos animais com obesidade, Pérez Matute e colaboradores (2007) demonstraram que o tratamento com EPA (1 g/Kg durante 35 dias) aumentou os níveis circulantes de leptina em ratos obesos. Por outro lado, Moreno Aliaga e colaboradores (2010) descreveram que a suplementação dietética com AGPI ω 3 levou à diminuição na massa de tecido adiposo causando, conseqüentemente, uma redução na expressão e a secreção de leptina por este tecido (Raclot et al., 1972 ; Reseland et.al, 2001).

O tratamento com AGPI ω 3 também foi capaz de diminuir a inflamação do tecido adiposo em roedores e humanos com obesidade. Vários mecanismos são propostos para os efeitos anti inflamatórios dos AGPI ω 3. Dentre eles estão: a redução da produção de adipocinas pró inflamatórias e o aumento na secreção de adipocinas anti inflamatórias; a diminuição na infiltração de macrófagos; a redução na formação de mediadores lipídicos pró inflamatórios da série ω 6; e os AGPI ω 3 serem substratos para a produção de mediadores lipídicos pró resolutivos. Foi demonstrado que a suplementação de AGPI ω 3 de origem marinha na dieta induz a produção de citocinas e adipocinas anti inflamatórias, como a IL 10 e adiponectina, e inibe a secreção de quimiocinas e adipocinas pró inflamatórias, como o TNF α , MCP1, IL 6 e resistina (Pérez Matute et al., 2007 ; Pérez Echarri et al., 2008). Além disso, reduz a infiltração de macrófagos no tecido adiposo e promove uma mudança do fenótipo M1 (pró inflamatório) para o fenótipo M2 (anti inflamatório). Neste contexto, foi observado, *in vitro*, que o DHA aumentou os níveis de RNA mensageiro dos principais marcadores do fenótipo M2 (CD36, IL 10 e TGF β) em macrófagos (Lumeng et al., 2007).

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).

O ALA, como citado, é a principal fonte vegetal de AGPI ω 3, sendo convertido a EPA e DHA pela ação de dessaturases (Andrade, 2006). Contudo, apesar da suplementação dietética com ALA aumentar os níveis de DHA em vários tecidos (Murphy et al., 2015), as respostas fisiológicas induzidas por ALA parecem ser

diferentes daquelas promovidas diretamente pela ingestão direta de EPA e DHA, sobretudo em situações de obesidade e sobre o metabolismo de glicose. Em um estudo comparativo sobre os efeitos da suplementação dietética com diferentes tipos de AGPI em animais com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica, foi demonstrado que o ALA não alterou o volume da massa total de gordura corporal, porém promoveu uma redistribuição da gordura 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. Esse estudo apoia fortemente a hipótese de que as respostas ao ALA na síndrome metabólica são independentes da sua conversão em EPA e DHA (Poudyal et al., 2013).

Outro fator importante que deve ser destacado é a proporção de ácidos graxos ω 3 / ω 6 na dieta que está relacionada a formação de mediadores inflamatórios. As últimas recomendações são de uma relação 1:4 (Molendi Coste, Legry e Leclercq, 2011). No entanto, essa relação atualmente situa-se em torno de 1:20 (Simopoulos, 2008).

No Brasil, o consumo de alimentos fonte de AGPI ω 3 é pequeno (POF Brasil, 2011). A presença de odores, de contaminações por compostos de mercúrio, como no caso dos peixes, ou de fatores anti-nutricionais presentes nas sementes, fazem com que o consumo destes ácidos graxos na dieta cotidiana no Brasil seja limitado.

***Salvia hispanica* L. – Chia**

A chia (*Salvia hispanica* L.) é uma semente nativa do México e de partes da América do Sul, rica em ácidos graxos poliinsaturados, proteínas e fibras, que é considerada uma nova fonte de isoflavonas com elevada capacidade antioxidante, podendo ser incorporada à dieta humana (Martínez Cruz e Paredes López, 2014). As formas de apresentação da chia, a planta, semente e cápsula com óleo são mostradas no QUADRO 3.

O óleo da semente de chia possui um alto teor de AGPI ω 3 (ALA), que representa cerca de 60% do seu total de ácidos graxos. Por isso a chia é considerada a mais rica fonte alimentar vegetal deste ácido graxo, mostrando-se uma excelente alternativa desses lipídeos (Ayerza et al., 2008; Ayerza et al., 2011).

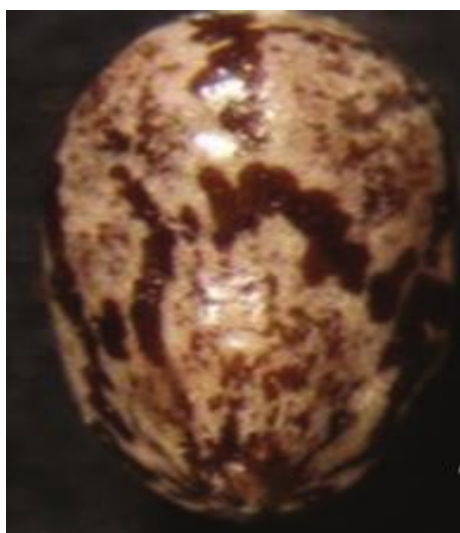
Devido à importância biológica dos AGPI ω 3, a busca por fontes alimentares acessíveis à população assume um importante papel na manutenção da saúde. Neste aspecto, os trabalhos desenvolvidos com a chia são recentes e ainda escassos, o que permite uma revisão mais detalhada desta literatura.

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

Outros trabalhos caracterizaram a *Salvia hispanica* L., desde a cor da semente a resistência do caule, comparando os cultivos domésticos e selvagens, porém não foram encontradas diferenças significativas entre as plantas (Cahill e Provance, 2002). Um estudo de Ayerza e colaboradores (2009) avaliou especificamente as possíveis alterações na composição protéica, conteúdo e perfil de ácidos graxos na semente de chia de locais diferentes e em períodos sazonais diferentes dentro de um mesmo local. Algumas diferenças em determinados tipos de ácidos graxos foram encontradas, mas, em valores absolutos, a composição das sementes não foi diferente. (Olivos Lugo, Valdivia Lopez e Tecante, 2010).

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

Figura 3 – *Salvia hispanica* L. – chia



Legenda: Relativas a planta (esquerda superior), semente (direita superior), semente em maior aumento (esquerda inferior) e cápsulas(direita inferior).

Nota: Apresentação da *Salvia hispanica* L. em suas formas: A planta, a semente em menor e maior aumento e a cápsula do óleo extraído da semente, respectivamente.

Fonte: Adaptado de Mohd Ali et al. 2012

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

Dentro da problemática da obesidade e da SM, os estudos com a chia vem buscando associar seu uso com possíveis melhoras dos quadros clínicos. A grande maioria desses estudos foi realizada com a semente da chia que, apesar de rica em ALA, possui um alto teor de fibras, o que reduz a absorção dos ácidos graxos presentes na semente. Contudo, foi observado que a introdução de sementes de chia na dieta reduziu o índice glicêmico, atenuou dislipidemias e ainda auxiliou na perda de peso (Wang et al. 2016). Dentre os estudos com a semente da chia que avaliaram o metabolismo de glicose, Oliva e colaboradores (2013) mostraram que ratos Wistar alimentados com dieta rica em gordura e açúcar ao receberem tratamento com sementes de chia obtiveram melhora na secreção de insulina, ativação da glicogênio sintase, aumento da glicose 6 fosfato, indução da expressão de GLUT4 no músculo e melhora da dislipidemia. Outro estudo demonstrou, através de clampeamento euglicêmico, uma melhora da resistência à insulina após a suplementação com a semente de chia em ratos com dislipidemia provocada por dieta rica em açúcar e gordura (Chicco et al. 2009). A suplementação com a semente de chia em camundongos induziu um aumento da expressão de enzimas chave na lipogênese *de novo*, de PPAR α e da enzima carnitina palmitoltransferase 1 (CPT 1), que transporta ácidos graxos livres, levando a redução da dislipidemia e da esteatose hepática (Rossi et al. 2013).

Poucos estudos avaliaram os efeitos da semente da chia em humanos. Destacam-se os estudos de Nieman e colaboradores (2009, 2013) que mostraram que o consumo de semente de chia não promoveu perda de peso ou alterou fatores de risco em adultos com sobrepeso (Nieman et al., 2009). Além disso, demonstraram ainda que a ingestão de 25 g de semente de chia durante 10 semanas por mulheres com sobrepeso aumentou os níveis plasmáticos de ALA e EPA, não influenciando, porém parâmetros inflamatórios ou metabólicos. Em concordância, foi mostrado que o consumo da semente de chia por mulheres em pós-menopausa aumentou os níveis plasmáticos de ALA e EPA (Jin et al., 2012).

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

Os estudos com o óleo da semente de chia são mais escassos, porém promissores. 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). Em camundongos obesos, a suplementação com óleo de chia promoveu um aumento da expressão de *heat shock proteins* (HSP) e de PGC 1α no músculo esquelético, além de melhorar a tolerância à glicose (Marineli et al., 2014). Em ambos os trabalhos, os autores relatam uma melhora do metabolismo da glicose, no entanto os mecanismos moleculares envolvidos nessa melhora não foram elucidados.

Com base no que foi descrito sobre os efeitos dos AGPI ω 3 sobre a resistência à insulina e as complicações decorrentes da obesidade, o estímulo ao aumento de sua ingestão através do consumo de alimentos fonte deste nutriente parece uma estratégia promissora para prevenção e controle de agravos à saúde causados por doenças metabólicas.

1 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

O óleo de semente de chia é a fonte alimentar de origem vegetal mais rica em AGPI ω 3. O ALA presente no óleo dessa semente apresenta um potencial resolutivo, porém a escassez de estudos sobre os mecanismos moleculares de sua ação, especialmente sobre a melhora da resposta glicêmica na obesidade, indicam a necessidade de novas investigações sobre os efeitos e ações do óleo de chia durante a síndrome metabólica.

Uma vez que sejam bem estabelecidos os efeitos do óleo de chia sobre parâmetros inflamatórios e metabólicos da obesidade, bem como os mecanismos de ação responsáveis por estes efeitos, justificar-se-ia assim sua utilização, na clínica, como tratamento complementar da obesidade.

O objetivo do nosso trabalho é avaliar os efeitos da suplementação com óleo de chia numa dieta hiperlipídica sobre as alterações metabólicas decorrentes da obesidade.

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).

