Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Nutrição

Aline Batista

Modulação da atividade antioxidante pelo consumo de óleo Chia (*Salvia hispânica L.*) em modelo murino de obesidade induzida por dieta

Rio de Janeiro
2016

Aline Batista

Modulação da atividade antioxidante pelo consumo de óleo Chia (*Salvia hispânica L.*) em modelo murino de obesidade induzida por dieta.

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane
Co-Orientador: Prof.ª Dr.ª Lilia Zago

Rio de Janeiro
2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CEH/A

B333 Batista, Aline.
Modulação da atividade antioxidante pelo consumo de óleo Chia (Salvia hispânica L.) em modelo murino de obesidade induzida por dieta / Aline Batista. – 2016.
62 f.

Orientador: Julio Beltrame Daleprane
Co-Orientador: Lilia Zago
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição.

1. Nutrição – Teses. 2. Obesidade – Teses. 3. Chia – Teses. I. Daleprane, Julio Beltrame. II. Zago, Lilia. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição. IV. Título.

es CDU 612.3

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

_____ _____
Assinatura Data

Aline Batista

Modulação da atividade antioxidante pelo consumo de óleo Chia (*Salvia hispânica L.*) em modelo murino de obesidade induzida por dieta.

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 29 de setembro de 2016.

Banca examinadora:

_____

Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane (Orientador)
Instituto de Nutrição – UERJ

_____

Profa. Dra. Cristiane Aguiar da Costa
Instituto de Biologia - UERJ

_____

Profa. Dra. Milena Barcza Stockler-Pinto
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2016

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por todo amor, dedicação, incentivo e apoio. Agora posso compreender melhor o tamanho do sentimento dos pais pelos filhos. Muito obrigada por tudo que fizeram e ainda fazem por mim e pela minha filha. Amo vocês!

Ao meu marido pelo companheirismo, carinho e compreensão sempre. À minha filha por me ensinar que a felicidade está nas coisas mais simples da vida. Amo vocês!

Aos meus orientadores os professores Julio Beltrame Daleprane e Lilia Zago minha eterna gratidão por abrirem esta porta para mim. Obrigada pelos ensinamentos, incentivo, por estarem sempre disponíveis e pela amizade, vocês contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos professores e colegas do Programa do PPGANS pelos conhecimentos transmitidos. À professora Marta Citelli minha gratidão por me permitir fazer parte desta pesquisa. À professora Ângela de Castro Resende por abrir as portas do Laboratório de Farmacologia do IBRAG. A professora Cristiane Aguiar da Costa pelos ensinamentos no laboratório que foram essenciais para condução da pesquisa, pela dedicação, disponibilide e amizade.

Aos meus amigos de trabalho, companheiros de Força, do Departamento de Abastecimento da Marinha do Brasil, em especial Lenise Moreira Ribeiro e Dora Lúcia Sabará Alves, por todo companheirismo, incentivo, amizade, sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus amigos que sempre me incentivaram e apoiaram, em especial à amiga Flavia Soares, a quem sempre recorro nos momentos de desespero com meu computador.

Aos companheiros de laboratório Elisa, Elaine, Paula, Flávia e Renata obrigada por dividirem o tempo de vocês comigo.

À todos os professores, alunos e equipe dos laboratórios; Laboratório para Estudos de Interações entre Nutrição e Genética (LEING) e do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Plantas Medicinais (LFCPM) por todo o suporte.

Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro de gigantes.

Issac Newton

RESUMO

BATISTA, A. **Modulação da atividade antioxidante pelo consumo de óleo Chia (Salvia hispânica L.) em modelo murino de obesidade induzida por dieta**. 2016.62 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição, Alimentação e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2016.

A obesidade está associada a um conjunto de alterações metabólicas mediadas pelo estresse oxidativo e inflamação. Ácidos graxos provenientes da dieta são importantes moduladores de respostas metabólicas, em especial os ácidos graxos poli-insaturados ômega 3. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do consumo do óleo de chia, fonte de acido alfalinolênico, em modelo murino de obesidade. Foram utilizados 40 animais, divididos nos grupos Controle (C), Controle + óleo de Chia (CC), Hiperlipídica (HFDC) e Hiperlipídica + óleo de Chia (HFDC), sendo os grupos CC e HFDC recebendo ração adicionada com 1.5% de óleo de chia. Foram avaliados o consumo de ração e massa corporal, marcadores bioquímicos de dislipidemia e dano oxidativo, marcadores hepáticos de dano oxidativo, atividade das enzimas antioxidantes e expressão de proteínas envolvidas na resposta antioxidante. A análise estatística foi realizada utilizando analise de variância *one way* ANOVA com significância estatística para $p < 0,05$ e pós testes de Bonferroni. Ao final do período experimental os grupos HFD e HFDC apresentavam massa corporal semelhante e concentração de colesterol total semelhantes, porém maiores ($p<0.05$) que os grupos C e CC. A concentração sérica de triacilglicerol foi superior ($p<0.05$) no grupo HFD comparado aos diferentes grupos experimentais, o consumo de óleo de chia reduziu ($p<0.05$) a concentração sérica de triacilglicerol nos animais que receberam dieta HFDC. Em relação aos danos oxidativos grupo HFD apresentou maiores ($p<0.05$) concentrações de F2-isoprostana (8-epi PGF2α) e TBARs quando comparado aos demais grupos e consumo de óleo de chia teve efeito protetor na peroxidação lipídica. Também foi observado que o consumo de óleo de chia aumentou ($p<0.05$) a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx. Observou-se ainda, que o consumo de óleo de Chia aumentou ($p<0.05$) a expressão de algumas proteínas envolvidas na atividade antioxidante como a SOD2, CAT e não influenciou a expressão de SOD1 e GPx. Houve também o aumento ($p<0.05$) da expressão de Nrf2 nos grupos que consumiram óleo de Chia. Os resultados demostram que o consumo de óleo de Chia foi capaz de minimizar as alterações metabólicas e no sistema antioxidante, ocasionadas pela obesidade. Sendo o óleo de Chia uma fonte de ALA, o aumento do consumo dietético do óleo reflete uma maior conversão em EPA e DHA. Esses efeitos estariam relacionados a ação desses ácidos graxos nos fatores de transcrição relacionados ao metabolismo de lipídios e atuação de forma direta na atividade as enzimas antioxidantes e também relacionado a ativação do fator de transcrição responsável pela regulação da expressão das enzimas antioxidantes.

Palavras-chave: Obesidade. Chia. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

BATISTA, A. **Modulation of antioxidant activity by Chia oil consumption (Salvia Hispanic L.) in a murine model of obesity induced by diet**. 2016. 62 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição, Alimentação e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2016.

Obesity is associated with a set of metabolic disorders mediated by oxidative stress and inflammation. Fatty acids from the diet are important modulators of metabolic responses, especially polyunsaturated fatty acids omega 3. The aim of this study was to evaluate the influence of chia oil consumption of alpha-linolenic acid source, in a murine model of obesity. 40 animals were divided in groups Control (C), Control + Chia oil (CC), hyperlipidemic (HFDC) and hyperlipidemic + Chia oil (HFDC), and the CC and HFDC groups receiving feed added with 1.5% oil chia. We evaluated the food intake and body weight, biochemical markers of dyslipidemia and oxidative damage, hepatic markers of oxidative damage, antioxidant enzyme activity and expression of proteins involved in antioxidant response. Statistical analysis was performed using analysis of variance one-way ANOVA with significance set at $p<0.05$ and after Bonferroni test. At the end of the trial period the HFD and HFDC groups had similar body mass and concentration of similar total cholesterol, but higher ($p<0.05$) than the C and CC groups. The serum concentrations of triacylglycerol was higher ($p<0.05$) in HFD group compared to different experimental groups, the consumption of chia oil reduced ($p <0.05$) serum concentrations of triacylglycerol in rats that received HFDC diet. Regarding the oxidative damage HFD group showed higher ($p<0.05$) F2-isoprostane concentrations (8-epi PGF2a) and TBARs when compared to the other groups and chia oil consumption had a protective effect on lipid peroxidation. It was also observed that the consumption of chia oil increased ($p<0.05$) the activity of antioxidant enzymes SOD, CAT and GPx. It was also observed that the Chia Oil consumption increased ($p <0.05$) the expression of certain proteins involved in antioxidant activity as SOD2, CAT and did not influence the expression of SOD1 and GPx. There was also increased ($p <0.05$) Nrf2 expression in groups consuming Chia oil. There was also increased ($p <0.05$) Nrf2 expression in groups consuming Chia oil. The results demonstrate that the Chia Oil consumption was able to minimize the metabolic and the antioxidant system caused by obesity. Being Chia Oil a source of ALA, increased oil dietary intake reflects a higher conversion to EPA and DHA. These effects are related to the action of these fatty acids in transcription factors related to lipid metabolism, acting directly in the activity of antioxidant enzymes, and related to activation of the transcription factor responsible for regulating the expression of antioxidant enzymes.

Key words: Obesity. Chia. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais adipocinas e seus papéis.....15
Figura 2 - Representação esquemática da via do Nrf2-Keap1.....19
Figura 3 - Esquema representativo dos fatores relacionados ao aumento do estresse oxidativo na obesidade. 21
Figura 4 - Biossíntese dos ácidos graxos poli-insaturados.....23
Figura 5 - *Salvia hispanica* L. -Chia.....26
Figura 6 - Linha do tempo das dietas. 31
Figura 7 - Consumo medio de ração e massa corporal final dos grupos:.....38
Figura 8 - Colesterol total e triacilglicerol dos grupos: 39
Figura 9 - Concentração de Isoprostanas em plasma dos grupos: 40
Figura 10 - Concentração de MDA em tecido hepático dos grupos: 40
Figura 11 - Atividade da SOD em tecido hepático dos grupos 41
Figura 12 - Atividade da CAT em tecido hepático dos grupos:.....42
Figura 13 - Atividade da GPx em tecido hepático dos grupos:.....43
Figura 14 - Expressão de SOD1, SOD2, CAT e GPx em tecido hepático dos grupos: 44
Figura 15 - Expressão de Nrf2 em tecido hepático dos grupos:.....45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
AGPI-CL	Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa
ALA	Ácido alfalinolênico
ARE	Elemento responsivo a antioxidante
C	Grupo controle
CAT	Catalase
CC	Grupo controle chia
COX	Cicloxigenases
DHA	Ácido docosaexaenoico
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DPA	ácido docosapentaenóico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GLA	Ácido gamalinolênico
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa reduzida
$H_2 O_2$	Peróxido de hidrogênio
HFD	Grupo dieta hiperlipídica
HFDC	Grupo dieta hiperlipídica chia
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HO-1	Heme oxigenase-1
IL1	Interleucina 1
IL6	Interleucina 6
Keap 1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LA	Ácido linoleico
MDA	Malondialdeído
n-3	Ácidos graxos ômega 3
n-6	Ácidos graxos ômega 6
Nrf2	Fator nuclear eritroide 2

