



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

Agatha de Assis Ferreira

O papel da suplementação dietética com óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) sobre o remodelamento morfofuncional do tecido adiposo branco em camundongos C57Bl/6

Rio de Janeiro

2022

Agatha de Assis Ferreira

**O papel da suplementação dietética com óleo de chia (*Salvia hispanica* L.)
sobre o remodelamento morfofuncional do tecido adiposo branco em
camundongos C57Bl/6**

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

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

Rio de Janeiro

2022

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

F383 Ferreira, Agatha de Assis.
O papel da suplementação dietética com óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) sobre o remodelamento morfofuncional do tecido adiposo branco em camundongos C57Bl/6 / Agatha de Assis Ferreira. - 2022.
144 f.

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

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

1. Tecido adiposo branco - Teses. 2. *Salvia hispanica*. 3. Ácidos graxos.- Teses. I. Silva, Simone Vargas da. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 613.2

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Agatha de Assis Ferreira

**O papel da suplementação dietética com óleo de chia (*Salvia hispanica* L.)
sobre o remodelamento morfofuncional do tecido adiposo branco em
camundongos C57Bl/6**

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

Aprovada em 07 de junho do 2022.

Banca Examinadora:

Prof^a Dra. Simone Vargas da Silva (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Mariana Renovato Martins

Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira

Universidade Federal de Minas Gerais

Prof Dr. Heitor Affonso de Paula Neto

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Fernando e Rita.

A minha irmã, Aimeé.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à Prof.^a Dr.^a Simone Vargas por aceitar me orientar durante o desenvolvimento desse projeto. Obrigada por confiar no meu trabalho e por todo o aprendizado e incentivo desde o mestrado até a conclusão desta tese.

A Prof.^a Dr.^a Christina Barja-Fidalgo, por ter me recebido em seu laboratório, pelos ensinamentos, pela confiança e pelo exemplo de profissionalismo.

A Dr.^a Roberta Saldanha Gama e o Dr. Rafael Simões, por todos os ensinamentos, ajudas e dicas.

A Prof.^a Dr.^a Patrícia Lisboa, por permitir o uso do equipamento de ressonância magnética.

A Prof.^a Dr.^a Tatiana Simão, por ter aceitado revisar este trabalho.

Aos meus pais e irmã, Fernando, Rita e Aimeé, por estarem ao meu lado.

Ao meu namorado, Bruno, por todo amor, compreensão, paciência, incentivo e por me ajudar a passar por esse momento de ansiedade.

A todos os meus companheiros de laboratório. Aos técnicos e aos alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado, que fazem parte da minha vida acadêmica e deste trabalho. Obrigada por tantos experimentos e experiências compartilhadas, e por todos os momentos até aqui.

Aos amigos que fiz graças a UERJ e a pós-graduação: Clarinha, Natália, Thamiris, Dafne, Izabelle e Bárbara.

Aos professores e demais funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aos membros titulares e suplentes da banca examinadora pela disponibilidade e interesse na participação.

Aos bioteristas que nos auxiliam sempre com a limpeza e cuidado com os animais.

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

A Deus, Nossa Senhora e aos anjos que me guardaram nessa jornada.

Estou entre aqueles que pensam que a ciência tem uma grande beleza. Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico: ele também é uma criança colocada diante de fenômenos naturais que o impressionam como um conto de fadas.

Marie Curie

RESUMO

FERREIRA, Agatha de Assis. *O papel da suplementação dietética com óleo de chia (Salvia hispanica L.) sobre o remodelamento morfofuncional do tecido adiposo branco em camundongos C57Bl/6*. 2022. 144 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

O remodelamento do tecido adiposo (TA) é um processo dinâmico que ocorre em situações de privação ou excesso de nutrientes. Na obesidade, a expansão prejudicial deste tecido pode aumentar o risco de desenvolvimento de comorbidades. Investigamos o efeito da suplementação com óleo de chia (SOC), a mais rica fonte vegetal de ácidos graxos $\omega 3$, sobre o remodelamento do TA branco em animais eutróficos e obesos e suas implicações na saúde metabólica de camundongos machos C57Bl/6. Esses camundongos, com 30 dias de vida, foram mantidos sob dieta normolipídica ou dieta hiperlipídica por 9 semanas. Depois, cada grupo foi subdividido, os quais receberam as respectivas dietas suplementadas com óleo de chia durante 7 semanas. Em animais eutróficos, a SOC induziu um aumento da glicemia de jejum, da tolerância à glicose e do colesterol LDL e, reduziu os níveis séricos de insulina, sem afetar o peso e a composição corporal. Nos TA subcutâneo (TAS) e epididimal (TAE), a SOC aumentou a secreção de TNF- α , enquanto os níveis de IL-10 aumentaram apenas no TAE. A análise por metabolômica mostrou que a SOC induziu um aumento da produção de lactato pelo TAE, sem alterações no consumo de glicose. Em animais obesos, a SOC diminuiu o acúmulo de gordura corporal e aumentou a massa livre de gordura. A avaliação da homeostase glicêmica desses animais mostrou que a SOC foi capaz de melhorar a tolerância à glicose e reduzir os níveis séricos de insulina. Além disso, reduziu os níveis de triglicerídeos e aumentou o colesterol HDL. Nos diferentes compartimentos de tecido adiposo, observamos que a SOC reduziu a massa do TAE, diminuindo a área dos seus adipócitos. No TAS, a SOC não alterou a massa do tecido, porém, aumentou o número de células. Em relação ao perfil de citocinas secretadas pelo TA, vimos que a SOC aumentou a produção de IL-10 e reduziu MCP-1 pelo TAS e, diminuiu os níveis de IL-10, aumentando os níveis de TNF- α pelo TAE. A análise in vitro do potencial proliferativo e de diferenciação das células-tronco mesenquimais presentes na fração vascular do estroma do TAS e TAE mostrou que a SOC inibiu a resposta proliferativa e de diferenciação adipocitária no TAS, e aumentou a diferenciação em adipócitos no TAE. Observamos ainda que a SOC induziu um aumento na expressão de UCP-1 no TAS, sem alterar a expressão no TAE. A análise por metabolômica mostrou que a SOC aumentou a secreção de lactato apenas no TAE. Por fim, observamos que a incubação de macrófagos RAW264.7 com o meio condicionado dos diferentes tecidos adiposos por 24 h não foi capaz de induzir um aumento na expressão proteica de iNOS e arginase. Nossos resultados mostram que a SOC em animais eutróficos e obesos induz o remodelamento do tecido adiposo branco, atuando de maneira distinta nos compartimentos subcutâneo e epididimal e promove um aumento da sensibilidade a insulina. Além disso, mostramos de forma inédita que a obesidade e a SOC são capazes de modificar o perfil de metabólitos secretados pelos diferentes compartimentos de tecido adiposo.

Palavras-chave: obesidade; ácidos graxos $\omega 3$; tecido adiposo branco; remodelamento.

ABSTRACT

FERREIRA, Agatha de Assis. *The role of dietary chia oil supplementation (Salvia hispanica L) on the morphofunctional remodeling of white adipose tissue in C57Bl/06 mice*. 2022. 144 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

The adipose tissue (AT) remodeling is a dynamic process in nutritional deprivation or excess situations. Impaired expansion of AT increases the risk of the development of obesity-associated comorbidities. Here, we investigated the effect of chia oil supplementation (COS) on white AT remodeling in eutrophic and obese mice and its implications for the metabolic health of these animals. Male C57Bl/6 mice at 30 days of age were fed with a chow control (Group C) or a high-fat diet (45% Kcal from fat) (Group H) for nine weeks. After this period, the groups were subdivided into the CC and HC groups, fed with respective diets supplemented with chia oil (1.5% w/w) for seven weeks. Chia oil supplementation increased fasting glucose, glucose tolerance, and serum LDL cholesterol levels in lean mice, reducing serum insulin levels without affecting body weight and composition. In subcutaneous (SAT) and epididymal (EAT) AT, COS significantly increased TNF- α secretion, while IL-10 levels increased only in EAT. Metabolomic analysis showed that COS induced a significant increase in lactate production by EAT without changes in glucose consumption. In obese mice, COS decreased body fat accumulation and increased fat-free mass. Besides, it improved glucose tolerance, reduced serum insulin, and triglyceride levels, and increased HDL cholesterol. In adipose tissue compartments, COS reduced the mass of the EAT, decreasing the area of its adipocytes. In SAT, COS did not change tissue mass but increased the cell number. Analysis of the profile of cytokines secreted showed that COS increased IL-10 production, reduced MCP-1 by SAT, and decreased IL-10 levels, increasing TNF- α levels by TAE. The proliferative potential and adipocytes' differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) from the stromal vascular fraction of SAT and EAT were evaluated. Chia oil supplemented obese mice showed inhibition of proliferative and differentiation response in SAT and increased differentiation in EAT. We also showed that COS induced an increase in the gene expression of UCP-1 in SAT without changes in EAT. Metabolomics analysis showed that COS increased lactate secretion in TAE. The incubation of RAW264.7 macrophages with the conditioned medium of different adipose tissues (24 hours) did not induce the protein expression of iNOS and arginase. Our results show that COS in obese and eutrophic mice differently induces white adipose tissue remodeling in the subcutaneous and epididymal compartments and promotes an increase in insulin sensitivity. Furthermore, we have shown for the first time that obesity and chia oil supplementation modify the profile of metabolites secreted by the different compartments of fatty tissue. Still, more studies are needed to elucidate how each of these metabolites interferes in the stages involved in adipose tissue remodeling.

Keywords: obesity; fatty acids ω 3; white adipose tissue; remodeling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Adipócitos e suas principais diferenças morfológicas e funcionais.	
Figura 2-	Características da hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos	17
Figural 3-	Armazenamento inadequado de gordura no tecido adiposo	23
Figura 4-	A expansão e inflamação do tecido adiposo	32
Figura 5-	O elo entre inflamação crônica de baixo grau, obesidade e resistência à insulina	33
Figura 6-	Estrutura dos ácidos graxos ômega-3 ($\omega 3$) e ômega-6 ($\omega 6$)	35
Figura 7-	Metabolismo dos ácidos graxos essenciais e formação de mediadores lipídicos pró-inflamatórios e pró-resolutivos	36
Figura 8-	Linha do tempo dos grupos e dietas utilizadas no estudo	49
Figura 9-	Avaliação do peso corporal, ingestão calórica e da composição corporal	64
Figura 10-	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a homeostase glicêmica dos animais	66
Figura 11-	Efeito da suplementação com óleo de chia sobre o perfil lipídico plasmático de animais obesos	68
Figura 12-	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre os níveis séricos de leptina, TNF- α e IL-6	70
Figura 13-	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a massa do tecido adiposo subcutâneo e morfometria dos adipócitos	72
Figura 14-	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a massa do tecido adiposo epididimal e morfometria dos adipócitos.....	73
Figura 15-	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a resposta proliferativa de células tronco presentes no tecido adiposo subcutâneo e epididimal	75
Figura 16-	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a resposta adipogênica de células tronco presentes no tecido adiposo subcutâneo e epididimal	76
Figura 17-	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a	

	produção de citocinas pelo tecido adiposo subcutâneo	77
Figura 18-	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a produção de citocinas pelo tecido adiposo epididimal	78
Figura 19-	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre o <i>browning</i> do tecido adiposo subcutâneo e epididimal	80
Figura 20-	Ilustração dos espectros obtidos pelos tecidos adiposos na análise de metabolômica	83
Figura 21-	Efeito da suplementação com óleo de chia sobre os níveis dos principais metabólitos secretados pelos tecidos adiposos subcutâneo	86
Figura 22-	Efeito da suplementação com óleo de chia sobre os níveis dos principais metabólitos secretados pelos tecidos adiposos epididimal	87
Figura 23-	Efeito do meio condicionado dos tecidos adiposos sobre a polarização de macrófagos	89
Figura 24-	Efeito do meio condicionado dos tecidos adiposos sobre os níveis de glicose e lactato secretados pelos macrófagos RAW264.7	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Algumas adipocinas alteradas na obesidade	27
Tabela 2-	Composição das dietas (g/100g de dieta)	50
Tabela 3-	Composição dos ácidos graxos da dieta (g/100g de dieta)	51
Tabela 4-	Primers utilizados no RT-PCR	56
Tabela 5-	Análise comparativa dos metabólitos encontrados no TAS e TAE	84
Tabela 6-	Análise dos principais metabólitos encontrados no meio condicionado do tecido adiposo subcutâneo	85
Tabela 7-	Análise dos principais metabólitos encontrados no meio condicionado do tecido adiposo epididimal	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
ALA	Ácido alfa-linolênico
BCA	Ácido bicinechônico (do inglês: <i>bicinchoninic acid</i>)
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês: <i>Bovine serum albumin</i>)
C	Grupo com dieta controle
CC	Grupo controle experimental com óleo de chia
CEBP	Proteína de ligação ao intensificador CCAAT (do inglês: <i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>)
CTMs	Células-tronco mesenquimais
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM	Meio utilizado em cultura de células, do inglês: <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ECL	Electroquimioluminescência (do inglês: <i>Electrochemiluminescence</i>)
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético (do inglês: <i>Ethylene diamine tetra acetic acid</i>)
EGF	Fator de crescimento epidérmico (do inglês: <i>Epidermal growth factor</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (do inglês: <i>Enzyme Linked immunosorbent assay</i>)
FADH ₂	Dinucleótido de flavina e adenina (do inglês: <i>flavin adenine dinucleotide</i>)
FNDC5	Irisina (do inglês: <i>Fibronectin type III domain-containing protein 5</i>)
GLUT-4	Transportador de glicose tipo 4 (do inglês: <i>glucose transporter type 4</i>)
HDL	Lipoproteína de alta densidade (do inglês: <i>High density lipoprotein</i>)
HFD	Grupo com dieta hiperlipídica (do inglês: <i>High fat diet</i>)
H	Grupo obeso
HC	Grupo obeso suplementado com óleo de chia
IBMTX	Isobutilmetilxantina
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8

IL-10	Interleucina 10
IL-18	Interleucina 18
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (do inglês: <i>Low density lipoprotein</i>) Proteína quimioatraente de monócito (do inglês: <i>Monocyte</i>
MCP-1	<i>Chemoattractant Protein-1</i>) Dinucleótido de nicotinamida e adenina (do inglês: <i>nicotinamide</i>
NADH	<i>adenine dinucleotide</i>) Fator de transcrição nuclear kappa (do inglês: <i>Nuclear Factor kappa</i>
NF-kB	<i>B</i>)
PBS	Tampão salina fosfato (do inglês: <i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia de polimerase (do inglês: <i>polymerase chain reaction</i>)
PGC-1	PPARGC1a (do inglês: <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>)
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (do inglês: <i>Peroxisome proliferator activated receptor</i>)
PVDF	Polivinilidenodifluorido
RIPA	Tampão de lise
RT-PCR	PCR em tempo real (do inglês: <i>Real time polymerase chain reaction</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês: <i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SFB	Soro fetal bovino
TA	Tecido adiposo
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TAS	Tecido adiposo subcutâneo
TAE	Tecido adiposo epididimal
TAV	Tecido adiposo visceral
TAPV	Tecido adiposo perivascular
TGF	Fator de transformação de crescimento (do inglês: <i>Transforming growth factor</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês: <i>Tumor necrosis factor</i>)
UCP-1	Termogenina (do inglês: <i>Uncoupling Protein 1</i>)

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	19
1	JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL	44
1.1	Objetivos específicos	45
2	MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1	Animais	48
2.1.1	<u>Modelo experimental de Obesidade induzida por dieta hiperlipídica e suplementação dietética com óleo de chia (<i>Salvia hispanica</i> L)</u>	48
2.2	Composição corporal	51
2.3	Teste de Tolerância peritoneal à glicose	51
2.4	Teste de Tolerância à insulina	52
2.5	Coleta de Sangue	52
2.6	Análises histológicas dos tecidos adiposos subcutâneo e epididimal	53
2.7	Análise do perfil de lipídeos séricos	53
2.8	Obtenção do Meio Condicionado dos tecidos adiposos subcutâneo e epididimal	54
2.9	Dosagem das citocinas por ELISA	54
2.10	Extração de RNA e análise da expressão gênica	55
2.11	Isolamento da Fração Vascular do Estroma do Tecido Adiposo	57
2.12	Análise da proliferação celular por incorporação de BrdU	57
2.13	Análise da diferenciação adipocitária	58
2.14	Indução da polarização dos macrófagos	58
2.15	Obtenção do extrato total celular, eletroforese em gel SDS-PAGE e Immunoblotting	59
2.16	Análise do consumo de glicose nos meios condicionados do TAS e TAE e no sobrenadante de macrófagos RAW264.7	60
2.17	Análise da produção de lactato nos meios condicionados do TAS e TAE e no sobrenadante de macrófagos RAW264.7	60
2.18	Análise do perfil metabólico	60
3	RESULTADOS	63

3.1	Avaliação do peso corporal, ingestão calórica e da composição corporal.....	63
3.2	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a homeostase glicêmica dos animais obesos.....	63
3.3	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre o perfil lipídico plasmático de animais obesos.....	67
3.4	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre os níveis séricos de leptina, TNF-α e IL-6 em animais obesos.....	69
3.5	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre o remodelamento dos tecidos adiposo subcutâneo e epididimal na obesidade.....	71
3.5.1	<u>Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a massa e a morfometria dos tecidos adiposos subcutâneo e epididimal.....</u>	71
3.5.2	<u>Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a resposta proliferativa e adipogênica de células tronco presentes nos tecidos adiposos.....</u>	74
3.5.3	<u>Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a produção de citocinas nos tecidos adiposos subcutâneo e epididimal.....</u>	76
3.6	Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre o perfil de metabólitos secretados dos tecidos adiposos subcutâneo e epididimal durante a obesidade.....	81
3.7	Efeito do meio condicionado do tecido adiposo de animais obesos suplementados com óleo de chia sobre a polarização de macrófagos de linhagem RAW264.5.....	88
4	DISCUSSÃO.....	92
	CONCLUSÃO.....	105
	REFERÊNCIAS.....	106
	ANEXO A – Carta de autorização do Comitê de Ética.....	125
	ANEXO B – <i>Chia supplementation improves...</i> (Artigo submetido).....	126
	ANEXO C – <i>Obesity enhances the recruitment of...</i> (Artigo publicado).....	130
	ANEXO D - Lista representativa com os metabólitos secretados pelos meios condicionados dos tecido adiposos.....	131

INTRODUÇÃO

A obesidade é definida como um transtorno metabólico caracterizado pelo aumento da gordura corporal de forma anormal ou excessiva, decorrente do aumento da adiposidade corporal e da produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente, pelo tecido adiposo (GUSTAFSON, 2009). Este aumento da adiposidade corporal é causado por hábitos alimentares inadequados, como o aumento do consumo calórico, proveniente de dietas ricas em carboidratos refinados e gorduras saturadas, e o sedentarismo (AFSHIN et al., 2017; SCHELBERT, 2009). O ganho excessivo de gordura corporal está associado a um risco iminente para o desenvolvimento de doenças crônicas, tais como: diabetes, hipertensão arterial sistêmica, doenças cardiovasculares, dislipidemias e certos tipos de câncer (endométrio, mama, cólon, ovário, próstata, fígado, vesícula biliar e rim), dentre outras condições associadas a inflamação (WHO, 2021; SCHELBERT, 2009). Trata-se de uma doença de origem multifatorial, que pode ser desencadeada por fatores endógenos e exógenos, que culminam num conjunto de alterações tornando-a uma doença complexa e de difícil controle (VISHVANATH et al., 2019; LEE et al., 2019).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a prevalência de obesidade em todo o mundo já chega a quase 15% na população adulta. Estima-se ainda que em 2025 cerca de 2,3 bilhões de adultos no mundo todo estejam com sobrepeso e mais de 700 milhões já serão obesos (WHO, 2021). No Brasil, dados recentes da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico demonstram que 21,5% da população se encontra nesta situação de obesidade (VIGITEL, 2020). O aumento alarmante da incidência somado a alta taxa de mortalidade e o custo exacerbado ao sistema de saúde fazem da obesidade um problema de saúde pública, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (NCD RISK FACTOR COLLABORATION, 2016; ZHANG e WANG, 2012).

O desenvolvimento da obesidade pode ser influenciado pela suscetibilidade genética e por fatores ambientais, como o aumento da ingestão alimentar, redução da taxa metabólica basal, sedentarismo e hábitos culturais; no entanto, apesar deste caráter multifatorial, o aumento da prevalência da obesidade se dá, principalmente, pelo aumento na ingestão alimentar aliada ao sedentarismo (YE et al., 2019; JIANG

et al., 2016). Considerada uma das principais doenças do século, a obesidade acomete indivíduos de forma independente de seus antecedentes culturais, financeiros ou étnicos, afetando a qualidade de vida e impactando diretamente a economia (ZHANG et al., 2012).

Diversos fatores contribuem para a disfunção metabólica associada a obesidade, dentre eles: o acúmulo exacerbado de gordura, sob a forma de triglicerídeos no tecido adiposo, o qual é capaz de controlar os níveis de ácidos graxos livre (COELHO et al., 2011); a produção e secreção de citocinas (GUTIERREZ et al., 2009); o recrutamento de células do sistema imune, principalmente monócitos/macrófagos, para o tecido adiposo onde promovem e exacerbam a inflamação local e contribuem para a resistência à insulina (RENOVATO-MARTINS et al., 2017; GUTIERREZ et al., 2009). Dessa forma, o tecido adiposo desempenha um papel importante no desenvolvimento das enfermidades associadas a obesidade.

Muitos estudos em animais, com modelo de obesidade induzida por dieta vêm sendo desenvolvidos para auxiliar a melhor compreensão da fisiopatologia da obesidade. Dentre esses modelos, os que utilizam dieta hiperlipídica vêm sendo comumente utilizados com o objetivo de mimetizar as alterações fisiopatológicas associadas ao aumento da adiposidade (SILVA et al., 2016; POLLIN et al., 2008; CARROLL et al., 2006; BOUSTANY et al., 2005; DU TOIT et al., 2005). Neste contexto, Hooper e colaboradores (2001) utilizando um modelo animal de obesidade induzida por dieta hiperlipídica (High Fat Diet – HFD), observaram a associação entre o acúmulo de tecido adiposo com o desenvolvimento de distúrbios metabólicos e cardiovasculares, como o diabetes tipo 2, aterosclerose, hipertensão e acidente vascular cerebral (HOOPER et al., 2001). O número crescente de trabalhos sobre esse tema demonstra o interesse pela compreensão dos mecanismos moleculares e funcionais dessa doença e a descoberta de possíveis alvos terapêuticos.

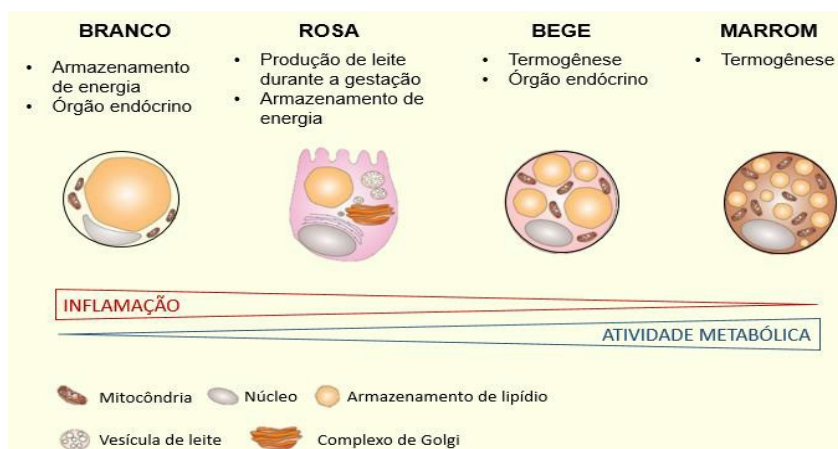
As complicações relacionadas à obesidade possuem uma relação direta com a expansão da massa do tecido adiposo. Isso evidencia a influência que esse tecido possui sobre o balanço energético e na gênese de alterações metabólicas e inflamatórias (JANSSEN e MARK, 2007).

Tecido Adiposo: Aspectos Morfológicos e Funcionais

O tecido adiposo (TA) é reconhecidamente um órgão/tecido multifuncional, capaz de armazenar grandes quantidades de energia, sob a forma de triglicerídeos, apresenta um papel protetor e é também um órgão secretor importante que produz diferentes substâncias como hormônios, citocinas, substâncias vasoativas, dentre outras (BORGES et al., 2018; ETO et al., 2009), que atuam de forma endócrina, parácrina e autócrina, agindo na regulação e integração do metabolismo corporal (MURAWSKA-CIATOWICZ, 2017). Além disso, este tecido vem sendo cada vez mais reconhecido como um importante órgão imune, pela presença de diversas células de defesa que fazem deste, um órgão capaz de ligar metabolismo e imunidade (STOLARCZYK, 2017). Trata-se de um tecido amplamente distribuído por toda extensão corporal, apresentando grande plasticidade, com grande capacidade de expansão em resposta ao balanço energético positivo e com regressão de seu tamanho quando em condições de mobilização de calorías para uso em outros órgãos (GEALEKMAN et al., 2014; LEMOINE, LEDOUX E LARGER, 2013).

Histologicamente, o tecido adiposo pode ser classificado de acordo com o seu tipo em tecido adiposo branco (TAB), tecido adiposo marrom (TAM), tecido adiposo bege (TABege) e o tecido adiposo rosa (CINTI, 2018; STOLARCZYK, 2017) com propriedades morfológicas e funcionais bem distintas (Figura 1).

Figura 1 – Adipócitos e suas principais diferenças morfológicas e funcionais



Legenda: Principais características dos adipócitos com as diferenças morfológicas e funcionais.

Fonte: Modificado de CORRÊA, HEYN e MAGALHÃES, 2019.

Em roedores, durante a gestação e a lactação, os adipócitos da região posterior e anterior do depósito de tecido adiposo subcutâneo presentes ao redor da mama se transdiferenciam em glândula mamária, produzindo leite. Tais células são denominadas de adipócitos rosa, uma vez que são derivadas de adipócitos, são capazes de armazenar grandes quantidades de lipídeos, surgem exclusivamente de depósitos subcutâneos durante a gravidez e a lactação, e a glândula mamária durante a gestação é macroscopicamente rosa (GIORDANO et al., 2014). Estes adipócitos são descritos como uma célula que possui atividade metabólica maior, comparado aos adipócitos brancos, porém baixa habilidade de regular a inflamação (CINTI, 2018).

Em seres humanos, o TAM está localizado ao redor dos ombros e das costelas; já em roedores e pequenos mamíferos, este tecido é encontrado no espaço interescapular e na região supraclavicular (CHAIT & HARTIGH, 2020) contribuindo para a geração de calor por apresentar adipócitos com muitas mitocôndrias.

Em relação a sua composição, o TAM apresenta cerca de 20% a 30% de adipócitos marrons maduros e metabolicamente ativos, além de possuir uma rica vascularização e inervação, principalmente ligadas à divisão simpática do sistema nervoso autônomo (SCHEELE e WOLFRUM, 2020). Estudos recentes com humanos adultos descrevem que o TAM se mostrou inversamente correlacionado com o índice de massa corporal e a adiposidade, além da sua associação com efeitos protetores no metabolismo da glicose e lipídeos (WANG et al., 2015). Este tecido representa cerca de 2% do depósito total de gordura em humanos (CHAIT & HARTIGH, 2020).

A principal função do TAM é a termogênese, um processo responsável pela dissipação de energia sob a forma de calor, manutenção da temperatura corporal central em resposta ao frio, promovendo a geração de calor, relacionada a presença da UCP-1 (proteína desacopladora 1) (CHOE et al., 2016). Os adipócitos que compõem o TAM são denominados de adipócitos marrons. Eles possuem elementos morfológicos e funcionais diferentes dos adipócitos brancos, sendo geralmente muito menores que os encontrados no TAB, apresentando diversas gotículas lipídicas citoplasmáticas e com diferentes tamanhos. Seu citoplasma é relativamente abundante e seu núcleo é esférico, ligeiramente excêntrico. Além disso, apresentam um grande número de mitocôndrias, as quais expressam UCP-1, presente na membrana interna mitocondrial.

Recentemente, estudos utilizando as técnicas de single cell RNA-seq, demonstraram diferentes subpopulações de adipócitos marrons dentro do TAM (SONG et al., 2020; SUN et al., 2020). Dentre elas, uma subpopulação com alta atividade termogênica, alta expressão de UCP-1, número aumentado de mitocôndrias e alta expressão de adiponectina, e outra subpopulação com baixa atividade termogênica, baixa expressão de UCP-1, número menor de mitocôndrias, baixa expressão de adiponectina, além de baixa OCR e gotículas lipídicas um pouco maiores (SONG et al., 2020; WU et al., 2012; PETROVIC et al., 2010). O tecido adiposo humano contém maior número de células da subpopulação com baixa atividade termogênica, o que poderia explicar a menor termogênese observada em humanos em comparação com o tecido adiposo de camundongos (SUN et al., 2020). Estes estudos possibilitam a melhor compreensão das diferenças entre os tecidos adiposos de humanos e roedores, e suas heterogeneidades.

De maneira geral, uma vez ativados pelo tônus simpático, os adipócitos marrons dissipam a energia química estocada sob a forma de triglicerídeos, direcionando os ácidos graxos para a β -oxidação. Posteriormente, a acetil-CoA (acetil coenzima A) formada vai para o ciclo do ácido cítrico, levando a formação dos carreadores de elétrons reduzidos FADH₂ (dinucleotídeo de flavina e adenina) e NADH (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina), os quais serão oxidados pela cadeia transportadora de elétrons com consumo de oxigênio. A oxidação destes carreadores resulta no bombeamento de prótons da mitocôndria e a formação de uma força próton motriz que dirige os prótons para a matriz mitocondrial. A energia estocada na força próton motriz é então liberada sob a forma de calor. Esse transporte de prótons a partir da membrana mitocondrial interna é mediado pela UCP-1 (HEINONEN et al., 2020; GUGLIELMI e SBRACCIA, 2018).

Além de melhorar a homeostase metabólica, a ativação do TAM é capaz de promover a produção de citocinas e fatores de crescimento, como FGF-21 (Fator de Crescimento de Fibroblasto), VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) e IL-6 (Interleucina 6). Estas terão efeitos autócrinos e parácrinos, porém seus efeitos endócrinos ainda são pouco conhecidos (CHAIT & HARTIGH, 2020; DAS et al., 2018; RUI, 2018)

Recentemente, novas descobertas destacaram a existência de um novo tipo de adipócito, além dos adipócitos brancos e marrons. Descrito inicialmente por Spiegelman e colaboradores (2008) como um adipócito semelhante ao marrom,

porém presente no TAB (CHU e TAO, 2017; ROSEN e SPIEGELMAN, 2014; ENERBÄCK, 2013; WU et al., 2012), os adipócitos bege apresentam características híbridas dos outros dois tipos de adipócitos (VAN DER LANS et al., 2013). A observação dessas células no TAB inguinal sugere que elas são formadas a partir do "escurecimento" (browning) dos adipócitos do TAB, um processo que ocorre a partir da produção/secreção de um fator solúvel derivado do músculo (miocina), a irisina, que induz o aumento do número de mitocôndrias nessas células (causando o "escurecimento") e, conseqüentemente, aumentando os níveis de UCP-1.

A secreção de irisina se dá a partir da clivagem da porção extracelular da proteína FNDC5 (proteína 5 contendo domínio de fibronectina) por uma protease desconhecida. A expressão de FNDC5 está associada ao aumento da expressão de PGC-1 α , em função do aumento das contrações musculares oriundas da atividade física (BOSTRÖM et al., 2012).

Por se tratar de um tecido cujas células se originam da transformação dos adipócitos brancos em adipócitos com características de adipócitos marrons (híbridos), as funções do TABeBege estão relacionadas às condições energéticas. Em condições em que a ingestão energética supera o gasto (estocagem de energia sob a forma de triglicerídeos), este tecido irá se comportar como o TAB, e quando estimulado (seja por exposição ao frio ou estímulo simpático), este tecido tem sua termogênese ativada, aumentando a expressão de UCP-1, promovendo maior dissipação de energia e aumento da taxa metabólica, se comportando como TAM (WU et al., 2012). No entanto, nem todo adipócito bege expressa marcadamente UCP-1. Essa hipótese foi confirmada por um estudo realizado com camundongos knockout para UCP-1 expostos ao frio, onde os autores identificaram um mecanismo termogênico independente de UCP e dependente de Ca²⁺ e de ATP (IKEDA et al., 2017). Este estudo fornece evidências sobre subpopulações distintas de adipócitos bege, confirmando estudos que mostram que estas células podem ter assinaturas transcricionais distintas dependendo do sinal de browning que irá levar ao recrutamento/expansão desse tecido (CHEN et al., 2019; WANG et al., 2016).

Diante disso, muitos estudos vêm investigando a ativação deste tecido, principalmente, através de fatores nutricionais. Além de possuir um importante efeito no combate a obesidade, o TABeBege vem sendo estudado pelo seu potente papel no controle do diabetes e pela sua alta capacidade de captação de glicose (MATSUSHITA et al., 2014; JACENE et al., 2011).

O escurecimento do TAB, principalmente no depósito subcutâneo, utilizando agentes que induzem a formação dos adipócitos bege, para aumentar a termogênese, são uma abordagem promissora no combate a obesidade (ADAMI et al., 2019). Na literatura já são conhecidos muitos agentes indutores de browning e ativadores de adipócitos bege, como os agonistas seletivos de receptores $\beta 3$ adrenérgicos, agonistas de PPAR γ (como os tiazolidinedionas), agonistas de GLP-1, curcumina, polifenóis (como o resveratrol) e flavonóides, porém seu uso clínico é limitado devido aos efeitos colaterais em outros órgãos, que não o tecido adiposo, em decorrência do direcionamento não-específico (KAISANLAHTI et al., 2019; WANKHADE et al., 2016; NEDERGAARD et al., 2014).

Um estudo realizado por Kim e colaboradores (2015) demonstrou que o TABe pode ser ativado em camundongos C57Bl/6 suplementados com diferentes concentrações de ácidos graxos $\omega 3$ (AG- $\omega 3$). Neste estudo, os autores viram que a ingestão de AG- $\omega 3$ de óleo de peixe (EPA e DHA) up-regulou a expressão do receptor $\beta 3$ adrenérgico, de UCP-1 e aumentou o consumo de oxigênio, ativando o TABe e induzindo o browning no compartimento inguinal de camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta controle (KIM et al., 2015).

Dentre os tecidos adiposos listados, o TAB é o maior órgão responsável pelo armazenamento energético, atuando como uma das principais fontes de sinalização endócrina. Sua massa representa, aproximadamente, 10 a 30% do peso corporal total em adultos magros e 40 a 70% em indivíduos obesos (KAJIMURA, 2017). De acordo com a sua localização, o TAB pode ser classificado em tecido adiposo subcutâneo (TAS), representando entre 80 e 90% da gordura corporal, tecido adiposo visceral (TAV), cerca de 10% da gordura corporal e o ectópico (intra-hepático, intramuscular e intrapancreático). Anatomicamente, o TAS se localiza, principalmente, nas regiões de abdômen, glúteos e coxas. Já o TAV está concentrado na região interna do abdômen, sendo dividido em TA perigonadal (tecido adiposo epididimal), mesentérico, omental, e em depósitos peritoneais, circundando os órgãos (ARNER, 1997). Em humanos, o acúmulo de TAB no compartimento visceral está associado a um risco aumentado de resistência à insulina, enquanto no TAB subcutâneo, a expansão é protetora (WINER et al., 2016).

Quanto a sua composição, o TAB é formado por adipócitos maduros, pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos, mastócitos, células-tronco mesenquimais

e células do sistema imune (NAE et al., 2013; LEE et al., 2010), porém diversos estudos têm evidenciado que o perfil celular dos tecidos adiposos não é uniforme, ou seja, dependendo da sua localização existem diferenças no conteúdo celular que contribuem para o seu perfil secretório (HEINONEN et al., 2020; GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017; CHOE et al., 2016; COELHO et al., 2013). De maneira geral, já foi descrito que o nicho do TAB é composto por cerca de 50% de adipócitos e 50% dos outros tipos celulares descritos acima (GUSTAFSON e SMITH, 2015).

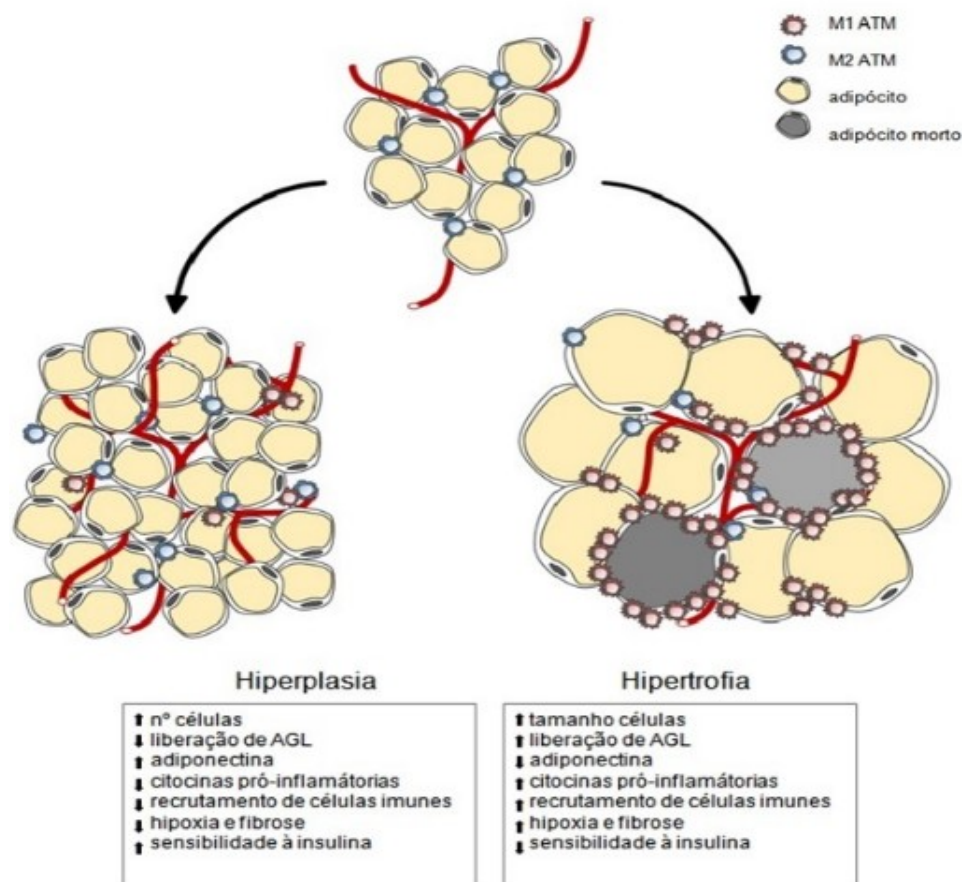
A heterogeneidade da compartimentalização do TAB depende não somente de regulação dos fatores ambientais (ingestão calórica e sedentarismo), genéticos, de gênero e idade, mas pode também resultar de sua diversidade intrínseca, desde a origem do desenvolvimento celular, a sua capacidade proliferativa, o metabolismo lipídico e de glicose, a sensibilidade à insulina, o perfil de citocinas, a capacidade termogênica e de vascularização (GUGLIELMI e SBRACCIA, 2018).

Remodelamento do Tecido Adiposo

Como dito anteriormente, uma das principais características do TAB é a sua alta capacidade de adaptação e expansão em condições de excesso ou escassez de energia, sendo capaz de se remodelar de maneira fisiológica e patológica (Figura 2) (PELLEGRINELLI et al., 2016).