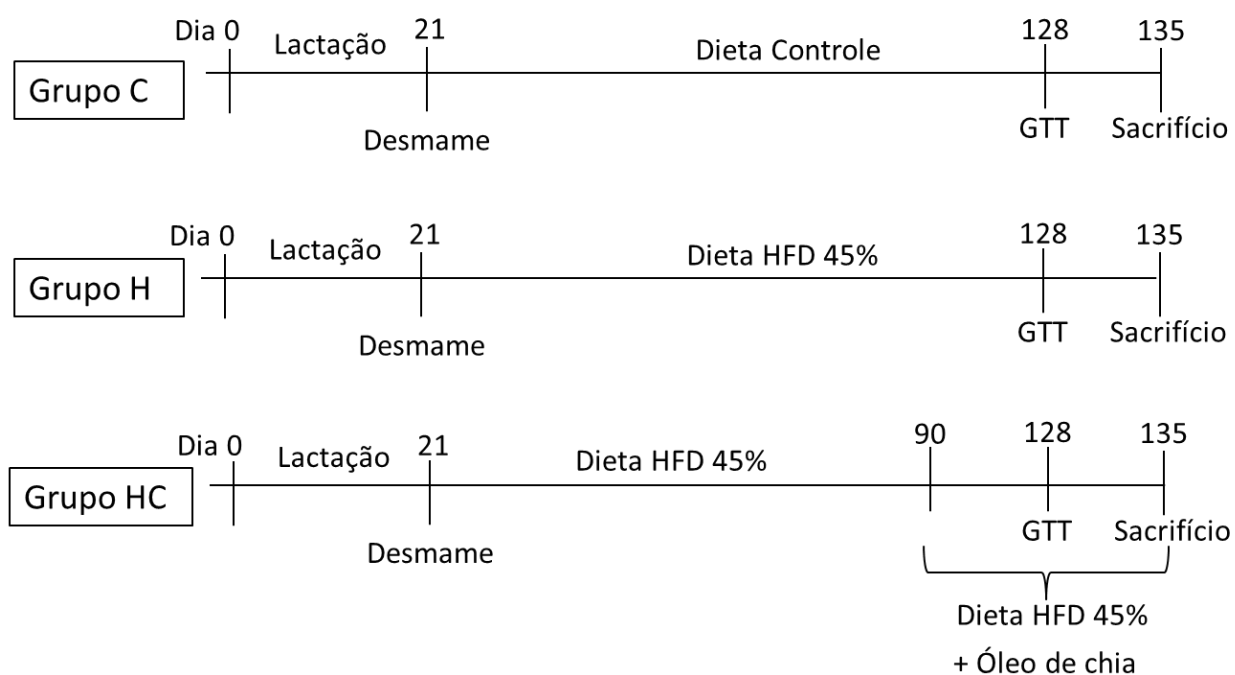
2.1 Modelo experimental de obesidade

Trinta camundongos C57Bl/6J 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 do grupo controle (Grupo C) foram mantidos em dieta normocalórica durante todo o experimento dos 21 aos 135 dias. Os animais dos grupos experimentais foram mantidos em dieta hiperlipídica com 45% de Kcal provenientes de lipídeos até 90 dias de vida (Grupo H). Neste momento, os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentavam peso significativamente superior ao grupo controle. Após esse período, aos 90 dias, os animais que receberam dieta hiperlipídica foram divididos em dois grupos: Metade foi mantido em dieta hiperlipídica (Grupo H), enquanto os outros camundongos receberam a mesma dieta hiperlipídica com suplementação de óleo de chia (1,5%). (Grupo HC). As dietas eram trocadas a cada 2 dias para evitar a oxidação dos lipídeos. Nos experimentos foi utilizado um número amostral de pelo menos 10 animais por grupo. Os animais de todos os grupos foram sacrificados aos 135 dias de vida.

Desde a primeira semana de dieta, o peso corporal e a ingestão alimentar de todos os animais foram aferidos uma vez por semana. A descrição da composição da dieta encontra-se nas tabelas 1 e 2. O esquema de dietas e suplementação dos animais está demonstrado no QUADRO 4.

Figura 4 – Linha do tempo das dietas e suplementação utilizadas no estudo



Legenda: Após 21 dias de lactação, os animais foram agrupados em C (dieta normocalórica até 135 dias), H (dieta hiperlipídica até 135 dias) e 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). O teste de tolerância à glicose foi realizado 10 dias antes do sacrifício, aos 125 dias de vida.

Tabela 1 - Composição das Dietas (g/100g)

Ingredientes	C	H	HC
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: A composição da dieta controle foi baseada na AIN 93 (Reeves, Nielsen, and Fahey 1993). As dietas experimentais e o valor de suplementação de ácido graxo ω 3 foram baseados no artigo de (D. Oh et al. 2011). Dieta controle normocalórica (C), Dieta hiperlipídica (H), Dieta hiperlipídica suplementada com óleo de chia (HC)

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

Ácido graxo	H	HC
Palmítico (16:0)	3,46	3,55
Esteárico (18:0)	1,67	1,72
Oleico (18:1 ω 9)	6,76	6,85
Linoleico (18:2 ω 6)	6,34	6,63
α linolênico(18:3 ω 3)	0,55	1,52
AG saturados (total)	6,31	6,45
PUFA	12,14	13,36
n 6:n3	11,52	4,36

Legenda: Composição de ácidos graxos foi realizada pela extração dos lipídeos pelo método de Bligh e Dyer, 1959 e posterior quantificação por cromatografia gasosa.

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 subseqüentes verificações da glicemia, aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração da glicose. Todas as alíquotas foram analisadas pelo aparato e glicofitas 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 3000 rpm por 10 minutos e o plasma foi coletado, aliqotado e estocado em freezer -80°C para dosagem de leptina, insulina e ácidos graxos.

2.4 Quantificação dos lipídeos

A quantificação dos lipídeos presentes nas amostras de plasma, fígado, tecido adiposo e na ração dos animais foi realizada por cromatografia gasosa. Este procedimento foi realizado em três etapas, como descrito a seguir.

Primeira etapa: Foi realizada a extração de lipídeos, segundo o método de Bligh e Dyer, 1959. Cinquenta miligramas de amostra de tecido adiposo, fígado ou 200 µL de plasma foram colocados em tubos de vidro para centrífuga com tampas plásticas. Foram adicionados 0,5 mL de clorofórmio + 1 mL de metanol + 0,4 mL de água. A mistura foi realizada em homogeneizador do tipo Vortex, até o aparecimento de duas ou mais fases. Foi acrescentado metanol simultaneamente à homogeneização em Vortex (até ficar uma fase única). Depois, essa mistura foi vortexada de 5 em 5 minutos por 1 hora. Uma centrifugação a 3.000 rpm por 20 minutos foi realizada. Após, foi coletado e reservado o sobrenadante. O precipitado foi suspenso em 0,5 mL de clorofórmio + 1 mL de metanol + 0,4 mL de água e novamente vortexado de 5 em 5 minutos por 1 hora. Após, outra centrifugação foi realizada, a 3.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e acrescentado ao anterior com adição de 0,5 mL de clorofórmio + 0,5 mL de água. Esse homogenato foi centrifugado 3.000 rpm por 30 minutos e a fase orgânica foi coletada da parte inferior do tubo com pipeta pasteur.

Segunda etapa: Preparação de ácido graxo metil éster, segundo William W. Christie, 1989. A amostra de lipídeos foi dissolvida em 1 mL de tolueno num tubo de extração, onde foram adicionados 2 mL de ácido sulfúrico a 1% em metanol. A mistura foi deixada durante a noite num tubo tampado a 50°C. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de cloreto de sódio (5%), e os ésteres foram extraídos com hexano (2 x 2 mL), utilizando pipetas de Pasteur para separar as fases. O solvente foi removido em corrente de gás nitrogênio.

Terceira etapa: As amostras foram ressuspensas em 50 µL de hexano. Utilizou-se um equipamento GC-MS Shimadzu, modelo GP2010 Plus, com uma coluna HP Ultra 2 (5% Phenyl methylpolysiloxane), Agilent (25 m x 0,20 mm x 0,33 µm). O injetor foi mantido a 250°C, com divisão de fluxo (split) na razão de 1:1. A temperatura do forno da coluna foi elevada a 40 160°C, com taxa de aquecimento de 30°C/min, de 160 233°C, com taxa de aquecimento de 1°C/min, e de 233 300°C, com taxa de aquecimento de 300°C/min, mantida assim por 10

min. Gás hélio foi utilizado como gás de arraste com velocidade linear de 36.1 cm/seg. Um volume de 1 µL de amostra foi injetado no cromatógrafo.

Para a detecção por espectrometria de massa utilizou-se um detector contendo uma fonte de ionização por elétrons (EI 70 eV) e um analisador de massas quadrupolo, operado em varreduras de 50 a 650 unidades de medidas de absorvância. A interface foi mantida a 240°C e a fonte de íons a 240°C. A identificação dos constituintes da mistura foi feita por comparação dos seus espectros de massas com aqueles da biblioteca NIST05, contida no computador do espectrômetro de massas, assim como com seus tempos de retenção com padrão Supelco 37 Component FAME Mix (Sigma).

2.5 Análise da morfologia dos adipócitos

Para análise histológica da morfometria dos adipócitos, o tecido adiposo epididimal dos animais suplementados ou não com óleo de chia foram fixados em solução de paraformaldeído 4%, paraformaldeído 4% adicionado de sacarose 10%, por 30 min em cada solução. A seguir, os tecidos foram armazenados em tampão fosfato com 20% de sacarose à 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% 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 Image J, para mensuração da área dos adipócitos. Foi utilizado um número amostral de 5 animais por grupo e 3 lâminas de cada animal foram analisadas.

2.6 Dosagem de leptina e insulina

A dosagem dos níveis plasmáticos de leptina e insulina 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 µg/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 µg/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.

2.7 Ensaio de PCR – Tecido adiposo

Para análise de adiponectina presente no tecido adiposo epididimal o RNA total do tecido adiposo foi extraído com o kit de extração de RNA da Qiagen seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação das amostras de RNA total foi realizada inicialmente no espectrofotômetro NanoVue® (GE Healthcare Life Sciences) por análise da absorvância a 260nm. A pureza do RNA extraído foi avaliada através do cálculo das razões A260/A280 e A260/A230, apresentadas pelo software do equipamento e que indicam possíveis contaminações da amostra por proteínas e compostos fenólicos. Após o tratamento com DNase (RQ1 RNase FreeDNase; Promega, São Paulo, SP, Brasil), a síntese do cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA total tratado, utilizando o High Capacity DNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies), de acordo com as recomendações do

fabricante. Brevemente, 1 µg de RNA total tratado foi adicionado a 10 µL do seguinte mix: tampão da enzima transcriptase reversa, 4 mM de dNTPs, 25 nM primers randômicos, 50 U de transcriptase reversa e 20 U de RNase Inhibitor, em um volume final de 20 µL. As amostras foram incubadas a 25°C, por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos. A reação foi realizada no Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems). O PCR em tempo real foi realizado em termociclador Rotor Gene Q (Qiagen) utilizando-se um sistema de quantificação de fluorescência verde emitida por SYBR (Qiagen) para quantificar amplicons. As condições padrões de PCR foram 95°C por 5 minutos e, 30 ciclos a 95°C (5 s) e 60°C (10 s), seguido pela curva padrão de dissociação para identificação do número de amplicons. Os primers do gene alvo foram baseados na sequência do gene da adiponectina murina: Primer senso: 5' CCCAAGGGAAGCTTGTGCAGGTTGGATG 3'. Primer antisenso: 5' GTTGGTATCATGGTAGAGAAGAAAGCC 3'. Primers do gene GAPDH (banco de acesso do gene nº DQ_403053) foram utilizados para normalizar as reações de cada reação; senso: 5' TCAACGGGAACCCATCACCATCT 3' e antisenso: 3' ACGACATACTCAGCACCAGCATCA 3'.

2.8 Ensaio de incubação do músculo esquelético com insulina e Separação das frações de citoplasma do músculo

Para avaliar a resposta à insulina no músculo esquelético dos animais, o músculo anterior da tíbia foi dissecado (30 µg) e picotado em placa de cultura, no gelo. A seguir, foi adicionado 1 µM de insulina ou apenas o veículo (PBS) e o músculo foi incubado em estufa a 37°C por 30 minutos. Após esse tempo, a amostra foi centrifugada a 1300 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi armazenado no freezer a -80 °C até o uso.