O_2	Oxigênio
OH-	Racdical hidroxila
PCR	Proteína C reativa
PPARs	Proliferadores de peroxissomos
SOD	Superóxido dismutase
SOD1	Superóxido dismutase citoplasmática
SOD2	Superóxido dismutase mitocondrial
STA	Ácido estearidônico
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marron
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 12
1 **REVISÃO DA LITERATURA** 14
1.1 **Obesidade** 14
1.2 **Estresse oxidativo** 17
1.3 **Obesidade e estresse oxidativo** 19
1.4 **Ácidos graxos poli-insatudos** 21
1.5 **Chia (Salvia hispanica L.)** 25
2 **OBJETIVOS** 28
2.1 **Objetivo Geral** 28
2.2 **Objetivos Específicos** 28
3 **MATERIAIS E MÉTODOS** 29
3.1 **Modelo experimental** 29
3.2 **Ingestão alimentar e massa corporal** 31
3.3 **Análises bioquímicas** 32
3.3.1 Colesterol total e triacilglicerol 32
3.4 **Ensaios de pró-oxidantes** 32
3.4.1 Determinação de Isoprostanas (8-iso-$PGF_{2\alpha}$) 32
3.4.2 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARs) 33
3.4.3 Dosagem de proteínas (Bradford) 33
3.5 **Atividade Enzimática Antioxidante** 34
3.5.1 Atividade da superóxido dismutase (SOD) 34
3.5.2 Atividade da catalase (CAT) 34
3.5.3 Atividade da glutationa peroxidase (GPx) 35
3.6 **Análise da expressão de proteínas por Western Blotting** 35
3.7 **Análise estatística** 36
4 **RESULTADOS** 38
4.1 **Consumo de ração e massa corporal final** 38
4.2 **Efeito do consumo de óleo de chia sobre o colesterol total e triacilglicerol** 38
4.3 **Efeito do consumo de óleo de chia sobre os marcadores de danos oxidativos** 39
4.3.1 Isoprostanas (8-iso-$PGF_{2\alpha}$) 39

4.3.2 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARs) 40
4.4 **Efeito do consumo de óleo de chia sobre a atividade enzimática antioxidante**..... 41
4.4.1 Atividade da superóxido dismutase (SOD) 41
4.4.2 Atividade da catalase (CAT) 41
4.4.3 Atividade da glutationa peroxidase (GPx)..... 42
4.5 **Efeito do consumo de óleo de chia sobre a expressão de proteínas de enzimas antioxidante e no fator nuclear eritroide 2 (Nrf2)**..... 43
5 **DISCUSSÃO** 46
CONCLUSÃO..... 51
REFERÊNCIAS 52

INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada uma epidemia global tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (FLEGAL et al., 2012). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a prevalência da obesidade mais do que duplicou entre 1980 e 2014 em todo o mundo. Em 2014, dos adultos com mais de 18 anos, 39% estavam com sobrepeso e 13% obesos. A maioria da população mundial vive em países onde a causa mortis por obesidade é maior do que por baixo peso (WHO, 2015).

No Brasil, observa-se o aumento tanto do sobrepeso quanto da obesidade. Segundo dados da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico-VIGITEL, a prevalência de excesso de peso na população adulta das 27 cidades monitoradas pela aumentou de 43,2% (2006) para 51,0% (2012), sendo de 1,37% o incremento anual médio calculado para o período. A prevalência da obesidade aumentou de 11,6% para 17,4%, com incremento anual de 0,89% (MALTA et al., 2014).

A obesidade é uma das principais causas de morbidade e mortalidade e está associada ao desenvolvimento de várias doenças, incluindo a síndrome metabólica, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, doenças hepáticas e câncer (MARSEGLIA et al., 2014). Está relacionada com um baixo grau de inflamação crônica e estresse oxidativo. O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre a formação de radicais livres e as defesas antioxidantes e de ser um dos mecanismos para o desenvolvimento das principais comorbidades relacionadas à obesidade (VINCENT; TAYLOR, 2006).

Os ácidos graxos ômega 3 destacam-se por possuírem efeitos benéficos a saúde (BRENNA; DIAU, 2007; LEE; PARK, 2014; SIMOPOULOS, 2010). Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa da série ômega 3 estão associados a prevenção da obesidade, diabetes e melhoria no metabolismo lipídico (CALDER, 2012).

A chia (Salvia hispanica L.) é uma semente nativa do México e de partes da América do Sul, rica em ácidos graxos poli-insaturados, proteínas e fibras, com alta capacidade antioxidante (MARTÍNEZ-CRUZ; PAREDES-LÓPEZ, 2014). Em relação ao perfil de ácidos graxos, possui um teor elevado de ácidos graxos ômega-3

alfalinolênico, sendo considerada uma das fontes botânicas mais ricas (AYERZA; COATES, 2005; AYERZA (H); COATES, 2011).

A identificação de fatores nutricionais que possam minimizar as importantes alterações metabólicas decorrentes da instalação da obesidade representa uma estratégia com potencial de melhorar a qualidade de vida da população, dada a magnitude da prevalência desta doença.

Considerando o potencial benéfico dos ácidos graxos ômega-3 e a forte correlação entre o estresse oxidativo e as comorbidades associadas à obesidade, deve-se explorar e compreender amplamente as repercussões de seu consumo dietético. Sendo a Chia, uma das fontes vegetais com maior concentração de ácido alfalinolênico, ácido graxo da série ômega 3, a condução de um ensaio experimental em modelo animal que avalie o impacto do consumo desse alimento no grupo em questão torna-se pertinente. Os resultados podem contribuir para a formulação de estratégias de intervenção e programas de nutrição e saúde eficientes.

1 **REVISÃO DA LITERATURA**

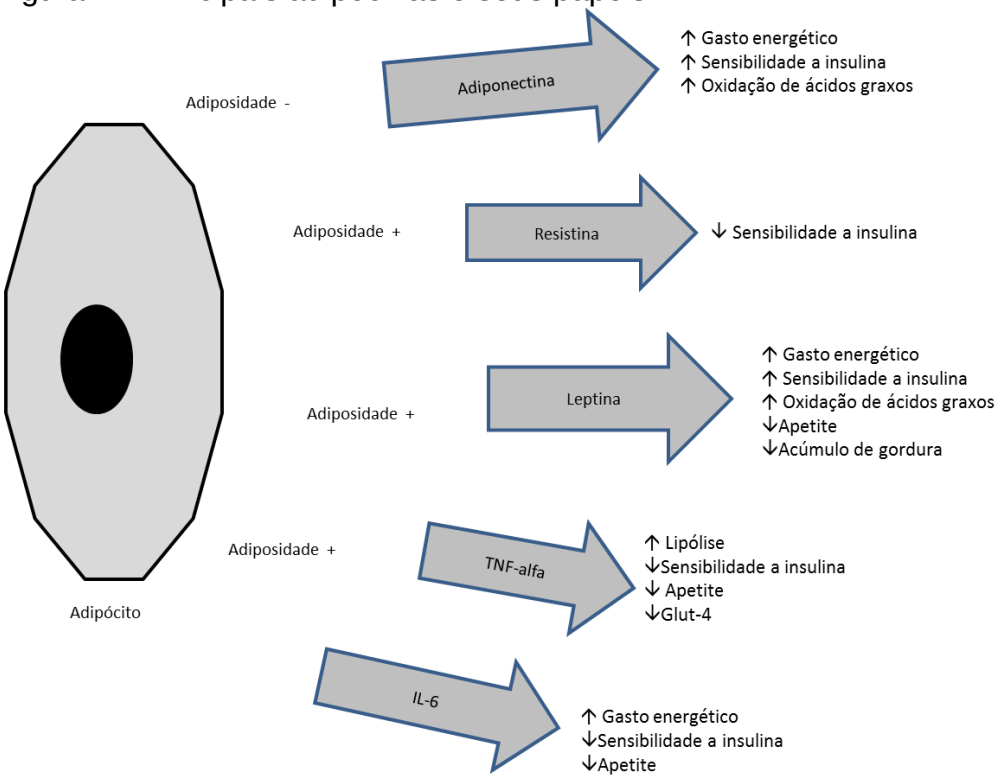
1.1 **Obesidade**

A obesidade é uma doença crônica, de origem multifatorial, determinada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo (MUENNIG, 2008). A origem multifatorial se desenvolve a partir da interação entre fatores sociais, comportamentais, psicológicos, metabólicos e genéticos (KAUFER *et al.*, 2001). É definida como a presença excessiva de gordura corporal e resulta do desequilíbrio energético, onde ingestão de energia é superior ao gasto pelo organismo (HAJER; VAN HAEFTEN; VISSEREN, 2008; MARINOU et al., 2010).

O tecido adiposo encontrado nos mamíferos é subdividido em dois tipos, tecido adiposo marrom (TAM) e tecido adiposo branco (TAB). Diferem no que diz respeito à sua função fisiológica, morfologia, metabolismo e desenvolvimento durante a ontogenia. O TAM tem função termogênica em quanto o TAB (CANNON; NEDERGAARD, 2004).

O tecido adiposo branco vem sendo descrito não apenas como um tecido de estoque de triacilglicerol. É um órgão endócrino capaz de secretar adipocinas que desempenham papel importante na homeostase de vários processos fisiológicos, tais como metabolismo lipídico, glicídico, inflamação, coagulação e comportamento alimentar (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011; HAJER; VAN HAEFTEN; VISSEREN, 2008). Dentre as adipocinas, encontram-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), a resistina, a leptina, a adiponectina e a interleucina 6 (IL-6) (FONSECA-ALANIZ et al., 2007) Figura (1).

Figura 1 - Principais adipocinas e seus papéis.



Legenda: TNF-alfa: fator de necrose tumoral-alfa; IL-6: Interleucina.
Fonte: Adaptado de SANCHEZ *et al*., 2011.

O tecido adiposo é composto por diversas células, adipócitos, fibroblastos, fibroblastos pré-adipócitos, células endoteliais e células do sistema imune, linfócitos e macrófagos (CRISTANCHO; LAZAR, 2011). Alem disso, não é um tecido heterogêneo, apresenta diferença no perfil metabólico e na secreção de adipocinas de acordo com a sua localização, intra-abdominal (visceral) ou subcutâneo (CASTEILLA et al., 2008; HAJER; VAN HAEFTEN; VISSEREN, 2008).

Na obesidade, o tecido adiposo é caracterizado pela hipertrofia e hiperplasia do adipócito, infiltração de macrófagos e ativação de células endoteliais (MARINOU et al., 2010). O acúmulo de gordura excessivo, associado às alterações patológicas do tecido adiposo altera o perfil de secreção de adipocinas, contribuindo para o aparecimento de alterações metabólicas, conhecida como síndrome metabólica, caracterizada por: hiperglicemia, hipertensão, dislipidemia, redução das lipoproteínas de alta densidade (HDL) e obesidade abdominal (BONDIA-PONS; RYAN; MARTINEZ, 2012; OLSON et al., 2012; TRAYHURN, 2013). Essas alterações metabólicas são mediadas pelo estresse oxidativo, inflamação e hipóxia (RUPÉREZ; GIL; AGUILERA, 2014).