O primeiro estudo a descrever o papel da obesidade sobre a hiperplasia e/ou hipertrofia de adipócitos foi publicado em 1978 por Faust e colaboradores. Nesse artigo, os autores demonstraram em ratos que o consumo transitório de uma dieta hiperlipídica resulta em obesidade persistente com adipócitos de característica mais hiperplásica (aumento no número de células) do que hipertrófica (aumento no tamanho das células) (FAUST et al., 1978).

Figura 2 – Características da hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos



Legenda: Características fisiológicas da hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos. ATM: macrófagos do tecido adiposo; M1: macrófagos com fenótipo pró-inflamatório; M2: macrófagos com fenótipo anti-inflamatório; AGL: ácidos graxos livres.

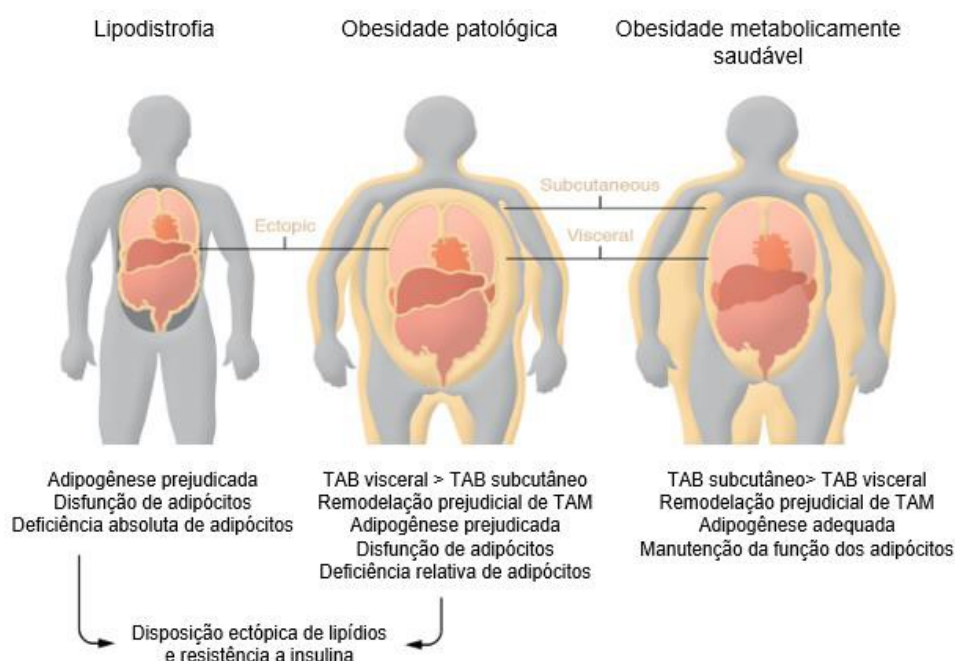
Fonte: Modificado de CHOIE et al., 2016.

Atualmente, sabe-se que o modo pelo qual o TAB se expande e remodela afeta diretamente o risco de desenvolvimento de síndrome metabólica na obesidade (SUN et al., 2011; SUGANAMI e OGAWA, 2010). O remodelamento patológico do TAB na obesidade é caracterizado, principalmente, pela hipertrofia dos adipócitos. Esta expansão pode acarretar um quadro de hipóxia tecidual e levar a apoptose de adipócitos, superprodução de matriz extracelular, aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, aumento da expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, além do recrutamento de células imunes para o tecido, como os macrófagos (VILLARROYA et al., 2018; MARCELIN et al., 2017; CURAT et al., 2004). Esses eventos contribuem assim para o quadro de inflamação crônica e fibrose no tecido adiposo, observado na obesidade.

Em contraste, a expansão saudável do TAB se caracteriza pela hiperplasia dos adipócitos, em geral observada em indivíduos obesos “metabolicamente saudáveis”, que apresentam adipócitos menores e mais numerosos e menores graus de inflamação e fibrose no TAB (DAM, SIKDER e SANTOSA 2016; SUN et al., 2011). A capacidade de recrutamento de novos adipócitos, através da adipogênese, é um fator determinante para a distribuição e o remodelamento saudável do tecido adiposo na obesidade.

O acúmulo diferencial de gordura em depósitos específicos pode ocasionar diferentes quadros clínicos (Figura 3). Estudos mostram que a hipertrofia dos adipócitos, mas não a hiperplasia, está ligada ao risco cardiometabólico (CHAIT & HARTIGH, 2020; GONZÁLEZ et al., 2017). O acúmulo no compartimento visceral resulta principalmente da hipertrofia dos adipócitos, enquanto no compartimento subcutâneo, observa-se a predominância de hiperplasia. No depósito subcutâneo encontra-se uma maior concentração de pré-adipócitos, apresentando níveis mais elevados da expressão de genes adipogênicos e que respondem melhor do que os presentes no depósito visceral, aos sinais de diferenciação, de maneira autônoma e hereditária (GUGLIELMI e SBRACCIA, 2018).

Figura 3 - Armazenamento inadequado de gordura no tecido adiposo



Legenda: Armazenamento inadequado de gordura no tecido adiposo em indivíduos com obesidade patológica e metabolicamente saudável. TAB: tecido adiposo branco; TAM: tecido adiposo marrom.

Fonte: Modificado de VISHVANATH et al., 2019.

As etapas do processo de remodelamento do TA vêm sendo estudadas em modelos experimentais com roedores. Um estudo feito por Halberg e colaboradores demonstrou que camundongos C57Bl/6 submetidos a um jejum de 24 horas apresentaram uma perda importante da massa do TA e um quadro de remodelamento agudo, caracterizado pela diminuição do volume dos adipócitos. Quando alimentados com uma dieta HFD por um período de 24 a 48 horas, esses animais apresentaram um aumento imediato na hipertrofia dos adipócitos (HALBERG et al., 2009), demonstrando assim que o remodelamento pode acontecer de forma rápida.

A expansão saudável do tecido adiposo é garantida pela alta flexibilidade da matriz extracelular. A composição da matriz extracelular garante a expansão saudável do tecido adiposo, porém quando a matriz é rígida e expande de maneira inadequada, como no quadro da obesidade, dificulta a expansão do tecido adiposo, contribuindo para o desenvolvimento das patologias associadas à obesidade (MARCELIN et al., 2019; PESSIN e KWON, 2012). O acúmulo excessivo de matriz extracelular pode levar a um quadro de fibrose tecidual. Na obesidade, a fibrose do TA contribui para a sua disfunção tecidual, aumentando a inflamação nesse tecido, comprometendo o armazenamento adequado de energia e das suas funções endócrinas (MARCELIN et al., 2019).

O excesso de deposição de matriz, acúmulo lipídico e expansão adiposa leva ao quadro de hipóxia local e inflamação (LI et al. 2021). Quando a expansão do tecido adiposo acontece de maneira exacerbada, os níveis de oxigênio se tornam marcadamente reduzidos, levando ao quadro de hipóxia tecidual, com a indução de genes de resposta à hipóxia, estresse oxidativo e inflamação, tanto em humanos quanto em roedores (MUIR et al, 2016). Na obesidade a densidade capilar está reduzida e o aumento de grandes vasos é perceptível (SPENCER et al., 2011). Já foi demonstrado, em camundongos, que a hipóxia estimula a liberação de citocinas e de quimiocinas de macrófagos residentes no TA e que é capaz de inibir a diferenciação dos pré-adipócitos, pela diminuição de PPAR γ nestas células (MICHAILIDOU et al., 2012).

O tecido adiposo também possui características secretoras, sendo capaz de secretar hormônios e moléculas sinalizadoras, influenciando vários processos relacionados ao metabolismo e a imunidade (BORGES et al., 2018; WAKI e TONTONNOZ, 2007). Dentre essas moléculas sinalizadoras, as adipocinas são

classificadas como fatores ou citocinas produzidas ou secretadas pelo tecido adiposo que apresentam propriedades pró ou anti-inflamatórias, contribuindo para o estabelecimento de um quadro de resistência à insulina ou para a manutenção da homeostase metabólica, respectivamente (D'ESPOSITO et al., 2012; GUTIERREZ et al., 2009).

Em indivíduos eutróficos, o TA secreta, preferencialmente, adipocinas anti-inflamatórias, como a adiponectina, o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) e a interleucina 10 (IL-10). Essas adipocinas modulam funções fisiológicas, como o controle da homeostasia, através de mecanismos que incluem a regulação da ingestão calórica, do balanço energético, a ação da insulina, o metabolismo dos lipídios e da glicose, angiogênese, o remodelamento vascular, a regulação da pressão sanguínea e da coagulação (ATHYROS et al., 2010).

Na obesidade, ao longo do processo de expansão hipertrófica do tecido adiposo, ocorre um aumento na secreção de adipocinas como a leptina, visfatina, resistina, angiotensina II, TNF- α e IL-6 (OUCHI et al., 2011), as quais modulam negativamente a sensibilidade à insulina, afetando diretamente a sua via de sinalização ou indiretamente através da estimulação de vias de sinalização pró inflamatórias, como a via do NF-kB (Fator nuclear-kB) e JNK (Jun-quinase) (SCHIPPER et al., 2012; TILG e MOSCHEN, 2008) (Tabela 1). Além dessas adipocinas, a secreção de quimiocinas, como a MCP-1 e a IL-8 promovem a infiltração de monócitos que se diferenciam em macrófagos pró-inflamatórios (M1) no TA, contribuindo para o estabelecimento de um quadro conhecido como metainflamação, que é considerado o principal evento responsável pelo desenvolvimento de comorbidades associadas à obesidade (SPERETTA et al., 2014).

Curiosamente, esse quadro inflamatório demonstrou-se necessário para a expansão e remodelamento adequado do tecido adiposo em três diferentes modelos de camundongos alimentados com HFD, exercendo um impacto positivo no metabolismo (ASTERHOLM et al., 2014). Dessa forma, as adipocinas são consideradas como reguladoras da homeostase corporal. Além da leptina, TNF- α e IL-6, outras adipocinas importantes, como a IL-18 e a IL-1 β também estão envolvidas nesse processo de regulação.

Tabela 1 – Algumas adipocinas alteradas na obesidade

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

Legenda: Tabela demonstrando de maneira resumida as funções das principais citocinas dentro do quadro de obesidade. IL: interleucinas; TAB: tecido adiposo branco; DM2: diabetes tipo 2

Fonte: Modificado de MAKKI et al., 2013.

A leptina é uma proteína não glicosilada, de 16 KDa, codificada pelo gene ob e é uma das principais adipocinas secretadas pelo tecido adiposo, principalmente no

depósito subcutâneo, em condições saudáveis. Apresenta ações antilipogênicas, atuando no hipotálamo para a redução da ingestão alimentar. 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 (LA CAVA et al., 2004; ZHANG et al., 1994).

De acordo com as suas ações sobre o metabolismo glicídico, lipídico e na modulação da resposta imune, a leptina vem sendo estudada como um importante fator no remodelamento do TA. Já foi demonstrado em ratos Wistar alimentados com dieta hiperlipídica por 6 semanas, que a leptina participa do remodelamento vascular e da fibrose do TA associados à obesidade, por induzir a produção de proteínas de matriz extracelular e produção de fatores pró-fibróticos como o TGF- β e o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 2014). Em um outro estudo, a administração de leptina exógena em baixas doses promoveu uma perda considerável na massa do TA, por diminuir a ingestão alimentar e a massa corporal (BJØRBAEK e KAHN, 2004).

Outra citocina importante, produzida exclusivamente por adipócitos, é a adiponectina. Esta adipocina é codificada pelo gene AdipoQ e possui dois receptores: o AdipoR1, que pode ser encontrado no músculo esquelético, fígado e TA, e o AdipoR2, encontrado apenas no fígado e TA (RUAN e LODISH et al., 2003). Já está bem elucidado que a adiponectina possui concentrações mais elevadas no TAS em comparação ao TAE (RUAN e LODISH et al., 2003) e que seus níveis circulantes estão diminuídos em indivíduos com obesidade (CHANDRAN et al., 2003).

Alguns estudos vêm demonstrando uma correlação inversamente proporcional entre a secreção de adiponectina e a resistência à insulina, além do seu importante papel no auxílio da reversão dos estados pró-inflamatórios (CHANDRAN et al., 2003; DIEZ e IGLESIAS et al., 2003). Esta hipótese também pode ser comprovada em estudos onde camundongos obesos, tratados com adiponectina, tiveram uma reversão efetiva do quadro de resistência à insulina no músculo esquelético e fígado (MAEDA et al., 2002; YAMAUCHI et al., 2001). Em outro estudo, realizado por Zhu e colaboradores (2019), demonstrou-se o papel protetor desta adipocina no tecido adiposo, quando ela está desregulada, com

alterações na sua secreção, a função deste tecido é significativamente alterada (ZHU et al., 2019). Até o momento o seu papel no remodelamento do TAB ainda não está claro.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que vem sendo associada ao aumento da adiposidade corporal. Esta citocina desempenha um importante papel na regulação do sistema imune, levando a diminuição da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (IYER e CHENG, 2012), tais como: TNF, IL-1, IL-6 e IL-8 em monócitos e macrófagos. Além disso, sua presença tem sido demonstrada em placas ateroscleróticas (FERNÁNDEZ et al., 2004).

Na obesidade, já foi relatado tanto um aumento na secreção de IL-10 em adipócitos isolados a partir da fração vascular do estroma quanto dos explantes dos tecidos adiposos de humanos (FAIN et al., 2004; ESPOSITO et al., 2003). Uma revisão recente (2019), descreveu a IL-10 como uma das citocinas mais importantes na supressão de respostas pro-inflamatórias em todos os tipos de doenças autoimunes e na limitação de respostas imunes excessivas (WEI et al., 2019). Além disso, já foi demonstrada uma associação entre esta citocina e a prevenção da resistência à insulina no músculo esquelético de indivíduos idosos (DAGDEVIREN et al., 2017), e também, com os níveis de adiponectina, especialmente em pacientes com síndrome metabólica que apresentaram obesidade abdominal (NISHIDA e OTSU, 2007). Contudo, pouco se sabe sobre o papel direto da IL-10 no remodelamento do tecido adiposo.

Dentre as adipocinas produzidas pelo tecido adiposo, destaca-se o TNF- α . Na década de 90 do século passado, Hotamisligil e colaboradores descreveram pela primeira vez o aumento da expressão e secreção de TNF- α no tecido adiposo de animais obesos (HOTAMISLIGIL et al., 1995). Posteriormente, diversos trabalhos descreveram que o aumento da produção de TNF- α pelo tecido adiposo obeso seria responsável pela ativação da via de sinalização do NF- κ B e da JNK, as quais induziriam a propagação da inflamação e a ativação em resíduos de serina do substrato do receptor de insulina (IRS), contribuindo para o estabelecimento da resistência à insulina (COELHO et al., 2013).

No TAB disfuncional esta citocina é produzida em maior parte pelos macrófagos, porém os adipócitos maduros também contribuem, em parte, para o aumento da secreção de TNF- α . Durante a obesidade, já foi demonstrado que o TNF- α é capaz de inibir a diferenciação de adipócitos, reduzir a capacidade destas

células em armazenar lipídeos e participar da lipotoxicidade em diversos órgãos, principalmente tecido adiposo e fígado em indivíduos obesos (RADIN et al., 2009).

O tecido muscular também é capaz de secretar TNF- α . A secreção desta citocina no tecido muscular está relacionada a sua citotoxicidade, apoptose, resistência à insulina e síntese de outras adipocinas, como a IL-1 e a IL6 (SILVA JR, 2017). A produção de TNF- α nesses tecidos está intimamente relacionada à infiltração de macrófagos pró-inflamatórios, além de atuar inibindo a produção/ação da adiponectina (SILVA JR, 2017).

Apesar de bem aceita a relação entre o TNF- α , o quadro de metainflamação e o desenvolvimento de resistência à insulina na obesidade, recentemente, nosso grupo demonstrou que na obesidade, anterior ao quadro de metainflamação, ocorre um aumento na secreção de TNF- α na medula óssea que é capaz de programar as células precursoras de adipócitos para um fenótipo pró adipogênico, possibilitando assim a sua diferenciação mais rápida em adipócitos, na tentativa de promover uma expansão mais eficiente dos compartimentos de tecido adiposo (SILVA et al., 2016). Além disso, mais recentemente, demonstramos que o TNF- α induz o aumento da expressão do receptor quimiotático CXCR4, promovendo o aumento da proliferação e migração de CTMs para o tecido adiposo epididimal, sugerindo um papel importante desta citocina no remodelamento e na funcionalidade deste compartimento de tecido adiposo (ASSIS-FERREIRA et al., 2021).

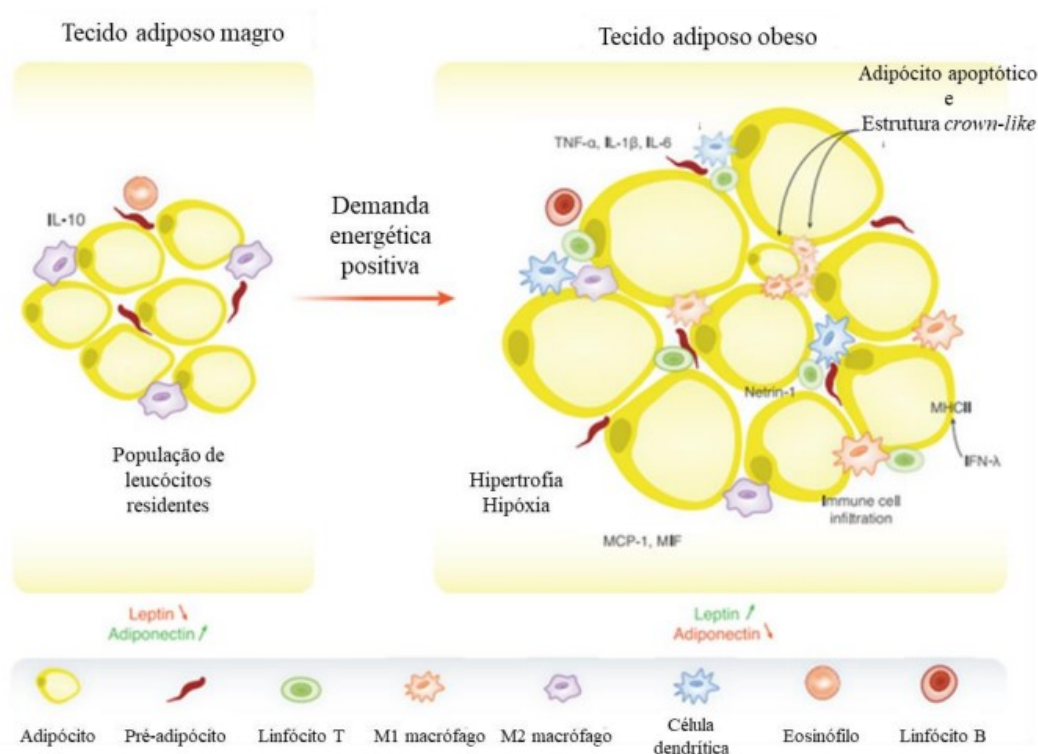
Outra citocina bastante estudada no contexto da inflamação metabólica é a IL-1 β . Essa citocina é reconhecida por induzir disfunções nos adipócitos, desregulação metabólica e resistência à insulina. A interação da IL-1 β com o seu receptor IL-1R leva a ativação das vias do NF- κ B e JNK, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias (MCARDLE et al., 2013). Em indivíduos com obesidade e síndrome metabólica foi observado aumento na expressão gênica e na secreção de IL-1 β no TAE, quando comparado com indivíduos eutróficos ou com obesos “metabolicamente saudáveis”. Além disso, já foi demonstrada uma correlação positiva entre a expressão gênica de IL-1 β no TAE com o índice de massa corporal e a circunferência de cintura, entretanto, nenhuma associação foi observada no TAS. Um estudo recente demonstrou em humanos e em culturas de pré-adipócitos murinos (3T3-L1) que a IL-1 β prejudica a adipogênese (KRAEMER et al., 2013), contudo os mecanismos moleculares envolvidos nesse efeito ainda não são conhecidos. (HEALY et al., 2016).

Uma das etapas envolvidas no processo de remodelamento do tecido adiposo é o processo de polarização dos macrófagos residentes, passando de um fenótipo M2, anti-inflamatório, para um fenótipo M1, pró-inflamatório, além do aumento exacerbado do recrutamento de outras células inflamatórias, tais como: linfócitos T e B, eosinófilos, os neutrófilos e monócitos, que irão contribuir para a disfunção tecidual (OIKONOMOU e ANTONIADES, 2019; KOLIAKI e KOKKINOS, 2019; NAKAMURA, FUSTER e WALSH, 2014).

Enquanto no tecido adiposo magro, os macrófagos residentes com fenótipo M2 (anti-inflamatórios), participam do remodelamento normal do TAB, na obesidade, macrófagos com perfil M1 (pró-inflamatório) são frequentemente encontrados formando estruturas de coroa ao redor dos adipócitos durante o remodelamento patológico deste tecido (CINTI et al., 2005). Os macrófagos com fenótipo M1, estimulados com interferon- γ (IFN- γ) e LPS, são caracterizados pela produção de fatores pró-inflamatórios, como: IL-6, IL-12, IL-23, TNF- α ; espécies reativas de oxigênio e aumento na expressão da NOS2 (iNOS); eventos relacionados a inflamação sistêmica e a resistência à insulina (FUJISAKA et al., 2009). Em contraste, os macrófagos M2, exibem uma atividade anti-inflamatória capaz de antagonizar a resposta de macrófagos M1 e estão envolvidos no remodelamento tecidual, tendo em comum a maior expressão de genes marcadores-chave, como: Arginase-1 e Ym-1 (SINDRILARU et al., 2011).

Em indivíduos eutróficos, os macrófagos do tecido adiposo apresentam fenótipo M2, os quais expressam F4/80+, CD206+, CD301+ e CD11c- (APPARI et al., 2018; FERRANTE, 2007). O perfil fenotípico M2 contribui para manter a sensibilidade à insulina pelas ações anti-inflamatórias da IL-10 e do transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT3) (LUMENG et al., 2007). Por outro lado, os macrófagos presentes em tecido adiposo de obesos, apresentam perfil pró-inflamatório clássico M1, expressando F4/80+, CD86 e CD11c+. Interessantemente, estas células M1 são também detectadas na formação de estruturas semelhantes a coroas (CLSs) ao redor dos adipócitos apoptóticos no TAB de obesos (OIKONOMOU e ANTONIADES, 2019; KOLIAKI e KOKKINOS, 2019; GERICKE et al., 2015) (Figura 4).

Figura 4 – A expansão e inflamação do tecido adiposo



Legenda: Modelo simplificado de expansão e inflamação do tecido adiposo branco.

Fonte: Modificado de VIEIRA-POTTER, 2014.

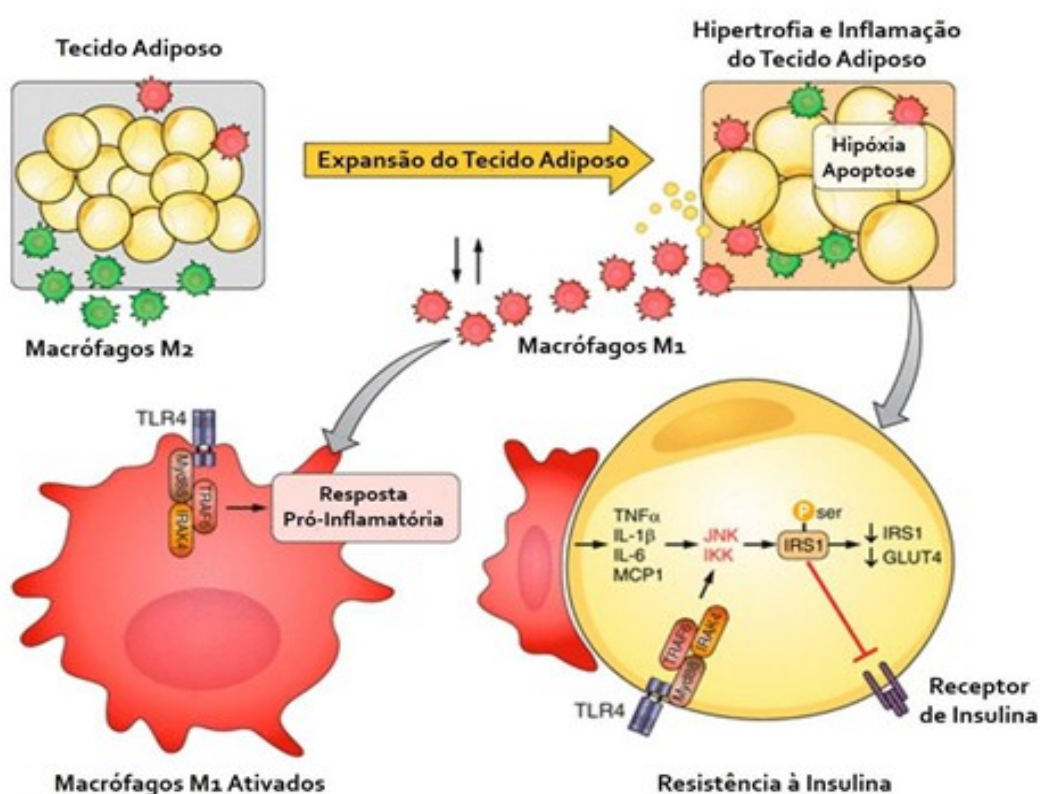
Um estudo realizado com meio condicionado de explantes de tecido adiposo omental de indivíduos obesos pós-bariátrica, mostrou que a obesidade induz a expressão gênica diferenciada de moléculas relacionadas à resposta migratória, de adesão e inflamação nas subpopulações de monócitos clássicos (CD14+CD16-), intermediários (CD14+CD16+) e não clássicos (CD14dimCD16+), o que parece contribuir para o aumento na infiltração de monócitos/macrófagos no tecido adiposo (RENOVATO-MARTINS et al., 2017).

Sabe-se que a resposta inflamatória é potencializada através de um crosstalk dessas células imunes com os adipócitos parenquimatosos. O TNF-α secretado pelos macrófagos no tecido adiposo obeso induz a lipólise nos adipócitos, promovendo a liberação de ácidos graxos saturados, que amplificam a resposta inflamatória nos macrófagos, via TLR4 (receptor do tipo Toll). Essa conversa entre adipócitos e macrófagos constitui um ciclo que contribui para a inflamação crônica no tecido adiposo (BAI e SUN, 2015).

Em uma recente revisão, Hammarstedt e colaboradores (2018) descreveram

que, em humanos, os adipócitos hipertroficados aumentam a secreção de diversos marcadores pró-inflamatórios, como MCP-1 (proteína quimioatratante de monócitos), IL-6 e IL-8, que estão relacionados a expansão do TA na obesidade e ao desenvolvimento de resistência à insulina, induzindo a expressão e a liberação de mediadores inflamatórios que irão promover a degradação do receptor da insulina (IRS), inibindo diretamente a sua sinalização celular, através de uma conversa entre os adipócitos hipertrofiados e os macrófagos presentes nesse tecido. Além disso, os ácidos graxos livres elevados irão promover o recrutamento ainda maior de macrófagos M1, ativando vias importantes como TLR4 (receptor do tipo Toll), promovendo a manutenção do microambiente inflamatório (HAMMARSTEDT et al., 2018) (Figura 5).

Figura 5 – O elo entre inflamação crônica de baixo grau, obesidade e resistência à insulina



Legenda: O crosstalk entre adipócitos hipertrofiados e macrófagos para induzir a inflamação e a resistência à insulina.

Fonte: Modificado de HAMMARSTEDT et al., 2018.

Pelo exposto, fica claro que os mecanismos que regulam o remodelamento do tecido adiposo envolvem processos metabólicos e imunes complexos que contribuem para a disfunção metabólica observada na obesidade, e que necessitam

ser melhor elucidados.

Ácidos Graxos

A compreensão dos mecanismos fisiopatológicos que medeiam o desenvolvimento, o estabelecimento da obesidade e suas comorbidades têm crescido bastante. Com base nesse conhecimento, diversos grupos de pesquisa buscam estratégias para a prevenção e o tratamento dessas doenças. Nesse sentido, ressaltamos a importância da qualidade nutricional e o papel dos lipídeos nesse contexto.

Os lipídeos são um grupo de nutrientes essenciais para os mamíferos, incluindo os humanos, pois apresentam diversas funções no organismo, tais como: participam da estrutura de membranas biológicas, do desenvolvimento e do funcionamento cerebral, são substratos para a biossíntese de hormônios, mensageiros intracelulares, cofatores enzimáticos, carreadores de elétrons, agentes emulsificantes do trato digestório, além de atuarem como reserva energética e isolante térmico (ALBERTS et al., 2010).

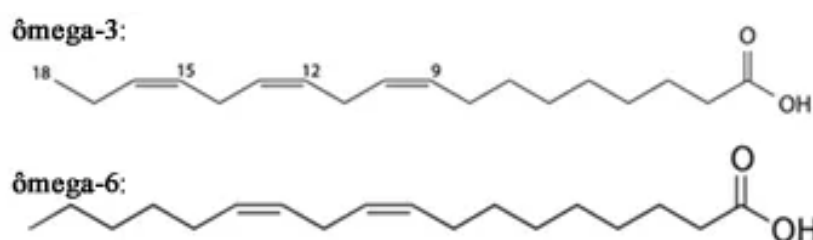
Os lipídeos podem ser classificados de acordo com a presença ou ausência de ácidos graxos. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos formados por uma cadeia de hidrocarbonetos que podem apresentar de 4 a 36 carbonos na sua estrutura. De acordo com a sua cadeia, os ácidos graxos podem ser classificados em ácidos graxos saturados (AGS), que não apresentam dupla ligação ou ácidos graxos insaturados (AGI), que apresentam uma ou mais duplas ligações. A presença ou ausência dessas duplas ligações na cadeia determinam algumas características estruturais e funcionais a esses ácidos graxos (NELSON e COX, 2002).

Os AGS apresentam como principais características: são sólidos a temperatura ambiente, pois apresentam maior ponto de fusão e o aumento do seu consumo está relacionado ao aumento da incidência de obesidade e doenças cardiovasculares (BARABINO et al., 2017). Dentre os principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessas doenças, destaca-se a capacidade desses AG em ativar uma resposta pró-inflamatória através da ativação da via do TLR, levando a ativação de NF- κ B e JNK, promovendo a produção de citocinas pró-

inflamatórias, que como dito anteriormente, participam do desenvolvimento das complicações relacionadas a obesidade (MARZZOCO e TORRES, 2017).

Em relação aos AGI, sua principal característica é: apresentam menor ponto de fusão que os AGS. Em relação a quantidade de duplas ligações, podem ser classificados em ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) (presença de uma dupla ligação) ou polinsaturados (AGPI) (presença de duas ou mais duplas ligações). De acordo com a sua estrutura, os AGPI apresentam 16 ou mais átomos de carbono e mais de uma dupla ligação. A localização desta dupla ligação define o tipo de ácido graxo, que será denominado ômega-3 (ω -3), ou ômega-6 (ω -6), quando a dupla ligação se localizar no terceiro ou sexto carbono, respectivamente, contando a partir da extremidade oposta a carboxila, ou seja, o lado ômega (WOLFE, 1982) (Figura 6).

Figura 6 – Estrutura dos ácidos graxos ômega-3 (ω 3) e ômega-6 (ω 6)



Legenda: Imagem com a estrutura dos ácidos graxos da série ômega 3 e ômega 6.

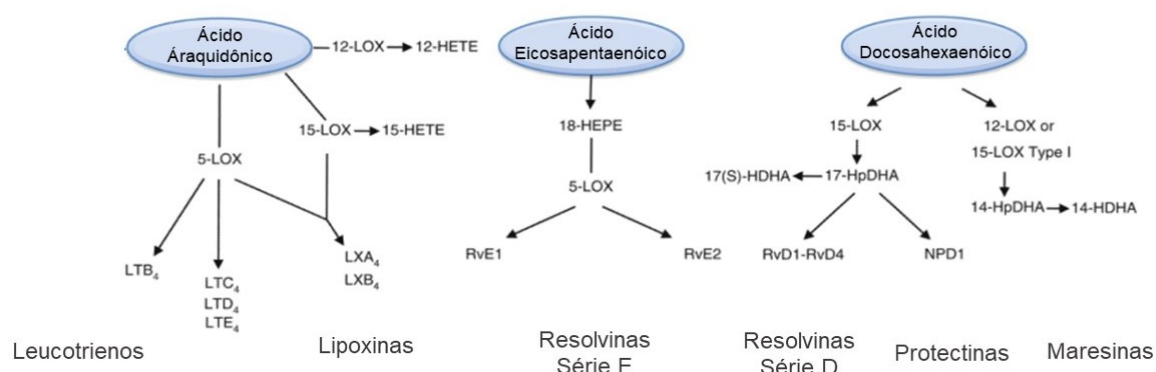
Fonte: A autora.

É importante ressaltar que os seres humanos não são capazes de biossintetizar dois tipos de AGPI, são eles: o ácido linoleico (LA, 18:2 ω -6) e o ácido α -linolênico (ALA, 18:3 ω -3) (HANSEN et al., 1963), sendo considerados AG essenciais devendo, portanto, ser consumidos na dieta. Após a ingestão e absorção, esses AG sofrem metabolização por enzimas dessaturases e elongases (BURDGE, 2006). A partir da ação dessas enzimas, o LA é convertido em ácido araquidônico (AA, 20:3 ω -6) e o ALA em ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 ω -3) e ácido docosaexaenoico (DHA, 22:6 ω -3) (EL-BADRY et al., 2007; SALDEEN e SALDEEN, 2006). O EPA e o DHA podem também ser obtidos através do consumo de alimentos de origem animal, sendo os peixes marinhos, principalmente os de águas frias e profundas a principal fonte alimentar destes ácidos graxos. Dentre as fontes de ALA e LA, podemos incluir os óleos vegetais (girassol, milho e soja) (RUSSO,

2009; SIROT et al., 2008; BAYLIN et al., 2007; CINTRA et al., 2006).

O AA, o EPA e o DHA são constituintes da membrana plasmática e servem como substrato para a ação de enzimas como as cicloxigenases e lipoxigenases, dando origem aos mediadores lipídicos pró inflamatórios, formados a partir do AA (leucotrienos e lipoxinas) e aos mediadores lipídicos pró resolutivos, formados a partir do EPA e do DHA (resolvinas e maresinas) (POUDYAL et al., 2013) (Figura 7).

Figura 7 - Metabolismo dos ácidos graxos essenciais e formação de mediadores lipídicos pró-inflamatórios e pró-resolutivos



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

Fonte: Modificado de PILLAI et al., 2012.

A relação entre o consumo de $\omega 6/\omega 3$ é um fator determinante para a síntese e a ação desses mediadores lipídicos (POUDYAL et al., 2013). A recomendação atual é de que a proporção seja de 4:1, contudo, as dietas ocidentais tendem a ser deficientes de AG- $\omega 3$ e essa proporção pode chegar a 20:1 (BALIC et al., 2020; ABESO, 2016). Esse aumento do consumo de AG- $\omega 6$ leva a um desequilíbrio na síntese dos mediadores lipídicos, promovendo um aumento da síntese de mediadores pró inflamatórios, fator que está relacionado ao aumento da incidência de doenças cardiovasculares, câncer e doenças autoimunes (BREANNE e DAVID, 2009).

Como dito anteriormente, o ALA é encontrado em fontes vegetais como os óleos de soja, milho e girassol e, também pode ser encontrado nas sementes de chia e linhaça. Apesar da maioria dos estudos relacionarem as ações do ALA a sua conversão a EPA e DHA (RUSSO, 2009; SIROT et al., 2008; BAYLIN et al., 2007;

CINTRA et al., 2006), alguns estudos mais recentes já demonstraram que tais efeitos podem ser independentes dessa conversão (POUDYAL et al., 2013). Um estudo utilizando a suplementação com EPA, DHA e ALA em animais com síndrome metabólica, induzida por dieta rica em gorduras e carboidratos, demonstrou que o ALA não foi capaz de alterar a massa de gordura corporal total, porém promoveu uma redistribuição lipídica da área abdominal, melhorou a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina, atenuou a dislipidemia e melhorou parâmetros cardiovasculares. Nesse estudo, a suplementação com EPA e DHA apresentou resultados similares, no entanto, não foi capaz de melhorar a tolerância à glicose (POUDYAL et al., 2012). Com base nesses achados, os autores concluíram que as respostas a suplementação com ALA na síndrome metabólica são independentes da sua conversão em EPA e DHA (POUDYAL et al., 2012).

De fato, a taxa de conversão de ALA em EPA e DHA ainda é bastante controversa e os estudos mostram que diversos fatores podem influenciar essa conversão. Burdge e colaboradores (2002) afirmam que essa taxa de conversão pode ser influenciada pelo sexo, sendo de 21% para mulheres e 8% em homens para EPA e 9% e 6% para DHA, respectivamente (BURDGE e WOOTTON, 2002; BURDGE, JONES e WOOTTON, 2002). Já Goyens e colaboradores (2006) afirmam que a conversão de ALA em EPA é de aproximadamente 12% e 1% para DHA (GOYENS et al., 2006). Independente da taxa de conversão, é importante ressaltar que após a ingestão de ALA, ocorre um aumento de aproximadamente 23% de EPA no plasma (LIN, HUANG e SU, 2010).

Outro fator importante em relação ao ALA é que ele é o principal AGPI presente no tecido adiposo humano, enquanto este tecido apresenta apenas vestígios de EPA e DHA (ANDERSEN et al., 1999; GEERLING et al., 1999), demonstrando mais uma vez que, não necessariamente, o ALA é metabolizado para a síntese de EPA e DHA, podendo ser oxidado ou armazenado no tecido adiposo (BAKER et al., 2016).

Salvia Hispanica L. – chia

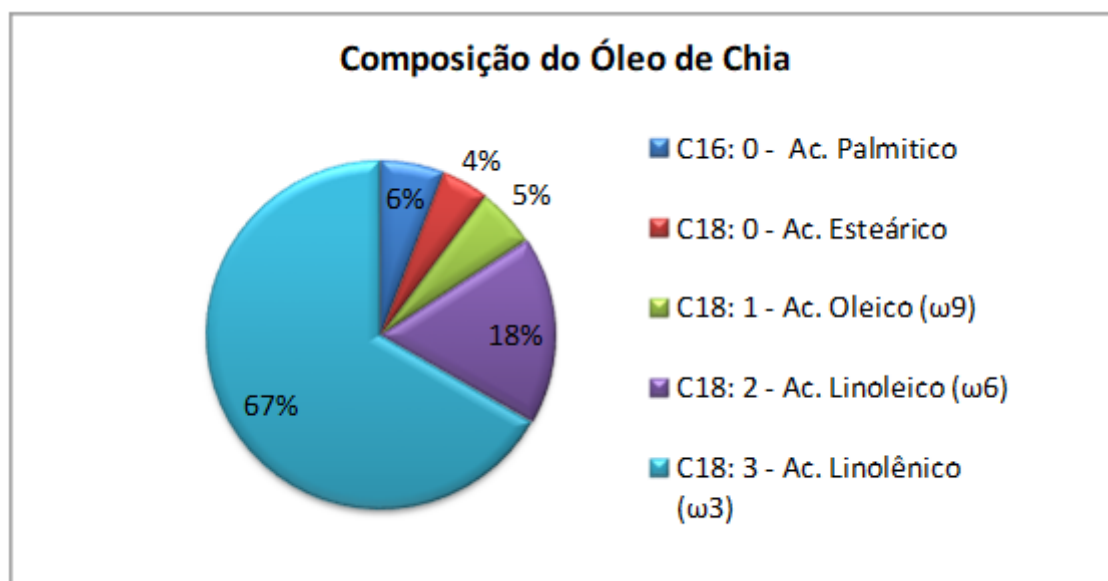
A Chia (*Salvia Hispanica* L) é uma semente pertencente a família Labiatae, nativa do México e de partes da América do Sul, compondo a alimentação humana

desde 1500 a.C (AYERZA e COATES, 2007; CAHILL et al., 2003). Inicialmente, as sementes eram utilizadas pelos astecas e maias como alimento e na preparação de medicamentos populares. Em tempos pré-históricos das sociedades colombianas, supõe-se que ela tenha sido o alimento de maior cultivo, logo atrás do feijão (CRAIG e SONS, 2004). Sua semente é muito utilizada há milhares de anos devido ao seu enorme potencial nutricional e terapêutico (JULIO et al., 2016).