Para separação das frações de membrana e citosol, o tecido muscular que foi previamente incubado, com ou sem insulina, foi descongelado, acrescentado 1 mL de tampão de lise HES (10mmol/L de HEPES + 5mmol/L de EDTA + 250mmol/L de sacarose) e 1mM de Ortovanatato de sódio + coquetel de inibidores de proteases: *Fenilmetilsufonilfluride* (PMSF), aprotinina e leupepina (40ul:1ml) e deixadas em repouso em gelo por 30 minutos. A seguir, foram sonicadas em Virsonic 60® 3 vezes por 45 segundos, na potência 4 com intervalos de 30 segundos e, posteriormente, deixadas novamente em repouso por 30 minutos em gelo. Em

seguida, os tubos foram centrifugados a 750 g por 3 minutos a 4°C. O sobrenadante 1 foi retirado e armazenado. O pellet foi ressuspensionado em 1 ml de HES + coquetel de inibidores de proteases e centrifugado a 750 g por 3 minutos a 4°C. O sobrenadante da segunda centrifugação foi adicionado ao primeiro, formando assim a amostra que foi usada nas etapas seguintes. A amostra foi submetida a ultracentrifugação a 31000 g por 60 minutos a 4°C com aceleração de 8 g e desaceleração de 2 g. Após essa etapa, o sobrenadante representa a fase do citosol e o pellet a fração de membrana. As amostras foram armazenadas em freezer 80°C para posterior dosagem de proteínas.

2.9 Western Blotting

A quantificação das proteínas nas amostras de citosol foi determinada pelo método de Bradford, 1976. 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 10%; azul de bromofenol 0,001%) por 5 minutos a 95°C e, em seguida congeladas para serem submetidas ao SDS PAGE.

Amostras contendo 10 μ g de proteínas foram separadas por eletroforese em gel a 10% 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 1 hora, 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 PBS (Tween 20 0,1% em PBS), seguidas de incubação overnight com os anticorpos primários específicos. Os seguintes anticorpos primários (Santa Cruz Biotechnology) foram utilizados: goat anti pIRS 1 (sc 17200; 1:250), goat anti IRS 1 (sc 559 G; 1:1000), goat anti AKT (sc 7126; 1:500), rabbit anti pAKT (Sc 7985 R; 1:500), mouse anti actina (Sc 8432; 1:1000), mouse anti IR β (Sc1:500), rabbit anti GLUT4 (Sc 1:500).

Em seguida, as membranas foram lavadas com T PBS e então incubadas com o anticorpo secundário específico conjugado com biotina (1:5000 1:10000,

Santa Cruz Biotechnology) por 1 hora. Após essa incubação, as membranas foram lavadas com TBS-PBS e incubadas com estreptavidina conjugada com peroxidase (1:5000 a 1:10000, Zymed, S. San Francisco, California, USA), por 1 hora.

As membranas foram “strippadas” com tampão de *Stripping* (62.5 mM Tris-HCl, 2% SDS e 100 mM β -mercaptoethanol) e re-probetadas com anticorpos anti-actina.

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-se Image J Software (NIH, USA).

Os extratos totais e de membrana foram normalizados pelos níveis de actina, respectivamente.

2.10 Análise estatística

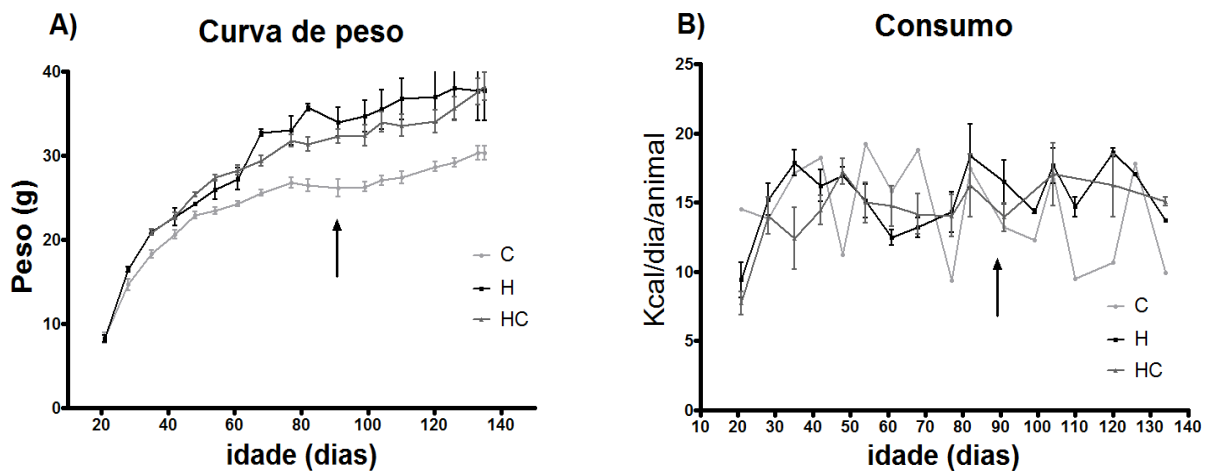
Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os resultados obtidos para cada grupo experimental foram analisados estatisticamente utilizando-se análise de teste t e ANOVA com análise de variação de Bonferroni. A significância foi considerada para valores de $p < 0,05$. 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. A dieta hiperlipídica promoveu um aumento significativo no peso corporal dos animais (grupo H), a partir dos 60 dias de idade, quando comparados com o grupo C. A suplementação com o óleo de chia não afetou o peso corporal dos animais, quando comparados com o grupo H (Fig. 1A). Nenhuma diferença significativa foi observada na ingestão calórica (kcal/dia/animal) entre os grupos (Fig. 1B).

Gráfico 1 – Peso corporal e ingestão calórica

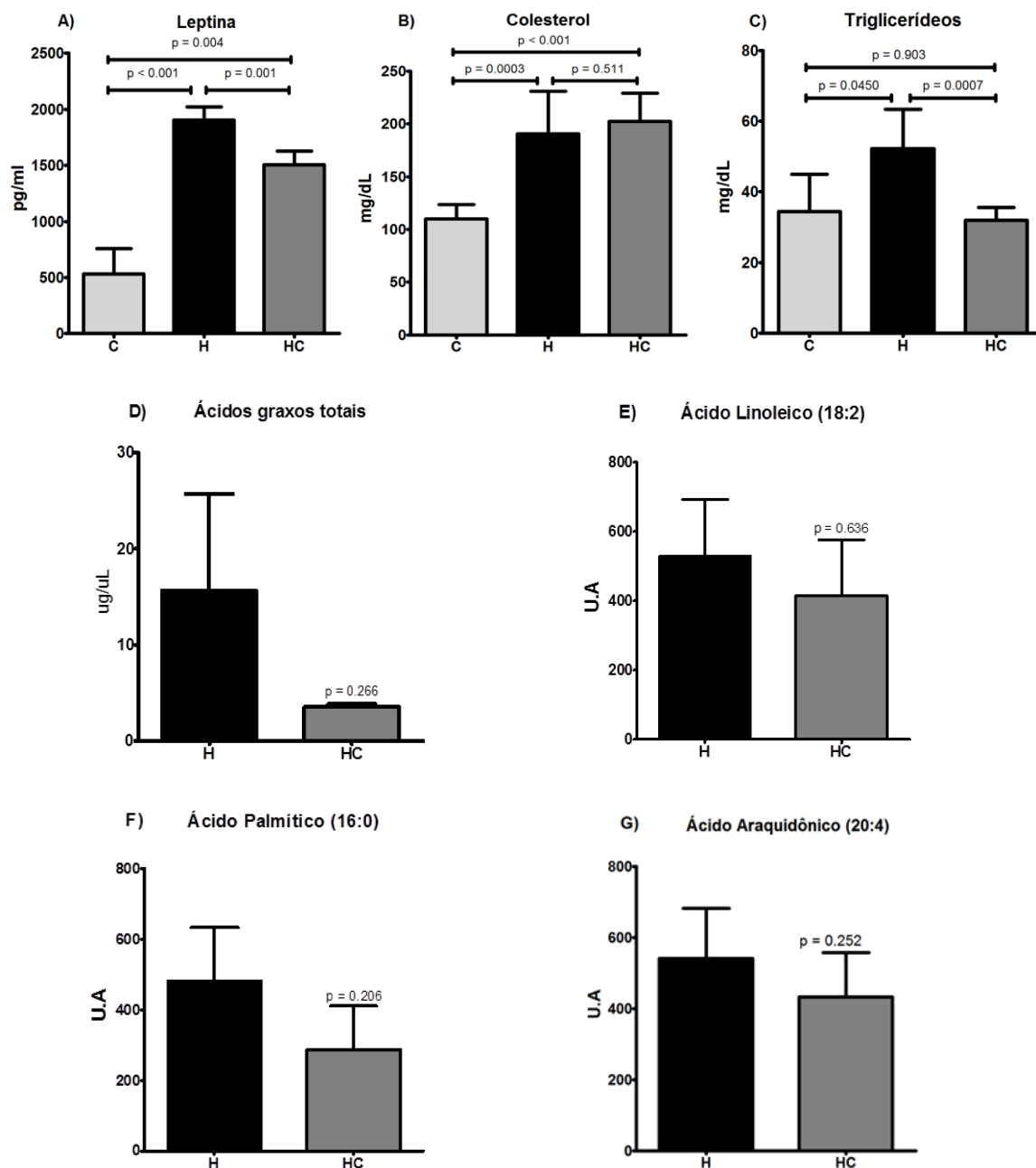


Legenda: Peso corporal ao longo do desenvolvimento (A). Ingestão calórica, expressa em quilocalorias por animal por dia (B). C: dieta controle; H: dieta hiperlipídica; HC: animais do grupo H que receberam a suplementação com o óleo de chia. A seta indica o início da suplementação com óleo de chia no grupo HC, aos 90 dias. Os gráficos apresentam média \pm E.P.M, n = 10 por grupo.

3.2 Alterações plasmáticas ocasionadas pela suplementação com óleo de chia (SOC)

O consumo de uma dieta rica em lipídeos afeta a concentração plasmática de diversos marcadores bioquímicos. A dieta hiperlipídica (grupo H) induziu um aumento expressivo nos níveis plasmáticos de leptina quando comparados aos animais controle ($p < 0,001$). Contudo, nos animais em dieta suplementada com óleo de chia a partir do 60º dia (grupo HC), os níveis plasmáticos desta adipocina estão significativamente diminuídos, em relação ao grupo H ($p = 0,001$). (Fig.2A). A colesterolemia dos animais em dieta hiperlipídica apresentou-se aumentada em relação ao grupo C, tanto em animais do grupo H como nos do grupo HC (Fig. 2B). Por outro lado, o aumento de triglicérides plasmáticos (30%) observados nos camundongos obesos do grupo H apresentou-se significativamente menor nos animais suplementados com chia, retornando aos níveis do grupo controle (Fig. 2C). Analisamos também os níveis plasmáticos de ácidos graxos nesses animais. A suplementação com chia não alterou de maneira estatisticamente significativa, os níveis de ácidos graxos totais ou dos ácidos graxos linoleico (Fig.2E), palmítico (Fig. 2F) e araquidônico (Fig.2G), quando comparado ao grupo H.