O fígado tem um papel central no metabolismo carboidratos, lipídios e esteróides e desempenha um papel essencial nas desordens metabólicas relacionadas à obesidade (MARCEAU et al., 1999; TURNER et al., 2011). O consumo de dietas hiperlipídicas favorece o desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (CARMIEL-HAGGAI, 2004). O acúmulo excessivo de lipídios no fígado, resultante do aumento de ácidos graxos livres circulantes, é o primeiro passo no desenvolvimento de doença hepática não-alcoólica. A DHGNA inclui um amplo espectro de alterações (inflamação, fibrose e cirrose), variando do acúmulo de gordura (esteatose) até esteato-hepatite não alcoólica(FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011).

O aumento do estresse oxidativo associado à inflamação é considerado maior mecanismo no desenvolvimento das comorbidades da obesidade (HOTAMISLIGIL, 2006; NUNN; BELL; GUY, 2009). Estudos recentes apontam que os mecanismos pelos quais a obesidade e a ingestão energética aumentada exercem efeitos prejudiciais à saúde estão relacionados à capacidade de induzir estresse oxidativo (DINIZ et al., 2008). Em humanos e modelos experimentais de obesidade tem sido demostrado forte correlação entre adiposidade e marcadores do estresse oxidativo sistêmico (PAUSOVA, 2006). Em humanos, marcadores da peroxidação lipídica, TBARS (plasmático) e F2-isoprostana (urinário) aumentados estão correlacionados com índice de massa corporal e circunferência de cintura em humanos obesos. Níveis plasmáticos de peroxidação lipídica elevados também foram encontrados em modelos animais de obesidade (FURUKAWA et al., 2004).

Mudanças no estilo de vida e na dieta acarretaram um aumento no número de indivíduos obesos; a obesidade tem sido considerada como um fator causal importante de várias doenças (LASTRA; MANRIQUE; HAYDEN, 2006). Estudos demostram que o sobrepeso e a obesidade são importantes causas de comorbidades, incluindo diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares, doenças hepáticas e vários tipos de câncer, o que pode levar a uma maior morbidade e mortalidade (CHAN; WOO, 2010; MARSEGLIA et al., 2014).

1.2 **Estresse oxidativo**

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a geração de oxidantes (radicais livres) e mecanismos de defesa antioxidantes (HIGDON; FREI, 2003). Pode ser resultante tanto do excesso da produção de radicais livres e/ou redução da capacidade antioxidante (ROBERTS et al., 2006).

Os radicais livres são moléculas altamente reativas com elétrons desemparelhados que se ligam rapidamente com as moléculas próximas. Espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas contendo oxigênio que podem ou não possuir elétrons desemparelhados, mas são altamente reativos em tecidos. EROs incluem aniôn superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^-), óxido nítrico (NO), hipoclorito e peroxinitrito (ONOO-, resultantes da reação entre O_2^- e NO)(ECHTAY, 2007; STEINBRENNER; SIES, 2009).

EROs podem ser produzidos por diferentes vias, sendo a cadeia respiratória mitocondrial a principal fonte por possuir vários centros redox, capazes de transferir um elétron da molécula de oxigênio para formar ânion superóxido (ECHTAY, 2007). Outra fonte importante de EROs e espécies reativas de nitrogênio são as oxidases de membranas, dentre elas destaca-se o complexo enzimático NADPH oxidase (NUNN; BELL; GUY, 2009). Baixas concentrações de radicais livres são necessárias para o estado redox celular normal, funcionamento celular e sinalização intracelular (YU, 1994).

Em condições fisiológicas, as células apresentam um sistema de defesa antioxidante. Este sistema tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das EROs. Essa defesa inclui antioxidantes não enzimáticos: α-tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), β-caroteno e ácido lipóico (CHAISWING; OBERLEY, 2010; MORALES et al., 2014), e antioxidantes enzimáticos que incluem as enzimas superoxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx). A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido (O_2^-) em O_2 e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Possui três isoformas, a Mn-SOD mitocondrial, Cu/Zn-SOD citoplasmática e a SOD extracelular. As SOD constituem o maior sistema de defesa do organismo contra o ânion superóxido (ROBERTS; SINDHU, 2009).

O H_2O_2 formado pela dismutação do O_2^- pela SOD é convertido em H_2O e O_2 pela catalase, uma enzima antioxidante localizada em peroxissomos celulares. Além da catalase, a glutationa peroxidase (GPx) também remove H_2O_2 por acoplar sua redução com a oxidação da glutationa reduzida (GSH). A GPx é uma enzima antioxidante que contém selênio e, além de reduzir efetivamente o H_2O_2, reduz também peróxidos lipídicos a lipídios alcoólicos. Essas enzimas estão presentes no citoplasma e também estão presentes na matriz mitocondrial (LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009; WASSMANN; WASSMANN; NICKENIG, 2004).

A regulação dos sistemas antioxidantes e resposta celular ao estresse oxidativo envolve várias moléculas sinalizadoras, dentre elas, o fator nuclear eritróide 2 (Nrf2). O Nrf2 é um fator de transcrição responsável pela regulação do equilíbrio redox celular e expressão das enzimas antioxidantes, CAT, GPx, SOD, heme oxigenase I (HO-I), entre outras enzimas de detoxificação de fase II (KOBAYASHI; YAMAMOTO, 2005; MITSUISHI; MOTOHASHI; YAMAMOTO, 2012). Em condições normais está no citoplasma associado a proteína Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) formando um complexo inativo. A Keap1 serve como substrato para interação do Nrf2 com um complexo ubiquitina-ligase (Ub) levando a ubiquitinação de Nrf2 e degradação proteossomal (Figura 2A).

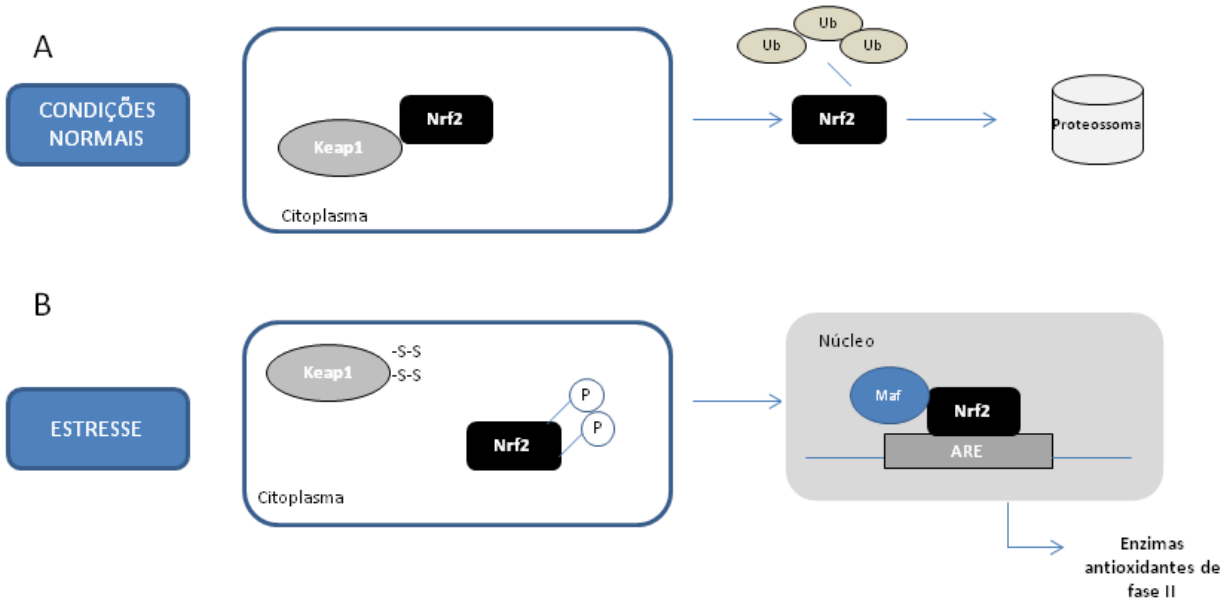
A exposição a diferentes estressores, o Nrf2 é dissociado da proteína Keap1, via proteossoma e transloca para o núcleo. Uma vez no interior do núcleo, Nrf2 dimeriza com pequenas proteínas Maf que conduzem à sua interação com o elemento responsivo a antioxidante (ARE), nas regiões promotoras de diversos genes, ativando a sua transcrição (KOBAYASHI; YAMAMOTO, 2005; OSBURN; KENSLER, 2008) (Figura 2B).

Adicionalmente, estudos demonstram que a via do *Nrf2* é responsável pela resposta antioxidante e pode ser modulada por diferentes componentes dietéticos. Esses atuariam em parte através do aumento Nrf2, dentre eles destacam-se os compostos fenólicos; ácidos graxos de cadeia longa da série ômega 3 (EPA e DHA) (PALL; LEVINE, 2015); sulfarofano, licopeno, vitamina E e alicina (CARDOZO et al., 2013).

Altas concentrações de EROs e radicais livres danificam o ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídios das células, comprometendo sua função (YU, 1994). Biomarcadores ou produtos finais do processo oxidativo mediado por radicais livres são utilizados, frequentemente, para estimar o stress oxidativo. Por exemplo, o

malondialdeído (MDA), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), hidroxiperóxidos lipídicos, dienos conjugados, e a F2-isoprostana (8-epi PGF2α). Os hidroperóxidos são gerados nos estágios iniciais da peroxidação lipídica, enquanto MDA e F2-isoprostana são formados no final do processo de oxidativo (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Figura 2 - Representação esquemática da via do Nrf2-Keap1.



Legenda: Em condições normais, o Nrf2 está associoado a Keap1 no citoplasma. Em condições de estresse o Nrf2 é ativado se transloca para o núcleo, após a ligação de proteínas Maf se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE) e aumenta a transcrição de genes regulados pelo Nrf2 (e.x. GPx, CAT, SOD).
Fonte: Adaptado de LOBODA et al., 2016.

1.3 **Obesidade e estresse oxidativo**

Existem vários fatores que podem contribuir para o aumento do estresse oxidativo na obesidade, dentre eles a inflamação crônica, a hiperglicemia, o aumento da atividade muscular para transportar o excesso de peso, o aumento da oxidação de lipídios e defesas antioxidantes inadequadas (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011; VINCENT; TAYLOR, 2006) (Figura 3).

A associação entre a obesidade e o estresse oxidativo está relacionada com a produção irregular de adipocinas (ESPOSITO et al., 2006), o tecido adiposo em excesso é fonte de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF-α, IL-1 e IL-6. Assim, a obesidade é considerada um estado de inflamação crônica. Estas citoquinas são potentes estimuladores para a produção de EROS e espécies reativas de nitrogênio por macrófagos e monócitos (FONSECA-ALANIZ et al., 2007).

Estados hiperglicêmicos podem induzir o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) através de vários mecanismos, incluindo a formação não enzimática aumentada de produtos finais da glicação avançada, fluxo aumentado da via do poliol e aumento da produção de anion superóxido (O_2^-),através da ativação mitocondrial, proteína-quinase C dependente e de NADPH-oxidases em diversos tecidos (BROWNLEE, 2001).