A chia é uma oleaginosa, rica em ácidos graxos polinsaturados (ALA – 18:3 ω 3), além de conter em sua composição proteínas, fibras, vitaminas, minerais e antioxidantes (DA SILVA MARINELI et al., 2015; CAHILL et al., 2003; AYERZA, COATES e LAURIA, 2002). Esses componentes vem auxiliando em diversas doenças, apresentando propriedades hipotensivas (TOSCANO et al., 2014), hipocolesterolêmicas (TOSCANO et al., 2015), antiinflamatórias (HAMED I et al., 2016), antioxidantes (SCAPIN et al., 2016), e hipoglicêmicas (VUKSAN et al., 2017; VUKSAN et al., 2010).

Atualmente, a semente da chia é utilizada para a extração de compostos bioativos para o desenvolvimento de alimentos funcionais. A semente da chia possui cerca de 28 – 32% de óleo, a maior parte desse óleo é utilizada na formulação de suplementos de ômega-3 (BELTRAN-OROZCO e ROMERO, 2003). Atualmente, sabe-se que o óleo de chia é a mais rica fonte vegetal de ALA, representando cerca de 67% do seu total de ácidos graxos (Quadro 1) (IXTAINA et al., 2011), e 18% composto de ácido linoleico (FERNANDES et al., 2019). Por conter compostos fenólicos, a chia também é utilizada como fonte natural de antioxidantes. A combinação destes componentes faz com que o consumo de chia seja associado a vários benefícios à saúde humana (CHICCO et al., 2009). Além disso, o óleo apresenta outros compostos, como: polifenóis, fitoesteróis, carotenóides e fosfolipídeos (FERNANDES et al., 2019; JULIO et al., 2019).

Quadro 1 – Composição do óleo extraído da semente de chia



Legenda: Gráfico de demonstração da porcentagem dos diferentes tipos de ácido graxo presentes na composição do óleo de chia. C: carbono; Ac: Ácido graxo.

Fonte: Modificado de IXTAINA et al., 2011.

Até o momento, a maioria dos estudos publicados utilizou a semente de chia que, apesar de ser rica em ALA, possui um alto teor de fibras, o que reduz a absorção dos ácidos graxos presentes em sua composição. Esses estudos utilizando a semente mostram uma divergência na porcentagem da suplementação na dieta de roedores, variando entre 3% e quase 42%, além de diferentes períodos de experimentação (ENES et al., 2020).

Em estudo recente utilizando a dosagem mais baixa, apenas 3%, foi observado um aumento no colesterol HDL de camundongos Swiss (DE MIRANDA et al., 2019). Outro estudo utilizando a dose mais alta de 42%, dessa vez em ratos Wistar, observou um aumento da capacidade antioxidante, acompanhado de uma diminuição dos marcadores pró-inflamatórios (citocinas e expressão de NF- κ B) e diminuição do colesterol LDL (DA SILVA et al., 2019). Em ambos os estudos a semente foi oferecida na forma de farinha, uma vez que o tamanho das partículas interfere diretamente na digestão e nos processos metabólicos (SLAVIN, 2003).

Em estudos realizados em ratos Wistar, machos, foi possível observar que a suplementação com a semente é capaz de modificar o metabolismo de glicose, reduzindo os níveis de insulina plasmática (RUI et al., 2018). Em outro estudo, Oliva e colaboradores 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 (OLIVA et al., 2013).

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 carnitinapalmitol transferase 1 (CPT1), que transporta ácidos graxos livres, levando a redução da dislipidemia e da esteatose hepática (ROSSI et al., 2013).

Poucos estudos avaliaram os efeitos da semente de chia em humanos. A maioria destes ensaios clínicos demonstrou melhora no perfil lipídico (VUKSAN et al., 2017; TOSCANO et al., 2015; TOSCANO et al., 2014; NIEMAN et al., 2012; NIEMAN et al., 2009), no estresse oxidativo (VUKSAN et al., 2017; TOSCANO et al., 2014; VUKSAN et al., 2007) e na pressão arterial (TOSCANO et al., 2014; VUKSAN et al., 2007). Outros estudos mostraram que o consumo da semente não promoveu perda de peso ou alteração de fatores de risco em adultos com sobrepeso (NIEMAN et al., 2009).

Em um estudo in vivo, foi avaliado o potencial antioxidante da semente e do óleo de chia em ratos com obesidade induzida por dieta. Neste trabalho foi visto que o consumo diário da semente e do óleo de chia melhoram o estado plasmático e antioxidante do fígado, com uma significativa redução da peroxidação lipídica plasmática, além de promover um efeito protetor contra o estresse oxidativo decorrente da obesidade (DA SILVA MARINELI et al., 2015).

Na literatura alguns estudos avaliaram as propriedades anti-inflamatórias do óleo de chia, quando administrado puro ou junto com outros óleos vegetais. Nesses estudos, os autores observaram um aumento na atividade anti-inflamatória à medida que a dose do óleo de chia foi aumentando na concentração de 10 a 40 $\mu\text{L/mL}$ (GAZEM et al., 2016).

Embora os estudos com a semente de chia sejam mais comuns e demonstrem efeitos positivos na melhora de diferentes parâmetros associados a resposta metabólica, é difícil interpretar se essas respostas se devem ao efeito do óleo, dos outros compostos presentes na semente ou ao fato simplesmente dela ser rica em fibras. Além disso, é grande a variação na dose da semente utilizada na ração de roedores. A partir desse viés, tem aumentado o interesse em se estudar o efeito do óleo de chia, embora, até o momento, também seja perceptível na literatura

que existem diferentes doses para a suplementação, com variações entre 0,15% até 10% (ENES et al., 2020).

Recentemente, Valenzuela e colaboradores mostraram que o consumo de óleo de chia em gestantes, entre o último trimestre de gestação até os primeiros três meses de lactação, foi capaz de aumentar os níveis de DHA no leite materno (VALENZUELA et al., 2015). Um outro estudo mostrou o potencial inibitório do extrato da semente sobre a produção de melanina, por melanócitos in vitro (DIWAKAR et al., 2014). Em um estudo mais antigo, Espada e colaboradores demonstraram que animais com adenocarcinoma mamário tratados com óleo de chia apresentaram redução na produção de mediadores lipídicos pró-inflamatórios, além de diminuição do peso do tumor e no número de metástases (ESPADA et al., 2007).

Em um estudo recente, Shen e colaboradores (2018) mostraram uma relação entre ácidos graxos poliinsaturados/ácidos graxos saturados contidos no óleo de chia e sugeriram que a incorporação de óleo de chia na dieta pode trazer grandes efeitos benéficos ao sistema cardiovascular, devido a alta presença de ácidos graxos poliinsaturados (SHEN et al., 2018).

Dentro da problemática da obesidade e da síndrome metabólica, estudos tanto com a semente, quanto com o óleo de chia vêm buscando associar o seu uso com possíveis melhorias dos quadros clínicos. No entanto, o consumo da semente e do óleo da chia também é realizada por indivíduos eutróficos com ausência de alterações metabólicas, contudo os estudos nessa população são muito escassos. Recentemente o grupo do departamento de Nutrição da Universidade de Viçosa, demonstrou o efeito da adição da farinha da semente de chia na biodisponibilidade de cálcio, inflamação e estresse oxidativo, em modelo de ratos machos Wistar, tanto alimentados com dieta hiperlipídica quanto com dieta padrão AIN-93G durante 35 dias, após o desmame. Porém neste estudo os autores avaliaram apenas o efeito da chia diante do grupo tratado com carbonato de cálcio (Da SILVA et al., 2019).

Um estudo avaliando os efeitos da suplementação dietética com óleo de chia (10% v/v) em coelhos, com ração regular e com adição de colesterol, durante 5 – 6 semanas, mostrou que a adição do óleo da chia nos animais controle melhora a resposta a acetilcolina, causando relaxamento dependente do endotélio em anel de aorta, redução da resposta contrátil a ANG II e noradrenalina, além de nenhuma alteração da túnica íntima nas artérias. Demonstrando assim, os efeitos benéficos na

função endotelial de animais controle e hipercolesterolêmicos, mostrando que o óleo de chia não altera as características intrínsecas das células endoteliais, mas atenua seletivamente as alterações prejudiciais induzidas pelo colesterol, sem alteração dos níveis de colesterol circulante (SIERRA et al., 2015).

Embora os estudos sobre os efeitos do óleo e da semente de chia sejam diversos, sobretudo em modelos de obesidade e síndrome metabólica, os mecanismos moleculares envolvidos nessas respostas ainda não estão bem elucidados. Num estudo publicado por Valenzuela e colaboradores (2014) foi demonstrado que a suplementação com óleo de chia em ratos Wistar aumentou a conversão de AGPI ω 3 em diversos tecidos (VALENZUELA et al., 2014). Em outro estudo, com camundongos obesos, a suplementação com óleo de chia promoveu um aumento da expressão de heat shock proteins (HSP) e de PGC-1 α no músculo esquelético, além de melhorar a tolerância à glicose (DA SILVA MARINELI et al., 2015).

Nosso grupo vem trabalhando com o efeito da suplementação com óleo de chia num modelo murino de obesidade induzido por dieta hiperlipídica. Nesse contexto, demonstramos que a suplementação com óleo de chia (1,5% v/v) em animais obesos melhora a resistência à insulina, através do aumento da fosforilação do substrato do receptor de insulina do tipo 1 (IRS-1) e da translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) para a membrana plasmática, além da redução dos níveis séricos de insulina em jejum (FONTE-FARIA et al., 2019). Em outro estudo, demonstramos ainda que a suplementação com óleo de chia desde o desmame em camundongos swiss submetidos a dieta hiperlipídica preveniu as alterações no metabolismo de glicose e induziu o "browning" no tecido adiposo subcutâneo, contribuindo para um fenótipo mais saudável (De SOUZA et al., 2020).

Mais recentemente, Enes e colaboradores (2020) discutiram em um artigo de revisão que o efeito dos compostos da chia em roedores estão principalmente associados a modulação da ativação da AMPK, a melhora da tolerância à glicose e à insulina, a diminuição da lipogênese, a modulação da atividade antioxidante e inflamatória, além do aumento na expressão de PGC-1 α , CTP-1, PPAR- α e da atividade mitocondrial no tecido adiposo epididimal e nos músculos, esquelético e cardíaco (ENES et al., 2020).

A partir do exposto até aqui, consideramos que a suplementação com óleo de chia, a mais rica fonte de ALA, seja uma estratégia para a prevenção e o controle de

agravos à saúde causados por doenças metabólicas, como a obesidade.

1 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O tecido adiposo é o principal tecido capaz de responder de forma rápida e dinâmica a condições de privação e excesso de nutrientes. Embora o TA se destaque pela sua capacidade quase ilimitada de expansão, em situações de oferta excessiva de nutrientes, como na obesidade, o crescimento desordenado dos adipócitos pode saturar a sua capacidade de difusão de oxigênio, causando hipóxia, produção excessiva de quimiocinas, citocinas e proteínas de matriz extracelular, além de infiltração de macrófagos pró inflamatórios (M1) e necrose, levando a fibrose neste tecido, limitando assim a sua expansão e promovendo a perda da sua capacidade funcional, ocasionando distúrbios metabólicos e doenças como diabetes tipo 2. Por outro lado, nem toda expansão do TA está relacionada a consequências patológicas. Essa miríade de alterações é comumente conhecida como remodelamento do TA e constituiu na resposta adaptativa ao processo de aumento da adiposidade. No entanto, para que isso ocorra são necessários mecanismos altamente regulados que permitam o remodelamento adequado deste tecido.

A qualidade da dieta é um fator determinante na modulação dos agravos à saúde ocasionados pela obesidade. Dentre os fatores dietéticos que influenciam o processo adipogênico, destacamos o ácido graxo poli-insaturado $\omega 3$: alfa-linolênico (ALA). A chia é uma oleaginosa, rica em proteínas, fibras, vitaminas, minerais e antioxidantes, descrita como a maior fonte de ALA. Como dito anteriormente, nosso grupo vem estudando os efeitos da suplementação dietética com óleo de chia (1,5% v/v) em camundongos C57/BL6 obesos induzidos por dieta hiperlipídica. Até o momento nossos resultados demonstram que a suplementação dietética com óleo de chia melhora a resposta glicêmica de animais obesos (FONTE-FARIA et al., 2019). Além disso, observamos que a suplementação com óleo de chia, desde o desmame, foi capaz de induzir o browning no TAS de camundongos suíços obesos, contribuindo para um perfil mais saudável do tecido (DE SOUZA et al., 2020).

Mais recentemente, avaliamos o efeito da suplementação com óleo de chia sobre as alterações cardiovasculares induzidas pela obesidade. Observamos que a suplementação melhora a disfunção vascular em animais obesos e que esse efeito

parece estar relacionado ao remodelamento morfofuncional do tecido adiposo perivascular mesentérico, caracterizado por uma diminuição na área dos adipócitos, redução da secreção de IL-1 β , aumento da produção de IL-10, inibição da expressão das proteínas iNOS e HO-1 e aumento da ativação da AMPK neste tecido (ASSIS-FERREIRA et al., Manuscrito submetido ao Br. J of Nutrition).

Desta forma, com base na experiência do nosso grupo de pesquisa nas áreas de inflamação, adipogênese e sinalização celular, nosso objetivo na segunda parte desse estudo é: avaliar o efeito da suplementação dietética com óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) sobre o remodelamento do tecido adiposo branco na obesidade, evidenciando os mecanismos moleculares e funcionais envolvidos nesse processo.

A procura por suplementos nutricionais está se tornando cada vez mais comum entre a população saudável e, frequentemente, o seu uso se dá sem uma orientação adequada, o que pode representar um risco a saúde do indivíduo. Embora os efeitos metabólicos da suplementação dietética com óleo de chia associados à obesidade estejam consolidados na literatura, pouco se sabe sobre o seu impacto em indivíduos saudáveis. Aqui, avaliaremos o papel da suplementação dietética com óleo de chia sobre as respostas glicêmica e adipogênica em animais eutróficos. Trata-se de um estudo inédito na literatura, onde comparamos o efeito da suplementação com óleo de chia em camundongos machos C57Bl/6 com a dieta controle (AIN-93).

11 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação dietética com óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) sobre o remodelamento do tecido adiposo branco na obesidade, evidenciando os mecanismos moleculares e funcionais envolvidos nesse processo

1.2 Objetivos específicos

- Parte 1:

Em camundongos C57Bl/06 eutróficos, avaliaremos o efeito da suplementação com óleo de chia (1,5% m/m) sobre parâmetros metabólicos, tais como:

- A massa corporal, o consumo alimentar e a composição corporal;
- A resposta glicêmica, através da mensuração da glicemia de jejum, do teste de tolerância peritoneal à glicose (TTG) e à insulina (TTI) e da insulinemia.
- A translocação de GLUT4 para a membrana plasmática no músculo esquelético;
- O perfil sérico de lipídeos (triglicerídeos, colesterol total e frações: HDL, LDL e VLDL);
- A análise da morfologia/morfometria do TAS e TAE;
- A resposta proliferativa e a diferenciação adipogênica, a partir do isolamento de células da fração vascular do estroma dos TAS e TAE;
- As alterações envolvidas no remodelamento dos dois compartimentos de tecido adiposo, através da: a) avaliação da secreção de adipocinas e citocinas no meio condicionado obtidos do TAS e TAE; b) análise da secreção de metabólitos pelo TAS e TAE.

- Parte 2:

Em um modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica (45% Kcal provenientes de lipídeos), avaliaremos o efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre:

- A massa corporal, o consumo alimentar e a composição corporal;
- A resposta glicêmica, através da mensuração da glicemia de jejum, do teste de tolerância peritoneal à glicose (TTG) e à insulina (TTI) e da insulinemia.
- O perfil sérico de citocinas, hormônios e lipídeos (triglicerídeos, colesterol total e frações: HDL, LDL e VLDL);
- A morfologia/morfometria do TAS e TAE;
- A resposta proliferativa e a diferenciação adipogênica, a partir do isolamento de

células da fração vascular do estroma dos TAS e TAE;

- As alterações moleculares e funcionais envolvidas no remodelamento dos dois compartimentos de tecido adiposo, através da: a) avaliação da secreção de adipocinas e citocinas no meio condicionado obtidos do TAS e TAE; b) análise da expressão gênica dos principais marcadores de browning (UCP-1 e PGC-1 α) nos dois compartimentos de TA; c) análise da secreção de metabólitos pelo TAS e TAE;
- O efeito dos meios condicionados do TAS e TAE sobre a polarização de macrófagos RAW264.7 (in vitro).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

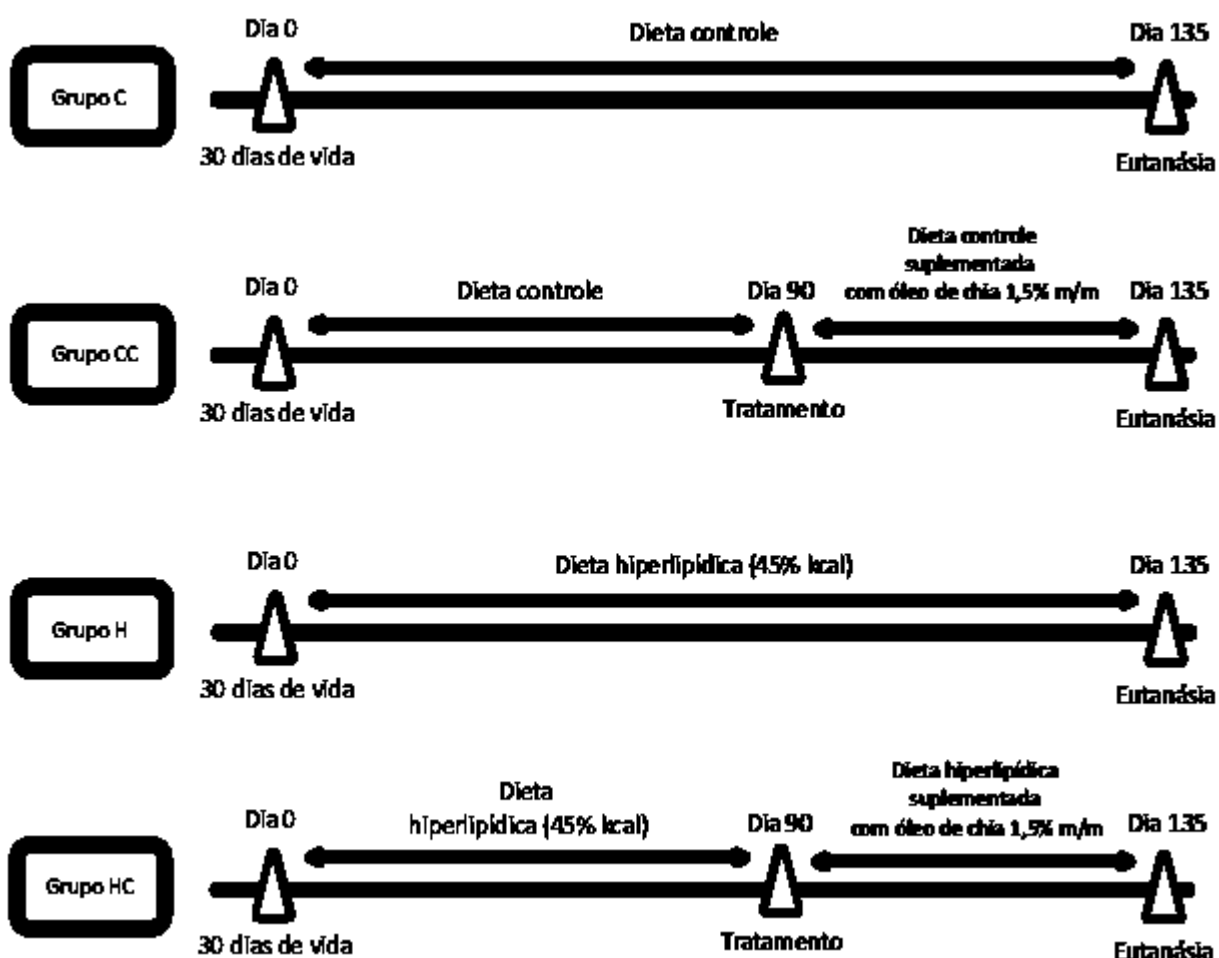
O cuidado com os animais e os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da UERJ (CEUA) sob o número de protocolo CEUA24/2017, e estão de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). 40 camundongos C57Bl/6J machos com 30 dias de vida, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), foram alocados (5 animais por caixa em estante ventilada) no biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (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.

2.1.1 Modelo experimental de Obesidade induzida por dieta hiperlipídica e suplementação dietética com óleo de chia (Salvia hispanica L)

40 animais com 30 dias de vida foram divididos em dois grupos base: grupo controle (grupo C), submetido a uma dieta normolipídica, contendo 16% das Kcal provenientes de lipídeos e grupo high fat diet (grupo H), submetido a uma dieta hiperlipídica, contendo 45% das Kcal provenientes de lipídeos, durante todo o período experimental (até o 135º dia de vida), 20 animais/grupo. A partir dos 90 dias de idade, os animais dos grupos C e H foram subdivididos em dois grupos, respectivamente: grupo controle sem e com suplementação de óleo de chia (1,5% m/m) (grupo CC), e grupo high fat diet sem e com suplementação de óleo de chia (1,5% m/m) (grupo HC), 10 animais/grupo. A suplementação com óleo de chia foi realizada até o 135º dia de vida, quando os 40 animais dos quatro grupos ($n = 10$ animais/grupo) foram submetidos aos protocolos experimentais (Quadro 9). As

dietas ofertadas eram isocalóricas e a composição das mesmas está descrita nas Tabelas 2 e 3. O peso corporal e a ingestão alimentar dos animais foram aferidos uma vez por semana. A descrição da composição da dieta encontra-se nas tabelas 2 e 3. O esquema de dietas e suplementação dos animais está demonstrado no Figura 8.

Figura 8 – Linha do tempo dos grupos e dietas utilizados no estudo



Legenda: Linha do tempo dos grupos experimentais utilizados neste trabalho.

Nota: Após 30 dias de lactação, os animais foram agrupados nos grupos C (dieta normocalórica, n=10 animais/grupo) e H (dieta hiperlipídica, n=10 animais/grupo), CC (dieta normocalórica suplementada, n=10 animais/grupo) e HC (dieta hipercalórica suplementada, n=10 animais/grupo). A composição corporal foi avaliada aos 120 dias. Os testes de tolerância à glicose e à insulina foram realizados 7 dias antes do sacrifício, aos 128 dias de vida, e a eutanásia aos 135 dias, 10 animais por grupo.

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 2 – Composição das dietas (g/100g de dieta)

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

Legenda: Composição das dietas padrão, hiperlipídica e suplementadas ofertadas aos animais durante o protocolo experimental. C: grupo controle; CC: grupo controle com a suplementação dietética; H: grupo obeso; HC: grupo obeso com a suplementação dietética.

Nota: Vitaminas e minerais seguem o padrão AIN-93G recomendado para roedores.

Fonte: A autora, 2022.

A composição da dieta controle foi baseada na AIN-93 (Reeves, Nielsen & Fahey 1993). Os ingredientes para o preparo da ração foram adquiridos com a Prag Soluções Biociências (Jaú, SP) e o óleo de chia utilizado na suplementação foi adquirido com a Equaliv Pharma Indústria.

Tabela 3 - Composição dos ácidos graxos da dieta (g/100g de dieta)

ÁCIDOS GRAXOS	C	CC	H	HC
Palmitico (16:0)	0,75	0,84	3,46	3,55
Estearico (18:0)	0,23	0,28	1,67	1,72
Oleico (18:1n9)	1,6	1,69	6,76	6,85
Linoleico (18:2n6)	3,76	4,05	6,34	6,63
Linolênico (18:3n3)	0,4	1,37	0,55	1,52
AGS	1,06	1,2	6,31	6,45
AGPI	4,2	5,42	12,14	13,36
n6:n3	9,4	2,95	11,52	4,36

Legenda: Composição dos ácidos graxos presentes nas dietas utilizadas pelos modelos experimentais. C: grupo controle; CC: grupo controle com a suplementação dietética; H: grupo obeso; HC: grupo obeso com a suplementação dietética.

Fonte: A autora, 2022.

2.2 Composição Corporal

A análise da composição corporal foi realizada ressonância magnética nuclear (RNM) para pequenos animais vivos, sem anestesia prévia. Os camundongos foram analisados utilizando o analisador decomposição corporal para animais de pequeno porte (Minuspec LF90 TD-NMR de Bruker's, Massachusetts, EUA). O instrumento foi calibrado para esses estudos usando varreduras de RNM e dados de composição química de 10 camundongos (faixa de peso corporal entre 25 e 35 g). No dia do teste, uma verificação de controle de qualidade de tensões internas, temperatura, magnetos e parâmetros do aparelho de RMN foi realizada usando um padrão fornecido pelo fabricante.

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

duração do exame. O Software do equipamento fornece os dados de fluídos, massa livre de gordura magra e massa gorda, já calculados em função do peso individual do animal.

2.3 Teste de Tolerância peritoneal à Glicose

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

2.4 Teste de Tolerância à Insulina

Para a avaliação da tolerância insulínica, foi realizado o teste de tolerância à insulina (TTI). Inicialmente, os animais com livre acesso à água e comida tiveram sua glicemia avaliada (tempo 0) e, após essa verificação, foi administrada, intraperitonealmente (i.p), insulina regular (Humulin insulina humana, Lilly), na dose de 0,5 U/Kg. A partir daí, a glicemia foi avaliada nos tempos de 15, 30, 45, 60 e 120 minutos, utilizando-se o aparato e glicofitas AccuCheck Active, Roche®.

2.5 Coleta de Sangue

Aos 135 dias, os animais foram mantidos em jejum, por aproximadamente 12 horas, e em seguida anestesiados com quetamina (50 mg/kg) (Syntec) e xilazina (20 mg/kg) (Syntec); 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 1600 x g por 10 minutos, o plasma foi coletado, aliquotado e estocado em freezer -80°C para dosagem de insulina e demais citocinas. O pellet de hemácias foi lisado com cloreto de amônio (0,144 M), centrifugado a 400 x g, por 10 minutos, e lavado com PBS estéril. Ao final, o pellet lavado foi ressuspenso em paraformaldeído 4% e mantido na geladeira para posteriores análises por citometria.

2.6 Análises histológicas dos tecidos adiposos subcutâneo e epididimal

Os tecidos adiposos subcutâneo e epididimal foram coletados e fixados em solução de paraformaldeído 4%, por 30 minutos. Em seguida, foram submersos em paraformaldeído 4% adicionado de sacarose 10%, por 30 min e, a seguir foram mantidos em tampão fosfato com 20% de sacarose à 4°C até o momento do preparo das lâminas. Para a preparação das lâminas, os tecidos foram submetidos a etapas de desidratação, diafanização em xilol, banho e inclusão em parafina. Em seguida, foram realizados cortes histológicos (5 µm de espessura) em micrótomo. As secções foram colocadas em lâminas, sendo posteriormente coradas com hematoxilina e eosina (H&E), e as imagens foram obtidas por meio de câmera digital acoplada ao microscópio ótico Olympus BX40, lente objetiva de 20x. A área média do adipócito (µm²) e o número de adipócitos foram medidos em 5 regiões diferentes da lâmina do tecido adiposo de cada animal, usando o programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

2.7 Análise do perfil de lipídeos séricos

Os níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram determinados através de kits comerciais (Bioclin®, Brasil), que se baseiam em métodos não-enzimáticos colorimétricos. As concentrações séricas foram expressas em mg/dL.

A análise dos níveis da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) foram realizadas conforme os cálculos no Quadro 2:

Quadro 2 - Cálculo de VLDL

VLDL	$\text{VLDL} = \frac{\text{Triglicerídeo sérico}}{5}$
-------------	---

Legenda: Fórmula para cálculo de VLDL.

Fonte: V Diretriz Brasileira de dislipidemias e prevenção de aterosclerose – XAVIER et al., 2013.

2.8 Obtenção do Meio Condicionado dos Tecidos Adiposos subcutâneo e epididimal

Cerca de 100 mg de tecido adiposo subcutâneo e epididimal foram extraídos dos grupos C, CC, H e HC. Em seguida, foram picotados com auxílio de uma tesoura cirúrgica em solução 1:1 contendo 1mL de DMEM privado de soro (Sigma, St Louis, Missouri, EUA) e M199 privado de soro (Sigma, St Louis, Missouri, EUA) (ambiente estéril). Após esta etapa os tecidos foram mantidos em placas de 24 poços por 24 horas em estufa à 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Após este período, os meios condicionados dos tecidos foram transferidos para microtubos (Axygen, Corning, EUA), centrifugados a 5000 x g por 10 minutos à 4°C e, imediatamente, alíquotados e estocados a -80°C até o momento do uso (RENOVATO-MARTINS et al., 2017).

2.9 Dosagem de citocinas por ELISA

As dosagens de TNF- α , Leptina, IL-10 e IL-1 β do meio condicionado dos tecidos adiposos subcutâneo e epididimal, e de Leptina, TNF- α e IL-6 séricos, foram realizadas pelo método de ELISA, utilizando-se kits comercialmente disponíveis (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, EUA). As dosagens foram realizadas conforme as

instruções do fabricante.

Todos os ensaios foram realizados em placas com 96 poços (Corning, EUA). Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, pH 7,4, sendo que a sensibilização ocorreu durante aproximadamente 18 horas. A placa foi bloqueada com PBS acrescido de 1% de albumina bovina, posteriormente as amostras foram pipetadas na placa. A reação ocorreu durante aproximadamente 2 horas. Os anticorpos de detecção foram diluídos em PBS, pH 7,4, contendo 0,1% de albumina bovina, sendo que a sensibilização ocorreu durante aproximadamente 2 horas. Todas as reações ocorreram em temperatura ambiente. A reação foi detectada pela incubação com streptavidina conjugada com peroxidase e revelada com ABTS (2,2' azino bis - 3 etil benzotiazolina6 ácido sulfônico) (Sigma, St Louis, Missouri, EUA).

A leitura da placa foi realizada a cada 5 minutos por um tempo total de 60 minutos, em leitor de placas (EnVision, Perkin Elmer, Massachusetts, EUA) com filtro para um comprimento de onda de 405 nm com correção a 650 nm. Todas as dosagens foram realizadas em duplicatas.

As dosagens de MCP-1 do meio condicionado dos tecidos adiposos subcutâneo e epididimal e insulina séricos, foram realizadas pelo método de ELISA, utilizando-se kits comercialmente disponíveis (Sigma, St Louis, Missouri, EUA). As dosagens foram realizadas conforme as instruções do fabricante.

2.10 Extração de RNA e análise da expressão gênica

O RNA total dos tecidos adiposos subcutâneo e epididimal foram extraídos com o minikit de extração de RNA da Qiagen (Cat. Nº: 74104), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação das amostras de RNA total foi realizada no espectrofotômetro NanoVue® (GE Healthcare Life Sciences) por análise da absorbância a 260 nm. A pureza do RNA extraído foi avaliada através do cálculo das razões A260/A280 e A260/A230, apresentadas pelo software do equipamento, as quais indicam possíveis contaminações da amostra por proteínas e compostos fenólicos. Após o tratamento com DNase (RQ1 RNase Free DNase; Promega, São Paulo, SP, Brasil), a síntese do cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA total tratado, utilizando-se o kit "High Capacity DNA Reverse Transcription Kit"

(Life Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, 1 µg de RNA total tratado foi adicionado a 10 µL do seguinte mix: tampão da enzima transcriptase reversa, 4 mM de dNTPs, 25 nM primers randômicos, 50 U de transcriptase reversa e 20 U de inibidor de RNase, 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, 40 ciclos a 95°C (5 s) e 60°C (10 s), seguido pela curva padrão de dissociação (curva de melting) para identificação do número de amplicons. Os números de referência dos primers utilizados estão descritos na tabela 4, eles foram adquiridos da Qiagen.

Os primers utilizados, junto com o número de acesso ao Gene Bank e o número de catálogo estão listados na tabela 4.

Tabela 4 – Primers utilizados no RT-PCR:

Primer	Nº de acesso no <i>Gene Bank</i>	Nº de catálogo
GAPDH	NM_008084.3	QT00199388
PGC1-α	NM_008904.2	QT00156303
UCP-1	NM_009463	QT00097300

Legenda: Primers utilizados para avaliação da expressão gênica por RT-PCR.

Fonte: A autora, 2022.

2.11 Isolamento da Fração Vascular do Estroma do Tecido Adiposo

Os fragmentos de tecido adiposo subcutâneo e epididmal foram dissociados e digeridos por tratamento com collagenase tipo IV (Sigma, St Louis, Missouri, EUA). O material digerido foi filtrado em filtros “cell strainer” com poros de 100 µm (Falcon, Corning, EUA) e centrifugado a 250 × g, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida o pellet celular foi ressuspensão em tampão de lise de

eritrócitos (154 mM NH₄Cl, 5,7 mM K₂HPO₄ e 0,1 mM EDTA, pH 7,0) e, após um minuto de incubação a temperatura ambiente, foi adicionado PBS 1x estéril para inibir a ação do tampão de lise. A suspensão de células foi centrifugada a 250 x g, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as células da SVF foram utilizadas em diferentes protocolos experimentais.

2.12 Análise da proliferação celular por incorporação de BrdU

As células da SVF foram semeadas em placas de 96 poços em meio DMEM 15% SFB acrescido de 2 mM de glutamina. Após atingirem, aproximadamente, 80% de confluência, o meio foi trocado por DMEM 1% SFB, elas permanecerem na estufa a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂, 12 h, na tentativa de sincronização dos seus ciclos celulares. Após este tempo, as células foram incubadas por 48 horas à 37°C em atmosfera a 5% de CO₂, respeitando os seguintes grupos: Basal (DMEM 1% SFB), FGF (5 ng/mL em DMEM 1% SFB) (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, EUA) e Controle positivo (DMEM 10% SFB). Nas últimas 24 h de incubação, as SVFs foram marcadas com anticorpo BrdU 1x (Roche - Sigma Aldrich). Em seguida, o meio de marcação foi removido por aspiração suave e lavadas com PBS 1x estéril; as células marcadas foram secas e incubadas com 200 µl/poço FixDenat por 30 min à temperatura ambiente. Após este tempo, a solução FixDenat foi removida e 100 µl/poço de solução de trabalho anti-BrdU-POD foi adicionado para incubar por aproximadamente 90 min à temperatura ambiente. Mais tarde, o conjugado de anticorpo foi eliminado e os poços foram lavados três vezes suavemente com a solução de lavagem de 300 µl/poço. Depois disso, a solução de substrato de 100 µl/poço foi adicionada para incubar por 5-10 min à temperatura ambiente, até que o desenvolvimento da cor fosse suficiente para a detecção fotométrica. Subsequentemente, o H₂SO₄ 1 M (25 µl/poço) foi adicionado a cada poço, e a microplaca foi incubada por cerca de 1 min no agitador suave. Finalmente, o valor de DO foi medido em 450/690 nm.

2.13 Análise da diferenciação adipocitária

As células da SVF foram semeadas em placas de 96 poços em meio DMEM 15% SFB acrescido de 2 mM de glutamina. Após atingirem, aproximadamente, 80% de confluência, o meio foi trocado por DMEM 1% SFB e as células permanecerem na estufa a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂, por 12 h, com o objetivo de sincronizar o ciclo celular. Após esse período, a diferenciação em adipócitos foi induzida através da incubação das células em meio de diferenciação (MD), contendo 1µM de dexametasona, 1µg/mL de insulina e 500 µM de IBMTX em meio DMEM 10% SFB por sete dias. Ao final deste período, as células foram lavadas com PBS 1x estéril e fixadas em paraformaldeído 4% (v/v), por 30 minutos. Após este período, os poços foram lavados três vezes com PBS 1x estéril. Imediatamente, uma solução de Nile Red (100µg/mL) (Invitrogen™, Massachusetts, EUA) foi adicionado a placa por 10 minutos, em seguida, os poços foram lavados 3x com PBS 1x estéril. A leitura da fluorescência foi realizada no leitor de placas EnVision (excitação: 552 nm/emissão: 636nm) (Adaptado de Bonilla E. & Prella A, 1987).

2.14 Indução da Polarização dos Macrófagos

A linhagem celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC TIB-71) foi semeada em placas de 24 poços, contendo DMEM 10% SFB. Após atingirem, aproximadamente, 80% de confluência, foi iniciado o protocolo de polarização de macrófagos M1 e M2. Para induzir a polarização em macrófagos com fenótipo M1 e M2, as células receberam tratamento com LPS (1µg/mL) + IFN-γ (100 ng/mL) ou IL-4 (40 ng/mL), respectivamente, por 24 horas. Além disso, as células sem estímulo (M0) foram tratadas com meio condicionado dos tecidos adiposos subcutâneo e epididimal na proporção 1:1 para DMEM suplementado com 20% de SFB.

2.15 Obtenção do extrato total celular, eletroforese em gel SDS-PAGE e Immunoblotting

O extrato celular total foi obtido a partir da lise das células com tampão RIPA (Sigma Aldrich). A quantificação do extrato total das células foi determinada pelo método de BCA (ThermoScientific). Em seguida, as amostras foram desnaturadas em tampão de amostra 5x concentrado (Tris HCl 50 mM em pH 6,8, SDS 1%; β -mercapto etanol 5%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,001%), por 5 minutos, a 95°C e em seguida os extratos foram congelados para serem submetidos posteriormente ao SDS PAGE.

Amostras contendo 20 μ g de proteína foram separadas por eletroforese em gel SDS PAGE com 10% de poliacrilamida. Um padrão de diferentes pesos moleculares foi utilizado em todas as eletroforeses (Rainbow Molecular Weight Marker, Amersham Biosciences) para estimar o peso molecular das proteínas. Após a separação eletroforética, foi realizada a transferência das proteínas para membranas de PVDF (PVDF Hybond P, Amersham Pharmacia Biotech) por 30 minutos, utilizando-se o sistema Semi-dry (BIO RAD). Em seguida, as membranas foram incubadas durante 1 hora, com solução de bloqueio contendo 5% de albumina de soro bovino (BSA; Sigma) em solução T-TBS (Tween 20 0,1% em TBS), seguidas de incubação overnight com os anticorpos primários específicos. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: rabbit anti-iNOS (Invitrogen PA1-036; 1:500) e rabbit anti-Arginase 1 (Invitrogen PA5-29645; 1:500). Em seguida, as membranas foram lavadas com solução T-TBS e então incubadas com o anticorpo secundário específico conjugado a biotina (1:5000), por 1 hora. Após essa incubação, as membranas foram lavadas com solução T-TBS (Tween 20 0,1% em TBS) e incubadas com estreptavidina conjugada à peroxidase (1:5000, Invitrogen™, Massachusetts, EUA), por 1 hora.