Gráfico 2 – Alterações plasmáticas ocasionadas pela suplementação com óleo de chia (SOC)

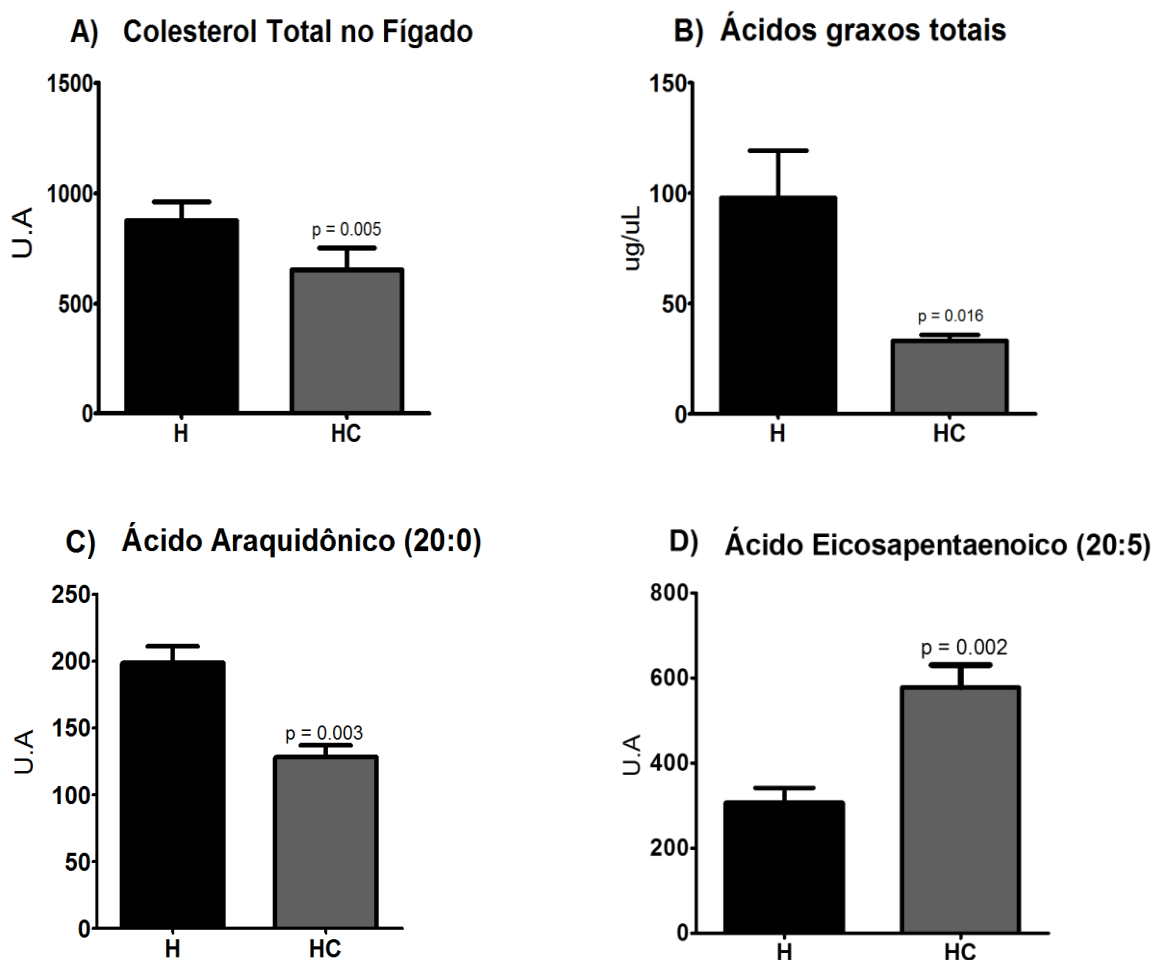


Legenda: Os níveis plasmáticos de Leptina (A), colesterol total (B), triglicerídeos (C), ácidos graxos totais (D), ácido graxo linoleico (E), ácido graxo palmítico (F) e ácido graxo araquidônico (G). Os níveis plasmáticos de ácido graxo total, ácido graxo linoleico, ácido graxo palmítico e ácido graxo araquidônico foram expressos em unidades arbitrárias (U.A.), usando como base a distribuição relativa das áreas dos picos obtidas durante ensaio de cromatografia gasosa. C: dieta controle; H: dieta hiperlipídica; HC: animais do grupo H que receberam a suplementação com o óleo de chia. Não foram realizadas análises de ácidos graxos em animais do grupo controle. Os gráficos apresentam média \pm E.P.M, $n = 5$ animais por grupo.

3.3 Efeito da suplementação com óleo de chia sobre o conteúdo de lipídeos hepáticos

O fígado é um órgão essencial para o metabolismo de lipídeos, além de ser um dos órgãos mais afetados pela deposição de gordura na obesidade. Observamos nos animais obesos que a suplementação com chia reduziu a concentração de colesterol total no fígado (Fig. 3A), a deposição de ácidos graxos totais (Fig. 3B) e os níveis hepáticos de ácido araquidônico (Fig. 3C). Além disso, observamos um aumento da concentração do ácido graxo eicosapentaenoico (EPA) no fígado dos animais obesos tratados com chia, sugerindo que a biossíntese de EPA esteja ocorrendo de forma mais eficiente neste grupo (Fig. 3D).

Gráfico 3 – Efeito da suplementação com óleo de chia sobre o conteúdo de lipídeos hepáticos

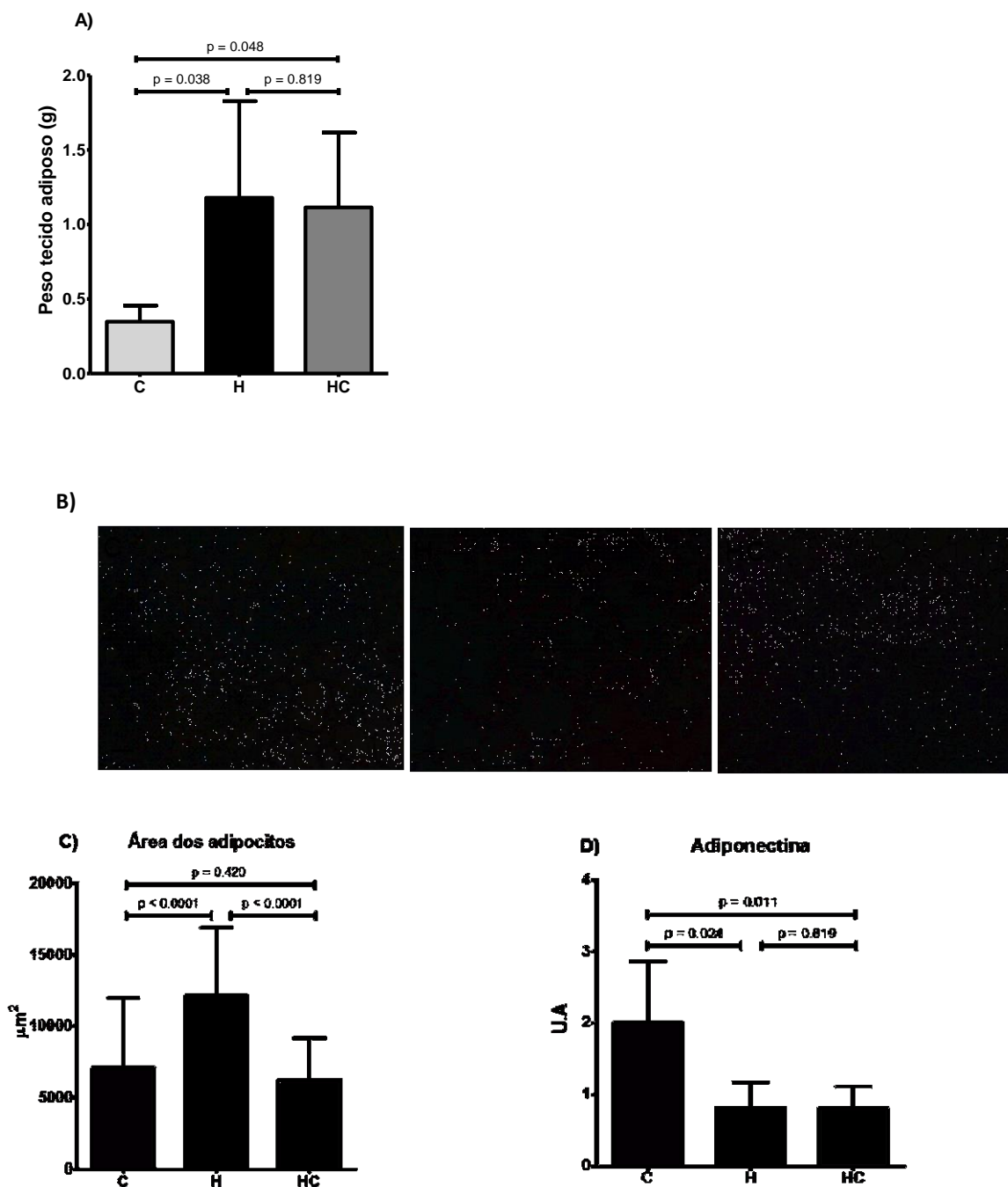


Legenda: Alterações lipídicas no fígado de animais após suplementação com óleo de chia. Colesterol total (A), ácidos graxos totais (B), ácido araquidônico (C) e ácido eicosapentaenoico (EPA) (D). Os níveis plasmáticos de ácido graxo total, ácido graxo linoleico, ácido graxo palmítico e ácido graxo araquidônico foram expressos em unidades arbitrárias (U.A.), usando como base a distribuição relativa das áreas dos picos obtidas durante ensaio de cromatografia gasosa. H: dieta hiperlipídica; HC: animais do grupo H que receberam a suplementação com o óleo de chia. Estas análises não foram realizadas em animais controle. Os gráficos apresentam média \pm E.P.M, n=5 animais por grupo.

3.4 Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a massa do tecido adiposo epididimal e adipócitos

Dados da literatura indicam a dieta hiperlipídica em camundongos induz um aumento da massa do tecido adiposo, associado à hipertrofia das células adiposas (Herberg et al. 1974). Corroborando estes resultados mostramos que os animais do grupo H tiveram aumento de peso corporal (Fig. 1A), e da massa de tecido adiposo epididimal (Fig. 4A). A suplementação com óleo de chia não modificou esses parâmetros (Fig. 1A e Fig. 4A). O tratamento com óleo de chia também não modificou a expressão gênica de adiponectina, que encontrava-se diminuída nos animais do grupo H, em comparação ao controle (Fig. 4B). Por outro lado, a análise histológica do tecido adiposo epididimal mostrou uma clara diferença no tamanho e na distribuição das células adiposas, com uma redução significativa no tamanho médio dos adipócitos do grupo tratado com óleo de chia, que apresentaram tamanho semelhante ao dos animais controle (Figura 4C e 4D).