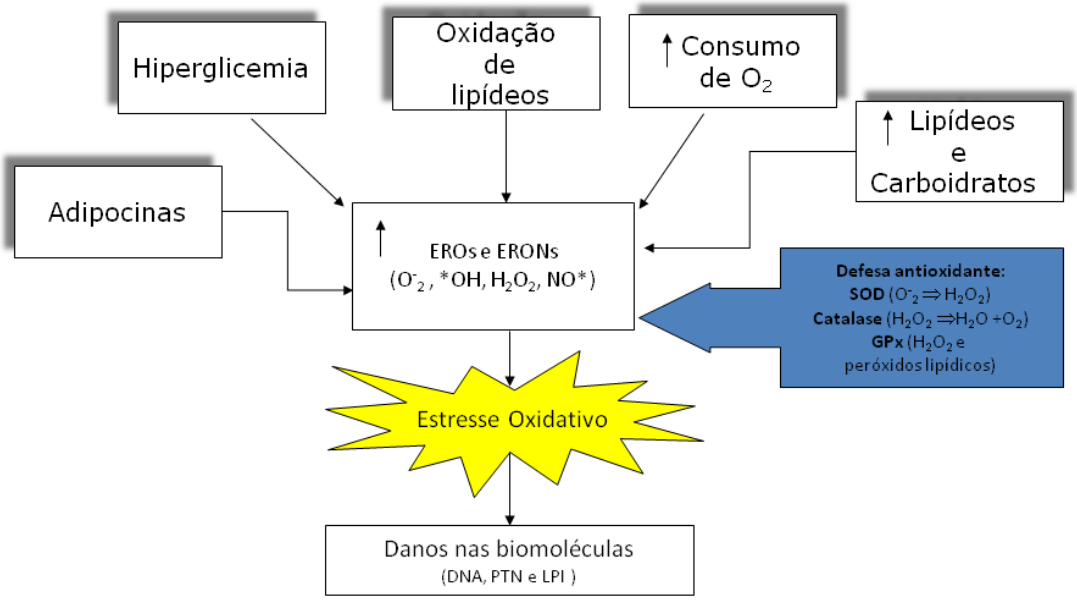
Na obesidade as taxas de respiração celular e consumo de oxigênio estão elevados devido à carga mecânica. Como consênquencia, o maior consumo de oxigênio gera a produção de EROs, como anion superóxido, radicais hidroxila, e derivados de peróxido de hidrogênio a partir do aumento da respiração mitocondrial (KHAN; NAZ; YASMEEN, 2006).

Outro fator é o aumento do consumo e estoque de lipídios, o excesso intracelular de triacilglicerol e dislipidemia são características da obesidade (DAVÌ et al., 2002; VINCENT; MORGAN; VINCENT, 2004) . Os lipídios são utilizados como substrato para oxidação. A oxidação mitocondrial e peroxissomal dos ácidos graxos são capazes de produzir radicais livres no fígado resultando no estresse oxidativo (DUVNJAK et al., 2007). Os ácidos graxos livres também são ativadores da produção de aniôn superóxido pela NADPH oxidase em várias células (SCHÖNFELD; WOJTCZAK, 2008). A NADPH oxidase compreende a principal via de produção de EROs nos adipócitos (MORROW, 2003). Outro possível mecanismo para o aumento da produção de EROs durante a obesidade é o tipo de dieta. O alto consumo de carboidrato e lipídios está associado à saturação da cadeia transportadora de elétrons e consequente aumento de ROS (FURUKAWA et al., 2004).

Alterações na defesa antioxidante ocorrem na obesidade. Adequadas concentrações de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos são fundamentais para manter o equilíbrio redox dos tecidos. Na obesidade a inadequação das defesas antioxidantes pode ocorrer pela baixa ingestão de antioxidantes e

fotoquímicos protetores na dieta (VINCENT; BOURGUIGNON; TAYLOR, 2010). Além disso, a atividade das principais enzimas antioxidantes também pode estar reduzida na obesidade. Estudos em modelos animais e em humanos demostraram redução da atividade de SOD e GPx (BEŁTOWSKI et al., 2000; OZATA et al., 2002).

Figura 3 - Esquema representativo dos fatores relacionados ao aumento do estresse oxidativo na obesidade.



Fonte: O autor, 2016.

1.4 **Ácidos graxos poli-insatudos**

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) são aqueles que apresentam duas ou mais duplas ligações (insaturações) entre as cadeias de carbono. Abrangem as famílias de ácidos graxos ômega 3 (n-3) e ômega 6 (n-6) com a primeira dupla ligação ocorrendo no terceiro e no sexto carbono a partir do carbono metílico terminal, n-3 e n-6, respectivamente (MARTIN et al., 2006; RUIZ-LÓPEZ et al., 2012).

Destacam-se por possuírem efeitos benéficos a saúde, são considerados importantes nutrientes bioativos que regulam diversas condições fisiológicas, modulam o desenvolvimento do cérebro e da cognição, regulam a resposta infamatória e o sistema imune, assim como o desenvolvimento de muitas doenças,

tais como doenças cardiovasculares, diabetes e câncer (BRENNA; DIAU, 2007; LEE; PARK, 2014; SIMOPOULOS, 2010).

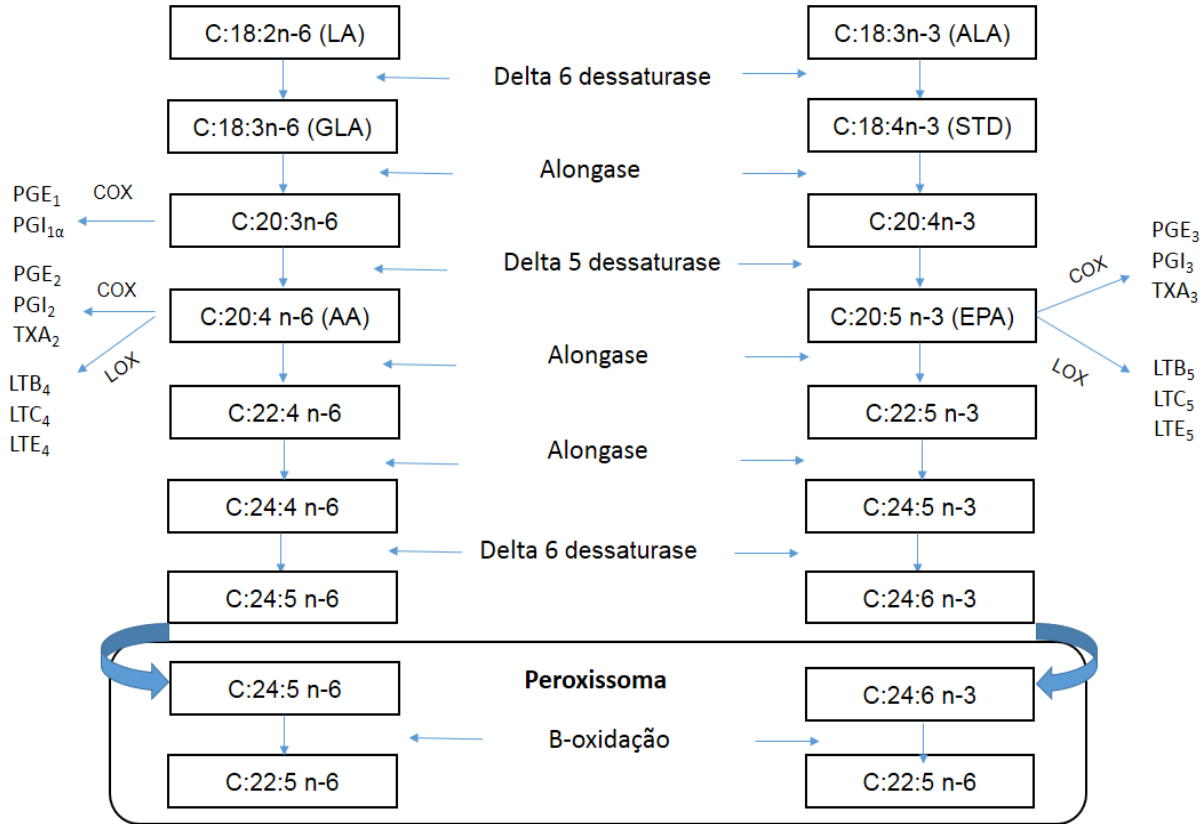
Os três ácidos graxos ômega 3, nutricionalmente importantes, são ácido alfalinolênico (ALA; C18: 3n-3), o ácido eicosapentaenóico (EPA; C20: 5n-3) e ácido docosahexanóico (DHA, C22: 6n-3) (LEE et al., 2009). Os ácidos graxos ômega 6 incluem o ácido linoleico (LA; C18:2n-6) e o ácido araquidônico (AA; C20:4n-6) (RUIZ-LÓPEZ et al., 2012). Tanto o ALA quanto o LA, são considerados ácidos graxos essenciais, pois não são sintetizados e devem, portanto, ser ingeridos pela dieta (VENEGAS-CALERÓN; SAYANOVA; NAPIER, 2010).

O ALA é proveniente de fontes vegetais, é encontrado nas plantas verdes, castanhas e óleos botânicos, como o óleo de semente de linhaça e óleo de chia (AYERZA; COATES, 2005; HIBBELN et al., 2006; LEE et al., 2009). O LA também é encontrado em óleos vegetais (soja, milho, de palma, e óleos de canola). No organismo humano, são precursores para a síntese de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPI-CL), competem pelas enzimas dessaturases e alongases para a adição de carbonos ou ligações duplas em suas cadeias, o ALA pode ser convertido a EPA e DHA e o LA pode ser convertido a AA. Porém, as taxas exatas de produção endógena de EPA e DHA são desconhecidas (BOURRE, 2004).

A Figura 4 apresenta as etapas mais importantes da conversão de LA e ALA em seus derivados insaturados. Uma das enzimas chave no metabolismo de ácidos graxos essenciais e poli-insaturados é a α-6-dessaturase que reconhece e metaboliza LA e ALA produzindo os ácidos gamalinolênico (GLA) e estearidônico (STD), respectivamente. A afinidade da Δ-6-dessaturase pelos ácidos graxos essenciais é diferente, a concentração de ALA precisa ser cerca de 10 vezes maior que a de LA para inibir em 50% a formação de GLA, sugerindo que na presença de alta concentração de LA, a via de formação do AA é preferencial. Após a dessaturação pela α-6-dessaturase, um ciclo de alongamentos e dessaturações pela Δ-5-dessaturase gera AA e EPA, a partir de LA e ALA, respectivamente. Em mamíferos, dois ciclos de alongamentos e uma dessaturação pela Δ-6-dessaturase formam os ácidos tetracosaexaenoico e tetracosapentaenóico. Esses dois ácidos graxos são transferidos do retículo endoplasmático para peroxissomos, onde são submetidos à beta-oxidação para gerar DHA e DPA e retornam ao retículo endoplasmático (CALDER, 2012; CALDER; YAQOOB, 2009).