As proteínas imunorreativas foram detectadas no sistema ChemiDoc™ – (BIO RAD) através do uso do substrato ECL (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA). As bandas foram quantificadas por densitometria, utilizando-se o software ImageLab® (BIO RAD). As membranas foram incubadas novamente com anticorpo anti-Tubulina (Invitrogen MA1-80017; 1:1000), utilizando-se como controle de carregamento.

2.16 Análise do consumo de glicose nos meios condicionados do TAS e TAE e no sobrenadante de macrófagos RAW264.7

Para analisar o consumo de glicose, o meio condicionado dos tecidos adiposos e o sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 foram coletados e a concentração de glicose presente foi analisada utilizando o kit colorimétrico enzimático (K082 – Bioclin®) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Este kit se baseia na atividade da glicose oxidase, a qual oxida a glicose gerando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O consumo de glicose foi definido através da subtração da absorbância referente à cada amostra de sobrenadante da absorbância referente ao meio condicionado dos tecidos. A absorbância foi lida em leitor de placas (EnVision – Perkin Elmer).

2.17 Análise da produção de lactato nos meios condicionados do TAS e TAE e no sobrenadante de macrófagos RAW264.7

Para analisar a produção de lactato, o meio condicionado dos tecidos adiposos e o sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 foram coletados e a concentração de lactato presente foi analisada utilizando o kit colorimétrico enzimático (K084, Bioclin®) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Este kit se baseia na atividade da lactato desidrogenase (LDH) que catalisa a oxidação da L-Lactato a Piruvato, com consequente redução da NAD⁺ a NADH. A produção de lactato foi definida através da subtração da absorbância referente à cada amostra de sobrenadante da absorbância referente ao meio condicionado dos tecidos. A absorbância foi lida em leitor de placas (EnVision – Perkin Elmer).

2.18 Análise do perfil metabólico

Para a metabolômica do meio condicionado dos tecidos adiposos subcutâneo

e epididimal, os meios foram misturados com água deuterada (D₂O) na concentração final de 10% v/v. A mistura foi transferida para tubos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de 5mm, e em seguida os tubos foram inseridos no magneto Bruker de 500.13 MHz. A aquisição dos espectros uni-dimensionais foi realizada no próton (H¹), através da sequência zgpg30, 64K pontos, 512 scans, 20ppm de largura de janela espectral, 3,27 segundos de aquisição e delay de relaxação de 1,74 segundos. Após a aquisição, os espectros foram processados com 128K pontos e referenciados no TopSpin 4.1.4 (Bruker®).

A tabela com os buckets foi gerada pelo método da média da soma das intensidades dos picos (averageSUM), com intervalo de 0,02 ppm através do programa MestReNova 14.2.1-27684. Foram deletadas as regiões com linha base negativas, e regiões da água, etanol e hepes.

Os buckets foram inseridos na plataforma Metaboanalyst 5.0, sem filtro de dados, e foi realizada a normalização pelo somatório das intensidades dos picos, sem scaling, para a geração da análise dos componentes principais (PCA), e da análise discriminada (PLS-DA) (PANG et al., 2021).

As análises univariadas, múltiplo teste t foram geradas no programa GraphPad, utilizando a abordagem FDR (false-discovery-rate) com erro de 5%, com pós-teste de Benjamini-Krieger e Yekutieli.

Os assinalamentos foram realizados através de espectros bi-dimensionais HSQC H¹-C¹³ e TOCSY H¹-H¹ utilizando a plataforma COLMARm com os parâmetros padrões indicados (BINGOL et al., 2015; ROBINETTE et al., 2008).

O preparo de amostra, aquisição dos espectros e análises dos dados, foram realizadas em colaboração com o professor Gilson Costa dos Santos do Laboratório de Metabolômica (LabMet), do Departamento de Genética da UERJ.

2.19 Análise Estatística

A distribuição das variáveis foi analisada quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Os resultados obtidos para cada grupo experimental foram analisados estatisticamente utilizando-se análise de teste t de Student para comparação entre

dois grupos ou ANOVA de um fator para comparações múltiplas. Foram utilizados pós testes de Dunn (não paramétrico) ou Tukey (paramétrico) para comparações múltiplas. A significância foi considerada para valores de $p < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando-se GraphPad Prism versão 8.00 para Windows (GraphPad Software, EUA).

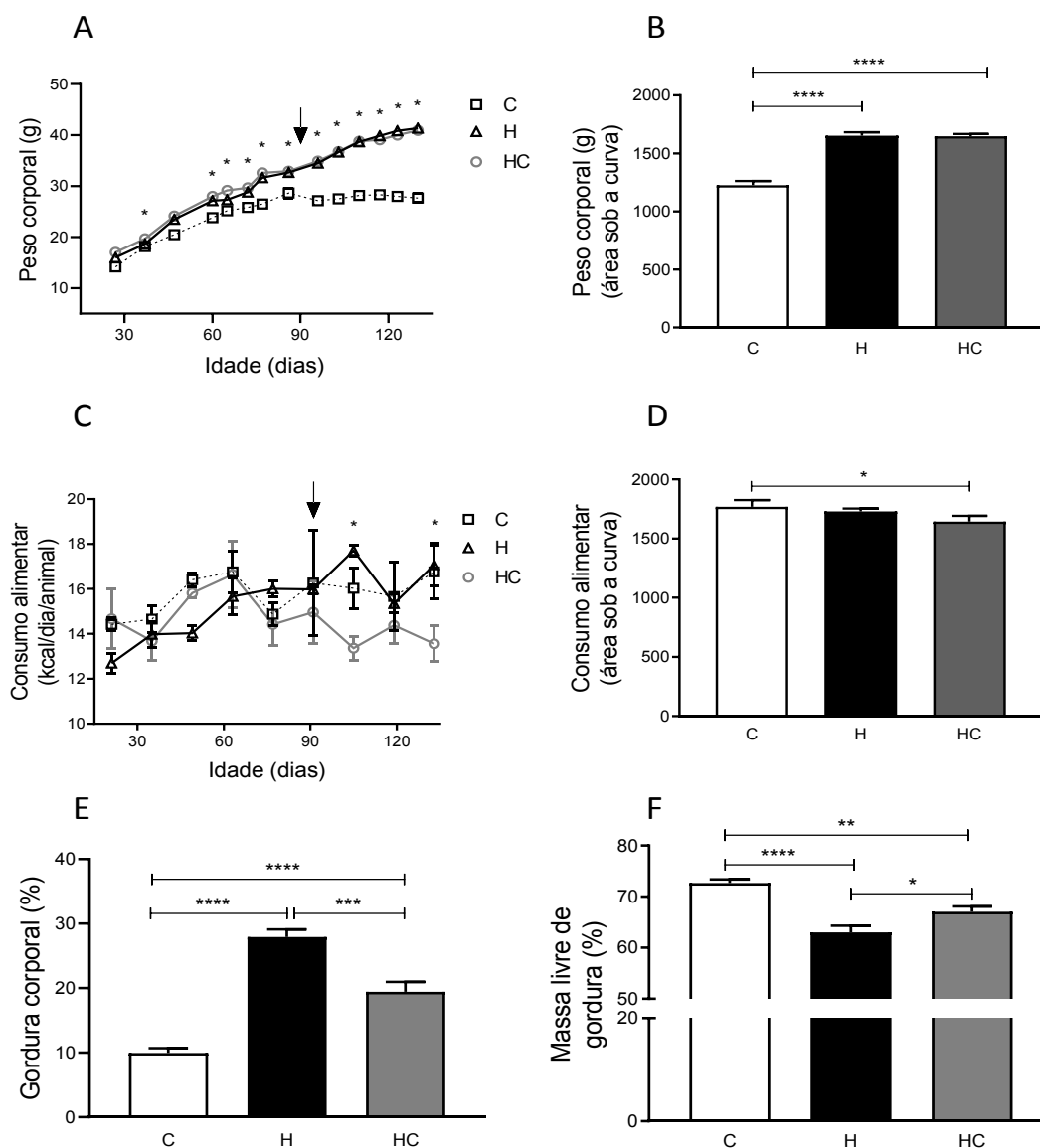
3 RESULTADOS

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

A análise do peso corporal (Figura 9A e B) demonstrou que os animais submetidos à dieta hiperlipídica (grupo H) apresentaram aumento significativo do peso corporal ($p<0,05$), a partir dos 60 dias de vida, quando comparados ao grupo controle (grupo C). A análise da área sob a curva do consumo energético mostrou que os animais do grupo HC tiveram uma pequena redução no consumo calórico em relação ao grupo controle (Figura 9C e D).

Em relação à composição corporal, observamos um aumento significativo do percentual de gordura corporal nos animais do grupo H, com consequente diminuição da massa livre de gordura (Figura 9E e F, respectivamente). A suplementação com óleo de chia diminuiu significativamente o percentual de gordura corporal nos animais submetidos à dieta hiperlipídica e aumentou a massa livre de gordura.

Figura 9 - Avaliação do peso corporal, ingestão calórica e da composição corporal



Legenda: Peso corporal, consumo alimentar e composição corporal. Curva do peso corporal ao longo do desenvolvimento (A) e a respectiva área sob a curva (B). O peso corporal dos animais foi aferido do 30º ao 135º dia de vida. Curva do consumo calórico ao longo do desenvolvimento (C) e a respectiva área sob a curva (D). O consumo calórico foi aferido ao longo dos 135 dias de vida. A análise da composição corporal foi realizada por ressonância magnética nuclear aos 130 dias de vida (E e F). A seta indica o início da suplementação dietética com óleo de chia, n = 10 animais por grupo.

Nota: Os gráficos representam média $\pm$ E.P.M. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, # $p < 0,05$. * em relação ao grupo C e # em relação ao grupo H. C: grupo controle; H: grupo obeso; HC: grupo obeso com suplementação dietética com óleo de chia.

Fonte: A autora, 2022.

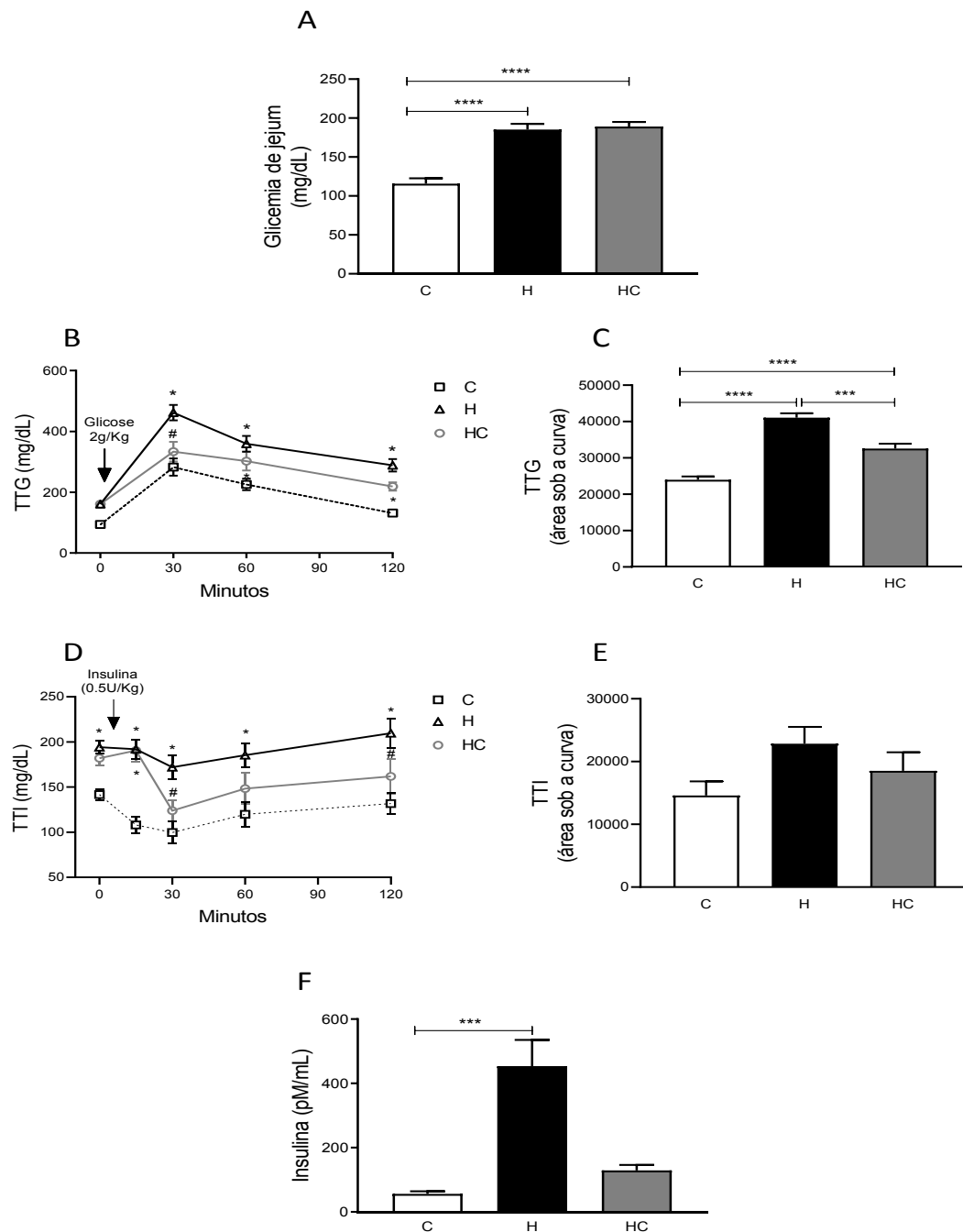
3.2 Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a homeostase glicêmica dos animais obesos.

A glicemia de jejum dos animais foi avaliada após jejum de, aproximadamente, seis horas. Observamos que os animais do grupo H e HC apresentaram um aumento significativo da glicemia de jejum (tempo zero), quando comparados ao grupo controle (Figura 10A).

Os animais do grupo H apresentaram uma diminuição da tolerância à glicose e à insulina, quando comparados com o grupo controle (Figura 10B e C, e 2D e E, respectivamente). A suplementação com óleo de chia dos animais obesos foi capaz de melhorar a tolerância à glicose, sem nenhum efeito significativo sobre a tolerância à insulina (Figura 10B e C e 10D e E, respectivamente). Apesar de não ter induzido efeito na tolerância à insulina, a suplementação com óleo de chia reduziu os níveis de insulina circulantes do grupo HC ($p=0,1534$), quando comparados ao grupo H (Figura 10F).

A avaliação da tolerância à glicose e à insulina dos animais demonstrou que os animais do grupo H apresentam uma menor eficiência tanto na captação de glicose, quanto na sensibilidade à insulina, quando comparados ao grupo controle (Figura 10C e D, e Figura 10E e F, respectivamente). A suplementação com óleo de chia foi capaz de melhorar a captação de glicose e a sensibilidade à insulina nos animais obesos. Ainda que não tenha sido observada diferença significativa no gráfico de área sob a curva, a suplementação com óleo de chia demonstrou eficácia na melhora da resposta a insulina no tempo de 30 minutos, com uma queda no TTI.

Figura 10 - Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a homeostase glicêmica dos animais



Legenda: Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a homeostase glicêmica. Glicemia de jejum após 6 horas (A). Teste de tolerância à glicose (TTG) após infusão peritoneal de 2g/kg de glicose por peso do animal (B) e área sob a curva do TTG (C). Teste de tolerância à insulina (TTI) após infusão peritoneal de 0,5U/Kg de insulina por peso do animal (D) e área sob a curva do TTG (E). Nível de insulina sérica avaliado por ELISA (F). n = 10 animais por grupo.

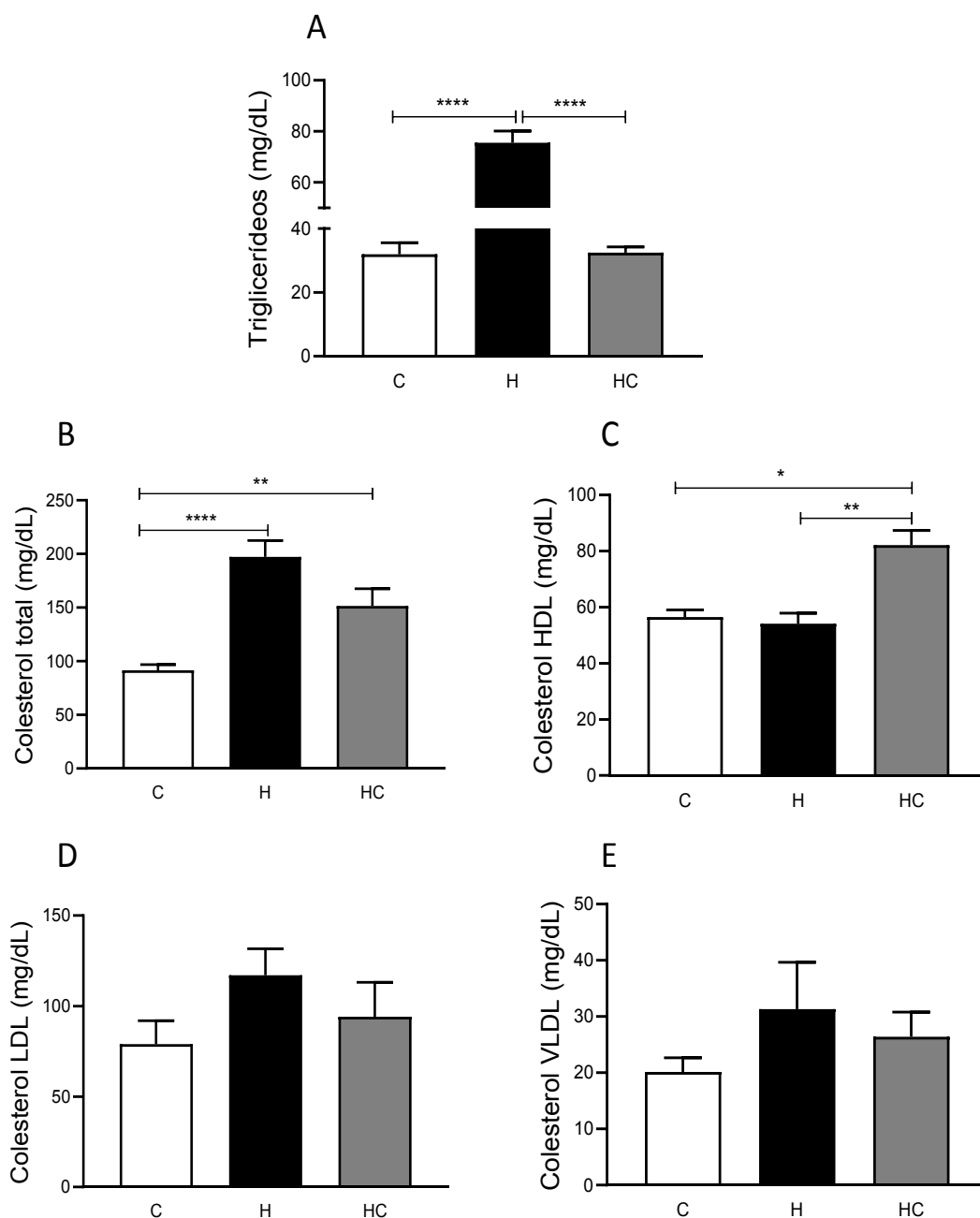
Nota: Os gráficos representam média $\pm$ E.P.M., * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. * em relação ao grupo C e # em relação ao grupo H. C: grupo controle; H: grupo obeso; HC: grupo obeso com suplementação dietética com óleo de chia.

Fonte: A autora, 2022.

3.3 Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre o perfil lipídico plasmático de animais obesos

A obesidade induzida por dieta hiperlipídica (grupo H) induziu um aumento significativo nos níveis plasmáticos de triglicerídeos (Figura 11A) e de colesterol total (Figura 11B,) em relação ao grupo controle, sem nenhum efeito sobre os níveis de colesterol HDL (Figura 11C). A suplementação com óleo de chia reduziu significativamente os níveis de triglicerídeos circulantes (Figura 11A) e aumentou os níveis de colesterol HDL (Figura 11C), porém não promoveu nenhuma alteração nos níveis de colesterol total (Figura 11B). Em nenhum dos grupos foram observadas diferenças significativas nos níveis de LDL e VLDL (Figura 11D e E).

Figura 11 - Efeito da suplementação com óleo de chia sobre o perfil lipídico plasmático de animais obesos



Legenda: Efeito da suplementação com óleo de chia sobre o perfil lipídico plasmático dos animais obesos. Níveis de triglicerídeos (A), Colesterol total (B), Colesterol HDL (C), Colesterol LDL (D) e Colesterol VLDL (E). Os níveis foram expressos em mg/dL. n = 7 a 10 animais por grupo.

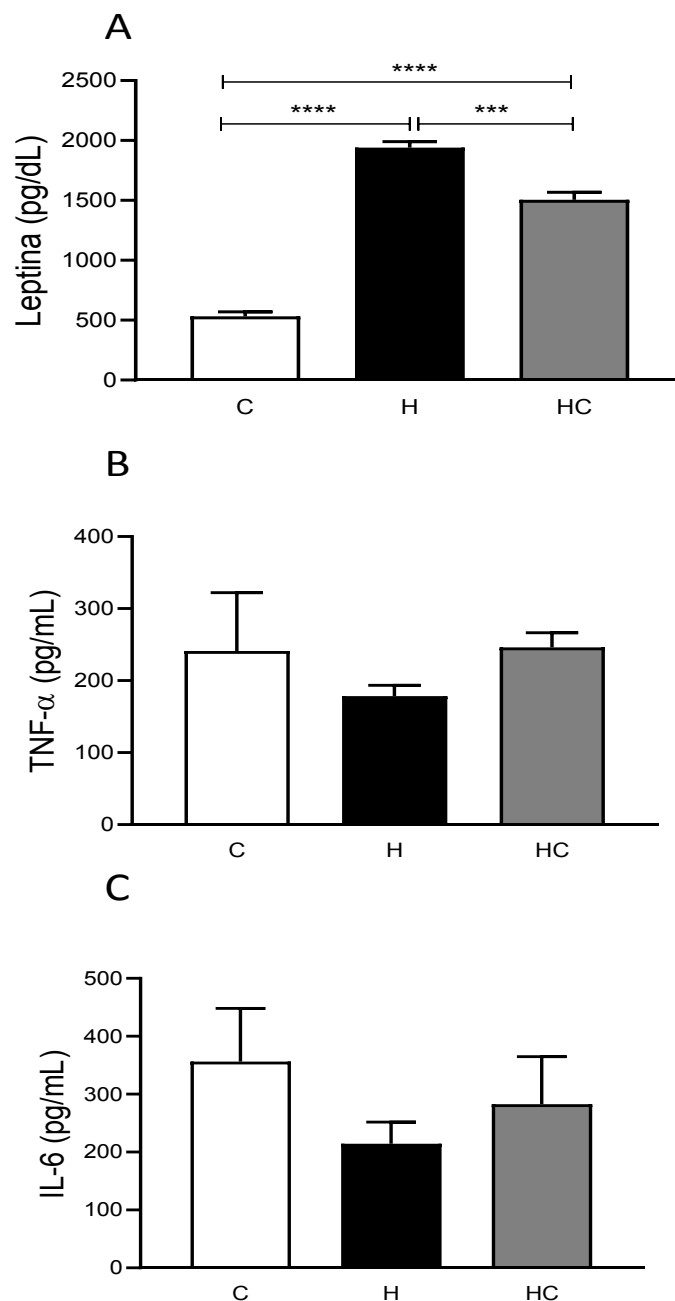
Nota: Os gráficos representam média $\pm$ E.P.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. C: grupo controle; H: grupo obeso; HC: grupo obeso com suplementação dietética com óleo de chia.

Fonte: A autora, 2022.

3.4 Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre os níveis séricos de leptina, TNF- α e IL-6 em animais obesos

Como esperado, os níveis séricos de leptina estavam aumentados nos animais obesos (grupo H), comparados ao grupo controle. A suplementação com óleo de chia reduziu significativamente a leptinemia dos animais HC, quando comparados ao grupo H (Figura 12A). Em relação aos níveis séricos de TNF- α e IL-6, não observamos alterações significativas entre os grupos (Figura 12B e C, respectivamente).

Figura 12 - Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre os níveis séricos de leptina, TNF- α e IL-6



Legenda: Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre os níveis séricos de leptina (A), TNF- α (B) e IL-6 (C). Os níveis séricos de leptina, TNF- α e IL-6 foram avaliados por Elisa. n = 5 a 9 animais por grupo.

Nota: Os gráficos representam média $\pm$ E.P.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. C: grupo controle; H: grupo obeso; HC: grupo obeso com suplementação dietética com óleo de chia.

Fonte: A autora, 2022.

3.5 Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre o remodelamento dos tecidos adiposos subcutâneo e epididimal na obesidade

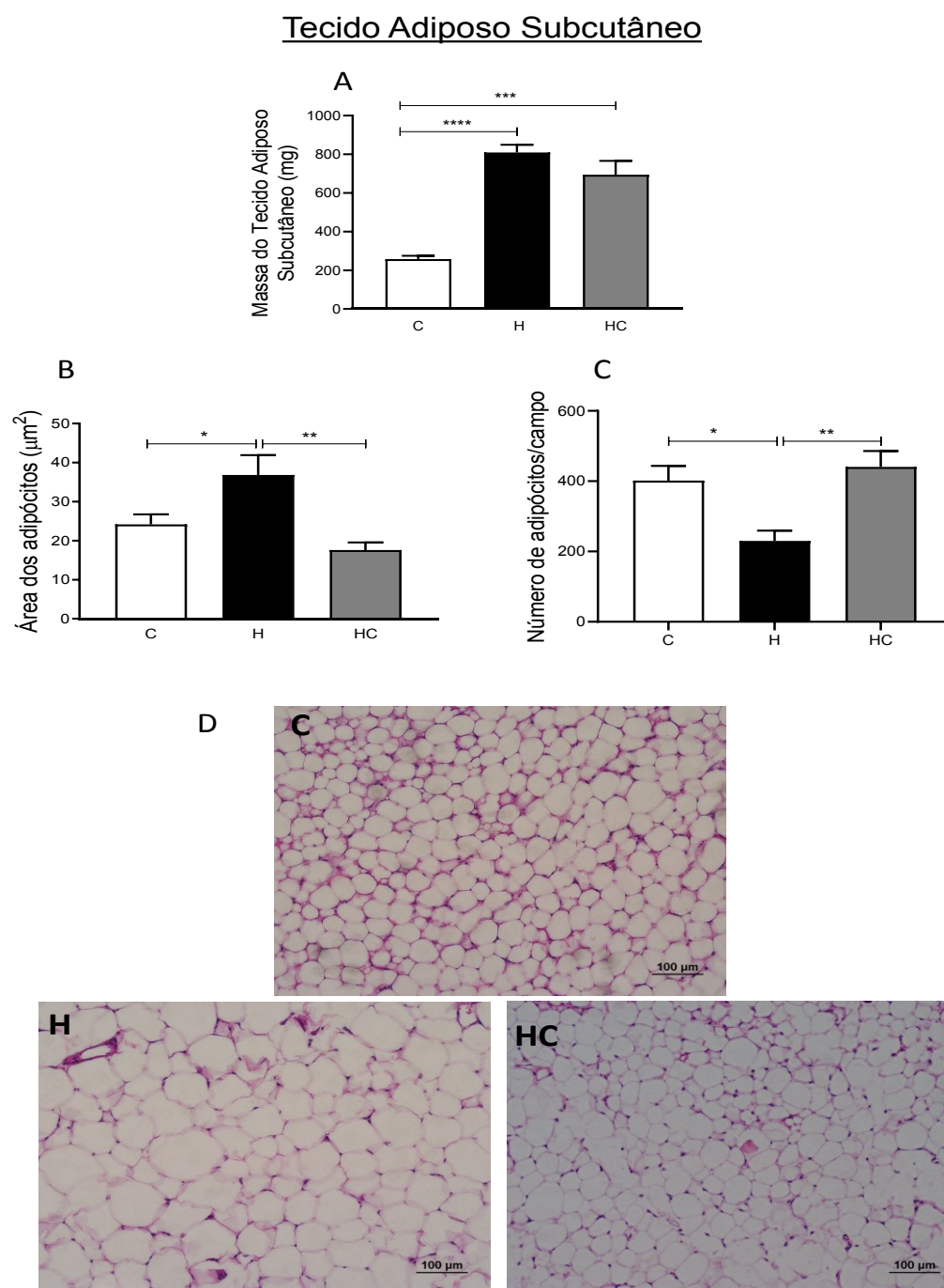
3.5.1 Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a massa e a morfometria dos tecidos adiposos subcutâneo e epididimal

A fim de avaliar o efeito da suplementação com óleo de chia na obesidade sobre o remodelamento de ambos os depósitos de tecido adiposo branco, subcutâneo e epididimal, nós inicialmente avaliamos a massa e a morfometria desses tecidos.

Corroborando com os dados da composição corporal, observamos que os animais submetidos a dieta hiperlipídica apresentam um aumento significativo na massa dos compartimentos de tecido adiposo subcutâneo e epididimal (Figura 13A e 14A, respectivamente). A suplementação com óleo de chia reduziu o acúmulo de massa apenas no compartimento epididimal (Figura 14A), sem nenhum efeito sobre o tecido adiposo subcutâneo (Figura 13A).

A análise da área dos adipócitos mostrou que a obesidade induziu um aumento significativo na área dos adipócitos e uma redução no número destas células por campo (Figura 13B e 13C) no compartimento de TA subcutâneo. Contudo, no compartimento de TA epididimal foi possível observar somente um aumento da área dos adipócitos no grupo H (Figura 14B). A suplementação com óleo chia foi capaz de reduzir significativamente a área dos adipócitos em ambos os depósitos de tecido adiposo analisados (Figura 13B e D, 14B e D, respectivamente). Além disso, a suplementação com óleo chia foi capaz de aumentar o número de células por campo somente no compartimento de TA subcutâneo (Figura 13C e 14C, respectivamente).

Figura 13 - Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a massa do tecido adiposo subcutâneo e morfometria dos adipócitos

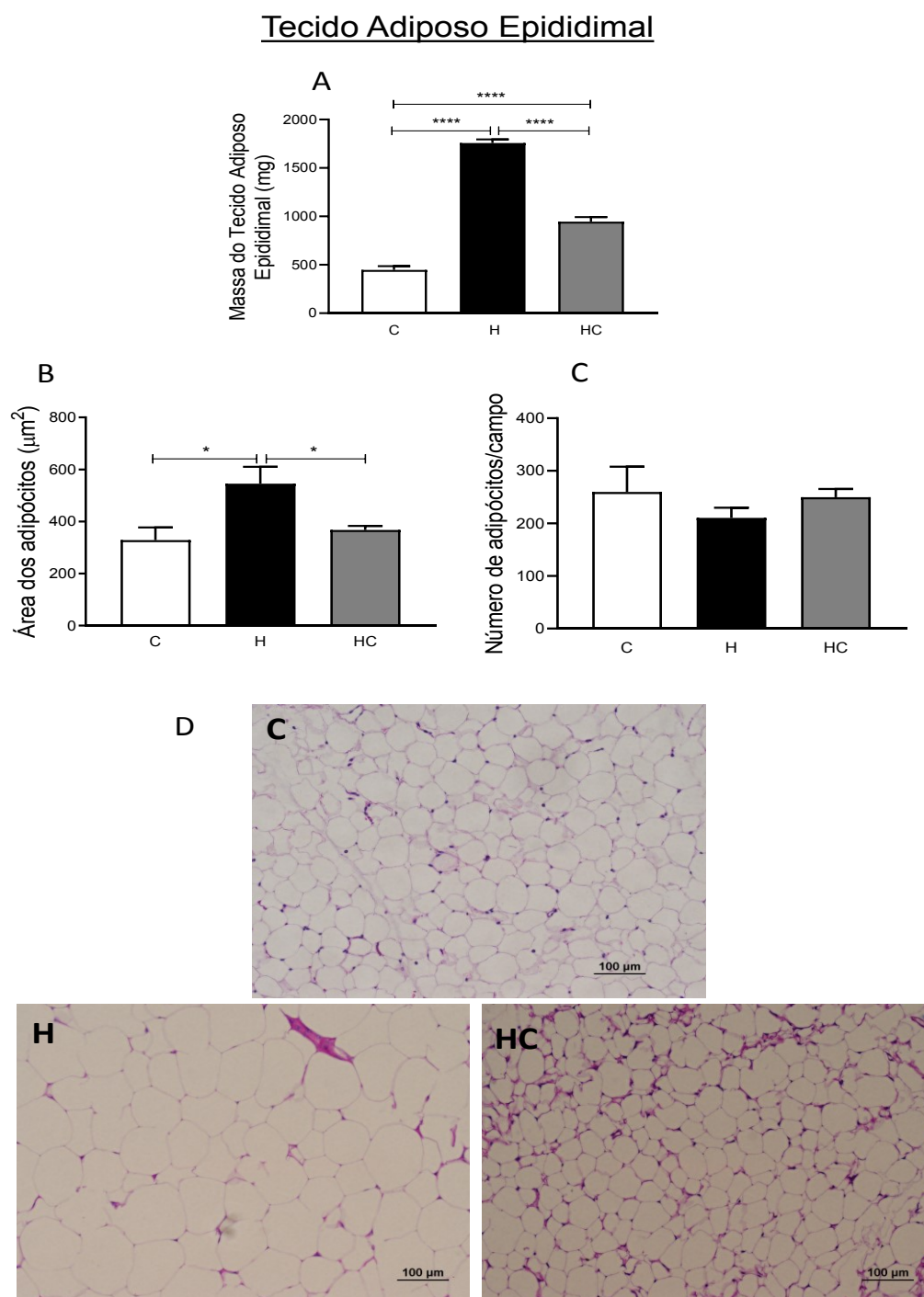


Legenda: Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a massa e morfometria do TAS. Massa do tecido (A), Área dos adipócitos (B) e Número de adipócitos por campo (C). A área dos adipócitos e o número de adipócitos foram mensurados com o auxílio do software Adiposoft. Microscopia dos tecidos adiposos marcados por H&E. n = 7 a 9 animais por grupo.

Nota: Os gráficos representam média $\pm$ E.P.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. C: grupo controle; H: grupo obeso; HC: grupo obeso com suplementação dietética com óleo de chia.

Fonte: A autora, 2022.

Figura 14 - Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a massa do tecido adiposo epididimal e morfometria dos adipócitos



Legenda: Efeito da suplementação com óleo de chia sobre a massa e a morfometria do TAE. Massa do tecido (A), Área dos adipócitos (B) e Número de adipócitos por campo (C). A área dos adipócitos e o número de adipócitos foram mensurados com o auxílio do *software* Adiposoft. Microscopia dos tecidos adiposos marcados por H&E. n = 7 a 9 animais por grupo.

Nota: Os gráficos representam média $\pm$ E.P.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. C: grupo controle; H: grupo obeso; HC: grupo obeso com suplementação dietética com óleo de chia.

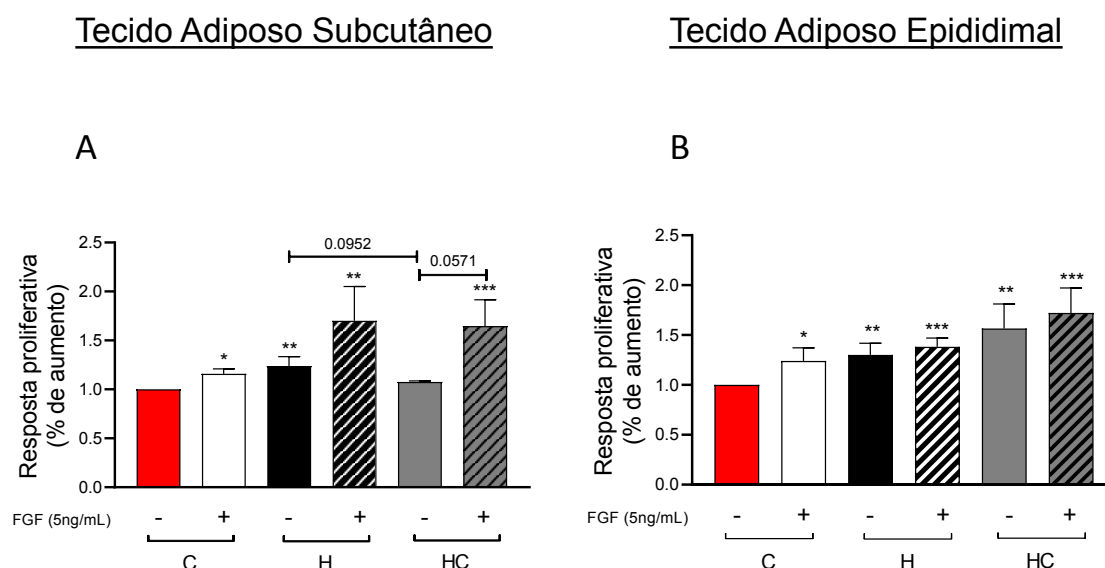
Fonte: A autora, 2022.

3.5.2 Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a resposta proliferativa e adipogênica de células tronco presentes nos tecidos adiposos

A fim de elucidar se o efeito da suplementação com óleo de chia sobre o número e o volume dos adipócitos está relacionado a um possível efeito sobre a proliferação e a diferenciação dessas células, nós avaliamos a resposta proliferativa e o potencial de diferenciação adipogênica de células isoladas da fração vascular do estroma do TA subcutâneo e do TA epididimal.

Conforme mostrado na figura 15, a obesidade induzida por dieta hiperlipídica aumentou significativamente a proliferação das células da fração vascular do estroma do TAS e do TAE (Figura 15A e B, respectivamente). Conforme esperado, a incubação das células com FGF (5 ng/mL) induziu um aumento significativo da proliferação nas células isoladas do TAS e TAE do grupo controle, porém não foi capaz de promover um aumento na capacidade proliferativa das células isoladas de ambos os tecidos adiposos dos animais obesos (Figura 15A e 15B). A suplementação com óleo de chia inibiu a proliferação das células da fração do vascular do estroma isoladas do TAS. A incubação com FGF promoveu um aumento, embora não significativo ($p=0,0571$), da capacidade proliferativa dessas células (Figura 15A). Nas células isoladas da fração vascular do estroma do TAE de animais suplementados com óleo de chia, não observamos alterações na resposta proliferativa, quando comparados ao grupo H. Mais uma vez, a incubação com o FGF não foi capaz de alterar essa resposta (Figura 15B).