Gráfico 4 – Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a massa do tecido adiposo epididimal e seus adipócitos

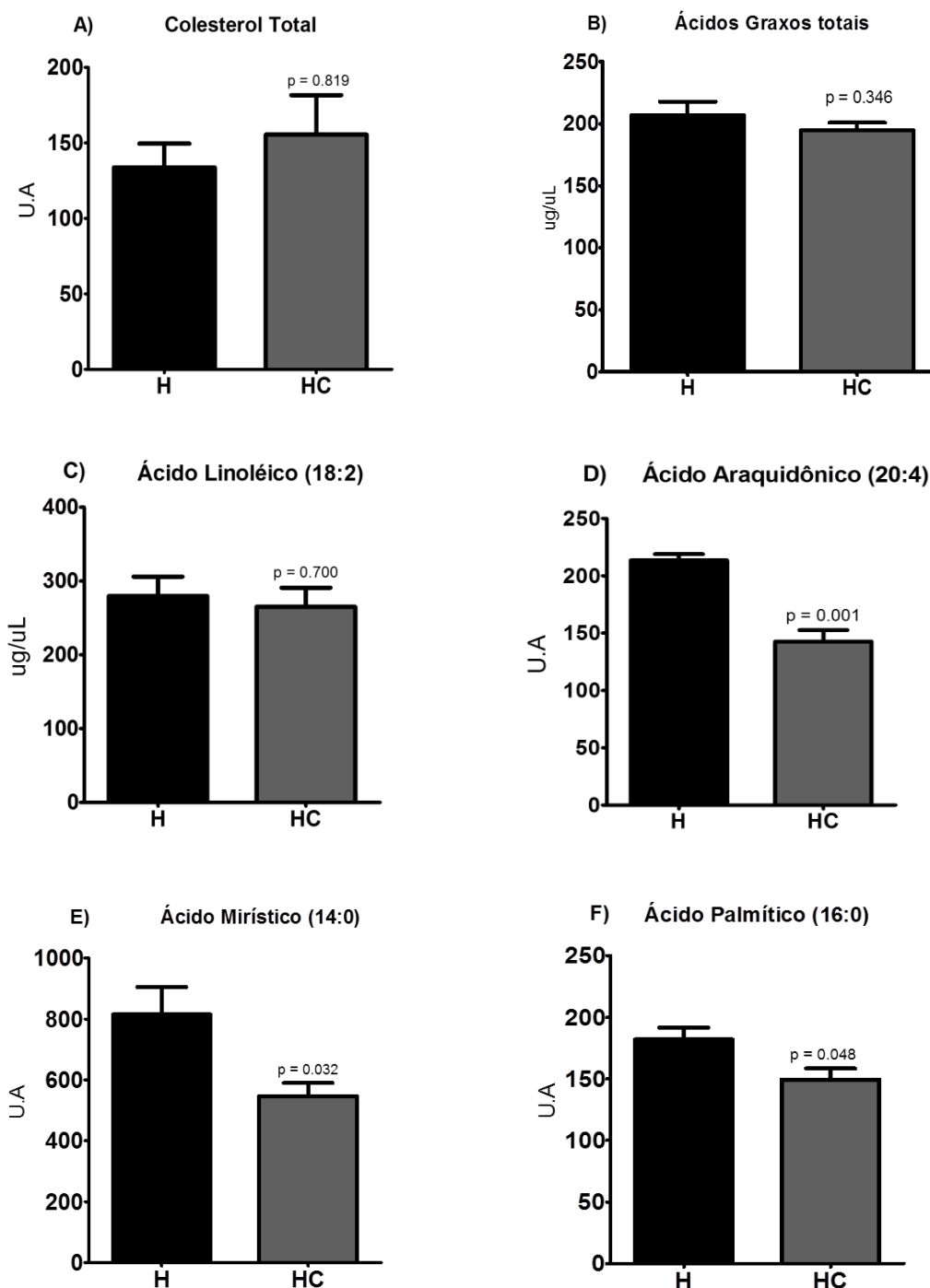


Legenda: Efeitos da suplementação com óleo de chia na massa do tecido adiposo epididimal e na área dos seus adipócitos. Peso total do tecido adiposo epididimal ao final da suplementação (A). Imagem representativa do tecido adiposo epididimal corado com hematoxilina e eosina (B). Quantificação da área dos adipócitos feita com auxílio do *software* ImageJ (C). (D) Análise da expressão gênica de adiponectina no tecido adiposo epididimal. C: dieta controle; H: dieta hiperlipídica; HC: animais do grupo H que receberam a suplementação com o óleo de chia. Os gráficos apresentam média \pm E.P.M, n= 5 por grupo.

3.5 Efeitos da suplementação com óleo de chia na composição lipídica do tecido adiposo epididimal

O tecido adiposo é a principal reserva corporal de lipídeos. A suplementação com óleo de chia, embora tenha alterado a composição lipídica no fígado, não afetou os níveis de colesterol, ácidos graxos totais e AGPI α linolênico no tecido adiposo epididimal nos animais obesos (Figs. 5A, 5B e 5C, respectivamente). Contudo, nos animais do grupo HC ocorreu uma redução significativa no conteúdo dos ácidos graxos araquidônico, mirístico e palmítico no tecido adiposo epididimal (Figs. 5D, 5E e 5F), em comparação ao grupo H.

Figura 5 – Efeitos da suplementação com óleo de chia na composição lipídica do tecido adiposo epididimal



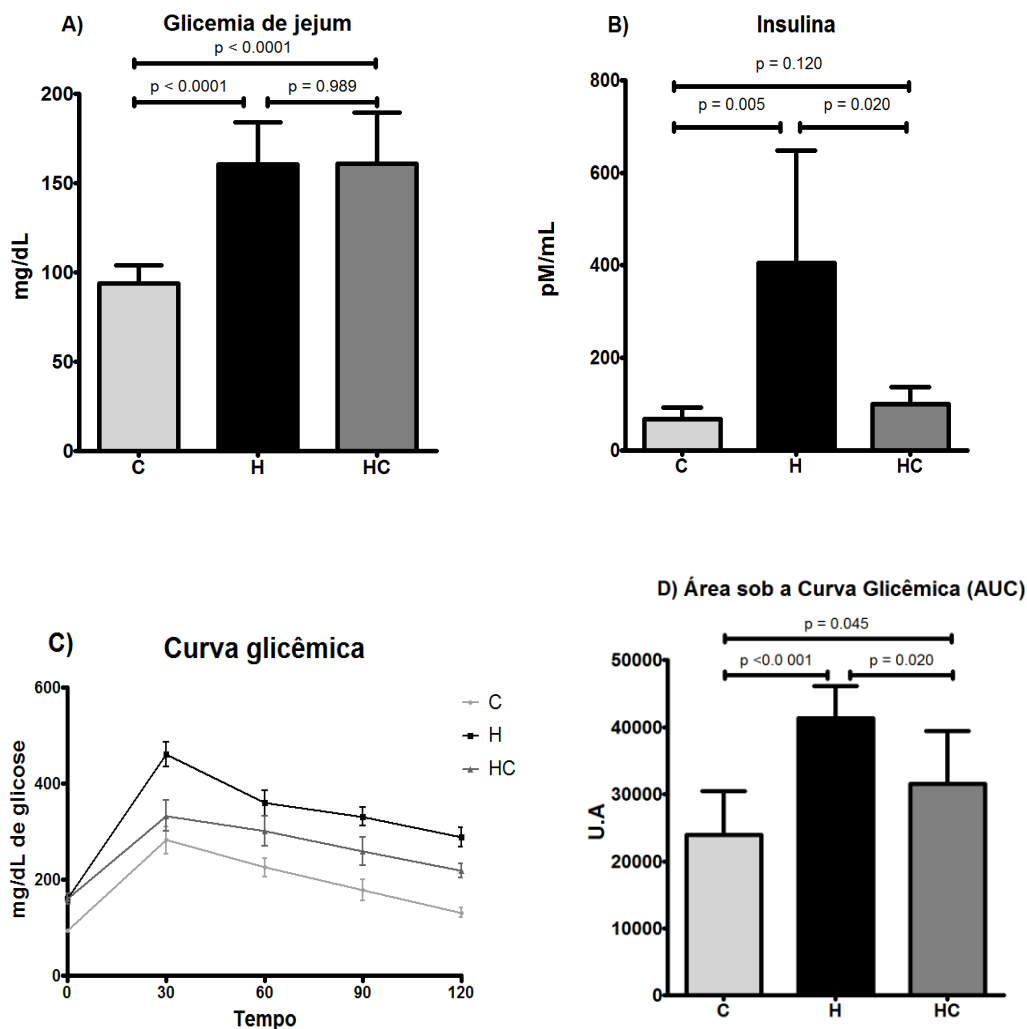
Legenda: Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a composição lipídica do tecido adiposo epididimal. Colesterol total (A), ácidos graxos totais (B), e ácidos graxos linoleico (C), araquidônico (D), mirístico (E) e palmítico (F). Os níveis plasmáticos de ácido graxo total, ácido graxo linoleico, ácido graxo palmítico e ácido graxo araquidônico foram expressos em unidades arbitrárias (U.A.), usando como base a distribuição relativa das áreas dos picos obtidas durante ensaio de cromatografia gasosa. H: dieta hiperlipídica; HC: animais do grupo H que receberam suplementação com o óleo de chia. Os gráficos apresentam média \pm E.P.M, n=5 animais por grupo.

3.6 Efeito da suplementação com óleo de chia sobre os indicadores da homeostase glicêmica

A glicemia dos animais de todos os grupos foi avaliada após um jejum de oito horas. Os níveis de glicose em jejum encontravam-se aumentados, em relação ao controle, nos animais obesos e não foram diferentes entre os grupos H e HC (Fig. 6A). No entanto, a concentração de insulina plasmática apresentou-se significativamente reduzida nos animais HC quando comparada ao grupo H, com valores similares aos dos animais C (Fig. 6B).

O teste de tolerância à glicose (TTG) mostrou que o grupo HC, apresentou maior eficiência na captação de glicose, quando comparado ao grupo H, conforme observado através dos cálculos das áreas das curvas glicêmicas (Fig. 6C e 6D)

Grafico 6 – Efeito da suplementação com óleo de chia sobre os indicadores da homeostase glicêmica



Legenda: Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a homeostase glicêmica. Glicemia de jejum após 8h (A). Insulina plasmática analisada por ELISA (B). Teste de tolerância à glicose (TTG) após infusão peritoneal de 2g/kg de peso por animal (C). Cálculo da área sobre a curva glicêmica (D). C: dieta controle; H: dieta hiperlipídica; HC: animais do grupo H que receberam a suplementação com o óleo de chia. Os gráficos apresentam média \pm E.P.M, n = 10 animais por grupo.