Embora ambos, AGPI n-3 e n-6, sejam substratos para mediadores lipídicos e sejam incorporados como componentes estruturais na formação de bicamadas lipídicas das membranas celulares, os efeitos biológicos dos AGPI n-3 são diferentes dos efeitos dos AGPI n-6. Sob ação das enzimas cicloxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX), os AGPI n-6 levam à formação de prostanóides da série 2 (prostaglandinas E2, prostaciclinas I2 e tromboxanos A2) e leucotrienos da série 4 (LTB4, LTC4 e LTE4), compostos caracterizados pela ação pró-inflamatória e pró-agregatória. Por outro lado, os AGPI n-3 são precursores de prostanóides da série 3 (prostaglandinas E3, prostaciclinas I3 e tromboxanos A3) e leucotrienos da série 5 (LTB5, LTC5 e LTE5) que são biologicamente menos ativos, resultando em uma resposta antiinflamatória (CALDER, 2012; CALDER; YAQOOB, 2009).

Figura 4 - Biossíntese dos ácidos graxos poli-insaturados.



Fonte: Adaptado de RUSSO, 2009 .

Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPI-CL) também podem ser obtidos pela dieta. O AA em carne vermelha, ovos e aves (MEYER et al., 2003). O EPA, o ácido docosapentaenóico (DPA) e o DHA são encontrados quase que exclusivamente derivados de fontes marinhas, foram propostos como os nutrientes

essenciais responsáveis pelos efeitos cardioprotetores potenciais do consumo de peixes. Como o DPA é um intermediário entre o EPA e o DHA e está presente em quantidades relativamente pequenas, as pesquisas tiveram seu foco principal no EPA e no DHA (HE, 2009)

Os AGPI-CL n-3 exercem numerosos efeitos benéficos, tais como a melhoria do metabolismo dos lipídios e a prevenção da obesidade e da diabetes, o que em parte resulta da ação metabólica desses ácidos graxos no tecido adiposo (FLACHS et al., 2005). É possível que o ALA possa exercer efeitos fisiológicos similares ao EPA e DHA (SIMOPOULOS, 1999). A atividade biológica do ALA está provavelmente relacionada com a sua conversão em EPA (CALDER, 2012).

Os efeitos de AGPI-CL n-3 dependem da relação n-6 (omega-6) e n-3 da dieta, uma vez que o ALA e o ácido linoleico competem por enzinas no seu metabolismo, quantidades excessivas de ácido linoleico diminuem a formação de EPA e DHA a partir do ALA (FLACHS et al., 2005; MASSIERA et al., 2003). Atualmente, na dieta ocidental, essa relação situa-se entre 10-20/1. Uma razão mais baixa é mais desejável para a redução do risco de muitas das doenças como síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (MOLENDI-COSTE; LEGRY; LECLERCQ, 2011; SIMOPOULOS, 2008).

Evidências sugerem que os efeitos biológicos dos ácidos graxos poli-insaturado ômega-3 e os seus metabolitos, EPA e DHA, incluem efeitos anti-inflamatórios, redução da produção de citocinas e redução do estresse oxidativo(KUSUNOKI et al., 2013).

Estudos tem demonstrado o efeito dos ácidos graxos n-3 no estresse oxidativo. Um estudo com animais os n-3 modularam a atividade de enzimas anti-oxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD) e catalase em fígados de ratos diabéticos alimentados com uma dieta rica em gordura (DE ASSIS et al., 2012).

Os efeitos metabólicos dos AGPI n-3 parecem envolver múltiplos mecanismos que envolvem importantes estruturas celulares como a membrana, o citossol e o núcleo. Para algumas ações parecem atuar através de receptores, de modo que influenciam os processos sinalização e a regulação de padrões de expressão gênica, incluindo os fatores de transcrição: receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) e o fator nuclear kappa B (NF-κB)(CALDER, 2012; FLACHS et al., 2009).

1.5 **Chia (Salvia hispanica L.)**

A Chia (*Salvia hispanica* L.) é uma planta herbácea anual, que pertence à família *Lamiaceae*, nativa do sul do México e do norte da Guatemala (AYERZA (H), 1995). As sementes de Chia fazem parte da nutrição humana desde 1500 AC (AYERZA; COATES, 2005; CAHILL, 2003). Tradicionalmente as sementes têm sido utilizadas como alimento, em uma grande variedade de remédios tradicionais e em cosméticos. Em muitos países, são amplamente utilizadas devido ao seu potencial nutricional e terapêutico (ULLAH et al., 2016).

As sementes de Chia são fonte de proteína (até 26%)(AYERZA (H); COATES, 2011); fibra dietética (até 40%) (REYES-CAUDILLO; TECANTE; VALDIVIA-LÓPEZ, 2008); antioxidantes, minerais essenciais tais como cálcio, magnésio, fósforo, ferro, zinco e cobre; e vitaminas tais como a tiamina, niacina, riboflavina, vitamina C e vitamina E (MUÑOZ et al., 2013). Sendo que o teor de nutrientes pode ser afetado por fatores ambientais (AYERZA, 2009).

Em sua composição, destaca-se o conteúdo de lipídios com cerca de 25 a 40%, sendo 60% deste de omega-3 (n-3), ácido alfalinolênico (ALA, C18: 3n-3) e 20% de omega-6, ácido linoleico (REYES-CAUDILLO; TECANTE; VALDIVIA-LÓPEZ, 2008). É uma das fontes botânicas mais ricas de ALA (AYERZA; COATES, 2005). As sementes de *Salvia hispanica* L. possuem elevado teor de ácidos graxos essenciais ômega-3, 6, 9 e fibra, assim tem sido associada a vários benefícios para a saúde (AYERZA, 2009). A figura 5 apresenta as imagens da *Salvia hispanica* L planta, semente e cápsula de óleo extraído da semente.

Estudos demostram que a incorporação de *Salvia hispanica* L.na alimentação de frangos pode melhorar o valor nutricional de seus produtos, por aumentar o teor de ômega-3 e diminuir o conteúdo de colesterol da carne (AYERZA; COATES; LAURIA, 2002; BETTI et al., 2009) e ovos (AYERZA; COATES, 2000). As sementes de Chia tem sido adicionadas as rações de animais para melhorar o teor de ômega 3 de carne de porco (AYERZA; COATES; LAURIA, 2002) e carne de coelho (PEIRETTI; MEINERI, 2008).

Figura 5 - *Salvia hispanica* L. -Chia

Legenda: *Salvia hispanica* L planta, semente e cápsula de óleo extraído da semente.
Fonte: Adaptado de MOHD ALI et al., 2012.

Alguns estudos demonstraram o benefício do consumo da Chia. Animais alimentados com uma dieta contendo 16% de sementes de chia apresentaram concentrações plasmáticas aumentadas ALA, EPA e DHA, redução dos níveis plasmáticos de triacilglicerol e aumento do HDL (AYERZA; COATES, 2007). O consumo de semente de Chia (36,2 g%) foi capaz de melhorar a sensibilidade a insulina e a tolerância a glicose, reduzir a adiposidade visceral, diminuir a esteatose hepática e inflamação em ratos resistentes à insulina e com dislipidemia (OLIVA et al., 2013).

Um estudo recente, em modelo animal de obesidade induzida pela dieta, avaliou o efeito da ingestão de óleo (4%m/m) e semente de Chia (13,3%) no estresse oxidativo, na intolerância a glicose e nas complicações da obesidade induzida pela dieta. O consumo de semente de chia ou óleo chia não reduziram o ganho de peso corporal ou o acúmulo de gordura abdominal. No entanto, melhoram o metabolismo da glicose e de tolerância à insulina. Óleo de chia restaurou a expressão da superóxido dismutase e da glutationa peroxidase (MARINELI et al., 2015a).

Em humanos, o consumo de aproximadamente 37 g de semente de chia na forma de suplemento e pão, durante 12 semanas, reduziu a pressão arterial sistólica

e a proteína C reativa (PCR), aumentou as concentrações no soro de ALA e EPA sem afetar o peso corporal em indivíduos recebendo tratamento convencional para diabetes (VUKSAN et al., 2007). Já o consumo da semente de chia em forma de pó, 25g, duas vezes ao dia, por 12 semanas, aumentou as concentrações plasmáticas de ALA, mas as concentrações de EPA e DHA, composição corporal, biomarcadores de inflamação (PCR, IL6, proteína quimiotática de monócitos 1, MCP-1 e TNF-alfa), e estresse oxidativo (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox e nitrito plasmático) não alteraram (NIEMAN et al., 2009). Em outro estudo de intervenção humana, a suplementação de 35g de farinha de Chia, por 12 semanas, reduziu a pressão sanguínea ambulatorial e clínica, tanto em indivíduos hipertensos não tratados farmacologicamente, quanto naqueles previamente tratados com terapia medicamentosa. Também foi capaz de reduzir marcadores do estresse oxidativo (MDA e nitrito plasmático), sem alterar marcadores inflamatórios (PCR e α-1-glicoproteína ácida)(TOSCANO et al., 2014).

2 **OBJETIVOS**

2.1 **Objetivo Geral**

Avaliar a influencia do consumo do óleo de chia nos marcadores de estresse oxidativo em modelo murino de obesidade induzida pela dieta.

2.2 **Objetivos Específicos**

- Determinar a influencia do óleo de chia no consumo de ração e massa corporal.
- Avaliar o impacto da adição de óleo de chia na dieta em marcadores bioquímicos de dislipidemia e dano oxidativo.
- Avaliar marcadores do dano oxidativo no tecido hepático.
- Avaliar a atividade de enzimas antioxidantes.
- Analisar a expressão de proteínas chave envolvidas na resposta antioxidante.

3 **MATERIAIS E MÉTODOS**

3.1 **Modelo experimental**

Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (protocolo: CEUA/035/2013, anexo).

Foram utilizados quarenta camundongos C57Bl/6 machos, provenientes da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia /IBRAG/UERJ, em temperatura média de 21º C e com ciclo de luminosidade de 12 h (claro e escuro). Após o nascimento, os camundongos foram mantidos na proporção de uma mãe para 6 filhotes, durante o período de amamentação. Logo após o desmame (21 dias), os animais foram divididos em dois grupos recebendo água e ração *ad libitum* durante noventa dias, sendo metade dos animais recebendo dieta controle (dieta normocalórica AIN93-G) e a outra dieta hiperlipídica (lipídios compondo 45% do valor calórico). Vide tabela 1- Composição das dietas.

Ao final de noventas dias, os grupos foram subdivididos, recebendo as dietas por quarenta e cinco dias, sendo eles:

a) Controle (C, recebendo dieta controle);

b) Controle + óleo de Chia (CC, recebendo dieta controle + óleo de Chia -1,5% m/m);

c) Hiperlipídica (HFD, recebendo dieta hiperlipídica, com lipídios compondo 45% do valor calórico);

d) Hiperlipídica + óleo de Chia (HFDC, dieta hiperlipídica, com lipídios compondo 45% do valor calórico + óleo de Chia -1,5% m/m).