Figura 15 - Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a resposta proliferativa de células tronco presentes no tecido adiposo subcutâneo e epididimal



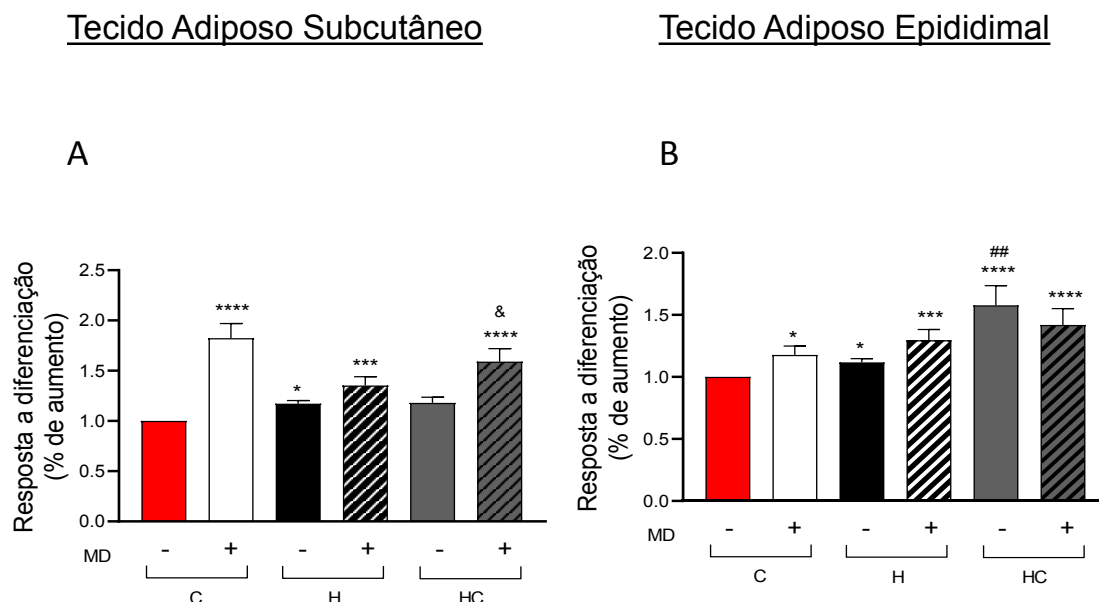
Legenda: Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a resposta proliferativa de células-tronco mesenquimais presentes no TAS e TAE. A resposta proliferativa das células-tronco mesenquimais da fração vascular do estroma do TAS e do TAE foi avaliada pelo ensaio de incorporação por BrdU (A e B, respectivamente). O FGF (5ng/mL) foi utilizado para induzir a proliferação, por 48h. n = 4 a 7 animais por grupo.

Nota: Os gráficos representam média $\pm$ E.P.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. * em relação ao grupo C. C: grupo controle; H: grupo obeso; HC: grupo obeso com suplementação dietética com óleo de chia.

Fonte: A autora, 2022.

Em relação ao potencial de diferenciação, observamos que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica promove um aumento na diferenciação de células isoladas da fração vascular do estroma de ambos os compartimentos de tecido adiposo. Conforme esperado, a incubação com o coquetel de diferenciação induziu a diferenciação na células isoladas de ambos os compartimentos de tecido adiposo do grupo C, porém não foi capaz de aumentar essa resposta nas células isoladas do grupo H (Figura 16A e B). A suplementação com óleo de chia inibiu a diferenciação das células da fração vascular do estroma isoladas do TAS, porém o mesmo não ocorreu no TAE (Figura 16A e B). O coquetel de diferenciação induziu um aumento na diferenciação das células isoladas do TAS dos animais suplementados com óleo de chia, porém não afetou a diferenciação das células do compartimento epididimal (Figura 16A e B).

Figura 16 - Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a resposta adipogênica de células tronco presentes no tecido adiposo subcutâneo e epididimal



Legenda: Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a resposta a diferenciação de células-tronco mesenquimais presentes no TAS e TAE. A resposta a diferenciação das células-tronco mesenquimais da fração vascular do estroma do TAS e do TAE foi avaliada pela marcação de Nile Red (A e B, respectivamente). n = 4 a 7 animais por grupo.

Nota: Os gráficos representam média $\pm$ E.P.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. * em relação ao grupo C e # em relação ao grupo H e & em relação ao grupo HC. C: grupo controle; H: grupo obeso; HC: grupo obeso com suplementação dietética com óleo de chia.

Fonte: A autora, 2022.

3.5.3 Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a produção de citocinas nos tecidos adiposos subcutâneo e epididimal

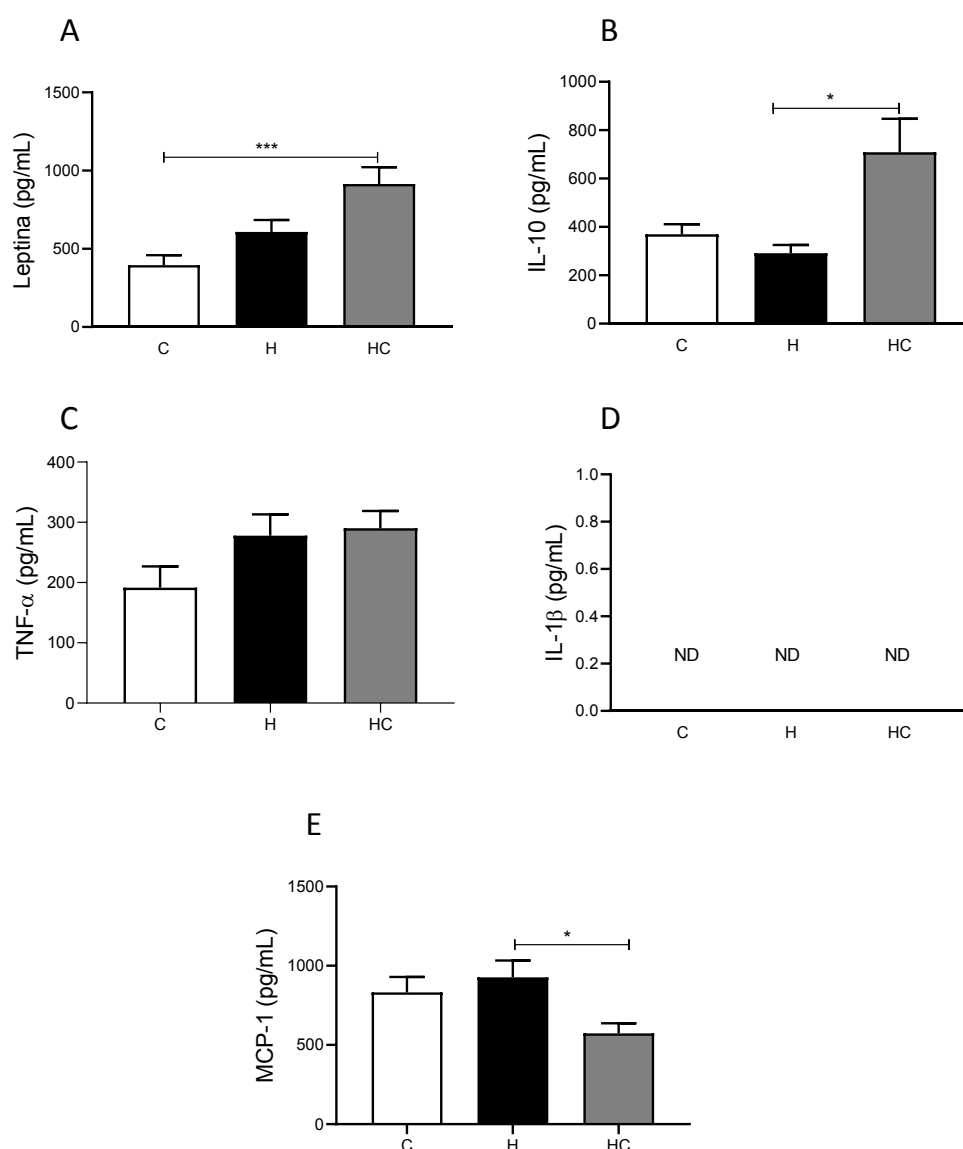
A fim de elucidar se a suplementação dietética com óleo de chia durante a obesidade altera a secreção de adipocinas nos compartimentos de TA subcutâneo e epididimal, nós avaliamos a produção de Leptina, IL-1 β , IL-10, MCP-1 e TNF- α no meio condicionado do TAS e TAE.

Em relação ao TA subcutâneo, nós observamos que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica não promoveu um aumento na produção de nenhuma das adipocinas/quimiocinas avaliadas (Figura 17A, B, C, D e E). Aqui, é importante salientar que os níveis de IL-1 β no meio condicionado do TAS não foram detectados pelo método de análise utilizado (ELISA), ficando abaixo do limite de detecção do kit

(2000 – 62 ng/mL). A suplementação com óleo de chia aumentou a secreção de leptina, comparado ao grupo controle. Além disso, aumentou a produção de IL-10 e reduziu a secreção de MCP-1 pelo TAS, comparado ao grupo obeso (Figura 17A, B, C, D e E, respectivamente).

Figura 17 – Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a produção de citocinas pelo tecido adiposo subcutâneo

Tecido Adiposo Subcutâneo



Legenda: Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a produção de adipocinas pelo TAS. Os níveis de Leptina (A), IL-10 (B), TNF-α (C), IL-1β (D) e MCP-1 (E) do meio condicionado do TAS foram avaliados por ELISA. n = 8 a 10 animais por grupo.

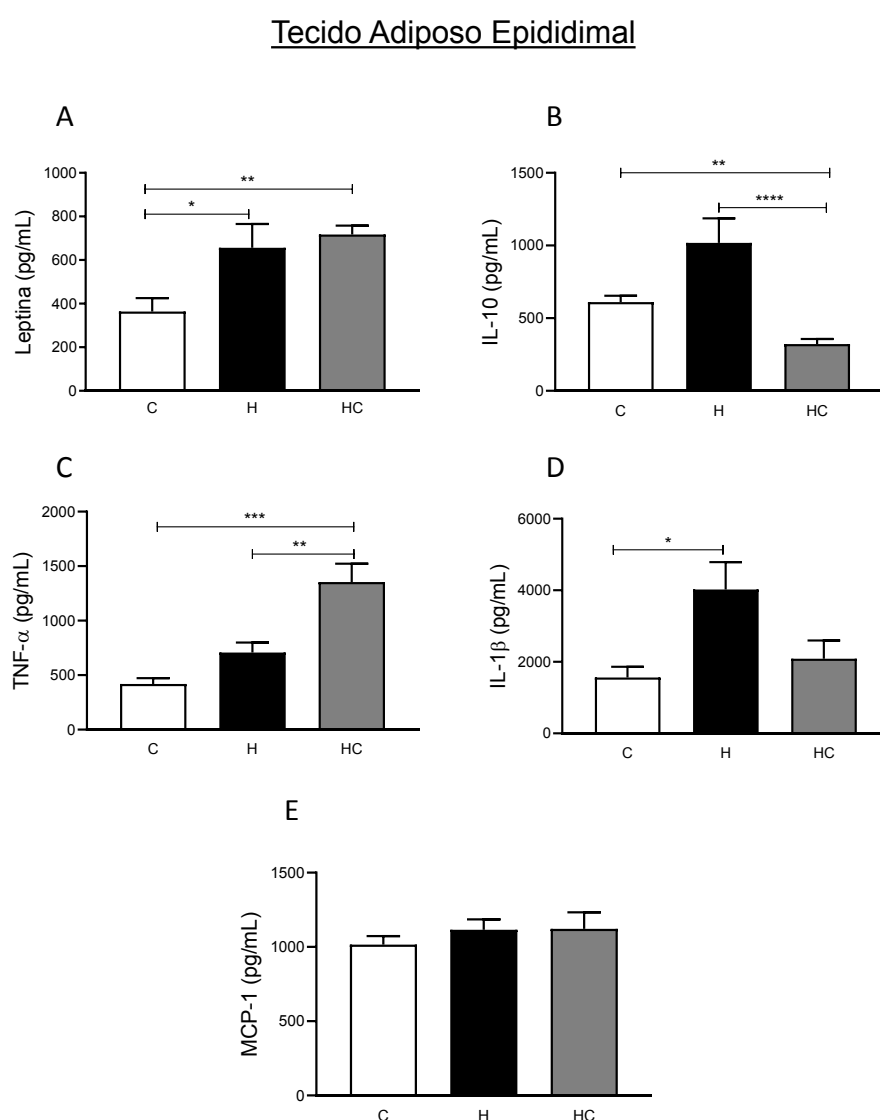
Nota: Os gráficos representam média ± E.P.M. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. ND: não detectado.

C: grupo controle; H: grupo obeso; HC: grupo obeso com suplementação dietética com óleo de chia.

Fonte: A autora, 2022.

Por outro lado, no compartimento de TA epididimal, a obesidade induziu um aumento significativo na secreção de leptina e IL-1 β (Figura 18A e D, respectivamente), sem nenhum efeito sobre a secreção de IL-10, TNF- α e MCP-1 (Figura 18B, C e E). A suplementação com óleo de chia reduziu a secreção de IL-10 e aumentou a secreção de TNF- α pelo TAE dos animais obesos (Figura 18B e C).

Figura 18 – Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a produção de citocinas pelo tecido adiposo epididimal



Legenda: Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre a produção de adipocinas pelo TAE. Os níveis de Leptina (A), IL-10 (B), TNF- α (C), IL-1 β (D) e MCP-1 (E) do meio condicionado do TAE foram avaliados por ELISA. n = 8 a 10 animais por grupo.

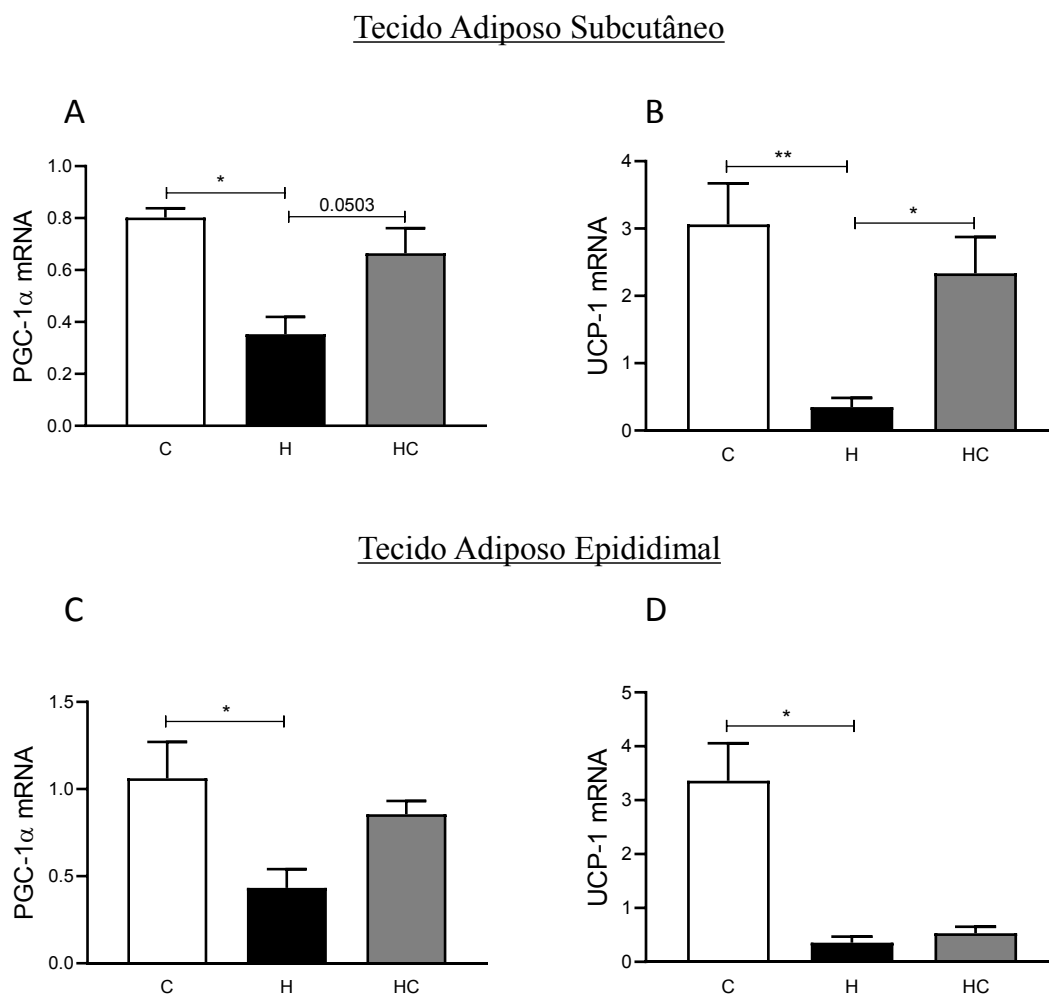
Nota: Os gráficos representam média $\pm$ E.P.M. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. C: grupo controle; H: grupo obeso; HC: grupo obeso com suplementação dietética com óleo de chia.

Fonte: A autora, 2022.

3.5.4 Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre o browning dos tecidos adiposos

A fim de investigar se a suplementação dietética com óleo de chia durante a obesidade altera o remodelamento do TAS e TAE através da indução de browning dos seus adipócitos, nós avaliamos a expressão gênica de PGC1- α e UCP-1 nesses compartimentos de tecido adiposo. Na figura 19, observamos que a suplementação com óleo de chia demonstrou uma tendência de aumento na expressão de PGC-1 α no TAS ($p=0,0503$), sem diferença no TAE ($p=0,1485$) (Figura 19A e C). Em relação a expressão gênica de UCP-1, a suplementação dietética com óleo de chia foi capaz de aumentar a expressão gênica no TAS dos animais obesos (grupo HC), porém não observamos nenhuma alteração significativa na expressão deste gene no compartimento epididimal (Figura 19B e D).

Figura 19 - Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre o browning do tecido adiposo subcutâneo e epididimal



Legenda: Efeito da suplementação com óleo de chia sobre o browning do TAS e TAE. n = 3 a 6 animais por grupo. Expressão gênica de PGC-1 α (A e C, respectivamente) e UCP-1 (B e D, respectivamente), analisado por qRT-PCR, utilizando GAPDH como gene constitutivo.

Nota: Os gráficos representam média $\pm$ E.P.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. C: grupo controle; H: grupo obeso; HC: grupo obeso com suplementação dietética com óleo de chia.

Fonte: A autora, 2022.

3.6 Efeito da suplementação dietética com óleo de chia sobre o perfil de metabólitos secretados dos tecidos adiposos subcutâneo e epididimal durante a obesidade

Inicialmente, a análise pela técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (metabolômica) identificou um total de 197 compostos secretados pelos compartimentos subcutâneo e epididimal dos animais (listados no anexo 4). Na figura 20 é possível observar a figura representativa de espectros do meio condicionado dos tecidos adiposos (Figura 20). Por meio da seleção dos dois primeiros componentes (PC1 e PC2) demonstrados nos *scores plot*, é possível observar que no compartimento epididimal os animais dos grupos H e HC possuem perfil metabólico muito mais semelhantes que o H e HC no compartimento subcutâneo, visto pela “elipse de Hotelling”, que está associada a variabilidade entre as amostras (quanto mais discrepantes mais distantes entre si e, portanto, maior será a elipse). A separação dos dados, avaliando a porcentagem do gráfico de PCA, demonstrou que no TAS 65,3% das variáveis foram encontradas e no TAE 63,2% das variáveis foram encontradas (Figuras 21A e 22A).

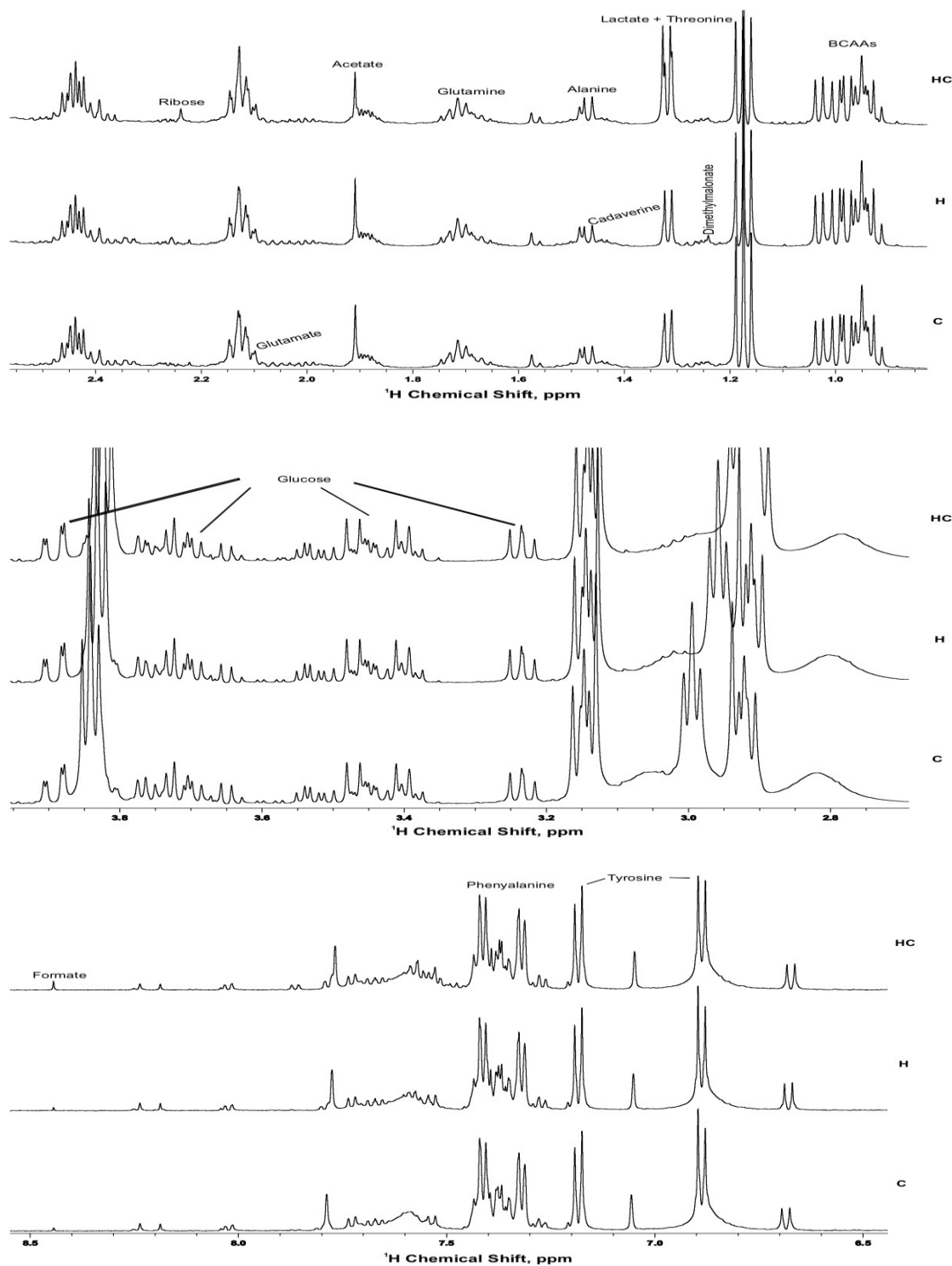
Na análise desses compostos, identificamos 13 que poderiam se destacar por terem suas ações reconhecidamente atribuídas ao metabolismo energético e/ou a resistência à insulina (Quadro 3). Posteriormente, comparamos se haveria diferença na concentração desses metabólitos entre os dois compartimentos de tecido adiposo. Conforme demonstrado na tabela 5, observamos uma redução significativa nos níveis de tirosina e frutose 2,6 bifosfato no meio condicionado do TAE dos animais obesos suplementados com óleo de chia, quando comparado ao TAS.

Em seguida, realizamos a análise multivariada desses metabólitos no TAS e TAE, isoladamente. A partir dessas análises, observamos que a obesidade induziu um aumento nos níveis de triptofano e frutose 1,6 bifosfato no MC do TAS quando comparado ao grupo controle (Tabela 6, Figura 21D e E). A suplementação com óleo de chia, por sua vez, não alterou os níveis desses metabólitos no MC do TAS contudo, induziu um aumento significativo nos níveis de tirosina (Tabela 6, Figura 21C) e frutose 2,6 bifosfato, quando comparado ao grupo H (Tabela 6).

No compartimento epididimal, observamos que a obesidade não foi capaz de alterar o nível de nenhum dos metabólitos analisados, quando comparado com o

grupo controle (Tabela 7, Figura 22B – E). No entanto, a suplementação com óleo de chia aumentou significativamente os níveis de lactato no meio condicionado do TAE, comparado ao grupo H (Tabela 7, Figura 22B).

Figura 20 – Ilustração dos espectros obtidos pelos tecidos adiposos na análise de metabolômica



Legenda: Picos de espectro representativos da análise de espectroscopia de ressonância magnética nuclear do meio condicionado de tecidos adiposos. ppm= partes por milhão.

Nota: C: grupo controle; H: grupo obeso; HC: grupo obeso com suplementação dietética com óleo de chia.

Fonte: A autora, 2022.

Quadro 3 - Alguns dos metabólitos que pertencem as vias associadas à obesidade:

Metabólito	Vias envolvidas
Ácido Hidroxi-Isobutírico (Butirato)	Sua metabolização ocorre no interior da mitocôndria (fonte de acetil-CoA independente de carnitina). Constitui potencial substrato para a cetogênese
Ácido Nicotinúrico (Niacina)	Produto da metabolização do triptofano. No tecido adiposo: inibe a lipólise, nos hepatócitos: bloqueia a diacilglicerol aciltransferase-2
D-Glicose	Glicólise/gliconeogênese e metabolismo do piruvato
Frutose 1,6 bisfosfato	Produto da fosfoenolpiruvato. Participa da glicólise
Glicerol	Participa da gliconeogênese/glicólise
Lactato	Intermediário do metabolismo da glicose. Alimenta o ciclo do ácido cítrico, precursor de gliconeogênese e funciona como molécula sinalizadora
L-Arginina	Substrato da NO sintase – síntese de óxido nítrico.
L-Glutamina	Envolvida com a glicólise. Aumenta quando ocorre redução da glicólise
L-Glutationa-Ox	GSH. Formada pela junção entre glutamato, cisteína e glicina. Possui atividade antioxidante, participa da sinalização redox e fibrogênese
Tirosina	Precursora de neurotransmissores dopaminérgicos e hormônios suprarrenais. Estimula liberação de GSH
Treonina	Aminoácido essencial. Exigido na formação de proteínas e manutenção do <i>turnover</i> proteico corporal. Auxilia na formação de colágeno e elastina. Atua na produção de anticorpos.
Triptofano	Aminoácido essencial. Precursor de serotonina. Quando metabolizado pode virar serotonina e/ou ácido nicotinúrico

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 5 – Análise comparativa dos metabólitos encontrados no TAS e TAE:

Metabólito	Grupo C				Grupo H				Grupo HC			
	Valor de P	Média do TAS	Média do TAE	Δ	Valor de P	Média do TAS	Média do TAE	Δ	Valor de P	Média do TAS	Média do TAE	Δ
Ácido Hidroxi-Isobutírico	0,271	1,187	1,329	-0,142	0,431	1,349	1,300	0,048	0,945	1,345	1,347	-0,002
Ácido Nicotinúrico	0,069	12,99	8,437	4,557	0,097	11,65	9,615	2,031	0,314	9,944	8,365	1,579
D-Glicose	0,249	1,142	1,052	0,090	0,187	1,235	1,083	0,152	0,892	1,178	1,165	0,013
Frutose 1,6 bisfosfato	0,161	0,886	1,028	-0,139	0,072	1,074	1,025	0,049	0,858	1,030	1,023	0,007
Frutose 2,6 bisfosfato	0,513	1,020	1,086	-0,066	0,241	1,077	1,022	0,055	0,048	1,205	1,091	0,114
Glicerol	0,865	1,564	1,542	0,022	0,369	1,542	1,470	0,072	0,415	1,596	1,527	0,068
Lactato	0,939	2,837	2,859	-0,021	0,231	2,790	2,514	0,276	0,557	3,147	3,353	-0,206
L-Arginina	0,575	1,034	0,993	0,040	0,198	1,046	0,988	0,058	0,449	1,008	0,984	0,023
L-Glutamina	0,405	0,789	0,725	0,063	0,985	0,776	0,774	0,001	0,538	0,689	0,722	-0,032
L-Glutationa-Ox	0,858	0,802	0,811	-0,009	0,692	0,818	0,803	0,014	0,082	0,823	0,770	0,052
Tirosina	0,368	1,284	1,360	-0,076	0,585	1,325	1,305	0,019	0,009	1,396	1,311	0,084
Treonina	0,096	0,834	0,950	-0,115	0,965	0,941	0,943	-0,001	0,640	0,933	0,923	0,010
Triptofano	0,109	0,931	1,049	-0,116	0,468	1,055	1,068	-0,013	0,841	1,033	1,039	-0,005

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 6 - Análise dos principais metabólitos encontrados no meio condicionado do tecido adiposo subcutâneo:

Metabólito	Chemical Shift (ppm)	C versus H					H versus HC				
		Valor de P	C	H	Δ	Valor de q	Valor de P	H	HC	Δ	Valor de q
Ácido Hidroxi-Isobutírico	1.06	0,129987	1,187	1,349	-0,1623	0,500448	0,921034	1,349	1,345	0,004107	0,967085
Ácido Nicotinúrico	8.22	0,543991	12,99	11,65	1,348	0,938912	0,233779	11,65	9,944	1,701	0,675037
D-Glicose	5.21	0,550795	1,142	1,235	-0,09325	0,938912	0,608502	1,235	1,178	0,05687	0,873555
Frutose 1,6 bisfosfato	3.92	0,014583	0,8886	1,074	-0,1857	0,214377	0,238539	1,074	1,030	0,04398	0,584421
Frutose 2,6 bisfosfato	3.96	0,531286	1,020	1,070	-0,0577	0,901371	0,024815	1,077	1,205	-0,1277	0,182392
Glicerol	3.66	0,820228	1,564	1,542	0,02186	0,938912	0,508919	1,542	1,596	-0,05325	0,839717
Lactato	1.34	0,894202	2,837	2,790	0,04741	0,938912	0,226927	2,790	3,147	-0,3569	0,675037
L-Arginina	1.64	0,863891	1,034	1,046	-0,01215	0,938912	0,318979	1,046	1,008	0,03805	0,736841
L-Glutamina	2.12	0,871757	0,7894	0,7761	0,01333	0,938912	0,127836	0,7761	0,6898	0,08627	0,675037
L-Glutationa-Ox	2.44	0,726539	0,8020	0,8182	-0,01620	0,938912	0,831448	0,8182	0,8233	-0,005151	0,960323
Tirosina	3.34	0,551860	1,284	1,325	-0,04071	0,938912	0,017576	1,325	1,396	-0,07096	0,203001
Treonina	3.56	0,070316	0,8343	0,9419	-0,1075	0,406077	0,680692	0,9419	0,9337	0,008120	0,873555
Triptofano	3.46	0,043505	0,9318	1,055	-0,1231	0,406077	0,406354	1,055	1,033	0,02172	0,782232

Nota: Análise de teste t múltiplo com menos suposições. Abordagem FDR. Descoberta determinada usando o procedimento de step-up linear de dois estágios de Benjamini, Krieger e Yekutieli, com Q = 5%.

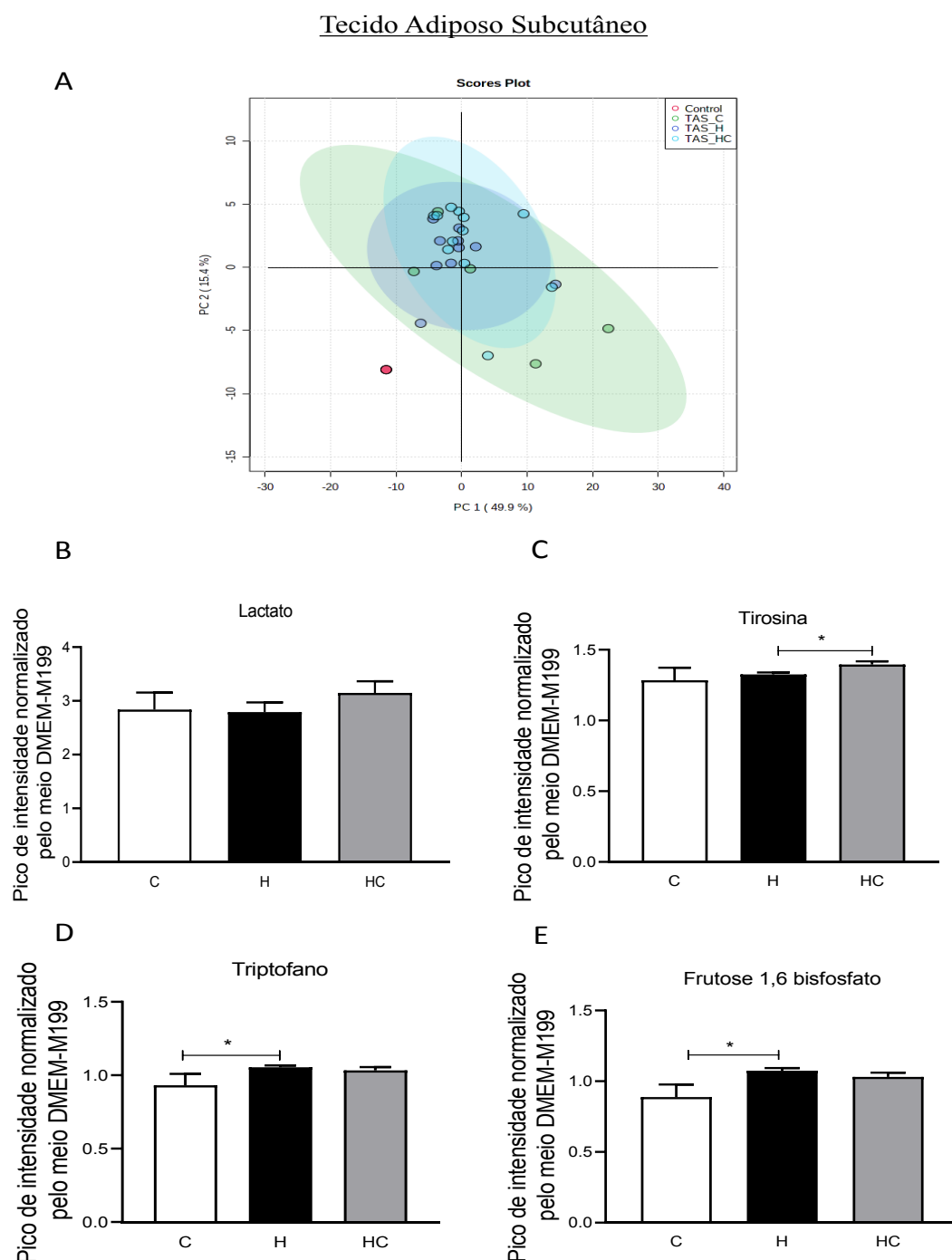
Fonte: A autora, 2022

Tabela 7 - Análise dos principais metabólitos encontrados no meio condicionado do tecido adiposo epididimal:

Metabólito	Chemical Shift (ppm)	C versus H					H versus HC				
		Valor de P	C	H	Δ	Valor de q	Valor de P	H	HC	Δ	Valor de q
Ácido Hidroxi-isobutírico	1.06	0,699280	1,329	1,300	0,02877	0,942981	0,368332	1,300	1,347	-0,0468	0,685518
Ácido Nicotinúrico	8.22	0,302189	8,437	9,615	-1,178	0,942981	0,401594	9,615	8,365	1,250	0,685518
Arginina	1.64	0,898077	0,9936	0,9883	0,005350	0,942981	0,713895	0,9883	0,9745	0,01378	0,824548
Frutose 1,6 bisfosfato	3.92	0,936996	1,028	1,025	0,0035	0,983846	0,962996	1,025	1,023	0,001523	>0,999999
Frutose 2,6 bisfosfato	3.96	0,196610	1,086	1,022	0,06393	0,867198	0,194863	1,022	1,091	-0,06868	0,785230
Glicerol	3.66	0,500520	1,542	1,470	0,07201	0,942981	0,512135	1,470	1,527	-0,0570	0,685518
Glicose	5.21	0,646213	1,052	1,083	-0,03131	0,942981	0,306654	1,083	1,179	-0,0963	0,685518
Glutamina	2.12	0,618201	0,7259	0,7744	-0,04855	0,942981	0,534170	0,7744	0,7223	0,05211	0,685518
Glutationa-Ox	2.44	0,850505	0,8113	0,8033	0,008008	0,942981	0,404289	0,8033	0,7706	0,03268	0,685518
Lactato	1.34	0,080134	2,859	2,514	0,3456	0,925549	0,013778	2,514	3,353	-0,8395	0,159140
Tirosina	3.34	0,235451	1,360	1,305	0,05531	0,942981	0,864576	1,305	1,311	-0,0062	0,907805
Treonina	3.56	0,820001	0,9500	0,9430	0,006986	0,942981	0,468913	0,9430	0,9234	0,01962	0,685518
Triptofano	3.46	0,353958	1,049	1,068	-0,01963	0,942981	0,186748	1,068	1,039	0,02958	0,685518

Fonte: A autora, 2022.

Figura 21 – Efeito da suplementação com óleo de chia sobre os níveis dos principais metabólitos secretados pelos tecidos adiposos subcutâneo

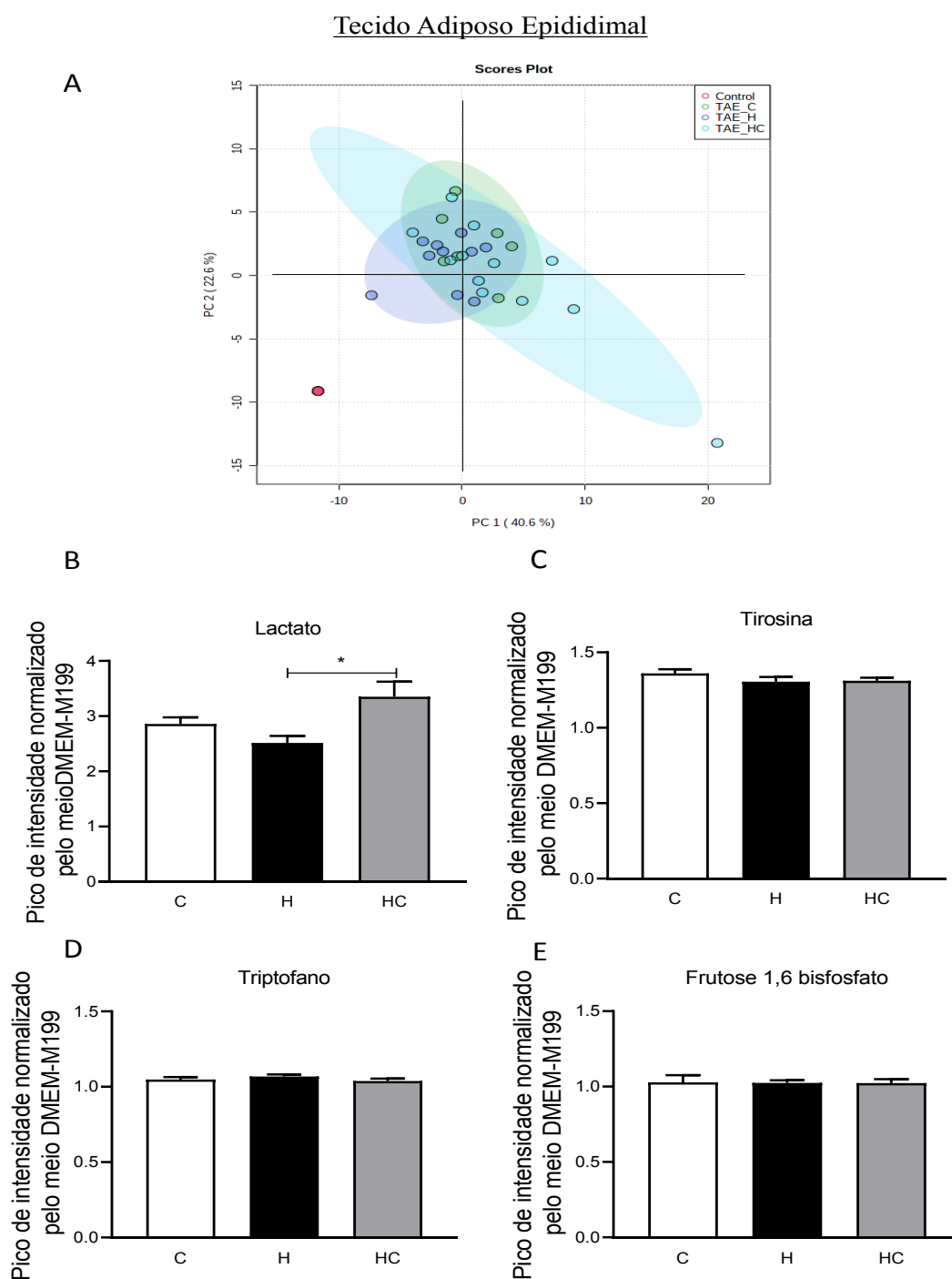


Legenda: Efeito da suplementação com óleo de chia sobre os níveis de metabólitos secretados em 24 horas pelo meio condicionado do TAS. n = 6 a 10 animais por grupo. Scores Plot do TAS (A), gráficos do pico de intensidade de Lactato (B), Tirosina (C), Tryptofano (D) e Frutose 1,6 bifosfato (E), analisados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear H-NMR.