3.7 Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a via de sinalização da insulina no músculo esquelético

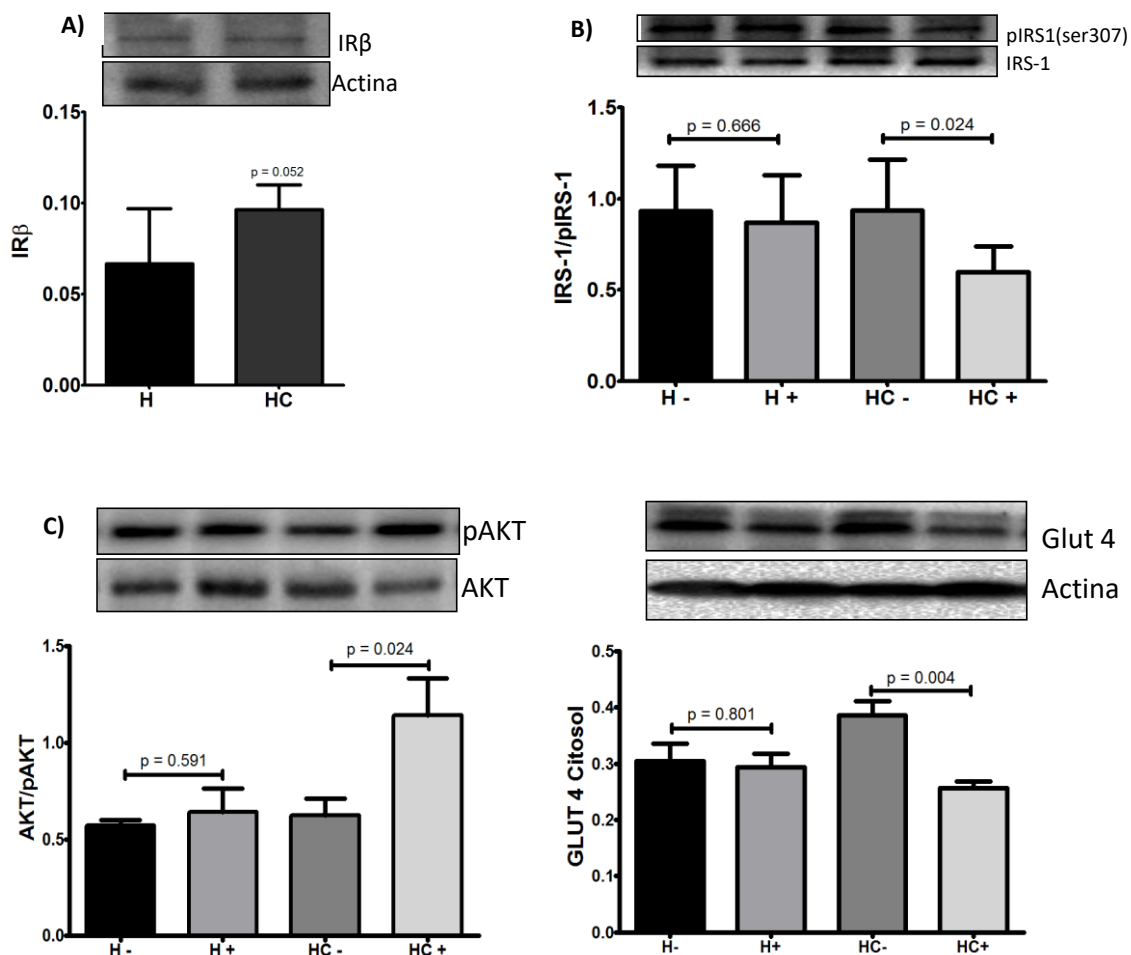
As principais proteínas envolvidas na sinalização de insulina foram analisadas buscando investigar possíveis modificações na cascata de sinais intracelulares induzidas pelo tratamento com chia, que modulariam o melhor desempenho das células musculares esqueléticas na captação de glicose observado.

A Figura 7A mostra que a expressão do IR β não foi afetada pela suplementação com chia nos animais obesos (Fig.7A). Por outro lado, o tecido muscular esquelético dos animais do grupo HC, quando estimulado com insulina, mostrou uma menor fosforilação do IRS1 em serina 307 do que os animais do grupo H (Fig. 7B). A fosforilação em Ser307 do IRS1 bloqueia a sinalização de insulina e impedir a captação de glicose.

A ativação de AKT, através de sua fosforilação, é um passo chave na sinalização da insulina, uma vez que induz a translocação de GLUT4 para membrana plasmática, aumentando a captação de glicose. Observamos no músculo esquelético dos animais obesos suplementados com chia que houve um aumento significativo da fosforilação de AKT no grupo HC, após o estímulo com a insulina, em relação ao grupo H (Fig. 7C). Coerentemente, a expressão de GLUT4 no citosol foi reduzida no grupo HC após o estímulo da insulina, quando comparado ao grupo H. (Fig. 7D).

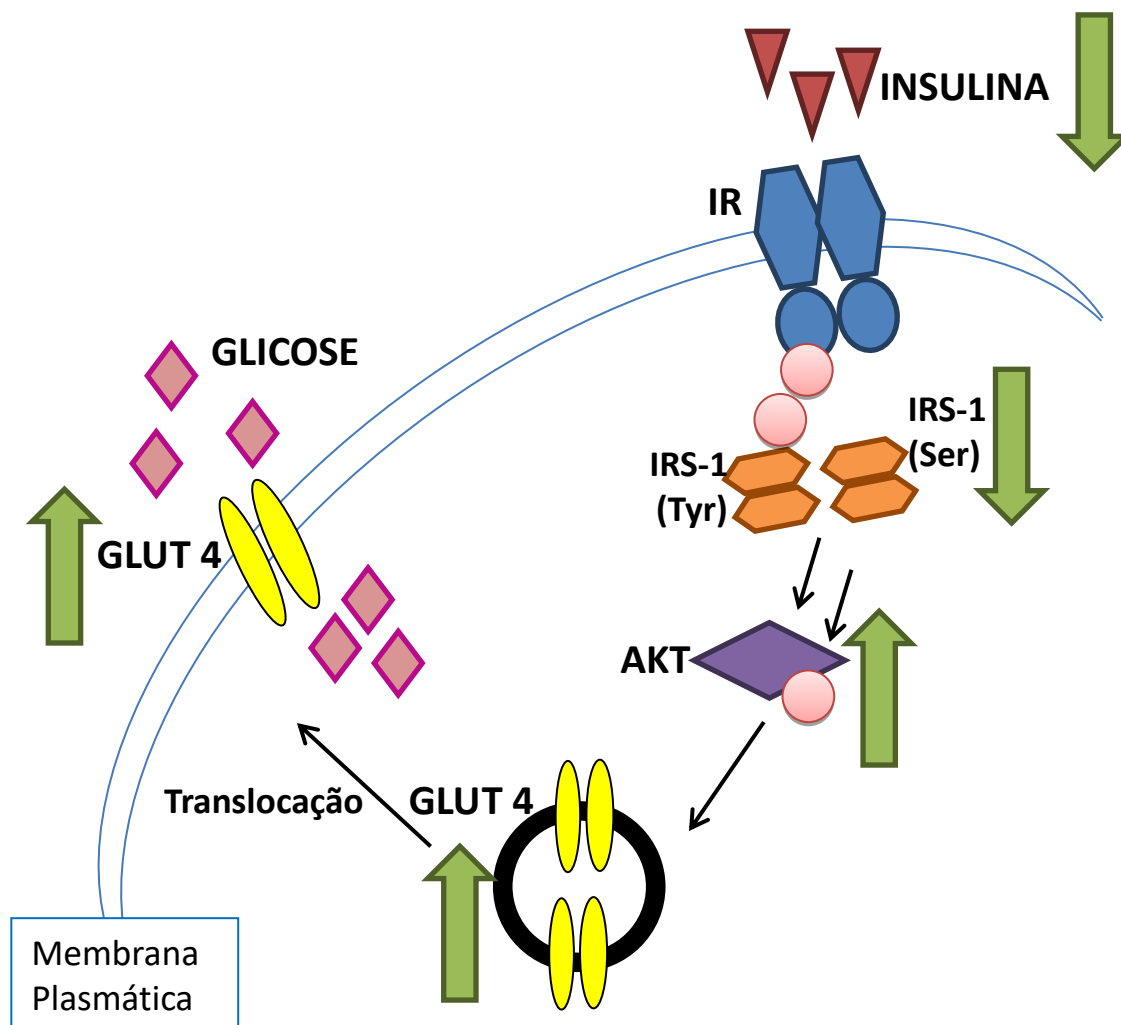
Um esquema representativo com os pontos abordados na figura 7 pode ser observado no quadro 5.

Grafico 7 - Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a via de sinalização da insulina no músculo esquelético



Legenda: Efeito da SOC sobre a via de sinalização da insulina no músculo esquelético. O extrato citosólico foi obtido conforme descrito no material e métodos. Expressão total de IRβ. A expressão de actina foi utilizada para normalizar o resultado (A). Fosforilação em serina 307 do IRS 1. A expressão de IRS 1 foi utilizada para normalizar o resultado (B). Ativação da AKT. A expressão de AKT foi utilizada para normalizar o resultado (C). Expressão de GLUT4 citosol. A expressão de actina foi utilizada para normalizar o resultado (D). A condição basal é representada pelo sinal - e o estímulo com insulina por 30 min é representado pelo sinal +. Os gráficos apresentam média ± EPM, n= 5 animais por grupo.

Figura 5 – Representação esquemática dos efeitos da suplementação com óleo de chia sobre a via de sinalização de insulina no músculo esquelético



Legenda: Esquema representativo das alterações na via de sinalização de insulina provocadas pela suplementação com óleo de chia. As setas em verde indicam a ação da suplementação com óleo de chia, com diminuição da insulina, IRS 1 em resíduos de serina, aumento da fosforilação de AKT e diminuição do GLUT4 no citosol, acarretando na maior captação de glicose com menores níveis séricos da mesma durante o teste de tolerância comparado ao grupo não suplementado.

4 DISCUSSÃO

Vários estudos têm demonstrado o potencial da utilização de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 (EPA e DHA) de origem animal no controle das consequências da obesidade, como a dislipidemia, a resistência à insulina e as disfunções do tecido adiposo (Capel et al. 2015; Da Silva et al. 2015; Flachs, Rossmeisl e Kopecky 2014; Huber et al. 2007; Kuda et al. 2009; Li et al. 2015; Liu et al. 2014; Oelrich, Dewell e Gardner 2013; Spencer et al. 2013; Wilt et al. 1989; Zhao e Chen 2014). Na busca de fontes vegetais ricas em AGPI ω 3, a suplementação dietética com óleo ou com a semente de chia tem sido apontada como promissora.

Neste trabalho, mostramos que a suplementação com óleo de chia não alterou o peso corporal ou induziu mudanças no perfil da ingestão calórica dos animais alimentados com dieta hiperlipídica (Fig. 1A, 1B). Estes resultados estão de acordo com os do único estudo em que o óleo de chia foi suplementado à dieta de animais com obesidade induzida por dieta (Marineli et al. 2014) e também com os demais estudos que utilizaram a semente de chia (Ayerza et al. 2002; Chicco et al. 2009; Espada et al. 2007; Guevara cruz et al. 2014; Nieman et al. 2009; Oliva et al. 2013; Rossi et al. 2013).

A suplementação com o óleo de chia afetou os níveis circulantes de colesterol dos animais submetidos a dieta hiperlipídica. Corroborando o achado, estudos realizados com a suplementação da semente da chia ou com óleo de peixe também não observaram alterações na concentração plasmática de colesterol (Ayerza et al., 2002, Wilt et al., 1989). Contudo, observamos que a suplementação com óleo de chia reduziu em 30% os níveis plasmáticos de triglicérides dos animais obesos. Este resultado ganha destaque uma vez que nas dietas dos grupos H e HC, não há variação do conteúdo de carboidratos, que são os metabólitos que mais contribuem para o aumento dos triglicérides plasmáticos. Outros autores já haviam mostrado que suplementação dietética com semente de chia (Ayerza et al. 2007; Chicco et al. 2009) ou óleo de peixe (Oelrich et al. 2013) também reduziu na trigliceridemia. Uma vez que o aumento da concentração plasmática de triglicérides tem relação direta com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, o uso de AGPI ω 3 vem sendo apontado como uma opção ao tratamento de hipertrigliceridemia (Ito, 2015).

Interessantemente, a suplementação com chia à dieta hiperlipídica por 60 dias em animais obesos reduziu significativamente os níveis plasmáticos de leptina.