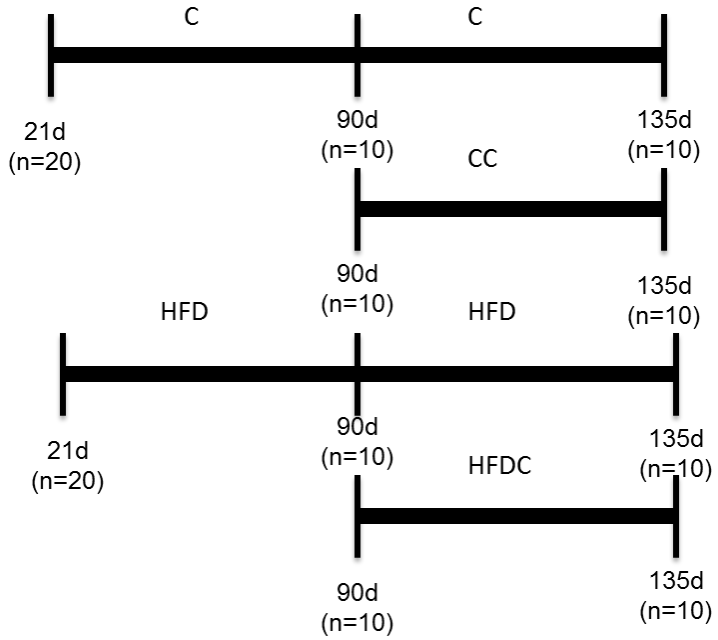
Tabela 1. Composição das dietas

	DIETAS			
Nutrientes (g/Kg)	Controle (C)	Controle Chia (CC)	HFD	HFD CHIA (HFDC)
Amido de milho	531,75	531,75	375,75	375,75
Caseína	200,0	200,0	200,0	200,0
Sacarose	100,0	100,0	100,0	100,0
Óleo de soja	70,0	70,0	70,0	70,0
Celulose	50,0	50,0	50,0	50,0
Mix de minerais *	35,0	35,0	35,5	35,5
Mix de vitaminas *	10,0	10,0	10,0	10,0
L-cistina	3,0	3,0	3,0	3,0
Colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Banha	0,0	0,0	156,0	156,0
Óleo de Chia	0,0	15,0	0,0	15,0
Carboidrato (g/Kg)	631,75	631,75	475,75	475,75
Proteína (g/Kg)	200,0	200,0	200,0	200,0
Lipídio (g/Kg)	70,0	85,0	226,0	241,0
Carboidrato (Kcal/g)	2,5	2,5	1,9	1,9
Proteína (Kcal/g)	0,8	0,8	0,8	0,8
Lipídio (Kcal/g)	0,6	0,8	2,0	2,2
Energia (Kcal/g)	3,9	4,1	4,7	4,8

*Segundo AIN93-G.

Após noventa dias com a dieta, aos 135 dias de vida, os animais foram mantidos em jejum por 12h, em seguida foram anestesiados com quetamina (50 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg). O protocolo experimental está representado na figura 3. As amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca. O plasma foi separado por centrifugação (3000 rpm durante 10 min) à temperatura ambiente e armazenado individualmente a -20 ° C até o ensaio. O fígado foi removido, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80ºC para análise subsequente.

Figura 6 - Linha do tempo das dietas.



Legenda: Animais do grupo Controle (C), controle com 1,5% de óleo de Chia (CC), hiperlipídico com 45% de lipídios (HFD), hiperlipídico com 1,5% de óleo de Chia (HFDC).

3.2 **Ingestão alimentar e massa corporal**

A ingestão de ração (g) dos camundongos foi monitorada a cada 2 dias e a massa corporal (g) foi aferida semanalmente. O consumo de ração diário foi calculado fazendo a diferença da quantidade fornecida pela sobra dividida pelo número de animais (n) vezes dois (referente aos dias), então:

Ingestão (ração) = (Oferta – sobra)/2n

3.3 **Análises bioquímicas**

3.3.1 Colesterol total e triacilglicerol

O colesterol total e o triacilglicerol (TG) foram avaliados no plasma através de Kit comercial (Sistema Diagnóstico Roche) que se baseia em método colorimétrico descrito por Friedewald (1972) (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972). As concentrações plasmáticas foram expressas em mg/dL.

3.4 **Ensaios de pró-oxidantes**

3.4.1 Determinação de Isoprostanas (8-iso-$PGF_{2\alpha}$)

Este método é utilizado para a avaliação do estado de oxidação dos ácidos graxos em sistemas biológicos. Consiste na aferição do 8-iso-$PGF_{2\alpha}$ isoprostanas, eicosanóides derivados da ação de radicais livres sobre os ácidos graxos poli-insaturados. Baseia-se na competição entre a 8-iso-$PGF_{2\alpha}$ isoprostana e a 8-iso-$PGF_{2\alpha}$ isoprostana-acetilcolinesterase conjugada (marcador) por um limitado número de sítios ligadores para antissoro específico de 8-iso- $PGF_{2\alpha}$ isoprostana.

Para a análise de 8-iso-$PGF_{2\alpha}$ isoprostana de foram utilizadas amostras de plasma dos animais. As amostras foram estocadas a -80 °C na presença de 0,005% de butil-hidroxi-tolueno para análise posterior.

A determinação de 8-iso-$PGF_{2\alpha}$ isoprostana foi realizada por ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), utilizando kit comercial Cayman ChemicalCo. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 405-420 nm. Os resultados foram expressos em pg/mL de amostra.

3.4.2 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARs)

Este método é utilizado para a avaliação do estado de oxidação dos ácidos graxos em sistemas biológicos. O dano em lipídios de membrana é determinado pela formação de subprodutos da peroxidação lipídica (malondialdeído-MDA), que são substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico formadas durante a peroxidação em sistemas de membranas e microssomos. MDA reage com o (ácido tiobarbitúrico) TBA gerando um produto colorido róseo lido em espectrofotômetro (532 nm). Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Draper & Hadley, 1990 (DRAPER; HADLEY, 1990) e adaptada para medida em fígado.

Foram utilizados 200 μl de homogenato de fígado para 600 μl de ácido tricloroacético (TCA). As amostras foram centrifugadas por 10 min em 1000 rpm à 4 ºC. Separou-se 500 μl do sobrenadante em um tubo de ensaio com tampa e adicionou-se 500 μl de TBA (0,67%). Os tubos foram colocados em banho seco (100 ºC) por 30 minutos. Deixou-se esfriar por 5 minutos e posteriormente foi feita a leitura em espectrofotômetro (532 nm; Ultrospec 2100 Pro — Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

3.4.3 Dosagem de proteínas (Bradford)

As proteínas totais das amostras estudadas foram quantificadas através do método de Bradford em placa de 96 poços, utilizando a albumina bovina (SIGMA®) (BRADFORD, 1976).

3.5 **Atividade Enzimática Antioxidante**

3.5.1 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A enzima SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido (O_2-) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A noradrenalina é oxidada pelo O_2- para formar um produto róseo, adrenocromo. A atividade da SOD foi determinada medindo-se a inibição da auto-oxidação da noradrenalina, por espectofometria (BANNISTER; CALABRESE, 1987).

Foi utilizado 20 μl, 40 μl e 60 μl de cada amostra de homogenato de fígado em cubetas separadas. Em cada cubeta foi adicionado 1,940 mL de tampão glicina (3,75 mg/mL de água destilada), 20 μl de catalase (1,2 mg/mL de água destilada) e 40 μl de noradrenalina (19 mg/ml de água destilada). A concentração de adenocromo foi medida, em um intervalo de 180 minutos, espectofotometricamente (480 nm; Ultrospec 2100 Pro - Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Uk)

3.5.2 Atividade da catalase (CAT)

A catalase é uma hemoproteína que catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formando oxigênio molecular e água. A atividade enzimática foi avaliada pelo consumo de peróxido hidrogênio pela reação, por espectrofotometria no comprimento de onda de 240 nanômetros (Ultrospec 2100 Pro - Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Uk; (AEBI, 1984).

Foram utilizados 60 μl de amostra de homogenato de fígado em cubetas (quartzo) separadas. As amostras foram incubadas com 2 mL de tampão fosfato (PBS) e H_2O_2 (0,16%). A concentração de H_2O_2 foi avaliada durante 60 segundos.

3.5.3 Atividade da glutationa peroxidase (GPx)

A GPx é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos para H_2O e álcool, usando a glutationa (GSH) como doadora de elétrons. Está localizada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial. A atividade da GPx foi medida em função da taxa de decaimento da NADPH, por espectrofotometria no comprimento de onda de 340 nanômetros (FLOHÉ; GÜNZLER, 1984).

Foram utilizados 60µl de homogenato fígado em cubetas separadas. Em cada cubeta foi adicionado 1540µl de tampão fosfato (PBS), glutationa reduzida (GSH; 2 mM), glutationa redutase (GR; 0,11 mg/mL), azida sódica (0,065 mg/mL) e incubada por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 200 µl de NADPH (10 nM) e a leitura realizada por 3 minutos. Posteriormente a esta leitura foi adicionado 200µl de peróxido de hidrogênio H_2O_2 (3%) e lido por 5 minutos. (340nm; Ultrospec 2100 Pro - Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Uk)

3.6 **Análise da expressão de proteínas por Western Blotting**

Western blot é uma técnica para separar e identificar proteínas. Nesta técnica uma mistura de proteínas é separada com base no peso molecular, por meio de eletroforese em gel. Estes resultados são, então, transferidos para uma membrana, resultando na produção de uma banda para cada proteína. A membrana é incubada com anticorpos específicos para a proteína de interesse. Foram analisadas a expressão das proteínas: glutationa peroxidase (GPx), superóxido dismutase citossólica (SOD-1), superóxido dismutase mitocondrial (SOD-2), catalase (CAT), fator de transcrição Nrf2 e α-actina. Para o preparo das amostras, o tecido hepático (100 mg) foi homogeneizado com 2 mL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, NaF 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton x100 e SDS 0,1%, pH 7.4) com 1 µl de coquetel inibidor de proteases, centrifugados (13000 rpm, 4°C for 25 min) e sonicados (3 vezes com 10 segundos de pulse on e 15 segundos de pulse off).

A concentração de proteína foi determinada usando ensaio colorimétrico kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific Inc., Barrington, IL, EUA) seguindo as recomendações do fabricante e a leitura foi realizada a 540 nm. As amostras foram desnaturadas em tampão de amostras (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol e 0.001% bromofenol azul) e aquecidas a 95 °C por 5 min. As amostras foram analisadas pelo método SDS-PAGE. Foram pipetados 20 µg de proteína dos homogenatos em poços no gel de 10% de poliacrilamida para eletro-separação de acordo com o tamanho e carga da proteína. Em seguida, as proteínas foram transferidas por eletroforese para membranas de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA).

Para inibir ligações inespecíficas do anticorpo, as membranas foram incubadas em T-TBS acrescido de albumina a 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 90 min. Posteriormente, as membranas foram lavadas com T-TBS e incubadas com o anticorpo primário (anti-rabit) específico para cada proteína (overnight, a 5ºC): anti-GPx (1:1000), anti-SOD-1 (1:1000) anti-SOD-2 (1:1000), anti-CAT (1:1000), anti-NRF2 e anti-α-actina (1:1000) para os homogenatos de todos os tecidos (anticorpos da Santa Cruz Biotechnology Inc.; CA, EUA). Após este período, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário (anti-rabit) conjugado à peroxidase (1:5000) por 1 h (25ºC) sob agitação constante. As membranas foram lavadas novamente com T-TBS e tratadas com kit de quimiluminescência (ECL-plus; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA) e as imagens das bandas foram obtidas com o sistema ChemiDoc XRS de imagens moleculares (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). As imagens das bandas foram analisadas e quantificadas com auxílio do programa Image J (The National Institute of Health, EUA).