Nota: Os gráficos representam média $\pm$ E.P.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. C: grupo controle; H: grupo obeso; HC: grupo obeso com suplementação dietética com óleo de chia.

Fonte: A autora, 2022.

Figura 22 – Efeito da suplementação com óleo de chia sobre os níveis dos principais metabólitos secretados pelos tecidos adiposos epididimal



Legenda: Efeito da suplementação com óleo de chia sobre os níveis de metabólitos secretados em 24 horas pelo meio condicionado do TAE. n = 6 a 10 animais por grupo. Scores Plot do TAE (A), gráficos do pico de intensidade de Lactato (B), Tirosina (C), Tryptofano (D) e Frutose 1,6 bifosfato (E), analisados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear H-NMR.

Nota: Os gráficos representam média $\pm$ E.P.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. C: grupo controle; H: grupo obeso; HC: grupo obeso com suplementação dietética com óleo de chia.

Fonte: A autora, 2022.

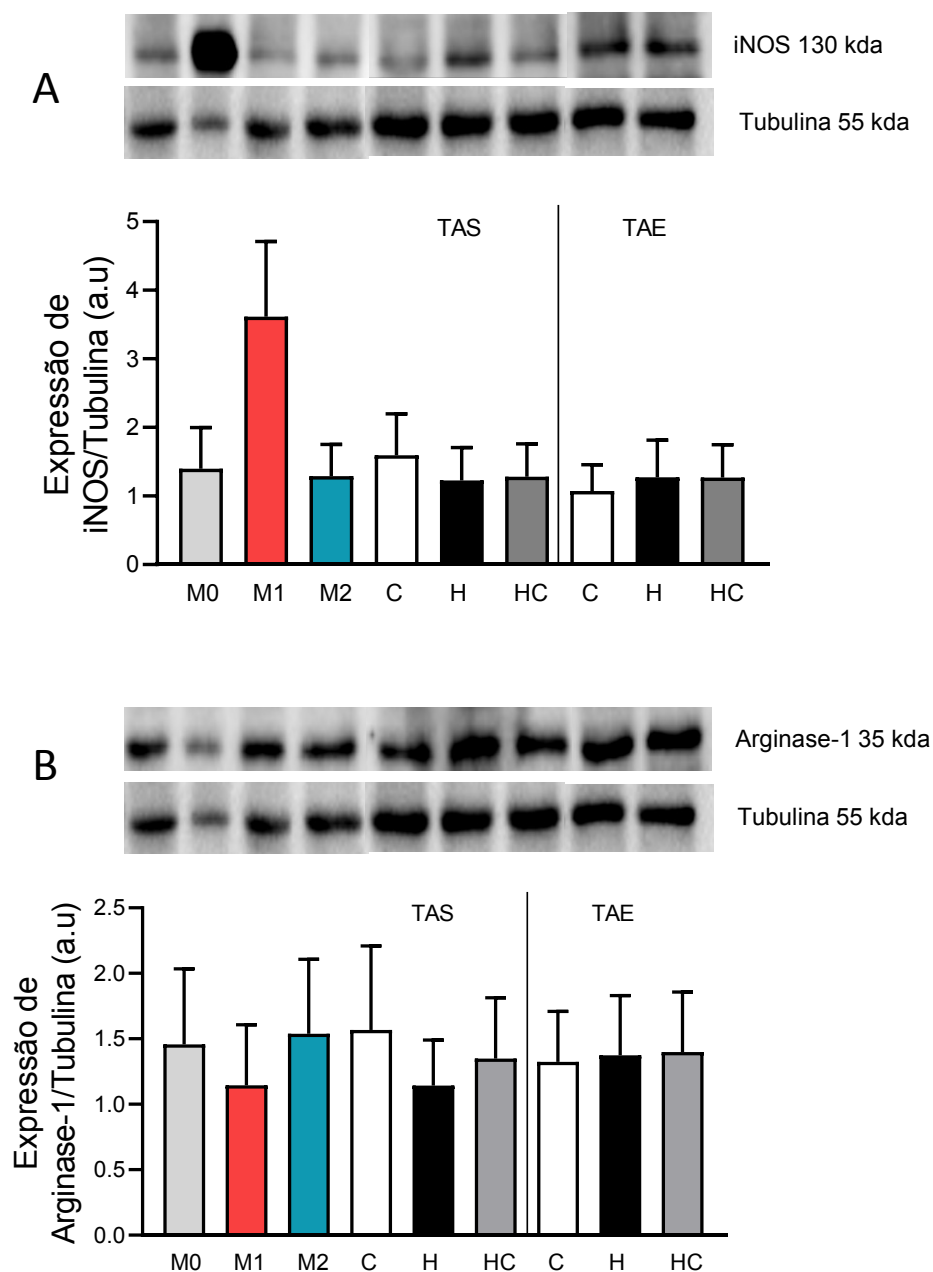
3.7 Efeito do meio condicionado do tecido adiposo de animais obesos e suplementados com óleo de chia sobre a polarização de macrófagos de linhagem RAW264.7

Aqui, nós avaliamos o efeito do meio condicionado dos tecidos adiposos subcutâneo e epididimal sobre a polarização de macrófagos murinos de linhagem RAW264.7 e o possível papel da suplementação dietética sobre este quadro. Para isso, nós incubamos macrófagos RAW264.7 com o meio condicionado (1:1) dos TAS e TAE dos animais por 24 horas e avaliamos a expressão de iNOS (M1) e Arginase-1 (M2) nessas células. Macrófagos RAW264.7 não polarizados (M0), polarizados para o perfil M1 (LPS 1 µg/mL + IFN-γ 100 ng/mL) e M2 (IL-4 40 ng/mL) foram utilizados como controles para a polarização.

Conforme demonstrado na figura 23A, a incubação de macrófagos RAW264.7 com LPS (1 ug/mL) + IFN-γ (100 ng/mL) por 24 h foi capaz de induzir a expressão de iNOS, caracterizando um perfil M1. Em contrapartida, a incubação dessas células com IL-4 (40ng/mL) induziu um aumento na expressão de arginase, indicando a polarização M2 das células (Figura 23B).

A incubação dos macrófagos RAW264.7 com os meios condicionados do TAS e TAE dos diferentes grupos (Grupo C, H e HC) não foi capaz de induzir a expressão iNOS nem de arginase nessas células (Figura 23A e B).

Figura 23 - Efeito do meio condicionado dos tecidos adiposos sobre a polarização de macrófagos



Legenda: Efeito do meio condicionado do TAS e TAE sobre a polarização de macrófagos RAW 264.7.

A expressão proteica de iNOS/Tubulina (A) e expressão proteica de Arginase-1/Tubulina (B) analisados por eletroforese. n = 3 - 5 animais por grupo.

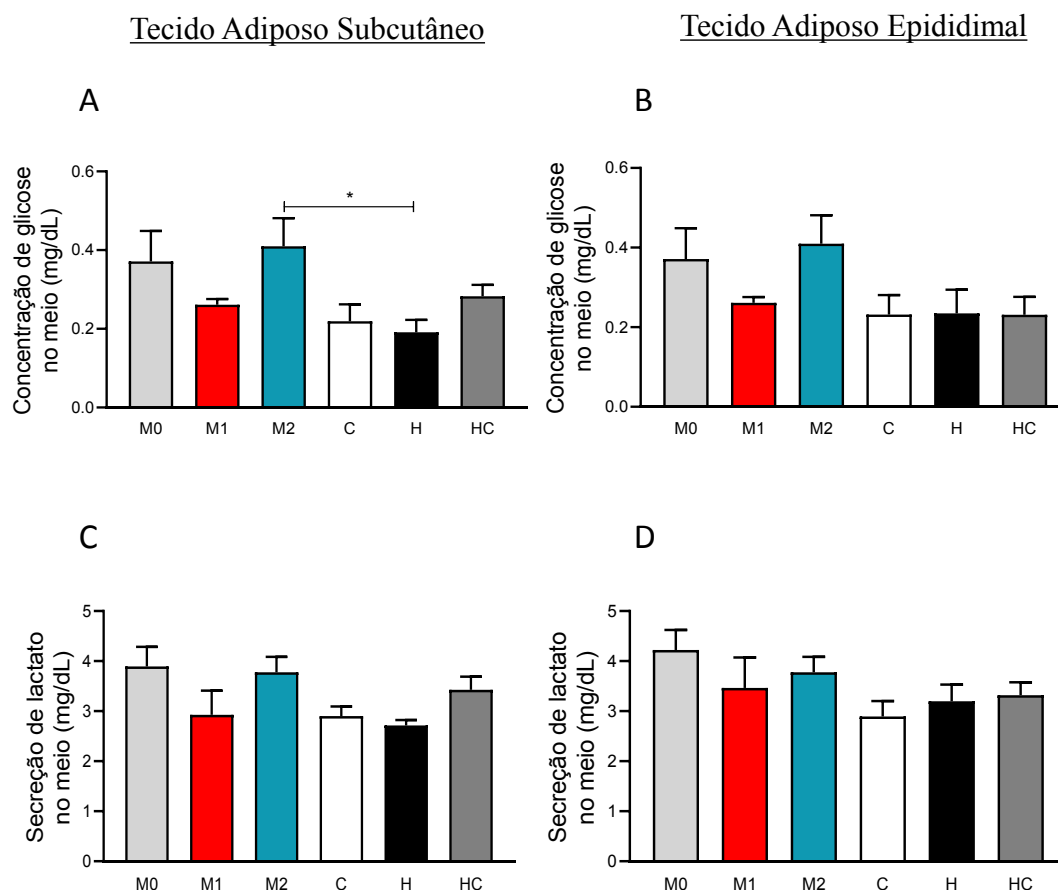
Nota: Os gráficos representam média $\pm$ E.P.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. * em relação ao M1. C: grupo controle; H: grupo obeso; HC: grupo obeso com suplementação dietética com óleo de chia.

Fonte: A autora, 2022.

Posteriormente, avaliamos os níveis de glicose e lactato no sobrenadante da células RAW264.7 incubadas com o meio condicionado do TAS e TAE. Para validar este resultado, subtraímos dos valores encontrados, o valor de glicose e lactato observados no meio condicionado dos tecidos adiposos.

Conforme observado na figura 24A, houve um aumento significativo na captação de glicose por macrófagos RAW264.7 incubados com o meio condicionado do TAS de animais obesos, quando comparados ao grupo M2. Contudo, não observamos diferenças significativas no conteúdo de glicose nem de lactato em nenhum dos outros grupos avaliados, tanto no compartimento subcutâneo, quanto no compartimento epididimal (Figura 24A - D).

Figura 24 - Efeito do meio condicionado dos tecidos adiposos sobre os níveis de glicose e lactato secretados pelos macrófagos RAW264.7



Legenda: Efeito do meio condicionado do TAS e TAE sobre a concentração de glicose e secreção de lactato de macrófagos RAW 264.7. Concentração de glicose no sobrenadante das células após 24 horas de estímulo com meio condicionado do TAS e TAE (A e B, respectivamente), e secreção de lactato (C e D, respectivamente). $n = 3 - 5$ animais por grupo.

Nota: Os gráficos representam média $\pm$ E.P.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. C: grupo controle; H: grupo obeso; HC: grupo obeso com suplementação dietética com óleo de chia.

Fonte: A autora, 2022.

4 DISCUSSÃO

O aumento da incidência de obesidade e suas comorbidades impactam sobre as condições de vida da população, diminuindo sua capacidade produtiva, elevando os custos médicos e interferindo com a economia global. Dentre as diversas estratégias conhecidas para o combate e a prevenção das complicações associadas a obesidade, destaca-se o consumo de ácidos graxos $\omega 3$ de origem animal (EPA e DHA) (CAPEL et al., 2015; FLACHS ROSSMEISL e KOPECKY, 2014; LIU et al., 2014; ZHAO e CHEN 2014). Embora vários estudos tenham evidenciado o papel do EPA e do DHA na disfunção metabólica associada à obesidade, o ALA vem ganhando destaque e o seu uso vem sendo estimulado, principalmente, devido à ausência de contaminação por metais pesados (KRÖGER e LAFORCE, 2016) e a ausência do sabor de peixe (JENKINS et al., 2009). No entanto, os estudos com esse tipo de ácido graxo $\omega 3$ ainda são escassos. No presente estudo, investigamos o papel da suplementação com óleo de chia no remodelamento do tecido adiposo branco em animais eutróficos e obesos.

Neste estudo, corroborando dados anteriores (De SOUZA et al., 2020; FONTE-FARIA et al., 2019), observamos que a suplementação com óleo de chia é capaz de alterar a composição corporal dos animais obesos, reduzindo a sua massa de gordura corporal, aumentando a massa livre de gordura, sem afetar o seu peso. Embora outros estudos já tenham demonstrado que o aumento da ingestão de EPA e DHA inibe a perda da massa muscular em roedores com dieta padrão AIN-93M (WEI et al., 2017; YU et al., 2010), nós demonstramos pela primeira vez o efeito do ALA sobre a composição corporal na obesidade. Além disso, demonstramos também de forma inédita que a suplementação com óleo de chia não altera a massa e a composição corporal em animais eutróficos.

Aqui, cabe ressaltar que o aumento do consumo de ácidos graxos $\omega 6$, resultando numa alta razão $\omega 6/\omega 3$ (20:1) (BALIC et al., 2020) está associado ao aumento da massa corporal e o consequente aumento na prevalência de sobrepeso e obesidade, tanto em humanos quanto em roedores (SIMOPOULOS, 2016; ABESO, 2016), demonstrando a importância na proporção equilibrada de $\omega 6/\omega 3$ para a saúde do indivíduo e prevenção/controla da obesidade. Em nossos estudos

com suplementação com óleo de chia, nós consideramos a razão de ácidos graxos $\omega 6/\omega 3$ de, aproximadamente, 4:1, seguindo a recomendação atual (BALIC et al., 2020; ABESO, 2016). Sendo assim, acreditamos que os efeitos da suplementação com óleo de chia sobre a massa e a composição corporal dos animais estejam relacionados à oferta equilibrada de ácidos graxos essenciais $\omega 6$ e $\omega 3$.

A modificação da composição corporal através da diminuição da massa de gordura e aumento da massa magra corporal é a principal estratégia terapêutica para o combate e prevenção das complicações associadas à obesidade, sobretudo da resistência à insulina (AL-SOFIANI et al., 2019; PATEL e ABATE, 2013). O aumento da massa de tecido adiposo é considerado o ponto de partida para as alterações metabólicas que culminam com o estabelecimento das comorbidades associadas à obesidade (PELLEGRINELLI et al., 2016). Ao contrário, o aumento da massa livre de gordura é uma importante estratégia terapêutica que está diretamente associada com a melhora da captação de glicose, auxiliando na reversão do quadro de resistência à insulina (LAGACÉ, BROCHU e DIONNE, 2020). Neste estudo, observamos mais uma vez que a suplementação com óleo de chia em animais obesos diminui a massa adiposa e, concomitantemente, aumenta a massa livre de gordura, ao mesmo tempo em que melhora a resposta glicêmica dos animais obesos, tornando-os mais tolerantes à glicose e reduzindo os níveis circulantes de insulina.

Em contrapartida, a suplementação com óleo de chia aumentou a massa do tecido adiposo subcutâneo e epididimal dos animais eutróficos, embora não tenha modificado significativamente a composição corporal destes animais. Tendo em vista que não observamos qualquer modificação no número ou no tamanho dos adipócitos presentes nesses compartimentos de tecido adiposo, é possível que o óleo de chia esteja atuando no balanço entre a lipólise e a lipogênese desses animais, contudo mais estudos são necessários para elucidar essa questão.

Além do seu papel importante sobre a modificação da composição corporal, outros eventos parecem estar envolvidos na melhora da resposta glicêmica associada a suplementação com óleo de chia na obesidade. Neste contexto, destacamos o já observado aumento da fosforilação de AKT no músculo esquelético de animais obesos, culminando com o aumento da translocação do GLUT-4 para a membrana e melhora da captação de glicose (FONTE-FARIA et al., 2019). Além disso, recentemente, observamos um aumento da fosforilação da AMPK no TA

perivascular de animais obesos suplementados com óleo de chia (ASSIS-FERREIRA et al., submetido ao Br. J. of Nutrition) e um aumento da expressão de UCP-1 no TA subcutâneo de animais obesos suplementados com óleo de chia desde o desmame (SOUZA et al., 2020). Com esse estudo, adicionamos mais evidências ao papel benéfico da suplementação com óleo de chia sobre a resposta metabólica de animais obesos.

Nos animais eutróficos, observamos que a suplementação com óleo de chia promoveu um aumento na tolerância à glicose e na glicemia de jejum e pós-prandial, além de redução nos níveis séricos de insulina e aumento da translocação do GLUT4 para a membrana do músculo esquelético. Em conjunto, esses dados indicam que a suplementação com óleo de chia modifica o metabolismo da glicose nesses animais, tornando-os mais sensíveis a insulina, porém levando a uma possível ativação das vias glicolítica e gliconeogênica, o que justificaria o aumento da glicemia de jejum. Esses resultados reforçam ainda mais a importância de se estudar o efeito de compostos isolados de alimentos sobre a saúde de indivíduos saudáveis que, muitas vezes, fazem uso desses componentes sem saber se eles apresentam riscos à saúde.

É bem estabelecido que a dislipidemia seja um dos principais fatores que correlacionam a obesidade ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e outras comorbidades (KLOP, ELTE e CABEZAS, 2013). Em relação a terapêutica das dislipidemias, já foi demonstrado que o uso de AG- ω 3, principalmente EPA, atua positivamente na melhora da hipertrigliceridemia (BRINTON e MASON, 2017). Aqui, observamos que a suplementação com óleo de chia reduziu os níveis de triglicerídeos plasmáticos e aumentou os níveis da fração de colesterol HDL em animais obesos, demonstrando o papel do óleo de chia sobre a prevenção de um dos principais fatores de risco que relacionam a obesidade ao surgimento das doenças cardiovasculares.

Por outro lado, a suplementação com óleo de chia de animais eutróficos aumentou os níveis da fração de colesterol LDL, mostrando mais uma vez um papel ambíguo da suplementação com óleo de chia em animais saudáveis. Este efeito pode estar associado a um conhecido papel do DHA sobre os níveis de colesterol LDL. Na literatura, alguns estudos já demonstraram que o uso de DHA por pacientes hipertrigliceridêmicos (>500 mg/dL) está associado a um aumento de LDL, o que inviabiliza o seu uso terapêutico por comprometer os objetivos do tratamento

(BRINTON e MASON, 2017; DAVIDSON, 2013; JACOBSON et al., 2012; WEI e JACOBSON, 2011).

Outro evento importante que atua no comprometimento da saúde metabólica num quadro de obesidade é o remodelamento do tecido adiposo (TANG et al., 2017; WINER et al., 2016; ASTERHOLM et al., 2014; HALBERG et al., 2009). O local de expansão (compartimento subcutâneo ou visceral) e a forma de expansão (hiperplasia e/ou hipertrofia) são alguns dos fatores que impactam sobre as alterações metabólicas que levam ao desenvolvimento das comorbidades num quadro de obesidade (CHAIT & HARTIGH, 2020; GONZÁLEZ et al., 2017; WINER et al., 2016). Em nosso estudo, demonstramos que a suplementação dietética com óleo de chia reduziu a massa do TA epididimal. Além disso, observamos que o óleo de chia foi capaz de diminuir o volume dos adipócitos nesse compartimento de TA, sem alterar o número dessas células, indicando um efeito sobre a hipertrofia, porém sem afetar a hiperplasia. A análise in vitro do potencial de proliferação e de diferenciação das células-tronco mesenquimais, precursoras de adipócitos, isoladas da fração vascular do estroma do tecido adiposo epididimal de animais obesos corrobora os resultados acima, uma vez que no grupo HC não observamos nenhuma alteração na proliferação, porém houve um aumento do potencial de diferenciação dessas células, quando comparado ao grupo H.

Já no TA subcutâneo, observamos que embora a suplementação com óleo de chia não tenha alterado a massa do tecido, ela aumentou o número e reduziu o volume dos adipócitos contidos nele, indicando um caráter mais hiperplásico. A análise in vitro das CTMs isoladas da fração vascular do estroma do TAS, não demonstrou um efeito da suplementação com óleo de chia sobre o potencial proliferativo e de diferenciação dessas células. Esses resultados indicam que a suplementação com óleo de chia em animais obesos atua diferencialmente sobre o remodelamento hiperplásico e hipertrófico dos compartimentos adiposo subcutâneo e epididimal, contudo nos mostram também que no compartimento subcutâneo essa resposta foi dissociada do potencial proliferativo e de diferenciação observado in vitro.

Nos animais eutróficos, a suplementação com óleo de chia promoveu um aumento na massa dos dois compartimentos de tecido adiposo, contudo não alterou a área nem o número de adipócitos destes. No entanto, quando colocados sob os protocolos in vitro de proliferação e diferenciação, observamos que a suplementação

com óleo de chia induziu a proliferação das CTMs isoladas de ambos os compartimentos, porém induzindo a diferenciação apenas nas células isoladas do compartimento epididimal. Novamente, esses resultados nos mostram que o efeito da suplementação com óleo de chia sobre o remodelamento dos diferentes compartimentos de tecido adiposo parecem não estar totalmente associados em condições *in vivo* e *in vitro*, sugerindo que outros fatores associados aos tecidos podem estar contribuindo para a resposta *in vivo*.

Dentre os fatores que poderiam explicar esse efeito diferencial da suplementação com óleo de chia sobre a hiperplasia e a hipertrofia de adipócitos nos diferentes compartimentos de tecido adiposo, destaca-se a inflamação. Estudos recentes demonstraram que a sinalização pró-inflamatória no adipócito é necessária para o remodelamento e expansão adequados do tecido adiposo, mesmo na ausência de obesidade (DAM, SIKDER e SANTOSA 2016; ASTERHOLM et al., 2014). Aqui demonstramos que a suplementação com óleo de chia na obesidade modificou o perfil de adipo/citocinas secretadas pelo TAS e TAE.

No compartimento de tecido adiposo subcutâneo de animais obesos, a suplementação com óleo de chia foi capaz de aumentar os níveis de IL-10, uma importante citocina anti-inflamatória e imunossupressora, secretada não só por adipócitos, mas também por células do sistema imune, como os macrófagos M2, que é capaz de melhorar a sensibilidade à insulina (DAGDEVIREN et al., 2017; LUMENG et al., 2007). Em outro estudo do grupo submetido recentemente, também vimos que a suplementação com óleo de chia aumenta os níveis desta citocina no TA perivascular de animais obesos, com consequente redução dos níveis de IL-1 β (ASSIS-FERREIRA et al., submetido ao Br. J. of Nutrition). Além disso, em animais eutróficos a suplementação com óleo de chia aumentou os níveis de IL-10 secretados pelo TAE, porém não afetou a secreção desta citocina pelo TAS desses animais. Esse aumento dos níveis de IL-10 observado nesse e no outro estudo podem estar associados a maresina 1, um mediador lipídico pró resolutivo, produzido a partir da metabolização de EPA e DHA, tendo em vista que já foi demonstrado que maresina 1 é capaz de induzir um aumento na secreção de IL-10, o que ocasionou melhora na sensibilidade à insulina e atenuou a inflamação no tecido adiposo epididimal de camundongos geneticamente obesos (ob/ob) ou induzidos por HFD (MARTINEZ-FERNANDEZ et al., 2017).

Em relação aos mecanismos propostos para a ação de IL-10 sobre a

adipogênese, já foi descrito que ela é capaz de inibir o recrutamento do ATF (fator de transcrição ativador), um fator de transcrição, envolvido com a redução do gasto calórico e aumento da massa do tecido adiposo (LIU et al., 2019; RAJBHANDARI et al., 2018). Contudo, mais estudos são necessários para elucidar o papel da IL-10 e seu mecanismo de ação sobre o remodelamento do tecido adiposo em nosso modelo experimental.

Ainda no TAS de animais obesos, observamos que a suplementação com óleo de chia foi capaz de reduzir os níveis de MCP-1, um potente fator quimiotático para monócitos, secretado por adipócitos e outras células, em resposta a estímulos, tais como TNF- α e, que está associado a obesidade e ao quadro de resistência à insulina (DESHMANE et al., 2009). A ação de MCP-1 no remodelamento e expansão do TAB já foi descrita desde 2003, num estudo onde os autores demonstraram que a adição de MCP-1 na cultura de adipócitos diferenciados diminui a captação de glicose estimulada por insulina e a expressão de vários genes adipogênicos, como o LPL, a adiposina, o GLUT4, o aP2 e o PPAR- γ , sugerindo que o aumento de MCP-1 pode induzir a desdiferenciação de adipócitos e contribuir para patologias associadas à hiperinsulinemia e obesidade, incluindo diabetes tipo II (SARTIPY e LOSKUTOFF, 2003). Desta forma, acreditamos que a diminuição nos níveis de MCP-1 observada possa estar relacionada ao aumento da hiperplasia/hipertrofia observada nesse depósito adiposo.

No compartimento adiposo epididimal, observamos que a suplementação com óleo de chia reduziu os níveis de IL-10 e aumentou os níveis de TNF- α secretado, sem alterar os níveis das outras citocinas analisadas (leptina, MCP-1 e IL-1 β). O conceito de adipogênese induzida por inflamação parece contraditório à primeira vista, uma vez que citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , são lipolíticas e bloqueiam a diferenciação de adipócitos *in vitro* (GUSTAFSON e SMITH, 2015), contudo, a redução na capacidade de resposta a estímulos pró-inflamatórios pelo adipócito diminui a sua capacidade de expansão e remodelamento funcional, o que pode resultar num quadro de acúmulo ectópico de gordura e disfunção metabólica (ASTERHOLM et al., 2014). Neste estudo, nós também observamos que a suplementação com óleo de aumentou a secreção de TNF- α pelo TAS e TAE dos animais eutróficos.

Quanto ao papel do TNF- α no processo adipogênico durante a obesidade, nosso grupo demonstrou que, anterior ao quadro de metainflamação (não observada

no nosso modelo experimental de obesidade), ocorre um aumento na secreção de TNF- α na medula óssea que é capaz de programar as células precursoras de adipócitos para um fenótipo pró-adipogênico (SILVA et al., 2016). Além disso, observamos que esta citocina induz o aumento da expressão do receptor quimiotático CXCR4 nessas células, aumentando a sua capacidade migratória e proliferativa, para o TAE (ASSIS-FERREIRA et al., 2021), sugerindo um importante papel dessa citocina no remodelamento e na funcionalidade do TA. Outros estudos também suportam um papel da inflamação local no aumento da adipogênese. Um estudo in vivo demonstrou que diferentes condições adipogênicas estão associadas a regulação positiva de vários genes inflamatórios, incluindo o TNF- α , em macrófagos associados ao tecido adiposo branco (LEE et al., 2013). Desta forma, fica clara a importância do TNF- α no processo de remodelamento do tecido adiposo, entretanto, são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos envolvidos nesta resposta.

Em relação a leptina, observamos que a obesidade induziu um aumento significativo na secreção de leptina pelo TAE, sem modificar essa secreção pelo TAS. Em ambos os casos, a suplementação com óleo de chia não alterou significativamente a secreção desta adipocina. A leptina vem sendo descrita como um fator importante no remodelamento do tecido adiposo (KOBAYASHI et al., 2020; BERG, BARCHUK e MIKSZTOWICZ, 2019). O aumento na produção de leptina pelo TA é um processo típico da obesidade e está relacionado ao aumento da massa (hipertrofia) deste tecido, além de atuar no seu remodelamento vascular, podendo ser um indicativo da capacidade funcional do tecido adiposo (LANDECHO et al., 2019; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 2014). Neste contexto, já foi observado em camundongos obesos alimentados com HFD (60% da energia derivada de gorduras), que a resistência à insulina estava associada à fibrose do tecido adiposo epididimal e à diminuição da expressão gênica de adiponectina e leptina neste tecido, sugerindo que a restrição da capacidade de expansão pode estar associada à perda da função tecidual relacionada a fibrose (MARCELIN et al., 2017). Em nosso modelo experimental de obesidade, a capacidade de expansão dos diferentes compartimentos adiposos parece ainda se manter e por isso não observamos nenhum efeito do óleo de chia sobre a produção de leptina nos tecidos.

Nos animais eutróficos, embora tenhamos observado que a suplementação com óleo de chia aumentou a massa de ambos os compartimentos de tecido

adiposo, não observamos alterações significativas na secreção de leptina. É importante destacar que o aumento na massa dos tecidos adiposos não se refletiu num aumento da massa corporal nem da massa adiposa nesses animais, além disso, também não observamos um aumento na hipertrofia nem na hiperplasia em nenhum dos compartimentos adiposos. Desta forma, sugerimos que o aumento observado na massa dos tecidos adiposos possa não ter sido suficiente para alterar a secreção de leptina, ou ainda, que esse aumento da massa esteja relacionado ao aumento de outros componentes do tecido adiposo, que não os adipócitos.

Embora a suplementação com óleo de chia não tenha modificado a secreção de IL-1 β em nenhum dos compartimentos de tecido adiposo avaliados, sob nenhuma condição (eutrófico ou obeso), chamamos atenção para o fato do óleo de chia ter reduzido drasticamente, porém não significativamente ($p=0,0577$), os níveis de IL-1 β secretados pelo TA epididimal de animais obesos. Dentre outras funções, a IL-1 β é uma citocina relacionada a ativação do inflamassoma induzido por NLRP3 (ZHU et al., 2019; MARTINEZ-MICAELO et al., 2016), além de induzir disfunções nos adipócitos, desregulação metabólica e resistência à insulina (MCARDLE et al., 2013). Já foi demonstrada uma correlação positiva, entre os níveis desta citocina no TAE e o índice de massa corporal (LINDEN et al., 2014). Com base nesse estudo, hipotetizamos que a redução não significativa dos níveis de IL-1 β no meio condicionado do tecido adiposo epididimal pode estar associada a redução da massa deste tecido. Contudo, mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Mais uma vez, nossos resultados chamam atenção para o fato do óleo de chia atuar diferencialmente nos dois depósitos de tecido adiposo. Essa ação pode ser explicada pela natureza distinta desses dois compartimentos de tecido adiposo. Enquanto o tecido adiposo subcutâneo é descrito como um compartimento que apresenta um papel protetor no desenvolvimento de complicações metabólicas (PELLEGRINELLI et al., 2016), o TAE é mais relacionado com o desenvolvimento do estado dismetabólico (SPIEGELMAN e FLIER, 2001).

Outro possível mecanismo que poderia explicar os efeitos da suplementação com óleo de chia no remodelamento do TAB na obesidade, é o processo de browning do TA. Este processo tem sido abordado como sendo capaz de atenuar alguns dos efeitos da obesidade, por potencializar o aumento do gasto calórico (LANGIN, 2010) melhorando a resistência à insulina (KUSMINSKI et al., 2012). Em

estudo anterior nosso grupo já demonstrou que a suplementação com óleo de chia, desde o desmame, induziu o browning no TAS de camundongos swiss (De SOUZA et al., 2020). No presente estudo, demonstramos que a obesidade diminui a expressão gênica de PGC-1 α em ambos os compartimentos de tecido adiposo e a suplementação dietética com óleo de chia foi capaz de induzir um aumento, embora não significativo ($p=0,0503$), nos níveis de RNAm deste gene no compartimento subcutâneo, mas não no epididimal. Em relação a expressão gênica de UCP-1 nossos dados demonstram que a suplementação dietética com óleo de chia aumentou os níveis de RNAm deste gene no TAS, sem afetar no TAE. Alguns estudos já demonstraram que nem todo adipócito bege expressa marcadamente UCP-1 (DENG et al., 2019; IKEDA et al., 2017; WANG et al., 2016). Uma vez que esse mecanismo termogênico pode acontecer de maneira independente de UCP (IKEDA et al., 2017), nossa hipótese é que a chia parece atuar induzindo o browning de maneiras diferentes em ambos os compartimentos de tecido adiposo, respondendo de maneira mais sensível, via UCP-1, nos adipócitos do TAS e possivelmente de maneira independente de UCP-1 no TAE.

A análise por metabolômica tem sido utilizada em estudos de obesidade para comparar os perfis dos metabólitos circulantes de indivíduos obesos e eutróficos, porém pouco se sabe sobre o efeito desses metabólitos sobre o remodelamento do TAB e, principalmente, diferenciando os compartimentos subcutâneo e visceral. Nesse sentido, nosso estudo é um dos primeiros a avaliar e comparar a secreção de metabólitos por dois diferentes compartimentos de tecido adiposo (HO et al., 2016; BOULET et al., 2015; BÖHM et al., 2014; CHEN et al., 2013; BLACHNIO-ZABIELSKA et al., 2012).

A análise dos metabólitos presentes nos meios condicionados dos tecidos adiposo subcutâneo e epididimal após 24 horas identificou um total de 197 compostos. A análise entre os tecidos (subcutâneo versus epididimal) mostrou que alguns metabólitos se encontram em níveis diferentes entre os dois tecidos. Com base nas nossas análises, vimos que nomeio condicionado do tecido adiposo subcutâneo de animais HC houve um aumento nos níveis de tirosina e frutose 2,6 bifosfato quando comparado ao TAE. Nos grupos controle e obeso não foram identificadas alterações nos níveis de metabólitos produzidos entre o TAS e o TAE. A possível relação entre as alterações da secreção dos metabólitos entre os grupos será discutida a seguir.

A análise multivariada dos metabólitos presentes no TAS ou no TAE entre os grupos mostrou alterações na presença dos seguintes metabólitos: tirosina, triptofano e frutose 1,6 bifosfato no TAS e lactato no TAE.

Os aminoácidos estão surgindo como uma nova classe de moléculas eficazes na etiologia da obesidade, neste sentido, a tirosina e o triptofano são aminoácidos precursores metabólicos de neurotransmissores como dopamina e serotonina, que desempenham papel crítico na regulação do metabolismo energético, na atividade locomotora e no comportamento alimentar (KENNY, 2011; VOLKOW e WISE, 2005). O efeito da serotonina nos processos metabólicos se dá pela ativação de uma via de sinalização nos neurônios hipotalâmicos (BURKE e HEISLER, 2015).

Recentemente, um estudo avaliou a possibilidade de modulação dos processos metabólicos aumentando a disponibilidade de tirosina e triptofano na dieta de ratos Wistar obesos alimentados com HFD por 64 dias. Foi visto que a suplementação com tirosina levou à normalização dos níveis de triglicerídeos e colesterol LDL, e o triptofano levou a normalização do peso corporal dos ratos obesos (SHIPELIN et al., 2021). Além disso, já foi relatado que os níveis de tirosina na dieta estão negativamente associados a resistência à insulina em crianças obesas (HELLMUTH et al., 2016). Aqui, demonstramos que a dieta hiperlipídica não alterou os níveis de tirosina no TAS de animais obesos, contudo a suplementação dietética com óleo de chia foi capaz de aumentar esses níveis.

Em relação ao triptofano, Takashina e colaboradores demonstraram que este aminoácido está positivamente associado a área da gordura visceral (TAKASHINA et al., 2016), porém no nosso estudo os níveis de triptofano no compartimento epididimal não apresentaram diferença entre os grupos, já no compartimento subcutâneo a obesidade induziu aumento nos níveis de triptofano e a suplementação com óleo de chia não modificou esses níveis.

A frutose 1,6 bifosfato é um metabólito intermediário altamente energético da glicólise, que se apresentou aumentado no meio condicionado do TAS de animais obesos comparado ao controle, porém a suplementação com óleo de chia não foi capaz de modificar estes níveis. Na literatura, poucos estudos identificaram alterações na produção deste intermediário na obesidade (YAMATANI et al., 2014; ANDRIKOPOULOS et al., 1996), dentre estes, o estudo de Yamatani e colaboradores (2014) identificou um aumento da frutose 1,6 bifosfato no TAS de mulheres obesas pós menopausa e mostrou que esse aumento estava

correlacionado com um melhor metabolismo de ácidos graxos neste tecido, quando comparado ao TAE (YAMATANI et al., 2014).

Embora os dados da análise por metabolômica pareçam promissores, mais estudos devem ser conduzidos para relacionar as alterações de cada um desses metabólitos ao remodelamento do tecido adiposo na obesidade e o papel da suplementação com óleo de chia.

O lactato tem sido identificado como um metabólito importante em diferentes estudos (medeia efeitos antilipolíticos, aumento da diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1; e indução de browning no TAB, por exemplo) e parece ter um potencial papel na biologia do tecido adiposo (HARADA et al., 2018; AHMED et al., 2010). Dados da literatura mostram que o lactato é capaz de modular a capacidade oxidativa dos tecidos adiposos com perfil mais termogênico (LAGARDE et al., 2021; CARRIERE et al., 2020), como o tecido adiposo subcutâneo, onde ele atua como uma molécula sinalizadora, controlando a produção de ROS e aumentando a transcrição de genes envolvidos na biogênese mitocondrial (TAUFFENBERGER et al., 2019; HASHIMOTO et al., 2007). Em nosso estudo, identificamos que a suplementação com óleo de chia aumenta a secreção de lactato apenas no TAE, sem alteração no TAS. Esse resultado indica que o óleo de chia parece modular positivamente a produção de lactato no tecido adiposo epididimal, onde o mesmo poderia atuar de forma autócrina e/ou parácrina, regulando a biologia deste tecido e sua atividade metabólica. (HARADA et al., 2018; AHMED et al., 2010).

Sabe-se que as células adiposas do TAB têm a capacidade de converter grande parte da glicose metabolizada em lactato (KRYCER et al., 2020; ROTONDO et al., 2019), contudo, em nossas análises, não identificamos alterações nos níveis de glicose no meio condicionado em nenhum dos compartimentos de tecido adiposo entre os grupos. Essa ausência de diferença na concentração de glicose pode ser justificada pelo fato de o meio de cultura utilizado para a obtenção do meio condicionado conter uma quantidade significativa de glicose (4500 mg/L), que apesar de estar sendo captada pelo tecido para a produção de lactato, não foi suficiente para mostrar-se diferente nas análises. Sabe-se ainda que a produção de lactato pelos adipócitos pode acontecer de maneira não dependente da disponibilidade direta de glicose, com o uso de fontes alternativas de carbono, como glicogênio, por exemplo (KRYCER et al., 2020).

Na obesidade, a disponibilidade de oxigênio no tecido adiposo encontra-se

diminuída (HODSON et al., 2013), favorecendo a produção de lactato para geração de ATP citosólico em um tecido que tem baixa capacidade de gerar esse ATP oxidativamente (KRYCER et al., 2020). Contudo, em nossos resultados não observamos diferença nos níveis de lactato entre o grupo obeso e controle em nenhum dos tecidos analisados. De fato, o nosso modelo de obesidade não se assemelha a um quadro de obesidade grave, onde são observadas aumento nos níveis séricos de citocinas inflamatórias, um quadro de hipóxia no tecido adiposo e fibrose tecidual (BAIGES-GAYA et al., 2021; PILLING, KARHADKAR e GOMER, 2021; SETYANINGSIH et al., 2021; MARCELIN et al., 2017).