A relação entre os níveis de leptina e a resistência à insulina, independentemente do percentual de gordura do indivíduo foi anteriormente descrita por Senegal & colaboradores (1996). Foi mostrado em humanos que, enquanto as concentrações plasmáticas de leptina correlacionam se positivamente com as medidas antropométricas e com as concentrações plasmáticas de ácido α linoléico, a adiponectina correlaciona se negativamente com as medidas antropométricas e com os níveis de triglicerídeos e insulina (Gray et al., 2014). Adicionalmente, Gomes e colaboradores (2015) mostraram em humanos que a suplementação alimentar com ALA (3g/dia em cápsulas de óleo de linhaça), durante 60 dias, melhorou a resposta à insulina em homens e mulheres com IMC > 30kg/m² e em diabéticos tipo 2. Esta melhora correlacionou positivamente com os níveis séricos de adiponectina nestes indivíduos. Mais recentemente, Lopez (2016) destaca as correlações positivas entre os níveis de EPA e DHA e os níveis de adiponectina sérica (Lopez, 2016). Embora não tenhamos dosado os níveis circulantes de adiponectina, a expressão gênica de adiponectina encontrava se, significativamente diminuída do tecido adiposo epididimal dos animais alimentados com dieta hiperlipídica, não foi significativamente alterada pela suplementação com chia. Até o momento, detectamos que nosso trabalho foi o primeiro a estudar os efeitos da suplementação com chia sobre a expressão de adiponectina no tecido adiposo.

A suplementação da dieta hiperlipídica com óleo de chia manteve uma tendência à redução de ácidos graxos saturados plasmáticos, embora não fosse estatisticamente significativa. Contudo, o tratamento causou uma redução significativa de ácidos graxos totais e colesterol no fígado. O aumento de EPA no fígado dos animais suplementados revela a melhora do metabolismo de ácidos graxos (Gray et al., 2014). Podemos inferir que esta melhora possa estar relacionada à bioconversão do ALA ao EPA, conforme já observado em outro estudo (González Mañán et al. 2012).

Em nosso trabalho, não foi observada a presença de macrófagos no tecido adiposo epididimal, diferentemente da maioria dos estudos que associam a infiltração de macrófagos no tecido adiposo com as complicações da obesidade. Entretanto, esse dado corrobora com novos trabalhos que vêm questionando a associação direta e inflexível 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. Neste estudo, o

autor descreve algumas linhas de evidências que apoiam essa afirmação, como no caso da síndrome de Cushing, onde os pacientes apresentam níveis séricos elevados de glicocorticóides e desenvolvem obesidade central e resistência à insulina mesmo sendo imunossuprimidos. Outra linha de evidência apresentada se refere à redução de EBF1 (do inglês: early B cell factor 1), que aumenta o tamanho dos adipócitos e provoca resistência à insulina, mas não influencia as vias inflamatórias (Gao et al. 2014). Em um estudo anterior do mesmo grupo, foi mostrado que camundongos *knockout* para JNK1, camundongos *knockout* para RAG1 (não realizam maturação de células T e B do sistema imune) e camundongos tratados com clodronato (para depleção de macrófagos), a dieta HFD induz hipertrofia de adipócitos e resistência à insulina independentemente da ativação de resposta inflamatória (Lee et al. 2011).

Em nosso trabalho, a suplementação com óleo de chia levou à redução do tamanho dos adipócitos sem alterar a massa de tecido adiposo epididimal total. Corroborando nossos dados, trabalhos recentes demonstraram que a suplementação de EPA em uma dieta HFD reduziu a hipertrofia dos adipócitos e melhorou o estado inflamatório, embora ambos os eventos ocorram de forma independente (LeMieux et al. 2015). Estes autores sugerem que a redução no tamanho dos adipócitos possa ser devida, em parte, a regulação pelo EPA de vários genes chave envolvidos na adipogênese / lipogênese (por exemplo, Bmp4 e CEBP α) e acúmulo de lipídeos (por exemplo, Lep e Srebp1). Adicionalmente, relatos anteriores sugerem que o efeito inibitório de AGPI ω 3 sobre a hipertrofia de adipócitos após dieta hiperlipídica estaria relacionado ao aumento da expressão de genes regulatórios da degradação de matriz (MMP 12 e 14 e catepsinas K, L e S) (Huber et al. 2007). Tem sido sugerido por diferentes autores que o uso de EPA durante a diferenciação de adipócitos induziria a expressão de genes envolvidos na biogênese mitocondrial, como PGC1 α , Fator de respiração nuclear 1 e Citocromo C oxidase. Desta forma, a função mitocondrial foi aumentada e o metabolismo oxidativo foi estimulado, reduzindo o volume de adipócitos subcutâneos (Marineli et al. 2014; Zhao e Chen 2014). Assim, a modificação da morfologia dos adipócitos após suplementação com óleo de chia também poderia se dever à capacidade dos AGPI ω 3 em aumentar a dissipação de energia pelo aumento da atividade mitocondrial.

Além da alteração da morfologia, a suplementação com óleo de chia causou uma modificação da composição lipídica dos adipócitos. Ocorreu a diminuição do

conteúdo de ácidos graxos saturados e do ácido araquidônico. Após a suplementação com EPA e DHA, foi também observada alteração do conteúdo lipídico do tecido adiposo. (Poudyal et al., 2012; Prostek et al., 2014).

Foi descrito que a insulina pode levar à hipertrofia dos adipócitos através do estímulo à lipogênese (aumento do conteúdo de ácidos graxos no adipócito). Este efeito o que pode levar a resistência à insulina devido à desregulação de estruturas de actina corticais e consequente prejuízo no tráfego do GLUT4 (Kim et al. 2015). A hipótese de que os AGPI ω 3 possam melhorar a resistência à insulina, baseia-se na atuação deles como moléculas de sinalização em vários processos celulares, por meio de receptores/sensores de ácidos graxos, como o GPR40, presente no pâncreas, que também regula a secreção de insulina (Itoh Y et al. 2003; Nolan et al. 2006).

A redução da insulina e a melhora da curva glicêmica dos animais suplementados com óleo de chia mostrados neste trabalho, também foram observadas em outros estudos com a chia, em óleo ou sementes (Chicco et al. 2009; Marineli et al. 2014; Matravadia et al. 2014). No único estudo que utilizou o óleo de chia em animais obesos, os autores evidenciaram a melhora da resistência à insulina (Marineli et al. 2014), que foi acompanhada pelo aumento da expressão de HSP e de PGC 1 α no músculo esquelético. No entanto, nenhum dos estudos com semente ou óleo de chia investigou se a melhora na resposta glicêmica e na resistência à insulina ocorreram devido a modificações na via de sinalização deste hormônio.

Nosso trabalho demonstra que a suplementação com óleo de chia na dieta hiperlipídica aumenta a capacidade de resposta da insulina em seu receptor no músculo esquelético. Nesses animais, diferentemente dos camundongos do grupo H, a estimulação com insulina foi capaz de diminuir os níveis de fosforilação do IRS 1 em Ser307 e aumentar a fosforilação de AKT, diminuindo o conteúdo de GLUT 4 no citosol, podendo supor que houve uma maior translocação para membrana celular. Estes dados *in vitro* corroboram com os dados da melhora da tolerância à glicose, obtidos *in vivo*, em animais obesos suplementados com óleo de chia. Estudos recentes também apoiam nossos resultados, uma vez que foi observado que há melhora da resistência à insulina pelo uso de AGPI ω 3, dependentemente da fosforilação de AKT (Capel et al. 2015). Além disso, observou-se que o tratamento a longo prazo com EPA regulava a fosforilação de AMPK α e a expressão de CPT1,

levando ao aumento da captação de glicose por aumentar a expressão do RNAm do GLUT4 (Zhao e Chen 2014).

Outros fatores podem influenciar o metabolismo de glicose e a resistência à insulina, independentemente da sensibilidade do músculo esquelético à insulina, como por exemplo, as ações da glicose e da insulina no tecido adiposo, fígado e pâncreas, que podem ser moduladas por ácidos graxos. Apesar dos benefícios do óleo de peixe sobre a sensibilidade à insulina serem extensivamente suportados na literatura, os dados mais recentes fornecem evidências de que ALA, o precursor de EPA e DHA, também pode ser eficaz na melhoria da sensibilidade à insulina (Matravadia et al. 2014).

Estudos com camundongos transgênicos que expressam FAT 1 (*ω3 fatty acid desaturase*), sendo capazes de produzir endogenamente mais AGPI ω 3, em detrimento do AGPI ω 6, mostram que os elevados níveis de ômega 3 presentes em todos os tecidos correlacionam com a resistência dos animais ao desenvolvimento de obesidade, dislipidemia e diabetes (Li et al. 2014)

As ações dos ômega 3 se dão através de sua ligação aos receptores de ácidos graxos de cadeia longa, GPR40, que é abundantemente expresso no pâncreas, que parece regular a secreção de insulina, (Itoh; Kawamata; Harada, 2003); e ao GPR120, outro receptor de ácidos graxos da série ômega 3 que foi descrito ter efeitos anti diabéticos *in vivo*, modulando a sensibilidade à insulina ao reprimir a inflamação dos tecidos induzida por macrófagos (D. Oh et al. 2011).

CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso estudo descreve, de forma inédita, os efeitos da suplementação com óleo de chia sobre as alterações metabólicas causadas pela obesidade induzida por dieta hiperlipídica. As mudanças no perfil de secreção da leptina, a redução de ácidos graxos saturados no plasma e no fígado, relacionam-se às modificações na morfologia e composição lipídica do tecido adiposo epididimal e uma significativa melhora no quadro de resistência à insulina. Mostramos ainda, pela primeira vez, os mecanismos celulares relacionados aos efeitos do óleo de chia sobre a resistência à insulina, identificando as modificações na via de sinalização desse hormônio, sendo um possível alvo primário, podendo contribuir para a melhora na resistência à insulina e redução da hipertrofia do tecido adiposo em animais obesos.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, Priscila de Mattos Machado; CARMO, M. G. T. Ácidos graxos n^o 3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. **Revista de Metabolismo e Nutrição**, v. 8, n. 3, p. 135-143, 2006.

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

AYERZA JR, Ricardo; COATES, Wayne. 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, Wayne E. Chia seeds and the Columbus concept. In: **Wild Type Food in Health Promotion and Disease Prevention**. Humana Press, 2008. p. 377-392.

BAILEY, N. Current choices in omega 3 supplementation. **Nutrition Bulletin**, v. 34, n. 1, p. 85-91, 2009.

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

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

BRASIL. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008- 2009**. IBGE, 2011.

CAHILL, J. P.; PROVANCE, M. C. Genetics of qualitative traits in domesticated chia (*Salvia hispanica* L.). **Journal of Heredity**, v. 93, n. 1, p. 52-55, 2002

CALDER, Philip C. n- 3 Polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. **Lipids**, v. 38, n. 4, p. 343-352, 2003.

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

CARVALHEIRA, José BC; ZECCHIN, Henrique G.; SAAD, Mario JA. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

CHICCO, Adriana 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. 41-50, 2009.

COATES, Wayne et al. Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 2, p. 1366-1371, 2011.

COPPS, K. D.; WHITE, M. F. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. **Diabetologia**, v. 55, n. 10, p. 2565-2582, 2012.

COTILLARD, Aurelie et al. Adipocyte size threshold matters: link with risk of type 2 diabetes and improved insulin resistance after gastric bypass. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 99, n. 8, p. E1466-E1470, 2014.

CZECH, Michael P.; CORVERA, Silvia. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 4, p. 1865-1868, 1999.