3.7 **Análise estatística**

Os resultados foram apresentados por meio de gráficos na forma de média ± desvio padrão. As associações entre as variáveis foram analisadas por meio de “One-way analysis of variance” (ANOVA), utilizada para comparar diferenças entre os diversos grupos experimentais, com posterior uso do pós-teste Bonferroni. Foi

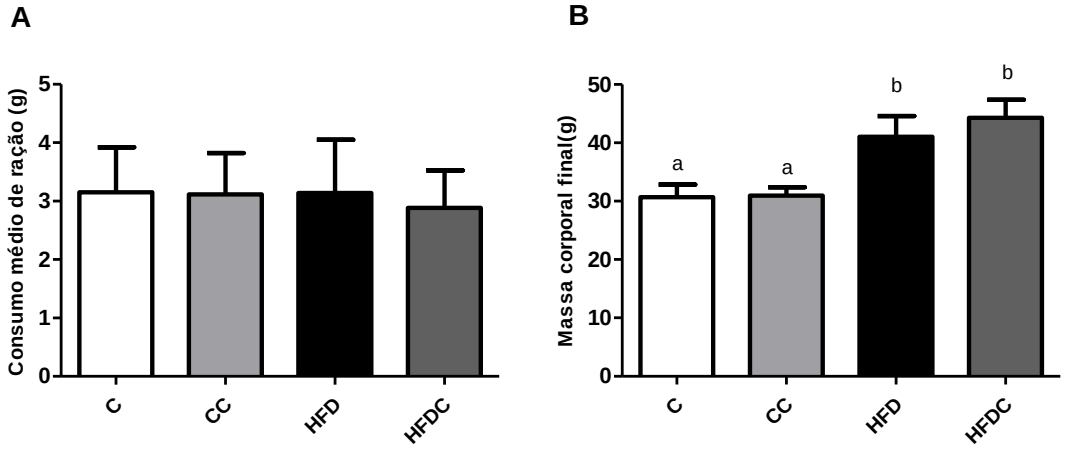
considerado como estatisticamente significante quando o valor de $p<0,05$. Os dados foram processados nos *softwares* Prisma e Microsoft Excel 2010.

4 **RESULTADOS**

4.1 **Consumo de ração e massa corporal final**

Durante o período experimental não houve diferença significativa ($p<0.05$) da quantidade média de ração consumida pelos grupos C, CC, HFD e HFDC (Figura 7A). Ao inicio do experimento os animais possuíam a mesma massa corporal (23 ± 2 g), já ao final do protocolo experimental os grupos HFD e HFDC apresentavam massa corporal semelhante, porem superiores ($p<0.05$) aos grupos C e CC (Figura 7B). Demonstrando que o consumo de óleo de chia não influenciou o ganho de massa corporal dos animais.

Figura 7 - Consumo medio de ração e massa corporal final dos grupos:



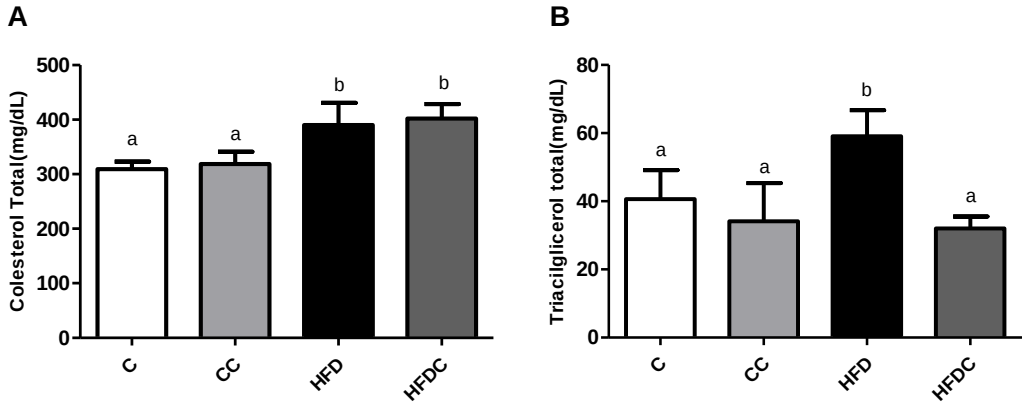
Legenda:Grupo controle (C), Controle + óleo de Chia (CC), Hiperlipídica (HFD) e Hiperlipídica + óleo de Chia (HFDC).
Nota: Valores estão expressos como média ± desvio padrão, n=6 animais por grupo. Letras distintas denotam significância estatística.

4.2 **Efeito do consumo de óleo de chia sobre o colesterol total e triacilglicerol**

As concentrações plasmáticas de colesterol foram significativamente maiores ($p< 0,05$) nos animais do grupo HFD, quando comparado ao C. Não houve diferença significativa entre os grupos CC e C, e entre os grupos HFD e HFDC (Figura 8). Ao avaliar as concentrações plasmáticas de triacilglicerol dos animais, observou-se que

o grupo HFD apresentou valor numericamente superior ($p<0.05$) comparado aos demais grupos.

Figura 8 - Colesterol total e triacilglicerol dos grupos:



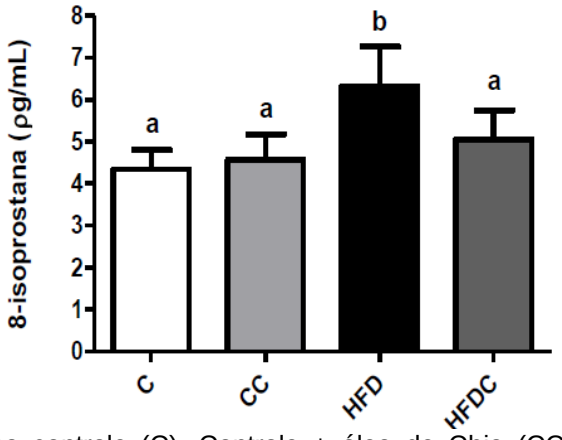
Legenda:Grupo controle (C), Controle + óleo de Chia (CC), Hiperlipídica (HFD) e Hiperlipídica + óleo de Chia (HFDC).
Nota: Valores estão expressos como média ± desvio padrão, n=6 animais por grupo. Letras distintas denotam significância estatística.

4.3 **Efeito do consumo de óleo de chia sobre os marcadores de danos oxidativos**

4.3.1 Isoprostanas (8-iso-PGF$_{2\alpha}$)

Para avaliar produto resultante da peroxidação lipídica no plasma dos animais realizou-se a análises de isoprostanas. Houve aumento ($p<0.05$) da formação de isoprostanas nos animais do grupo HFD quando comparado ao C (Figura 9). Não houve diferença entre os animais do grupo C e CC. Houve redução significativa ($p<0.05$) da formação de isoprostanas no grupo HFDC quando comparado ao HFD.

Figura 9 - Concentração de Isoprostanas em plasma dos grupos:

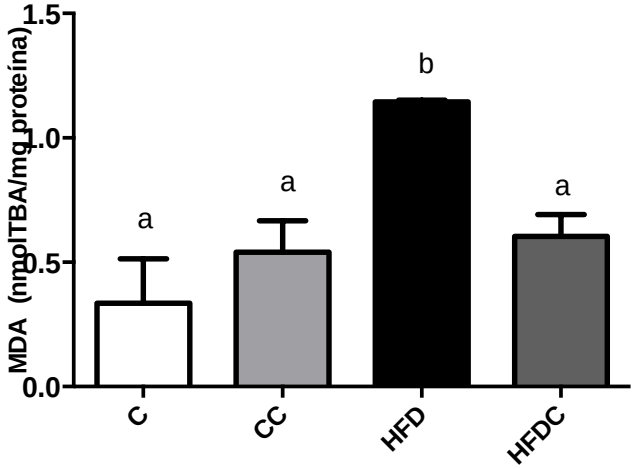


Legenda:Grupo controle (C), Controle + óleo de Chia (CC), Hiperlipídica (HFD) e Hiperlipídica + óleo de Chia (HFDC).
Nota: Valores estão expressos como média ± desvio padrão, n=6 animais por grupo. Letras distintas denotam significância estatística.

4.3.2 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARs)

Na formação de subprodutos da peroxidação lipídica (malondialdeído-MDA) no tecido hepático dos animais, foi observado aumento significativo ($p<0.05$), na formação de MDA, no grupo HFD quando comparado ao C (Figura 10). Não houve diferença significativa na formação de MDA entre os grupos C e CC. Animais do grupo HFDC apresentaram redução significativa ($p<0.05$), na formação de MDA em tecido hepático quando compardo ao grupo HFD.

Figura 10 - Concentração de MDA em tecido hepático dos grupos:



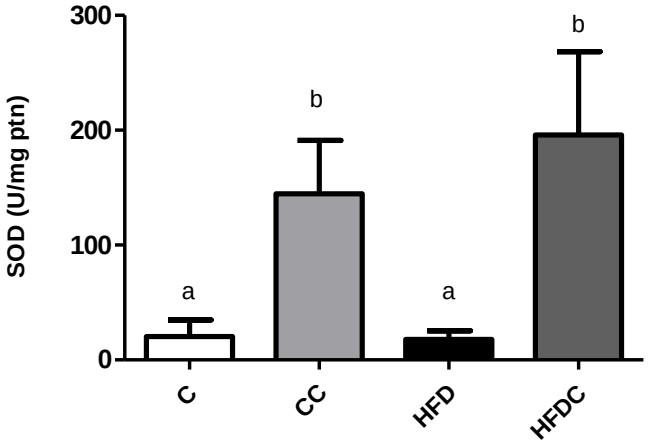
Legenda:Grupo controle (C), Controle + óleo de Chia (CC), Hiperlipídica (HFD) e Hiperlipídica + óleo de Chia (HFDC).
Nota: Valores estão expressos como média ± desvio padrão, n=6 animais por grupo. Letras distintas denotam significância estatística.

4.4 **Efeito do consumo de óleo de chia sobre a atividade enzimática antioxidante**

4.4.1 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD em amostras de tecido hepático dos animais, foi semelhante entre o grupo HFD e C (Figura 11). Entretanto, a atividade da SOD foi significativamente maior ($p<0,05$) no grupo CC, quando comparado ao C. O consumo de óleo de chia aumentou significativamente ($p<0,05$) a atividade enzimática do grupo HFDC quando comprado com o grupo HFD.