Nos animais eutróficos, a análise entre os tecidos mostrou um aumento nos níveis de triptofano e treonina no meio condicionado do TAE dos animais suplementados com óleo de chia, quando comparado ao compartimento subcutâneo. A análise multivariada dos metabólitos presentes no TAS e no TAE mostrou que a suplementação com o óleo de chia reduziu a secreção de lactato pelo TAE, sem alterações no TAS. Assim, ao contrário do que observamos no modelo de obesidade, a suplementação com óleo de chia nos animais eutróficos aumenta a sensibilidade à insulina, porém essa resposta não parece estar relacionada ao aumento do fluxo glicolítico no tecido adiposo e, subsequente, produção de lactato.

Evidências dos últimos anos vêm mostrando que altos níveis séricos de lactato podem ser usados como marcador da gravidade e do desfecho clínico dos pacientes sépticos, estando associado a fase imunossupressora da sepse (NOLT et al., 2018). Em paralelo, o lactato derivado de tumores tem efeito imunossupressor sobre as células imunes, levando a polarização M2 de macrófagos associados ao tumor, os TAMs (COLEGIO et al., 2014). As evidências, portanto, sugerem que o aumento da concentração de lactato pode alterar significativamente a função das células imunes durante a inflamação.

Neste contexto, testamos a hipótese se o lactato produzido pelo tecido adiposo de animais com obesidade suplementados com óleo de chia poderia induzir a polarização de macrófagos RAW 264.7, porém não observamos alterações na expressão de iNOS (marcador M1) e Arginase-1 (marcador M2). Vários fatores podem ter contribuído para o insucesso dessa abordagem, tais como o tempo de incubação (24 horas), a presença de outros fatores no meio que poderiam estar regulando a expressão dessas enzimas, dentre outros. Por isso, pretendemos reformular a abordagem experimental desse ensaio para minimizar os vieses

envolvidos.

Nossos resultados mostram que os macrófagos RAW264.7 quando estimulados com meio condicionado do TAS de animais obesos apresentou maior captação de glicose em comparação aos macrófagos M2, visto pelos níveis reduzidos de concentração de glicose no meio. Curiosamente, os outros grupos não apresentaram diferenças nos níveis de glicose e lactato em nenhum dos compartimentos de tecido adiposo, que seriam resultados importantes para a comprovação do modelo, visto que os macrófagos com fenótipo M1 são altamente glicolíticos, enquanto os com fenótipo M2 são menos glicolíticos e mais oxidativos (VAN DEN BOSSCHE, 2017; NAGY e HASCHEMI, 2015). Podemos perceber que o modelo experimental não obteve o desempenho esperado, sendo necessário novos ajustes.

A identificação do lactato como fator de polarização dos macrófagos M1 do TA obeso, para um fenótipo M2, com perfil anti-inflamatório, pode auxiliar a preservar a função normal dos adipócitos, promover o reparo tecidual e o remodelamento funcional deste tecido (MANOSALVA et al., 2021; LAGARDE et al., 2021; OHASHI et al., 2017; JEANSON et al., 2016). Com base nessa afirmação, após a padronização com as células RAW 264.7, nosso grupo refinará os estudos utilizando o modelo de células BMDM (macrófagos derivados de medula óssea), a fim de validar os resultados no modelo experimental “padrão ouro” de estudos com macrófagos murinos e correlacionar os resultados observados com o remodelamento morfofuncional apresentamos nesta tese.

CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que a suplementação com óleo de chia em animais obesos e eutróficos induz o remodelamento do tecido adiposo branco, atuando de maneira distinta no compartimentos subcutâneo e epididimal e promovendo um aumento da sensibilidade a insulina. Enquanto nos animais obesos, esse efeito mostrou-se benéfico por melhorar a resistência à insulina, a composição corporal, diminuir os níveis séricos de triglicerídeos e aumentar o colesterol HDL, nos animais eutróficos essa resposta parece comprometer o metabolismo de glicose, aumentando a glicemia de jejum e os níveis séricos de colesterol LDL. Além desses efeitos, mostramos de forma inédita que a obesidade e a suplementação com óleo de chia são capazes de modificar o perfil de metabólitos secretados pelos diferentes compartimentos de tecido adiposo, porém a maneira como cada um desses metabólitos interfere nas etapas envolvidas no processo de remodelamento do tecido adiposo ainda precisa ser melhor estudada. Com base nos dados apresentados nessa tese, sugerimos que a suplementação com óleo de chia pode atuar como um agente terapêutico na prevenção e no combate da disfunção metabólica associada à obesidade. Entretanto, o seu uso por indivíduos eutróficos saudáveis não se mostrou seguro, devendo ser desestimulado. Além disso, outra questão que se levanta a partir dos nossos resultados é se essas ações da suplementação de óleo de chia em camundongos magros os impedirão dos efeitos nocivos de uma sobrecarga nutricional, contudo mais estudos são necessários para se avaliar essa hipótese.

REFERÊNCIAS

- ABESO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. – 4.ed. - São Paulo, SP, 2016. Disponível em: <http://www.abeso.org.br>. Acesso em: 22 de janeiro de 2020
- AFSHIN, Ashkan et al. The prospective impact of food pricing on improving dietary consumption: a systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 12, n. 3, p. e0172277, 2017.
- AHMED, Kashan et al. An autocrine lactate loop mediates insulin-dependent inhibition of lipolysis through GPR81. **Cell metabolism**, v. 11, n. 4, p. 311-319, 2010.
- ALBERTS, Bruce et al. **Biologia molecular da célula**. Artmed Editora, 2010.
- AL-SOFIANI, Mohammed E.; GANJI, Suneeta S.; KALYANI, Rita R. Body composition changes in diabetes and aging. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 33, n. 6, p. 451-459, 2019.
- ANDERSEN, Lene Frost et al. Evaluation of a food frequency questionnaire with weighed records, fatty acids, and alpha-tocopherol in adipose tissue and serum. **American journal of epidemiology**, v. 150, n. 1, p. 75-87, 1999.
- ANDRIKOPOULOS, Sofianos et al. Impaired regulation of hepatic fructose-1, 6-bisphosphatase in the New Zealand Obese mouse: an acquired defect. **Metabolism**, v. 45, n. 5, p. 622-626, 1996.
- ARNER, P. Regional adiposity in man. **Journal of Endocrinology**, v. 155, n. 2, p. 191-192, 1997.
- ASSIS-FERREIRA, Agatha de et al. Obesity enhances the recruitment of mesenchymal stem cells to visceral adipose tissue. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 67, n. 1, p. 15-26, 2021.
- 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.
- ATHYROS, Vasilios G. et al. Should adipokines be considered in the choice of the treatment of obesity-related health problems?. **Current drug targets**, v. 11, n. 1, p. 122-135, 2010.
- AYERZA, R.; COATES, W. Effect of dietary α linolenic fatty acid derived from chia when fed as ground seed, whole seed and oil on lipid content and fatty acid composition of rat plasma. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 51, n. 1, p. 27-34, 2007.
- AYERZA, R; COATES, W.; 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.

BAI, Yuntao; SUN, Qinghua. Macrophage recruitment in obese adipose tissue. **Obesity Reviews**, v. 16, n. 2, p. 127-136, 2015.

BAIGES-GAYA, Gerard et al. Hepatic metabolic adaptation and adipose tissue expansion are altered in mice with steatohepatitis induced by high-fat high sucrose diet. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 89, p. 108559, 2021.

BAKER, Ella J. et al. Metabolism and functional effects of plant-derived omega-3 fatty acids in humans. **Progress in Lipid Research**, v. 64, p. 30-56, 2016.

BALIĆ, Anamaria et al. Omega-3 versus omega-6 polyunsaturated fatty acids in the prevention and treatment of inflammatory skin diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 3, p. 741, 2020.

BARABINO, Stefano et al. The role of systemic and topical fatty acids for dry eye treatment. **Progress in retinal and eye research**, v. 61, p. 23-34, 2017.

BAYLIN, Ana et al. Fatty acid composition of Costa Rican foods including trans fatty acid content. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3-4, p. 182-192, 2007.

BELTRAN-OROZCO, M. C.; ROMERO, M. R. La Chia, Alimento Milenario, Departamento de Graduados e Investigacion en Alimentos. **ENCB, IPN, Mexico**, 2003.

BERG, Gabriela; BARCHUK, Magalí; MIKSZTOWICZ, Verónica. Behavior of metalloproteinases in adipose tissue, liver and arterial wall: an update of extracellular matrix remodeling. **Cells**, v. 8, n. 2, p. 158, 2019.

BINGOL, Kerem et al. Unified and isomer-specific NMR metabolomics database for the accurate analysis of ^{13}C - ^1H HSQC spectra. **ACS chemical biology**, v. 10, n. 2, p. 452-459, 2015.

BJORBÆK, Christian; KAHN, Barbara B. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. **Recent progress in hormone research**, v. 59, p. 305-332, 2004.

BLACHNIO-ZABIELSKA, Agnieszka U. et al. Sphingolipid content of human adipose tissue: relationship to adiponectin and insulin resistance. **Obesity**, v. 20, n. 12, p. 2341-2347, 2012.

BÖHM, Anja et al. Metabolic signatures of cultured human adipocytes from metabolically healthy versus unhealthy obese individuals. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e93148, 2014.

BORGES, Maraisa D. et al. Relationship between proinflammatory cytokines/chemokines and adipokines in serum of young adults with

obesity. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)**, v. 18, n. 3, p. 260-267, 2018.

BOSTRÖM, Pontus et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature**, v. 481, n. 7382, p. 463-468, 2012.

BOULET, Marie Michèle et al. Alterations of plasma metabolite profiles related to adipose tissue distribution and cardiometabolic risk. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 309, n. 8, p. E736-E746, 2015.

BOUSTANY, Carine M. et al. AT1-receptor antagonism reverses the blood pressure elevation associated with diet-induced obesity. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 289, n. 1, p. R181-R186, 2005.

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

BRINTON, Eliot A.; MASON, R. Preston. Prescription omega-3 fatty acid products containing highly purified eicosapentaenoic acid (EPA). **Lipids in health and disease**, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2017.

BURDGE, G. C. Metabolism of α -linolenic acid in humans. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, v. 75, n. 3, p. 161-168, 2006.

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

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

BURKE, Luke K.; HEISLER, L. K. 5-hydroxytryptamine medications for the treatment of obesity. **Journal of neuroendocrinology**, v. 27, n. 6, p. 389-398, 2015.

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

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

CARRIÈRE, Audrey et al. The emerging roles of lactate as a redox substrate and signaling molecule in adipose tissues. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 76, n. 2, p. 241-250, 2020.

CARROLL, Joan F.; ZENEBE, Woineshet J.; STRANGE, Taylor B. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. **Hypertension**, v. 48, n. 1, p. 65-72, 2006.

CHAIT, Alan; DEN HARTIGH, Laura J. Adipose tissue distribution, inflammation and its metabolic consequences, including diabetes and cardiovascular disease. **Frontiers in cardiovascular medicine**, v. 7, p. 22, 2020.

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

CHEN, Tianlu et al. Random forest in clinical metabolomics for phenotypic discrimination and biomarker selection. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

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

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

CHU, Dinh-Toi; TAO, Yang. Human thermogenic adipocytes: a reflection on types of adipocyte, developmental origin, and potential application. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 1-4, 2017.

CINTI, Saverio et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **Journal of lipid research**, v. 46, n. 11, p. 2347-2355, 2005.

CINTI, Saverio. Pink adipocytes. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 29, n. 9, p. 651-666, 2018.

CINTRA, Dennys EC et al. Lipid profile of rats fed high-fat diets based on flaxseed, peanut, trout, or chicken skin. **Nutrition**, v. 22, n. 2, p. 197-205, 2006.

COELHO, Desiré Ferreira et al. Effect of high-fat diets on body composition, lipid metabolism and insulin sensitivity, and the role of exercise on these parameters. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 10, p. 966-972, 2011.

COELHO, Marisa; OLIVEIRA, Teresa; FERNANDES, Ruben. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. **Archives of medical science: AMS**, v. 9, n. 2, p. 191, 2013.

COLEGIO, Oscar R. et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. **Nature**, v. 513, n. 7519, p. 559-563, 2014.

CORRÊA, Luís Henrique; HEYN, Gabriella Simões; MAGALHAES, Kelly Grace. The

impact of the adipose organ plasticity on inflammation and cancer progression. **Cells**, v. 8, n. 7, p. 662, 2019.

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

CURAT, Cyrile A. et al. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. **Diabetes**, v. 53, n. 5, p. 1285-1292, 2004.

D'ESPOSITO, V. et al. Adipocyte-released insulin-like growth factor-1 is regulated by glucose and fatty acids and controls breast cancer cell growth in vitro. **Diabetologia**, v. 55, n. 10, p. 2811-2822, 2012.

DA SILVA MARINELI R. et al. Chia (*Salvia hispanica* L.) enhances HSP, PGC1 α expressions and improves glucose tolerance in diet induced obese rats. **Nutrition**, v. 31, n. 5, p. 740-748, 2015

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

DA SILVA, Bárbara Pereira et al. Effects of chia (*Salvia hispanica* L.) on calcium bioavailability and inflammation in Wistar rats. **Food Research International**, v. 116, p. 592-599, 2019.

DA SILVA, Bárbara Pereira et al. Effects of chia (*Salvia hispanica* L.) on calcium bioavailability and inflammation in Wistar rats. **Food Research International**, v. 116, p. 592-599, 2019.

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

DAGDEVIREN, Sezin et al. IL-10 prevents aging-associated inflammation and insulin resistance in skeletal muscle. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 2, p. 701-710, 2017.

DAM, V.; SIKDER, T.; SANTOSA, S. From neutrophils to macrophages: differences in regional adipose tissue depots. **Obesity Reviews**, v. 17, n. 1, p. 1-17, 2016.

DAVIDSON, Michael H. Omega-3 fatty acids: new insights into the pharmacology and biology of docosahexaenoic acid, docosapentaenoic acid, and eicosapentaenoic acid. **Current opinion in lipidology**, v. 24, n. 6, p. 467-474, 2013.

DE MIRANDA, Danielle Araujo et al. Chia flour (*Salvia hispanica* L.) did not improve the deleterious aspects of hyperlipidic diet ingestion on glucose metabolism, but worsened glycaemia in mice. **Food Research International**, v. 121, p. 641-647, 2019.

DE SOUZA, Thamiris et al. Chia oil induces browning of white adipose tissue in high-fat diet-induced obese mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**, p. 110772, 2020.

DENG, Hong et al. The Combination of Aerobic and Resistance Exercise Induces Weight Loss via the PGC-1 α /Irisin/UCP-1 Pathway. **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering**, v. 9, n. 10, p. 1388-1394, 2019.

DESHMANE, Satish L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **Journal of interferon & cytokine research**, v. 29, n. 6, p. 313-326, 2009.

DIEZ, Juan J.; IGLESIAS, Pedro. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. **Eur J Endocrinol**, v. 148, n. 3, p. 293-300, 2003.

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

DU TOIT, Eugene F.; NABBEN, Marinda; LOCHNER, Amanda. A potential role for angiotensin II in obesity induced cardiac hypertrophy and ischaemic/reperfusion injury. **Basic research in cardiology**, v. 100, n. 4, p. 346-354, 2005.

EL-BADRY, Ashraf Mohammad; GRAF, Rolf; CLAVIEN, Pierre-Alain. Omega 3–omega 6: what is right for the liver?. **Journal of hepatology**, v. 47, n. 5, p. 718-725, 2007.

ENERBÄCK, Sven. Adipose tissue plasticity and new therapeutic targets. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, n. 2, p. 69-70, 2013.

ENES, Bárbara N. et al. Chia seed (Salvia hispanica L.) effects and their molecular mechanisms on unbalanced diet experimental studies: A systematic review. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 2, p. 226-239, 2020.

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.

ESPOSITO, Katherine et al. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 3, p. 1055-1058, 2003.

ETO, Hitomi et al. Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 124, n. 4, p. 1087-1097, 2009.

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

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

FERNANDES, Sibeles Santos et al. Yield and quality of chia oil extracted via different methods. **Journal of Food Engineering**, v. 262, p. 200-208, 2019.

FERNANDEZ, Stefan et al. Inhibition of IL-10 receptor function in alveolar macrophages by Toll-like receptor agonists. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 4, p. 2613-2620, 2004.

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.

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

FUJISAKA, Shiho et al. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. **Diabetes**, v. 58, n. 11, p. 2574-2582, 2009.

GAZEM, Ramzi Abdulrashed Abdulkhaleq et al. Physicochemical properties and in vitro anti-inflammatory effects of Indian Chia (*Salvia Hispanica* L.) seed oil. **Journal of Pharmacy and Biological Science**, v. 11, p. 1-8, 2016.

GEALEKMAN, Olga et al. Control of adipose tissue expandability in response to high fat diet by the insulin-like growth factor-binding protein-4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 26, p. 18327-18338, 2014.

GEERLING, B. J. et al. Fat intake and fatty acid profile in plasma phospholipids and adipose tissue in patients with Crohn's disease, compared with controls. **The American journal of gastroenterology**, v. 94, n. 2, p. 410-417, 1999.

GERICKE, Martin et al. A method for long-term live imaging of tissue macrophages in adipose tissue explants. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 308, n. 11, p. E1023-E1033, 2015.

GIORDANO, Antonio et al. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. **Eur J Endocrinol**, v. 170, n. 5, p. R159-71, 2014.

GONZÁLEZ, N. et al. Regulation of visceral and epicardial adipose tissue for preventing cardiovascular injuries associated to obesity and diabetes. **Cardiovascular diabetology**, v. 16, n. 1, p. 1-11, 2017.

GONZÁLEZ-MUNIESA, Pedro et al. Obesity. **Nature Reviews**, v. 3, n. 17034, p. 1-18, 2017.

GOYENS, P. L. L.; MENSINK, R. P. Effects of alpha-linolenic acid versus those of

EPA/DHA on cardiovascular risk markers in healthy elderly subjects. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 60, n. 8, p. 978-984, 2006.

GUGLIELMI, Valeria; SBRACCIA, Paolo. Obesity phenotypes: depot-differences in adipose tissue and their clinical implications. **Eating and weight Disorders-Studies on anorexia, bulimia and obesity**, v. 23, n. 1, p. 3-14, 2018.

GUSTAFSON, Birgit et al. Inflammation and impaired adipogenesis in hypertrophic obesity in man. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 297, n. 5, p. E999-E1003, 2009.

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.

GUTIERREZ, Dario A.; PUGLISI, Michael J.; HASTY, Alyssa H. Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. **Current diabetes reports**, v. 9, n. 1, p. 26-32, 2009.

HALBERG, Nils et al. Hypoxia-inducible factor 1 α induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. **Molecular and cellular biology**, v. 29, n. 16, p. 4467-4483, 2009.

HAMEDI, A. et al. Salvia macrosiphon seeds and seed oil: pharmacognostic, anti-inflammatory and analgesic properties. **Research Journal of Pharmacognosy**, v. 3, n. 4, p. 27-37, 2016.

HAMMARSTEDT, Ann et al. Impaired adipogenesis and dysfunctional adipose tissue in human hypertrophic obesity. **Physiological reviews**, v. 98, n. 4, p. 1911-1941, 2018.

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

HARADA, Naoki et al. Stereoselective effects of lactate enantiomers on the enhancement of 3T3-L1 adipocyte differentiation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 498, n. 1, p. 105-110, 2018.

HASHIMOTO, T. Hussien R, Oommen S, Gohil K, Brooks GA. **Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. FASEB J**, v. 21, p. 2602-2612, 2007.

HEINONEN, Sini et al. White adipose tissue mitochondrial metabolism in health and in obesity. **Obesity Reviews**, v. 21, n. 2, p. e12958, 2020.

HELLMUTH, Christian et al. Tyrosine is associated with insulin resistance in

longitudinal metabolomic profiling of obese children. **Journal of diabetes research**, v. 2016, 2016.

HO, Jennifer E. et al. Metabolomic profiles of body mass index in the Framingham Heart Study reveal distinct cardiometabolic phenotypes. **PloS one**, v. 11, n. 2, p. e0148361, 2016.

HODSON, Leanne et al. Metabolic signatures of human adipose tissue hypoxia in obesity. **Diabetes**, v. 62, n. 5, p. 1417-1425, 2013.

HOOPER, L. V. Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, and Gordon JI. **Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. Science**, v. 291, p. 881-884, 2001.

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

IKEDA, Kenji et al. UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis. **Nature medicine**, v. 23, n. 12, p. 1454-1465, 2017.

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

IYER, Shankar Subramanian; CHENG, Gehong. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 32, n. 1, 2012.

JACOBSON, Terry A. et al. Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on low-density lipoprotein cholesterol and other lipids: a review. **Journal of clinical lipidology**, v. 6, n. 1, p. 5-18, 2012.

JANSSEN, Ian; MARK, Amy E. Elevated body mass index and mortality risk in the elderly. **Obesity reviews**, v. 8, n. 1, p. 41-59, 2007.

JEANSON, Yannick et al. Lactate induces FGF21 expression in adipocytes through a p38-MAPK pathway. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 6, p. 685-692, 2016.

JENKINS, David JA et al. Are dietary recommendations for the use of fish oils sustainable?. **Cmaj**, v. 180, n. 6, p. 633-637, 2009.

JIANG, Shu-Zhong et al. Obesity and hypertension. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 12, n. 4, p. 2395-2399, 2016.

JULIO, Luciana M. et al. Design of microparticles of chia seed oil by using the electrostatic layer-by-layer deposition technique. **Powder Technology**, v. 345, p. 750-757, 2019.

JULIO, Luciana Magdalena et al. Development and characterization of functional O/W emulsions with chia seed (*Salvia hispanica* L.) by-products. **Journal of food science and technology**, v. 53, n. 8, p. 3206-3214, 2016.

KENNY, Paul J. Reward mechanisms in obesity: new insights and future directions. **Neuron**, v. 69, n. 4, p. 664-679, 2011.

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.

KLOP, Boudewijn; ELTE, Jan Willem F.; CABEZAS, Manuel Castro. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. **Nutrients**, v. 5, n. 4, p. 1218-1240, 2013.

KOBAYASHI, Masaki et al. Srebp-1c/Fgf21/Pgc-1 α Axis Regulated by Leptin Signaling in Adipocytes—Possible Mechanism of Caloric Restriction-Associated Metabolic Remodeling of White Adipose Tissue. **Nutrients**, v. 12, n. 7, p. 2054, 2020.

KOLIAKI, Chrysi; LIATIS, Stavros; KOKKINOS, Alexander. Obesity and cardiovascular disease: revisiting an old relationship. **Metabolism**, v. 92, p. 98-107, 2019.

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

KRYCER, James R. et al. Lactate production is a prioritized feature of adipocyte metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 1, p. 83-98, 2020.

KUSMINSKI, Christine M.; SCHERER, Philipp E. Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. **Trends in endocrinology & metabolism**, v. 23, n. 9, p. 435-443, 2012.

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.

LAGACÉ, Jean-Christophe; BROCHU, Martin; DIONNE, Isabelle J. A counterintuitive perspective for the role of fat-free mass in metabolic health. **Journal of cachexia, sarcopenia and muscle**, v. 11, n. 2, p. 343-347, 2020.

LAGARDE, Damien et al. Lactate Fluxes and Plasticity of Adipose Tissues: A Redox Perspective. **Frontiers in Physiology**, v. 12, 2021.

LANDECHO, Manuel F. et al. Relevance of leptin and other adipokines in obesity-associated cardiovascular risk. **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 2664, 2019.

LANGIN, Dominique. Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity?. **Biochimica et**

Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, v. 1801, n. 3, p. 372-376, 2010.

LEE, Ji-Eun et al. Transcriptional and epigenomic regulation of adipogenesis. **Molecular and cellular biology**, v. 39, n. 11, p. e00601-18, 2019.

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

LEE, Mi-Jeong; WU, Yuanyuan; FRIED, Susan K. Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 13, n. 4, p. 371, 2010.

LEMOINE, Amal Y.; LEDOUX, Séverine; LARGER, Etienne. Adipose tissue angiogenesis in obesity. **Thrombosis and haemostasis**, v. 110, n. 10, p. 661-669, 2013.

LI, Chaoran et al. Interferon- α -producing plasmacytoid dendritic cells drive the loss of adipose tissue regulatory T cells during obesity. **Cell Metabolism**, v. 33, n. 8, p. 1610-1623. e5, 2021.

LIN, Pao-Yen; HUANG, Shih-Yi; SU, Kuan-Pin. A meta-analytic review of polyunsaturated fatty acid compositions in patients with depression. **Biological psychiatry**, v. 68, n. 2, p. 140-147, 2010.

LINDEN, Melissa A. et al. Moderate exercise training provides modest protection against adipose tissue inflammatory gene expression in response to high-fat feeding. **Physiological reports**, v. 2, n. 7, p. e12071, 2014.

LIU, Xiaofang et al. Comparative study of DHA-enriched phospholipids and EPA-enriched phospholipids on metabolic disorders in diet-induced-obese C57BL/6J mice. **European journal of lipid science and technology**, v. 116, n. 3, p. 255-265, 2014.

LIU, Yang et al. The transcription factor ATF7 controls adipocyte differentiation and thermogenic gene programming. **IScience**, v. 13, p. 98-112, 2019.

LUMENG, Carey N. et al. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 1, p. 175-184, 2007.

MAEDA, Norikazu et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. **Nature medicine**, v. 8, n. 7, p. 731-737, 2002.

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

MANOSALVA, Carolina et al. Role of Lactate in Inflammatory Processes: Friend or Foe. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 808799-808799, 2021.

MARCELIN, Geneviève et al. A PDGFR α -mediated switch toward CD9high adipocyte progenitors controls obesity-induced adipose tissue fibrosis. **Cell metabolism**, v. 25, n. 3, p. 673-685, 2017.

MARCELIN, Geneviève et al. Deciphering the cellular interplays underlying obesity-induced adipose tissue fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 10, p. 4032-4040, 2019.

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

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, E. et al. The potential role of leptin in the vascular remodeling associated with obesity. **International journal of obesity**, v. 38, n. 12, p. 1565-1572, 2014.

MARTÍNEZ-MICAELO, N. et al. Dietary fatty acid composition is sensed by the NLRP3 inflammasome: omega-3 fatty acid (DHA) prevents NLRP3 activation in human macrophages. **Food & function**, v. 7, n. 8, p. 3480-3487, 2016.

MARZZOCO, Anita; TORRES, Bayardo Baptista. Bioquímica básica. In: **Bioquímica básica**. 2017. p. 392-392.

MCARDLE, Maeve A. et al. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. **Frontiers in endocrinology**, v. 4, p. 52, 2013.

MICHAILIDOU, Zoi et al. Increased angiogenesis protects against adipose hypoxia and fibrosis in metabolic disease-resistant 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (HSD1)-deficient mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 6, p. 4188-4197, 2012.

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

MURAWSKA-CIAŁOWICZ, E. Adipose tissue-morphological and biochemical characteristic of different depots. **Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)**, v. 71, p. 466-484, 2017.

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

NAGY, Csörsz; HASCHEMI, Arvand. Time and demand are two critical dimensions of immunometabolism: the process of macrophage activation and the pentose phosphate pathway. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 164, 2015.

NAKAMURA, Kazuto; FUSTER, José J.; WALSH, Kenneth. Adipokines: a link between obesity and cardiovascular disease. **Journal of cardiology**, v. 63, n. 4, p. 250-259, 2014.

NCD RISK FACTOR COLLABORATION. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants. **The Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1377–1396, 2016.

NELSON, David L.; COX, Michael M. Leninger princípios de bioquímica. In: **Leninger princípios de bioquímica**. 2002. p. 975-975.

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.

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

NISHIDA, Kazuhiko; OTSU, Kinya. Inflammation and metabolic cardiomyopathy. **Cardiovascular research**, v. 113, n. 4, p. 389-398, 2017.
NOLT, Benjamin et al. Lactate and immunosuppression in sepsis. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 49, n. 2, p. 120, 2018.

OHASHI, Toshimitsu et al. M2-like macrophage polarization in high lactic acid-producing head and neck cancer. **Cancer science**, v. 108, n. 6, p. 1128-1134, 2017.

OIKONOMOU, Evangelos K.; ANTONIADES, Charalambos. The role of adipose tissue in cardiovascular health and disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 16, n. 2, p. 83-99, 2019.

OLIVA, Maria Eugenia 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**, v. 89, n. 5, p. 279-289, 2013.

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

PANG, Zhiqiang et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic acids research**, v. 49, n. W1, p. W388-W396, 2021.

PATEL, Pavankumar; ABATE, Nicola. Body fat distribution and insulin resistance. **Nutrients**, v. 5, n. 6, p. 2019-2027, 2013.

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

PESSIN, Jeffrey E.; KWON, Hyokjoon. How does high-fat diet induce adipose tissue fibrosis?. **Journal of Investigative Medicine**, v. 60, n. 8, p. 1147-1150, 2012.

PETROVIC, Natasa et al. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor γ

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

PILLAI, Padmini S. et al. Chemical mediators of inflammation and resolution in post-operative abdominal aortic aneurysm patients. **Inflammation**, v. 35, n. 1, p. 98-113, 2012.

PILLING, Darrell; KARHADKAR, Tejas R.; GOMER, Richard H. High-fat diet-induced adipose tissue and liver inflammation and steatosis in mice are reduced by inhibiting sialidases. **The American Journal of Pathology**, v. 191, n. 1, p. 131-143, 2021.

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

POUDYAL, Hemant et al. Effects of ALA, EPA and DHA in high carbohydrate, high fat diet induced metabolic syndrome in rats. **The Journal of nutritional biochemistry**, 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.

RADIN, M. Judith; SHARKEY, Leslie C.; HOLYCROSS, Bethany J. Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses. **Veterinary clinical pathology**, v. 38, n. 2, p. 136-156, 2009.

RAJBHANDARI, Prashant et al. IL-10 signaling remodels adipose chromatin architecture to limit thermogenesis and energy expenditure. **Cell**, v. 172, n. 1-2, p. 218-233. e17, 2018.

REEVES, Philip G.; NIELSEN, Forrest H.; FAHEY JR, George C. 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. 1993.

RENOVATO-MARTINS, Mariana et al. Microparticles derived from obese adipose tissue elicit a pro-inflammatory phenotype of CD16 $^{+}$, CCR5 $^{+}$ and TLR8 $^{+}$ monocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 1, p. 139-151, 2017.

ROBINETTE, Steven L. et al. Web server based complex mixture analysis by NMR. **Analytical chemistry**, v. 80, n. 10, p. 3606-3611, 2008.

ROSEN, Evan D.; SPIEGELMAN, Bruce M. What we talk about when we talk about fat. **Cell**, v. 156, n. 1-2, 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.

ROTONDO, Floriana et al. Higher lactate production from glucose in cultured adipose nucleated stromal cells than for rat adipocytes. **Adipocyte**, v. 8, n. 1, p. 61-76, 2019.

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

RUI, Yehua et al. Chia seed supplementation reduces senescence markers in epididymal adipose tissue of high-fat diet-fed SAMP8 Mice. **Journal of medicinal food**, v. 21, n. 8, p. 755-760, 2018.

RUSSO, Gian Luigi. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. **Biochemical pharmacology**, v. 77, n. 6, p. 937-946, 2009.

SALDEEN, Pia; SALDEEN, Tom. Omega-3 Fatty acids: structure, function, and relation to the metabolic syndrome, infertility, and pregnancy. **Metabolic syndrome and related disorders**, v. 4, n. 2, p. 138-148, 2006.

SARTIPY, Peter; LOSKUTOFF, David J. Expression profiling identifies genes that continue to respond to insulin in adipocytes made insulin-resistant by treatment with tumor necrosis factor- α . **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 52, p. 52298-52306, 2003.

SARTIPY, Peter; LOSKUTOFF, David J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 12, p. 7265-7270, 2003.

SCAPIN, G. et al. Phenolics compounds, flavonoids and antioxidant activity of chia seed extracts (*Salvia hispanica*) obtained by different extraction conditions. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 6, p. 2341, 2016.

SCHEELE, Camilla; WOLFRUM, Christian. Brown adipose crosstalk in tissue plasticity and human metabolism. **Endocrine reviews**, v. 41, n. 1, p. 53-65, 2020.

SCHELBERT, Kavitha Bhat. Comorbidities of obesity. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 36, n. 2, p. 271-285, 2009.

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

SETYANINGSIH, Wiwit Ananda Wahyu et al. Liver fibrosis associated with adipose tissue and liver inflammation in an obesity model. **The Medical Journal of Malaysia**, v. 76, n. 3, p. 304-310, 2021.

SHEN, Yingbin et al. Phytochemical and biological characteristics of mexican chia seed oil. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 3219, 2018.

SHIPELIN, Vladimir A. et al. Effects of tyrosine and tryptophan in rats with diet-induced obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 2429, 2021.

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

SILVA JR, Autran José. Adipocinas-A relação endócrina entre obesidade e diabetes tipo II. **RBONE-Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 11, n. 63, p. 135-144, 2017.

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

SINDRILARU, Anca et al. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 3, p. 985-997, 2011.

SIROT, Véronique et al. Lipid and fatty acid composition of fish and seafood consumed in France: CALIPSO study. **Journal of food composition and analysis**, v. 21, n. 1, p. 8-16, 2008.

SLAVIN, Joanne. Why whole grains are protective: biological mechanisms. **Proceedings of the Nutrition society**, v. 62, n. 1, p. 129-134, 2003.

SONG, Anying et al. Low-and high-thermogenic brown adipocyte subpopulations coexist in murine adipose tissue. **The Journal of clinical investigation**, v. 130, n. 1, p. 247-257, 2020.

SPENCER, Michael et al. Adipose tissue extracellular matrix and vascular abnormalities in obesity and insulin resistance. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 12, p. E1990-E1998, 2011.

SPERETTA, Guilherme Fleury; LEITE, Richard Diego; DE OLIVEIRA DUARTE, Ana Cláudia. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF-alfa e IL-10. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 13, n. 1, 2014.

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

STOLARCZYK, Emilie. Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response?. **Current opinion in pharmacology**, v. 37, p. 35-40, 2017.

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

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

SUN, Wenfei et al. snRNA-seq reveals a subpopulation of adipocytes that regulates thermogenesis. **Nature**, v. 587, n. 7832, p. 98-102, 2020.

TAKASHINA, Chisa et al. Associations among the plasma amino acid profile, obesity, and glucose metabolism in Japanese adults with normal glucose tolerance. **Nutrition & metabolism**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2016.

TANG, Hao-Neng et al. Plasticity of adipose tissue in response to fasting and refeeding in male mice. **Nutrition & metabolism**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2017.

TAUFFENBERGER, Arnaud et al. Lactate and pyruvate promote oxidative stress resistance through hormetic ROS signaling. **Cell death & disease**, v. 10, n. 9, p. 1-16, 2019.

TILG, Herbert; MOSCHEN, Alexander R. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. **Molecular medicine**, v. 14, n. 3-4, p. 222-231, 2008.

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.

TOSCANO, Luciana Tavares et al. Chia induces clinically discrete weight loss and improves lipid profile only in altered previous values. **Nutricion hospitalaria**, v. 31, n. 3, p. 1176-1182, 2015.

VALENZUELA, Rodrigo et al. Alpha linolenic acid (ALA) from Rosa canina, sachainchi and chia oils may increase ALA accretion and its conversion into n⁻³ LCPUFA in diverse tissues of the rat. **Food & function**, 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.

VAN DEN BOSSCHE, Jan; O'NEILL, Luke A.; MENON, Deepthi. Macrophage immunometabolism: where are we (going)?. **Trends in immunology**, v. 38, n. 6, p. 395-406, 2017.

VAN DER LANS, Anouk AJJ et al. Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 8, p. 3395-3403, 2013.

VIEIRA-POTTER, Victoria J. Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues. **Cellular microbiology**, v. 16, n. 10, p. 1484-1492, 2014.

Vigilância para Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) <Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de->

conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/vigitel/relatorio-vigitel-2020-original.pdf>
[Acesso em: 02 março 2022].

VILLARROYA, Francesc et al. Toward an understanding of how immune cells control brown and beige adipobiology. **Cell metabolism**, v. 27, n. 5, p. 954-961, 2018.

VISHVANATH, Lavanya et al. Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity. **The Journal of clinical investigation**, v. 129, n. 10, p. 4022-4031, 2019.

VOLKOW, Nora D.; WISE, Roy A. How can drug addiction help us understand obesity?. **Nature neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 555-560, 2005.

VUKSAN, V. et al. Comparison of flax (*Linum usitatissimum*) and Salba-chia (*Salvia hispanica* L.) seeds on postprandial glycemia and satiety in healthy individuals: a randomized, controlled, crossover study. **European journal of clinical nutrition**, v. 71, n. 2, p. 234-238, 2017.

VUKSAN, V. et al. Reduction in postprandial glucose excursion and prolongation of satiety: possible explanation of the long-term effects of whole grain Salba (*Salvia Hispanica* L.). **European journal of clinical nutrition**, v. 64, n. 4, p. 436-438, 2010.

VUKSAN, Vladimir et al. Supplementation of conventional therapy with the novel grain Salba (*Salvia hispanica* L.) improves major and emerging cardiovascular risk factors in type 2 diabetes: results of a randomized controlled trial. **Diabetes care**, v. 30, n. 11, p. 2804-2810, 2007.

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

WANG, Hong et al. Browning of white adipose tissue with roscovitine induces a distinct population of UCP1+ adipocytes. **Cell metabolism**, v. 24, n. 6, p. 835-847, 2016.

WANG, Qidi et al. Brown adipose tissue activation is inversely related to central obesity and metabolic parameters in adult human. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0123795, 2015.

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

WEI, Huaxing et al. Interleukin-10 family cytokines immunobiology and structure. **Structural Immunology**, p. 79-96, 2019.

WEI, Melissa Y.; JACOBSON, Terry A. Effects of eicosapentaenoic acid versus docosahexaenoic acid on serum lipids: a systematic review and meta-analysis. **Current atherosclerosis reports**, v. 13, n. 6, p. 474-483, 2011.

WINER, Daniel A. et al. The intestinal immune system in obesity and insulin resistance. **Cell metabolism**, v. 23, n. 3, p. 413-426, 2016.

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

World Health Organization. Global health observatory: Overweight and obesity. <Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>> [Acesso em 10 março 2022]

WU, Jun et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 366-376, 2012.

XAVIER, Hermes T. et al. V Diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 101, p. 1-20, 2013.

YAMATANI, Hizuru et al. Differences in the fatty acid metabolism of visceral adipose tissue in postmenopausal women. **Menopause**, v. 21, n. 2, p. 170-176, 2014.

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

YE, Yuqing et al. mTOR signaling in Brown and Beige adipocytes: implications for thermogenesis and obesity. **Nutrition & metabolism**, v. 16, n. 1, p. 1-14, 2019.

YU, Huanling et al. Long-term effects of high lipid and high energy diet on serum lipid, brain fatty acid composition, and memory and learning ability in mice. **International journal of developmental neuroscience**, v. 28, n. 3, p. 271-276, 2010.

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

ZHANG, Zhi-yun; WANG, Ming-wei. Obesity, a health burden of a global nature. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 2, p. 145-147, 2012.

ZHAO, M.; CHEN, X. 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.

ZHU, Xiao et al. Perivascular adipose tissue dysfunction aggravates adventitial remodeling in obese mini pigs via NLRP3 inflammasome/IL-1 signaling pathway. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 40, n. 1, p. 46-54, 2019.