MARINELI, DA SILVA, Rafaela 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

DASILVA, Gabriel et al. Healthy effect of different proportions of marine ω 3 PUFAs EPA and DHA supplementation in Wistar rats: Lipidomic biomarkers of oxidative stress and inflammation. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 26, n. 11, p. 1385-1392, 2015.

DE SOUZA FERREIRA, Cynthia et al. Effect of chia seed (*Salvia hispanica* L.) consumption on cardiovascular risk factors in humans: a systematic review. **Nutricion hospitalaria**, v. 32, n. 5, 2015.

DE VOS, Piet et al. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. 1995.

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

ELCHEBLY, Mounib et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase 1B gene. **Science**, v. 283, n. 5407, p. 1544-1548, 1999.

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

FLACHS, P.; ROSSMEISL, M.; KOPECKY, J. The effect of n 3 fatty acids on glucose homeostasis and insulin sensitivity. **Physiological Research**, v. 63, p. S93, 2014.

FRIED, Susan K. et al. Regulation of leptin production in humans. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 12, p. 3127S-3131S, 2000.

GAO, Hui et al. Early B cell factor 1 regulates adipocyte morphology and lipolysis in white adipose tissue. **Cell metabolism**, v. 19, n. 6, p. 981-992, 2014.

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

GOLDSTEIN, Barry J. et al. Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein tyrosine phosphatases. In: **Insulin Action**. Springer US, 1998. p. 91-99.

GONZÁLEZ MAÑÁN, Daniel et al. Bioconversion of α linolenic acid to n 3 CPUFA and expression of PPAR alpha, acyl coenzyme A oxidase 1 and carnitine acyl transferase I are incremented after feeding rats with α linolenic acid rich oils. **Food & function**, v. 3, n. 7, p. 765-772, 2012.

GONZÁLEZ PÉRIZ, Ana 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.

GRANADOS, N. et al. Vitamin A supplementation in early life affects later response to an obesogenic diet in rats. **International Journal of Obesity**, v. 37, n. 9, p. 1169-1176, 2013.

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

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

GUO, Shaodong. Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. **Journal of Endocrinology**, v. 220, n. 2, p. T1-T23, 2014.

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

GUSTAFSON, Birgit; SMITH, Ulf. Regulation of white adipogenesis and its relation to ectopic fat accumulation and cardiovascular risk. **Atherosclerosis**, v. 241, n. 1, p. 27-35, 2015.

HENNIGE, Anita M. et al. Leptin down regulates insulin action through phosphorylation of serine 318 in insulin receptor substrate 1. **The FASEB journal**, v. 20, n. 8, p. 1206-1208, 2006.

HENSLER, Michal et al. The inhibition of fat cell proliferation by n 3 fatty acids in dietary obese mice. **Lipids in health and disease**, v. 10, n. 1, p. 1, 2011.

HERBERG, L. et al. Dietary induced hypertrophic–hyperplastic obesity in mice. **Journal of lipid research**, v. 15, n. 6, p. 580-585, 1974.

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

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

ITO, Matthew K. Long chain omega 3 fatty acids, fibrates and niacin as therapeutic options in the treatment of hypertriglyceridemia: A review of the literature. **Atherosclerosis**, v. 242, n. 2, p. 647-656, 2015.

ITOH, Yasuaki et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic β cells through GPR40. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 173-176, 2003.

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

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

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

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

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

KIM, Jason K. et al. Tissue specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue specific insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 13, p. 7522-7527, 2001.

KIM, Jong 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.

KLÖTING, Nora; BLÜHER, Matthias. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 15, n. 4, p. 277-287, 2014

KRIS ETHEERTON, Penny M. et al. Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease new recommendations from the American Heart Association. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 23, n. 2, p. 151-152, 2003.

KRIS ETHEERTON, Penny M. et al. Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease new recommendations from the American Heart Association. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 23, n. 2, p. 151-152, 2003.

KRIS ETHEERTON, Penny M. et al. Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease new recommendations from the American Heart Association. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 23, n. 2, p. 151-152, 2003.

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

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

LEE, Yun Sok 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.

LEMIEUX, Monique J. et al. Eicosapentaenoic acid reduces adipocyte hypertrophy and inflammation in diet induced obese mice in an adiposity independent manner. **The Journal of nutrition**, v. 145, n. 3, p. 411-417, 2015.

LI, Jie et al. Endogenous ω 3 polyunsaturated fatty acid production confers resistance to obesity, dyslipidemia, and diabetes in mice. **Molecular Endocrinology**, v. 28, n. 8, p. 1316-1328, 2014.

LI, Meng Ying et al. Dietary fish oil inhibits mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in diabetic rats by blocking nuclear factor κ B mediated inflammatory pathways. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 26, n. 11, p. 1147-1155, 2015.

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

LIU, Menghan et al. PPAR α independent actions of omega 3 PUFAs contribute to their beneficial effects on adiposity and glucose homeostasis. **Scientific reports**, v. 4, 2014.

LOPEZ JARAMILLO, Patricio. The Role of Adiponectin in Cardiometabolic Diseases: Effects of Nutritional Interventions. **The Journal of nutrition**, p. jn202432, 2016.

LÓPEZ VICARIO, Cristina et al. Pro resolving mediators produced from EPA and DHA: Overview of the pathways involved and their mechanisms in metabolic syndrome and related liver diseases. **European journal of pharmacology**, 2015.

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

LUMENG, Carey N.; BODZIN, Jennifer L.; SALTIEL, Alan R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 1, p. 175-184, 2007

MANICKAM, Elizabeth; SINCLAIR, Andrew J.; CAMERON SMITH, David. Suppressive actions of eicosapentaenoic acid on lipid droplet formation in 3T3 L1 adipocytes. **Lipids in health and disease**, v. 9, n. 1, p. 57, 2010.

MARQUARDT, Andreas 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

MARTÍNEZ CRUZ, Oliviert; PAREDES LÓPEZ, Octavio. Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) by ultra high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1346, p. 43-48, 2014.

MATRAVADIA, Sarthak et al. Linoleic and α linolenic acid both prevent insulin resistance but have divergent impacts on skeletal muscle mitochondrial bioenergetics in obese Zucker rats. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, p. ajpendo. 00032.2014, 2014.

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

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

MURALI, Ganesan et al. Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in promoting the differentiation of 3T3 L1 preadipocytes. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 90, n. 1, p. 13-21, 2014.

MURPHY, Eric J. Blood–brain barrier and brain fatty acid uptake: Role of arachidonic acid and PGE2. **Journal of neurochemistry**, v. 135, n. 5, p. 845-848, 2015.

NIEMAN, David 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.

NOLAN, Christopher J. et al. Fatty acid signaling in the β cell and insulin secretion. **Diabetes**, v. 55, n. Supplement 2, p. S16 S23, 2006

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

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

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

OLIVOS LUGO, B. L.; VALDIVIA LÓPEZ, M. Á.; TECANTE, A. Thermal and physicochemical properties and nutritional value of the protein fraction of Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.). **Food Science and Technology International**, 2010.

PALOU, Andreu; PICÓ, Catalina; BONET, Maria Luisa. Nutritional potential of metabolic remodelling of white adipose tissue. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 16, n. 6, p. 650-656, 2013.

PAULI, José Rodrigo et al. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 4, p. 399-408, 2009.

PAZ FILHO, Gilberto; MASTRONARDI, Claudio A.; LICINIO, Julio. Leptin treatment: facts and expectations. **Metabolism**, v. 64, n. 1, p. 146-156, 2015.

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

PELLEGRINELLI, Vanessa; CAROBBIO, Stefania; VIDAL PUIG, Antonio. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. **Diabetologia**, p. 1-14, 2016.

PÉREZ ECHARRI, Nerea et al. Down regulation in muscle and liver lipogenic genes: EPA ethyl ester treatment in lean and overweight (high fat fed) rats. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 20, n. 9, p. 705-714, 2009.

PÉREZ MATUTE, Patricia 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 . **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 02, p. 389-398, 2007.

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

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

POUDYAL, Hemant 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

PROSTEK, Adam et al. The influence of EPA and DHA on markers of inflammation in 3T3 L1 cells at different stages of cellular maturation. **Lipids in health and disease**, v. 13, n. 1, p. 1, 2014

PROSTEK, Adam et al. The influence of EPA and DHA on markers of inflammation in 3T3 L1 cells at different stages of cellular maturation. **Lipids in health and disease**, v. 13, n. 1, p. 1, 2014.

REEVES, Philip 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. **J nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

RESELAND, Janne E. et al. Effect of long term changes in diet and exercise on plasma leptin concentrations. **The American journal of clinical nutrition**, v. 73, n. 2, p. 240-245, 2001.

RONDINONE, Cristina M. et al. Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS 2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3 kinase in adipocytes from subjects with non insulin dependent diabetes mellitus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 8, p. 4171-4175, 1997.

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

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

SALADIN, R et al. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. **Nature**, v. 377, n. 7 p. 527-9, 1995.

SEGAL, Karen R.; LANDT, Michael; KLEIN, Samuel. Relationship between insulin sensitivity and plasma leptin concentration in lean and obese men. **Diabetes**, v. 45, n. 7, p. 988-991, 1996

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, Artemis P. The importance of the omega 6/omega 3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. **Experimental biology and medicine**, v. 233, n. 6, p. 674-688, 2008

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

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

SUN, Ye et al. Abstract P034: Circulating Omega 3 Fatty Acids and Risk of Acute Myocardial Infarction in Singapore Chinese. **Circulation**, v. 131, n. Suppl 1, p. AP034-AP034, 2015.

SWEENEY, Gary et al. High leptin levels acutely inhibit insulin stimulated glucose uptake without affecting glucose transporter 4 translocation in l6 rat skeletal muscle cells. **Endocrinology**, v. 142, n. 11, p. 4806-4812, 2001

TALUKDAR, Saswata 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.

TANABE, Y et al. Involvement of cyclooxygenase 2 in synergistic effect of cyclic stretching and eicosapentaenoic acid on adipocyte differentiation. **J Pharmacol Sci.** v.106, n.3, p.478-84, 2008

TANABE, Yoshiyuki et al. Involvement of cyclooxygenase 2 in synergistic effect of cyclic stretching and eicosapentaenoic acid on adipocyte differentiation. **Journal of pharmacological sciences**, v. 106, n. 3, p. 478-484, 2008.

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

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

ULBRICHT, Catherine 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.

VALENZUELA, Rodrigo 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.

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

VIGARELLO, Georges. **Les métamorphoses du gras: Histoire de l'obésité. Du Moyen Age au XXe siècle**. Seuil, 2013.

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

WANG, Qinghua et al. Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 6, p. 4008-4018, 1999.

WEINTRAUB, Howard. Update on marine omega-3 fatty acids: Management of dyslipidemia and current omega-3 treatment options. **Atherosclerosis**, v. 230, n. 2, p. 381-389, 2013.

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

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

YU, Chunli et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) associated phosphatidylinositol-3 kinase activity in muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 52, p. 50230-50236, 2002.

YU, Wenxin et al. Molecular genetic analysis of familial hypercholesterolemia: spectrum and regional difference of LDL receptor gene mutations in Japanese population. **Atherosclerosis**, v. 165, n. 2, p. 335-342, 2002.

ZECCHIN, Henrique Gottardello; CARVALHEIRA, José Barreto Campello; SAAD, Mario José Abdalla. Mecanismos moleculares da resistência à insulina na síndrome metabólica. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**, v. 14, n. 4, p. 574-89, 2004.

ZHANG, Yiyang 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.