ANEXO A - Carta de autorização do Comitê de Ética



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "O papel da obesidade e da suplementação dietética com óleo de chia (*Salvia hispanica* L) sobre os mecanismos moleculares e funcionais que regulam a adipogênese e o recrutamento de células tronco da medula óssea e suas possíveis implicações sobre o desenvolvimento das comorbidades", registrada com o nº 024/2017, sob a responsabilidade de **Simone Vargas da Silva** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 28/03/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	28/03/2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57/BI06
Nº de animais	80
Peso/Idade	32 g / 30 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 28 de Março de 2017.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ

<http://www.biologiauerj.com.br/comite-de-etica>
ceua.ibrag@yahoo.com.br

ANEXO B - Artigo submetido ao periódico British Journal of Nutrition (fator de impacto atual: 3.718)

British Journal of Nutrition

Chia oil supplementation improves vascular dysfunction and induces perivascular adipose tissue remodeling in obese mice

Journal:	<i>British Journal of Nutrition</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Fonte-Faria, Thais; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Biologia Celular Assis-Ferreira, Agatha; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Biologia Celular Muniz-Cassuque, Gabrielly; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Biologia Celular de Souza, Thamiris; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Nutrição Básica e Experimental Citelli, Marta; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Nutrição Básica e Experimental Marins de Carvalho, Lenize; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Farmacologia Ognibene, Dayane; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Farmacologia de Bem, Grazielle; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Farmacologia Resende, Angela; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Farmacologia Barja-Fidalgo, Christina; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Biologia Celular Vargas da Silva, Simone; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Biologia Celular
Keywords:	Obesity, Vascular dysfunction, Perivascular adipose tissue, Omega 3 fatty acids
Subject Category:	Molecular Nutrition
Abstract:	Objective: To determine whether dietary supplementation with chia seed oil (<i>Salvia hispanica</i> L.) could improve vascular dysfunction in obese mice by regulating perivascular adipose tissue (PVAT). Methods: Male C57BL/6 mice were fed with a standard chow diet (C) or a high-fat diet (45% Kcal from fat, H). After ten weeks, the groups were subdivided into a standard chow diet supplemented with chia oil (CC) and a high-fat diet supplemented with chia oil (HC) for six weeks. Results: The chia oil supplementation significantly restored vasodilator response to acetylcholine and decreased the vasoconstrictor response to norepinephrine in the mesenteric vascular bed from obese animals. Treatment of H mice with chia oil reduced the adipocytes area, IL-1 β secretion, and iNOS and HO-1 protein expression in mesenteric PVAT. In contrast, chia oil supplementation increased the production of IL-10 and induced the activation of the AMPK in the PVAT from obese animals. In vitro, endothelial cells incubated with PVAT conditioned medium (CM) derived from HC mice decreased NO production compared to obese mice. Conclusion: The dietary supplementation with chia oil promoted the

Cambridge University Press

	morphological and functional remodeling of PVAT, contributing to the improvement of vascular dysfunction of obese animals.

SCHOLARONE™
Manuscripts

Chia oil supplementation improves vascular dysfunction and induces perivascular adipose tissue remodeling in obese mice

Thaís Fonte-Faria^{1*}, Agatha de Assis-Ferreira^{1*}, Gabrielly Muniz-Cassuce¹, Thamiris de Souza², Marta Citelli², Lenize Costa Reis Marins de Carvalho³, Dayane Teixeira Ognibene³, Grazielle Freitas de Bem³, Angela Castro Resende³, Christina Barja-Fidalgo¹, Simone Vargas da Silva¹

¹ Departamento de Biologia Celular, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

² Instituto de Nutrição, Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

³ Departamento de Farmacologia e Psicobiologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*T.F.F and A.A.F contribute equally to this work.

Corresponding author: Dr^a. Simone Vargas da Silva, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Laboratório de Farmacologia Molecular e Celular, Av. 28 de setembro, 87 - fcos - 5º andar, Rio de Janeiro, 20551-030, RJ, Brazil.

Phone/Fax: +55 21 28688298;

e-mail: simonevargasdasilva@gmail.com

Abbreviations: AMPK, AMP-activated protein kinase; FNDC5, Fibronectin type III domain-containing protein 5; GPR120, G-protein coupled receptor 120; HO-1, heme oxygenase-1, IL-1 β , interleukin 1 β ; IL-10, interleukin 10; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; PVAT, perivascular adipose tissue.

Keywords: Obesity, vascular dysfunction, perivascular adipose tissue, omega 3 fatty acids.

Words count: 4116

Abstract

Objective: To determine whether dietary supplementation with chia seed oil (*Salvia hispanica* L.) could improve vascular dysfunction in obese mice by regulating perivascular adipose tissue (PVAT). **Methods:** Male C57BL/6 mice were fed with a standard chow diet (**C**) or a high-fat diet (45% Kcal from fat, **H**). After ten weeks, the groups were subdivided into a standard chow diet supplemented with chia oil (**CC**) and a high-fat diet supplemented with chia oil (**HC**) for six weeks. **Results:** The chia oil supplementation significantly restored vasodilator response to acetylcholine and decreased the vasoconstrictor response to norepinephrine in the mesenteric vascular bed from obese animals. Treatment of H mice with chia oil reduced the adipocytes area, IL-1 β secretion, and iNOS and HO-1 protein expression in mesenteric PVAT. In contrast, chia oil supplementation increased the production of IL-10 and induced the activation of the AMPK in the PVAT from obese animals. *In vitro*, endothelial cells incubated with PVAT conditioned medium (CM) derived from HC mice decreased NO production compared to obese mice. **Conclusion:** The dietary supplementation with chia oil promoted the morphological and functional remodeling of PVAT, contributing to the improvement of vascular dysfunction of obese animals.

ANEXO C – Artigo publicado no periódico *Journal of Molecular Endocrinology* (fator de impacto atual: 5.098)

Journal of Molecular Endocrinology

A Assis-Ferreira *et al.*

Obesity induces migration to adipose tissue

67:1

15–26

RESEARCH

Obesity enhances the recruitment of mesenchymal stem cells to visceral adipose tissue

Agatha de Assis-Ferreira¹, Roberta Saldanha-Gama¹, Natália Mesquita de Brito¹, Mariana Renovato-Martins², Rafael Loureiro Simões¹, Christina Barja-Fidalgo¹ and Simone Vargas da Silva¹

¹Laboratory of Molecular and Cellular Pharmacology, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

²Laboratory of Inflammation and Metabolism, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil

Correspondence should be addressed to S Vargas da Silva: simonevargasdasilva@gmail.com

Abstract

In obesity, high levels of TNF- α in the bone marrow microenvironment induce the bone marrow-mesenchymal stem cells (BM-MSCs) towards a pro-adipogenic phenotype. Here, we investigated the effect of obesity on the migratory potential of BM-MSCs and their fate towards the adipose tissues. BM-MSCs were isolated from male C57Bl/06 mice with high-fat diet-induced obesity. The migratory potential of the BM-MSCs, their presence in the subcutaneous (SAT) and the visceral adipose tissues (VAT), and the possible mechanisms involved were investigated. Obesity did not affect MSC content in the bone marrow but increased the frequency of MSCs in blood, SAT, and VAT. In these animals, the SAT adipocytes presented a larger area, without any changes in adipokine production or the *Sdf-1 α* gene expression. In contrast, in VAT, obesity increased leptin and IL-10 levels but did not modify the size of the adipocytes. The BM-MSCs from obese animals presented increased spontaneous migratory activity. Despite the augmented expression of *Cxcr4*, these cells exhibited decreased migratory response towards SDF-1 α , compared to that of BM-MSCs from lean mice. The PI3K-AKT pathway activation seems to mediate the migration of BM-MSCs from lean mice, but not from obese mice. Additionally, we observed an increase in the spontaneous migration of BM-MSCs from lean mice when they were co-cultured with BM-HCs from obese animals, suggesting a paracrine effect. We concluded that obesity increased the migratory potential of the BM-MSCs and induced their accumulation in VAT, which may represent an adaptive mechanism in response to chronic nutrient overload.

Keywords

- obesity
- adipose tissue remodelling
- mesenchymal stem cell
- migration

Journal of Molecular Endocrinology
(2021) **67**, 15–26

Introduction

The prevalence of obesity and associated metabolic disorders has risen dramatically worldwide, resulting from chronic nutrient overload and sedentary behaviour (Adams *et al.* 2006). Upon excess caloric intake, lipid deposition

increases in the white adipose tissue (WAT), which responds rapidly and dynamically through hypertrophy and hyperplasia to buffer nutrient excess and maintains the whole-body energy homeostasis (Choe *et al.* 2016). In

ANEXO D – Lista representativa com os metabólitos secretados pelos meios condicionados dos tecido adiposos

Sample	Class	Isovaleric acid 0,9	L-Isoleucine 0,92	Leucine 0,94	0,96	L-valine 0,98	L-Isoleucine 1	01.02	01.04	01.06	01.08	1.1	1.12	L_Isoleucine 1,26
DMEM_M199	Control	31,11	105,92	536,07	2299,35	3647,95	2021,44	1904.3	1904.10	1296,64	198,61	92,61	60,17	233,68
TAS grupo C	TAS_C	4,272025723	1,77501888	1,03598	0,8544197	0,8862347	0,89067694	0,8705351	0,7585946	1,2142460	1,2781330	1,3081740	1,4375934	1,1340722
						3			1	5	2	6	9	4
TAS grupo CC	TAS_CC	3,81607717	1,6814577	1,24728	1,0725553	1,0888718	1,00879076	1,0385863	0,9097999	1,3393154	1,3925280	1,4286794	1,6247299	1,2179476
						3		6	1	6	7	1	3	2
TAS grupo H	TAS_H	4,199678457	1,61603097	0,96652	0,8724161	143,90986	0,85094784	0,8862784	0,7859828	1,3027748	0,9975328	1,2061332	1,2197108	1,0870421
						7		2	8	6	5	5	2	1
TAS grupo HC	TAS_HC	2,446945338	1,22885196	1,07829	1,0857329	215,45607	0,93271628	4,0450559	0,9613675	1,3472822	0,8802678	0,9753806	1,0392222	1,1282095
						8		3	8	1	6	3		2
TAE grupo C	TAE_C	2,18842443	0,8473376	0,8551	0,919790	0,9165832	0,8404652	0,8087748	0,854235	1,0734822	0,7961834	0,9433106	0,8121987	0,9535689
		7	1	5	4	9	1	8	6	3	8	6	7	8
TAE grupo CC	TAE_CC	2,98199356	1,3847243	1,1026	0,971487	1,0431996	23,880995	1,0465577	0,8567984	1,4294715	1,7385328	1,8163265	2,0292504	1,2268058
		9	2	2	6	1	7	9	9	6		3	6	9
TAE grupo H	TAE_H	2,53215434	1,2334781	1,0802	58,46956	0,9895119	0,8999030	0,9387333	0,849209	1,1851477	1,2359397	1,3009394	1,4744889	1,1140876
		1		5	7	2	4	9	6	7	8	2	5	4
TAE grupo HC	TAE_HC	2,82443729	1,3675415	1,1109	0,958801	0,9760221	0,9320434	0,9467678	0,8388845	1,2518355	1,4873873	1,7989418	1,9654312	1,1564532
		9	4	2	4	5	9	4	1	1	4		8	7

Lactate														
1,28	1,3	1,32	1,34	1,36	1,38	1,4	1,42	1,44	1,46	1,48	1,5	1,52	1,54	1,56
327,03	195,18	993,75	1157,35	130,6	79,56	59	98,33	229,66	409,42	700,86	722,93	500,9	212,32	109,88
1,14946641	1,5131161	0,4361761	2,6471681	9,64969372	2,2717446	2,2659322	1,77697549	1,29238875	1,10571052	1,15007277	1,17568783	1,18372929	1,33143365	1,72033127
1,2216616	1,3302080	0,3234213	2,3449863	7,4258039	1,6656611	1,7649152	1,4958812	1,2194548	1,1483317	1,2144508	1,2532610	1,1922539	1,2987000	1,5837277
2	1	8	9	8	4	5	2	5	9	2	3	4	8	
1,1482127	1,2996721	0,2842566	2,8209876	8,54525268	1,52765205	1,74084746	1,48845724	1,20730645	1,10949636	1,25889621	1,21858271	1,25470154	1,28226262	1,66317801
1,1787603	1,1488369	0,2029886	2,4941374	5,8392036	0,9149069	1,0381355	1,0910200	1,0786379	1,0996043	1,1356191	1,0597153	1,1531643	1,1347494	1,4073534
6	7	8	7	8	9	9	3	9	2		3		3	8
0,95220622	0,81724562	0,2444478	3,0963667	12,5469372	1,15912519	1,16559322	1,06732432	1,0061395	1,01074691	1,1986274	1,19574505	1,01195847	1,0329691	1,19275573
1,2431581	1,2682651	0,290928	2,7798073	11,990352	2,2278783	2,2447457	1,7148377	1,2838543	1,1827707	1,1573352	1,2017899	1,301776	1,474189	1,85156534
2	9	3	2	2	3	6	9	9	5	7	4	8	9	
1,092438	1,10569731	0,26674717	2,42033093	8,85061256	1,4739819	1,45457627	1,2295332	1,07532875	1,04606517	1,08346888	1,1114354	1,05595927	1,17332329	1,43856935
1,160291	1,2227174	0,3816452	3,7030025	18,184303	2,3750628	2,0283050	1,484592	1,1858834	1,1296468	1,1436806	1,1781638	1,1904172	1,2916352	1,59819803
1	9	8	5	2	5	8	7	8	2	2	6	5	7	

L-arginine

1,58	1,6	1,62	1,64	1,66	1,68	1,7	1,72	1,74	1,76	1,78	1,8	1,82	1,84	1,86
263,3	275,12	84,66	131,34	237,43	440,99	746,31	1211,18	1311,69	809,11	260,21	95,36	66,31	88,77	165,74
1,298139	1,2566153	1,59390503	1,30630425	1,14362128	0,99448967	0,98832925	1,04516257	1,04417965	1,04516073	1,43253526	1,5122693	1,64801689	1,30787428	1,0236515
1,2705279	1,2281913	1,3060477	1,1257042	1,0703786	1,0098641	1,0622261	1,1600092	1,1631559	1,1361990	1,5108566	1,4412751	1,3825968	1,0647741	0,8468685
1	3	2	8	4	7	5	5	3	3	2	7	9	4	9
1,29620205	1,29198168	1,20789039	1,11839501	1,03921156	0,91947663	0,97007946	1,09692201	1,08327425	1,06021431	1,46443257	1,3520344	1,38591464	1,14002475	0,8945939
1,2546904	1,0970485	0,9462556	0,9715242	0,9761192	0,9306560	1,0371963	1,1735332	1,1352453	1,0929910	1,4321893	1,1393666	1,0419242	0,907063	0,7694581
7	6	1	9	8	2	4	5	7	6	9	1	9	2	9
1,10394987	1,00930503	0,82199386	0,80097457	0,83574106	0,80806821	0,91717915	1,00421903	0,9679345	0,99084175	1,24795355	1,15362836	1,00361936	0,83530472	0,71250151
1,3521078	1,3470849	1,5696905	1,2668646	1,1496019	1,0473706	1,0602832	1,1674895	1,204873	1,2026671	1,7959724	2,2018666	2,3732468	1,7600540	1,14221069
6	1	3	3	9	9	6	6	1	3	8	1	7	7	
1,17641474	1,08181884	1,1535554	0,99817265	0,96339974	0,9111998	0,97237073	1,05559867	1,04841083	1,03386437	1,39614155	1,49024745	1,42331473	1,11062296	0,82593218
1,2289023	1,2574512	1,2964800	1,0826861	1,0162995	0,9463479	0,9897093	1,0845786	1,0984836	1,1040402	1,6462088	1,9016359	2,0144774	1,6190154	1,07336793
9	9	4	6	4	9	7	8	4	4	3	1	5	3	

L-arginine								L-Glutamine				Glutathione		
1,88	1,9	1,92	1,94	1,96	1,98	2	02.02	02.04	02.06	02.08	2.1	2.12	2,14	2,16
524,48	925,9	754,97	1903,03	171,47	228,66	288,74	362,67	371,53	411,97	402,39	584,87	1289,29	1681,71	1903,7
0,68999771	1,01271196	1,38993602	0,54576649	1,2809821	1,04521998	1,0923322	1,14503543	1,1724759	1,0091511	0,98374711	0,70752475	0,81063221	14,799826	13,263660
0,6140367	0,9495949	1,4851186	0,804669	1,3407593	1,0866351	1,1373207	1,165908	1,1332059	1,0281088	1,1041775	0,7176124	0,6554305	169,96475	12,940639
6	9	1	4	2	8	7	4	3	4	4	6	1	2	7
0,6374504	1,0427908	1,45829636	0,62053672	1,05872747	0,87418001	0,94891598	1,02975156	1,05859554	0,88817147	0,9260916	0,6554619	0,77223123	15,668913	15,605663
0,6010524	1,0067177	1,3795515	0,8309537	1,0058319	0,968512	1,0506684	1,1043924	1,0353134	0,8976381	0,9877730	0,6275411	0,6696553	492,95034	13,051861
7	9	1	9	2	2	2	2	3	8	6	6	9	3	6
0,5483526	0,9438816	1,2051737	0,7858730	0,7928500	0,7230823	0,79472882	0,9262966	0,8191263	0,7535985	0,8035736	0,5190897	0,6908531	13,405417	11,7077609
0,6841252	0,9946646	1,5890300	0,919659	1,5830174	1,1955742	1,2236960	1,2033529	1,1625171	0,9783964	0,9739804	0,7411561	0,7345360	14,03883	15,2909806
3	5	3	7	4	1	6	1	6	9	7	5	6	5	
0,563014	0,8556107	1,3900949	0,7770450	1,2515308	1,00454824	1,0482441	1,0554222	0,9621564	0,8715197	0,9302418	0,6283618	0,5762008	10,834456	12,0701626
0,6630567	0,9766173	1,4378849	0,839482	1,305242	1,031094	1,0769896	1,106377	1,0692272	0,9511614	1,0134943	0,7248790	0,7400662	703,56193	13,1509701
4	5	5	3	9	2	8	7	5	9	7	3	4	2	

duzida	Lactate												L-glutathione ox	
2,18	2,2	2,22	2,24	2,26	2,28	2,3	2,32	2,34	2,36	2,38	2,4	2,42	2,44	2,46
354,6	230,91	170,96	181,02	231,25	322,15	285,4	271,42	357,09	590,61	445,89	570,91	992,66	1904,6	1815,57
1,9468979	1,6244424	1,44291062	1,3274223	1,3222054	1,09889803	1,3764541	1,17887407	0,94354364	0,7575218	0,97427617	1,00162898	1,01341849	0,8634936	1,34705354
2,0765651	1,4787579	1,4269419	1,1070599	1,1418378	0,9738320	1,2445339	1,0450593	0,9093225	1,0567210	1,2178564	0,9439666	0,9504966	0,7358710	1,1154403
4	6	7	9	4	7	9	2	8	2	2	5	5	5	3
1,99909757	1,8476895	1,22718765	1,1056236	1,1400648	0,9287598	1,22648914	0,99487879	0,81581674	0,7632955	0,93126107	0,8803314	0,97769629	0,8928383	129,253623
1,6081782	1,4841280	1,0522344	0,9960225	1,1051675	0,8825081	1,2566573	0,9616093	0,8282505	0,9277695	1,0817914	0,9155383	0,9669675	0,7977213	38,425398
3	2	4	4	7	5	2	1	8	9	7	5	4	1	1
1,7165538	1,1625308	0,8794454	0,82151144	0,8618810	0,71463604	1,0073931	0,71280672	0,6255565	0,7241496	0,8806880	0,74234117	0,8631051	0,7447705	1,19651129
2,6060349	1,8796933	2,5795507	1,3669207	1,2809513	1,0849914	1,3850735	1,1568786	0,9275532	0,8223700	1,0416021	1,0008232	0,9929784	0,8236742	1,3499507
7	9	7	8	5	6	8	4	8	9	9	5	6	6	
2,0281443	1,3725260	1,3466892	1,3402938	1,0288864	0,8735992	1,11692362	0,93117677	0,80450307	0,9241292	1,08472942	0,80299872	0,8282392	0,6567993	1,01132978
1,9672306	2,472132	1,3613710	1,2262733	1,1552	0,9557349	1,2935178	1,0384275	0,8980929	0,9029647	1,1384646	0,9935191	0,9800032	0,8075291	71,248698
8		8	4		1	7	3	2	3	4	2	2	4	8

D-Glucose								o-Tyrosine				L-Proline			
2,48	2.5	2,52	3,22	3,24	3,26	3,28	3.3	3,32	3,34	3,36	3,38	3.4	3,42	3,44	
1110,63	657,94	679,03	758,55	3148,73	6848,78	4784,52	852,86	539,96	519,15	522,74	604,27	2793,99	8308,27	8833.3	
1,80307573	1,1686628	0,85728171	1,23116472	1,03085053	1,02198345	1,07233115	1,08870155	1,06326395	0,91580468	1,1912423	1,06808215	1,0024338	1,00576775	1,02745973	
1,5859377	1,0739733	0,7336789	1,4005932	1,1386749	308,48516	1,1634751	1,2128368	1,2421475	0,9680631	1,215116	1,1225114	1,1236940	1,107063	1,1260219	
1	1	2	4	6	1	2	1	7	8	5	6	7	2	8	
2,03601555	1,09485667	0,76235218	1,04353042	1,06888492	1,09905852	1,13331745	0,94933518	0,96740495	0,74862755	1,08769178	0,84250415	0,95718668	299,402282	323,692391	
1,6840802	0,9579444	0,7580666	0,9222200	1,0915353	1,1330032	1,1588644	0,909973	0,9037891	0,7142829	1,0699200	0,7534380	1,0210809	1,1116550	1,1482232	
1	9	5	3	2	5	2	5	7	6	4	3	6	1		
1,48099727	0,79806665	0,64963255	1,05216532	147,809117	1,01431785	1,06096535	0,90602205	0,89476995	0,75115092	0,97639362	0,73281811	0,9732891	1,01777506	0,99722074	
87,178448	1,327081	0,8235129	1,4952079	1,1717136	1,158158	1,2051825	1,3189972	1,3817875	1,1010305	1,3855645	1,1350720	167,86173	1,1229064	1,1686346	
3	5	5	6	8	1	5	6	4	3	3	7	2	5		
1,46265633	0,97887345	0,64004535	1,28771995	1,05043303	271,745475	1,04299282	1,07617897	1,14149195	0,89105265	1,07791635	0,96964933	148,710267	294,57035	1,01407741	
0,4384898	1,1262121	0,823483	1,3238151	1,0881244	1,0781467	265,92489	1,1624299	1,1652344	0,9633631	1,2954432	1,0678504	1,0675199	1,0609537	1,0827618	
7	2	5	7	2	6	9	4	6	9	4	6	3	2	2	

L-tryptophane	L-Threonine							Glycerol						
3,46	3,48	3,5	3,52	3,54	3,56	3,58	3,6	3,62	3,64	3,66	3,68	3,7	3,72	3,74
5622,27	11286,2	9548,79	3329,14	3444,07	5533,35	1923,17	748,84	1903,2	822,23	987,19	1570,95	1696,95	6014,04	8888,89
0,98566415	0,97551878	1,03225435	1,17723496	1,00332455	0,86828594	234,358377	1,49774318	0,5872583	0,90525765	1,44011791	1,25364907	1,08615457	0,97885115	0,85854477
275,207345	1,08073577	1,1299128	1,26892531	1,10750943	220,767889	1,56702736	1,62942685	0,58275011	1,03084295	1,33068609	1,30356154	1,24985415	1,06992471	0,93648813
1,09146306	1,040678	1,1328451	1,18147025	1,02083001	0,94785257	1,72146508	1,72616313	0,55889554	0,84354743	1,67712396	1,32354944	0,94824833	1,02132511	0,88889839
1,07577366	1,10907126	1,18349026	1,11485849	1,07188588	223,776555	1,44667918	1,32729288	0,56029844	0,79136008	1,38350267	1,36823578	0,94839565	1,05223444	0,92827338
0,97233502	1,03448455	1,00248723	0,82824093	0,97058713	0,87081424	156,016885	1,32582394	0,56607293	0,67096798	1,54489004	1,2307139	0,88857067	0,97132044	0,86676514
1,11181782	1,08729245	1,16842029	1,40076116	1,12942536	0,96944347	1,7375687	1,84633567	0,60996217	1,15740121	1,57172378	1,47914956	1,31529509	282,559311	0,94885301
1,01237934	1,01350322	1,00595782	1,61,257262	1,00170438	0,855592	1,26653397	1,49532617	0,50815465	0,91844137	1,16594577	1,09335116	1,22329473	241,975278	0,84711702
1,05027507	1,03804646	1,08937363	1,22913425	1,06456605	0,92281168	1,63475928	1,64657337	0,59864439	0,99537842	1,66182802	93,2703141	1,2262353	1,04345166	256,869418

		frutose 1,6 bifosfato		Frutose 2,6 bifosfato		Tryptophane						Lactate			
3,88	3.9	3,92	3,94	3,96	3,98	4	04.02	04.04	04.06	04.08	4.1	4.12	4,14	4,16	
2872,33	5838,47	3067.2	2934,7 3	659,37	653,59	440,36	384,37	254,3	257,16	247,19	217,31	233,69	276,78	223,24	
1,07913784	0,94695357	1,00371022	1,0280775	1,03943158	1,05630441	1,11090926	0,74019825	0,65340149	0,9361487	1,06662891	0,72182596	1,07907912	1,07804032	0,8313922 2	
1,3113012 8	1,1224122 1	1,1233470 3	170,95030 9	1,1542684 7	1,219112 9	1,3793260 1	0,9112313 7	0,7623672 8	0,8059573 8	1,2358509 6	1,1245225 7	1,1024862	1,098273	0,8897151	
188,70464	1,09320421	1,00076617	1,2333093	1,19445835	1,21238085	1,35770735	0,86866821	0,72304365	1,02620936	1,34232776	0,8264691	1,15644657	1,18856131	0,9103207 3	
1,1349357 5	285,26446 1	0,967846 9	1,1579497 9	0,9624641 7	0,9842867 9	1,0661731 3	0,6484637 2	0,489343 3	0,7658267 2	1,0593875 2	0,6194836 9	0,8475758 5	0,8837705	0,6393567 5	
1,03016715	1,07030265	0,84077985	0,97565705	1,00858395	1,12201835	1,10748025	0,82451804	0,79657884	1,0871053	1,2348396	0,87685795	1,53609485	1,30804249	1,0086902	
1,3415136 8	1,0917243 7	1,1692944 7	1,190848 9	1,1531158 5	1,2359889 2	1,4173630 7	0,9261648 9	0,7614235 2	0,8256727 3	1,3230308 7	1,2320647 9	1,2791732 6	1,3740154 6	1,0856925 3	
191,883595	1,00675862	0,95599245	0,89031355	0,86596295	0,94940255	1,17683259	0,7122304	0,54195832	0,5488025	0,86787491	0,94988725	0,99084257	0,95108025	0,7271546 3	
1,2127958 8	1,0765508 8	1,0796198 5	1,115111 1	1,1904545 2	1,1304793 5	1,2558815 5	0,8463719 9	0,7505701 9	0,9922227 4	1,3235972 3	1,0095715 8	1,739141 6	1,7336512 8	1,2115212 3	

Lactate			L-threonine											
4,18	4,2	4,22	4,24	4,26	4,28	5,24	5,26	6,66	6,68	6,7	6,72	6,74	6,76	6,78
249,28	278,24	258,39	276	293,19	228,77	578,68	757,83	36,1	1,27	01.04	1,66	6,43	7,99	11,95
0,68272625	0,6802400 8	0,5844266 4	0,5098913	0,7277874 4	0,7332255 1	0,7275523 6	0,9807344 7	1,5199446	40,763779 5	18,5	26927,108 4	3,78538103	3,44430538	2,69205021
0,76676829	0,7567927	0,6485545 1	0,5268840 6	0,7977079 7	0,8449097 3	0,9181412 9	1,1699061 8	0,4396121 9	40,590551 2	46,451923 1	8,3674698 8	6984,91446	5591,11389	2,04267782
0,74506579	0,7446089 7	0,6658926 4	0,5443115 9	0,8894232 4	0,8214363 8	0,8373539 8	1,3197550 9	1,3412742 4	40,244094 5	42862,5	26960,843 4	2,73094868	2,69336671	2,14058577
0,56221919	0,5904974 1	0,4942528 7	0,3731159 4	0,6768989 4	0,6077282 9	0,8540471 4	1,1915601 1	1,1523545 7	35,944881 9	11,019230 8	4,4096385 5	6945,87869	1,78222778	3735,39749
0,76207478	0,761716 5	0,6491737 3	0,5690217 4	0,7742078 5	0,7795165 5	0,9835487 7	0,9369119 7	1,6980609 4	43,905511 8	23	14,632530 1	4,4199066 9	3,9148936 2	2,7389121 3
0,87187099	0,846211 9	0,771856 5	0,6518840 6	0,9306593	1,0487389 1	0,8115193 2	1,2161038 8	0,5772853 2	44,228346 5	52,384615 4	10,698795 2	3,8242612 8	3,7784730 9	2,9280334 7
0,58131418	0,5688614 1	0,4814814 8	0,4033333 3	0,6027831 8	0,6922236 3	0,8104479 2	0,8692054 9	0,1202216 1	34,212598 4	41	6	2,1508553 7	1,9173967 5	1,6619246 9
0,84391046	0,8073246 1	0,7078060 3	0,5980797 1	0,8821583 3	0,8932115 2	0,8805211 9	1,1609331 9	1,1988919 7	40,818897 6	21,403846 2	8,3975903 6	3,2597200 6	3,0237797 2	2,2937238 5

Lactate														
6.8	6,82	6,84	6,86	6,88	6,9	6,92	6,94	6,96	6,98	7	07.02	07.04	07.06	07.08
20,49	30,78	45,15	80,52	132,49	432,96	461,65	55,61	24,85	12,4	09.02	5,27	18,15	141,29	1,25
2,11761835	1,9392462 6	1,8529346 6	1,6472926	1,5729489	1,3115299 3	1,3455215	2,4484804 9	2,9710261 6	4,4072580 6	4,5842572 1	6,8292220 1	2,0837465 6	1,4136173 8	33,864
1,66373841	1,5159194 3	1,5399778 5	1,4016393 4	1,3665182 3	1,2865160 8	1,3765623 3	2,4698795 2	2,7770623 7	3,8137096 8	4,0920177 4	5,7779886 1	1,6975206 6	1,1522400 7	64,096
1,80136652	1,7803768 7	1,7262458 5	1,6485345 3	1,5989886	1,4733231 7	1,5287988 7	2,5781334 3	3,1581488 9	4,3645161 3	4,5310421 3	6,1612903 2	1,7278236 9	1,5113596 1	30,568
1,3284529	1,2797271	1,2936877 1	1,2644063 6	1,2484715 8	1,2989652 6	1,3671612 7	1,9656536 6	2,3082495	3,1217741 9	3,1773835 9	4,3396584 4	1,2385674 9	1,4405124 2	35938,4
2,09224012	1,7118258 6	1,6046511 6	1,4525583 7	1,3322514 9	1,2465816 7	1,2953752 8	2,0532278 4	2,7758551 3	4,1653225 8	4,5332594 2	6,5502846 3	1,8539944 9	1,41637766	26,304
2,32015617	2,1666666 7	2,0883720 9	1,8594138 1	1,7592271 1	1,4467156 3	1,494638 8	2,6788347 4	3,0281690 1	4,1822580 6	4,4667405 8	6,6963946 9	2,0016528 9	1,17276523	69,184
1,35090288	1,2573099 4	1,3331118 5	1,2611773 5	1,2351875 6	1,1651422 8	1,2318856 3	2,0821794 6	2,2519114 7	3,0879032 3	3,0332594 2	4,2789373 8	1,3757575 8	0,82001557	72,912
1,88628599	1,6900584 8	1,6600221 5	1,5074515 6	1,4668276 9	1,3069336 7	1,3571536 9	2,3853623 4	2,7734406 4	3,8854838 7	3,9966740 6	5,6432637 6	1,8743801 7	1,34390261	37,448

		Indole			L-Tryptophane									
7.1	7.12	7.14	7.16	7.18	7.2	7.22	7.24	7.26	7.28	7.3	7.32	7.34	7.36	7.38
0	0	8,83	16.3	79,29	451,87	293,99	19.01	1,47	32,45	46,7	59,7	489,64	309,9	305,35
23,65	26,28	3,5571913 9	2,3760736 2	0,9204187 2	1,1250580 9	1,3745705 6	2,9510783 8	18,585034	1,8261941 4	1,8815845 8	1,2991624 8	1,0384034	1,4946111 6	0,9645652 5
30,37	28,25	2,6591166 5	1,9177914 1	0,7951822 4	1,1584526 5	1,4429062 2	2,9647553 9	30328,571 4	1,6345146 4	1,8017130 6	1,1450586 3	1,0458593 8	1,5506615 2	0,9532012 4
20,41	22,36	2,4269535 7	2748,3435 6	0,6047420 9	1,2332086 7	1,5459709 5	2,6443976 9	30365,986 4	1,5164869 4	1,7764454 6	0,8184254 6	1,0656330 4	1,7015166 2	0,9802194 2
12,19	13,43	1,7281993 2	2740,5521 5	0,5120443 9	1,1596919 5	1,4600836 8	2,1709626 5	30361,904 8	1,3383667 2	1,5306209 9	0,6691792 3	1,0049434 2	1,5699580 5	0,9034223
25.2	24,52	2,8074745 2	1,8128834 4	0,6824315 8	1,0866399 6	1,3573590 9	2,5428721 7	15,129251 7	1,6163328 2	1,5796573 9	0,867839 2	1,0203864 9	1,3652468 5	0,9189782 2
26.04	29,18	3,8607021 5	2,7619631 9	1,0254761	1,2477482 5	1,4957651 6	3,0804839 6	20,727891 2	1,9149460 7	2,1008565 3	1,4932998 3	1,1089594 3	1,6666666 7	0,9974128
15,87	15,94	2,2231030 6	1,6282208 6	0,7303569 2	1,049660 3	1,287798 9	2,3613887 4	12,054421 8	1,3852080 1	1,5111349	1,0386934 7	0,9578175 4	1,3659244 9	0,8422466
21,41	22,13	3,158550 4	2,0932515 3	0,8716105 4	1,1363666 5	1,392156 2	2,6817464 5	15,591836 7	1,6326656 4	1,7717344 8	1,215912 9	1,0329697 3	1,4937399 2	0,9678074 3

7.4	7,42	7,44	7,46	7,48	7.5	7,52	7,54	7,56	7,58	7.6	7,62	7,64	7,66	7,68
342,68	295,02	639,51	203,64	3,95	0	0	1,95	41,12	25,74	38,92	20,16	5.4	3,77	12,18
1,24039921	1,0797573	1,1945708	1,3645158	11,146835	44,13	42,36	23,958974	2,6070038	4,1662781	3,1590441	5,5257936	15,527777	18,710875	5,2922824
		4	1	4			4	9	7	9	5	8	3	3
1,26788841	1,1742932	1,2768838	1,5740522	12,620253	54,96	58,37	24,820512	2,5620136	4,1254856	3,4062178	6,3298611	17,179629	19,750663	5,5262725
	7	6	5	2			8	2	3	8	1	6	1	8
1,3497432	1,0158633	1,3749589	1,4402867	11,291139	28,55	35,73	26,533333	3,182393	5,4075369	3,6217882	6,5297619	18,305555	21,275862	5,8210180
	3	5	8	2			3		1	8		6	1	6
1,30885958	0,9946783	1,3639974	1,4408760	10,192405	26,17	26,06	19,374359	2,5102140	4,0508935	3,0544707	5,3799603	14,359259	16,851458	4,8021346
	3	4	6	1				1	5	1	2	3	9	5
1,21118828	1,0196596	1,1916154	1,1805146	11,643038	58,73	57,52	30,169230	3,2886673	5,0485625	3,0102774	5,1433531	14,251851	17,010610	5,0205254
	8	6	3				8	2	5	9	7	9	1	5
1,31606747	1,190970	1,3025910	1,5392359	10	41,73	64,25	40,497435	3,5479085	6,3539238	4,1903905	7,0585317	19,655555	22,212201	6,0402298
	1	5	1				9	6	5	4	5	6	6	9
1,13105521	1,0844010	1,1366202	1,2966018	8,8	20,52	33,2	25,758974	2,4717898	4,3640248	3,3442959	5,9231150	16,279629	17,901856	4,8711001
	6	2	5				4	8	6	9	8	6	8	6
1,23502977	1,1138905	1,2166033	1,4146533	11,465822	60,39	73,23	35,107692	3,4182879	6,1328671	3,5614080	5,8283730	15,907407	18,655172	5,5459770
	8	4	1	8			3	4	3	2	2	4	4	1

7.7	7,72	7,74	7,76	7,78	7.8	7,82	7,84	7,86	7,88	7.9	7,92	7,94	7,98	8
14,29	21,73	51,14	166,46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4,75717285	3,3676944 3	1,9614782 9	0,9130121 4	149,64	20.8	15,97	14,24	12,65	31,42	28,78	13,41	10,69	10,28	10,21
5,11336599	3,6856879 9	2,1842002 3	0,6046497 7	237,57	38,49	24,63	25,24	32,94	41,12	37,18	17,36	15,22	13,56	16,53
5,19384185	3,5839852 7	2,1454829 9	0,7414994 6	215,33	32,29	19,64	15.2	16,39	18,68	16.02	14,45	12.4	12.08	10,78
4,54723583	3,2853198 3	2,0142745 4	0,6801033 3	106,43	15,27	9,49	8,26	9.9	17,79	14,78	6,18	5,52	2,79	04.04
4,49055283	3,2816382 9	1,9184591 3	1,11155833	136,8 1	17,81	15.01	12,62	09.09	27,64	24,77	10,89	9,78	8.1	6,59
5,41357593	3,7606994 9	2,2626124 4	0,64129521	238,2 4	43,04	16.1	12,73	13.02	26,24	22,77	12,66	12.1 1	9,79	8,89
4,36668999	3,1757938 3	1,9509190 5	0,49098883	192,1 4	35,56	11,83	8,93	7,21	10,95	8,73	8,29	5,88	5.7	6,79
4,97410777	3,5729406 4	2,101877 2	0,89571068	221,2 5	23,74	16,49	13,47	11,49	25.05	21,35	12,93	11.0 1	8,85	9,36

Ác. Nicotinurico											
08.02	08.04	08.06	8,14	8,2	8,22	8,26	8,28	8,48	8,72	8,74	8,96
0	0	0	0	0	0	08.08	0	0	-11,54	-11,66	-4,39
12,54	26,69	26,69	11,31	13,26	25,79	4,1274752	15,36	11,5	-1,02513	-3824,9571	-3,0159453
						5					
19,53	32,65	34,24	14,77	16,98	30,15	4,8650990	21,77	19,58	-1,0121317	-1,2581475	-10209,795
						1					
13,24	27,38	26,76	10,21	15,32	32,02	4,3081683	18,37	12,86	-1,2331023	-0,771012	-3,5854214
						2					
6,19	13,37	16,1	6,1	12,28	8,37	4,3923267	9,93	2,66	-1,1239168	-0,6663808	-3,4009112
						3					
10,6	24,18	24,8	6,42	9,36	21,36	3,79207921	11,5	5,22	-	-	-
									0,6906412	0,1363636	10200,911
13,62	26,24	27,72	12,52	15,54	33,57	4,91584158	19,07	14,23	-	-	-
									1,3717504	1,4914237	10224,146
7,99	18,32	18,86	7,46	11,32	25,82	4,11881188	13,69	8,77	-	-	-
									3862,2184	1,1106346	3,405467
10,45	26,08	25,56	9,8	11,92	26,83	4,20792079	15,35	12,74	-	-	-
									1,4636049	1,1766724	4,0113895