Figura 11 - Atividade da SOD em tecido hepático dos grupos



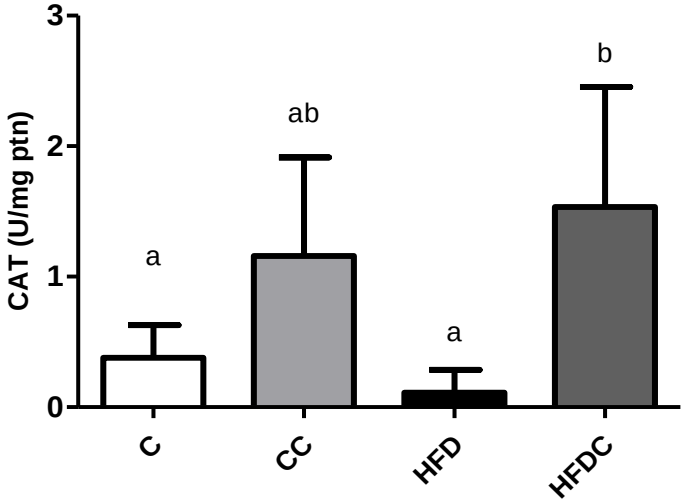
Legenda:Grupo controle (C), Controle + óleo de Chia (CC), Hiperlipídica (HFD) e Hiperlipídica + óleo de Chia (HFDC).
Nota: Valores estão expressos como média ± desvio padrão, n=6 animais por grupo. Letras distintas denotam significância estatística.

4.4.2 Atividade da catalase (CAT)

Não foi observada diferença significativa na atividade da CAT em amostras de tecido hepático dos animais do grupo HFD quando comparados ao C. Os animais do grupo HFD apresentaram redução de 70% da atividade enzimática, embora não significativa, quando comparado ao C. O consumo de óleo de chia aumentou a atividade da CAT, no tecido hepático dos animais do grupo CC, embora de forma

não significativa, quando comparado ao grupo C. O consumo de chia aumentou significativamente (p<0,05) a atividade enzimática do grupo HFDC quando comprado ao HFD (Figura 12).

Figura 12 - Atividade da CAT em tecido hepático dos grupos:

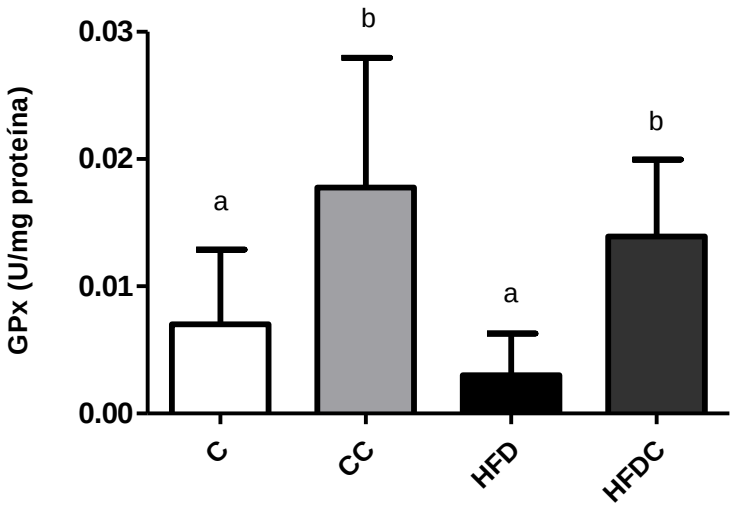


Legenda:Grupo controle (C), Controle + óleo de Chia (CC), Hiperlipídica (HFD) e Hiperlipídica + óleo de Chia (HFDC).
Nota: Valores estão expressos como média ± desvio padrão, n=6 animais por grupo. Letras distintas denotam significância estatística.

4.4.3 Atividade da glutationa peroxidase (GPx)

Não foi observada diferença significativa na atividade da GPx em amostras de tecido hepático dos animais do grupo HFD quando comparados ao C. Os animais do grupo HFD apresentaram menor atividade enzimática, embora não significativa, redução de 54% quando comparado ao grupo C. A atividade da GPx foi significativamente (p<0,05) maior no grupo CC, quando comparado ao C. O consumo de óleo de chia aumentou significativamente (p<0,05) a atividade da GPx nos animais do grupo HFDC quando comprado ao HFD (Figura 13).

Figura 13 - Atividade da GPx em tecido hepático dos grupos:



Legenda:Grupo controle (C), Controle + óleo de Chia (CC), Hiperlipídica (HFD) e Hiperlipídica + óleo de Chia (HFDC).
Nota: Valores estão expressos como média ± desvio padrão, n=6 animais por grupo. Letras distintas denotam significância estatística.

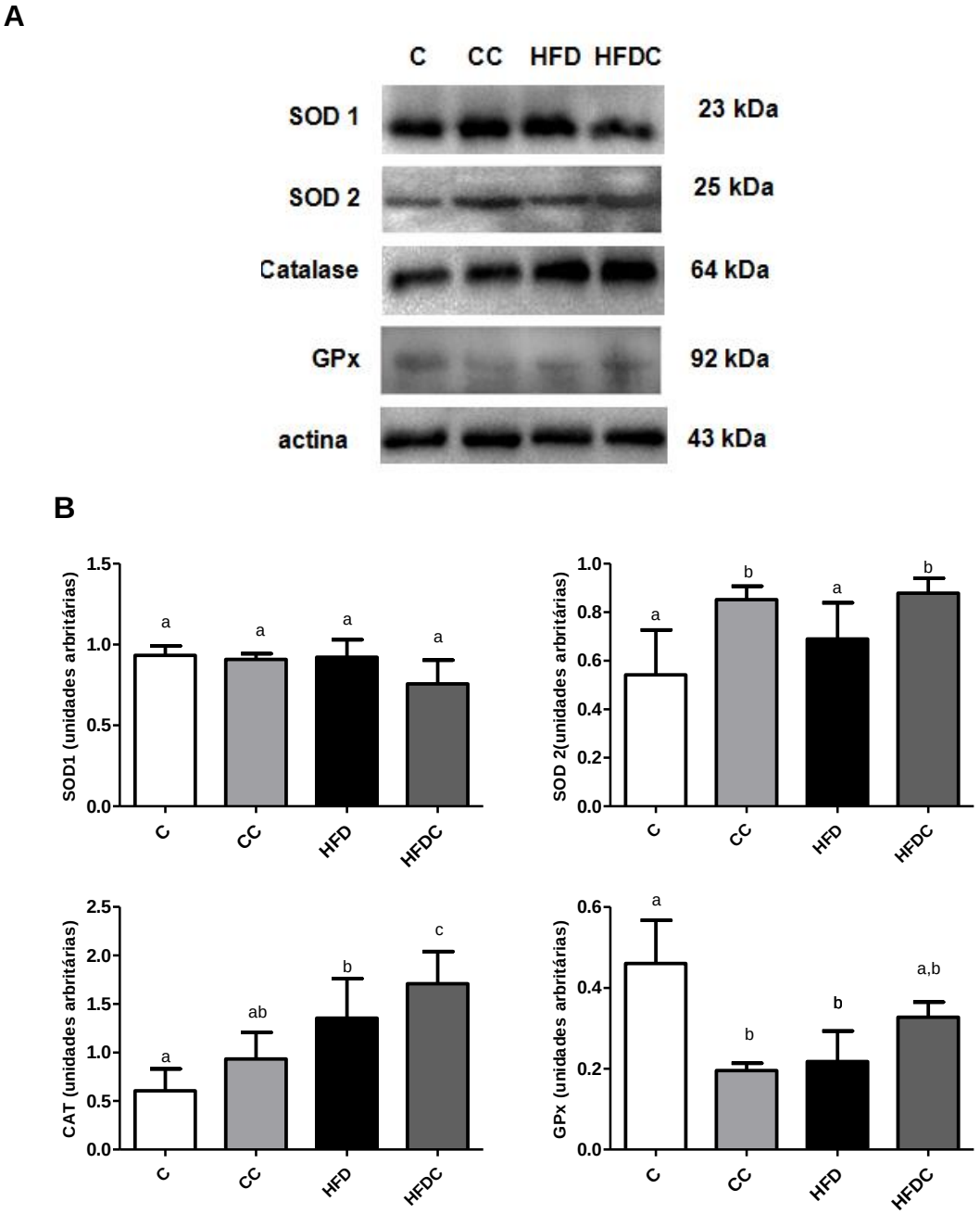
4.5 **Efeito do consumo de óleo de chia sobre a expressão de proteínas de enzimas antioxidante e no fator nuclear eritroide 2 (Nrf2)**

A expressão de proteínas envolvidas na atividade antioxidante foram analisadas em tecido hepático dos animais experimentais. Duas isoformas da enzima superóxido dismutase foram avaliadas: SOD-Cu-Zn (SOD1), que contém cobre (Cu) e zinco (Zn) no seu sitio de ativação, localizada nos compartimentos intracelulares citoplasmáticos e SOD-Mn (SOD2) que contém manganês (Mn) como cofator, localizada na mitocôndria. Não foram observadas diferenças significativas ($p<0,05$) na expressão de SOD1 dos grupos (Figura 14B). Em relação a SOD2, não houve diferença significativa na sua expressão entre os grupos HFD e C. O grupo CC apresentou aumento significativo ($p<0,05$) da expressão comparado ao C e o grupo HFDC quando comparado ao HFD (Figura 14B).

A enzima CAT apresentou maior expressão ($p<0,05$) no grupo HFD quando compardo com o C. Não foi observada diferença na expressão de CAT entre os animais do grupo C e CC. Observou-se um aumento significativo ($p<0,05$) da expressão dessa proteína quando comparado o grupo HFDC com o HFD (Figura 14B).

A expressão de GPx foi significativamente ($p<0,05$) menor no grupo HFD quando ao C. O grupo CC apresentou menor ($p<0,05$) expressão dessa proteína quando comparado ao C. Não houve diferença significativa na expressão da proteína GPx entre os grupos HFD e HFDC. No grupo HFDC, a expressão da proteína GPx apresentou valores semelhantes ao controle (Figura 14B).

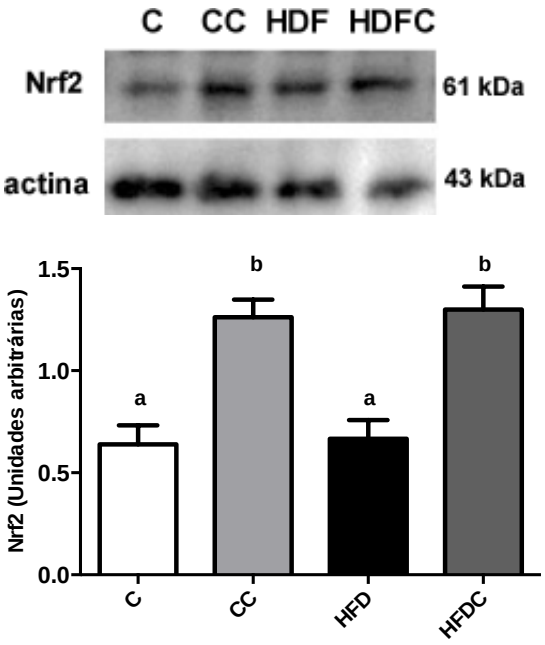
Figura 14 - Expressão de SOD1, SOD2, CAT e GPx em tecido hepático dos grupos:



Legenda:Grupo controle (C), Controle + óleo de Chia (CC), Hiperlipídica (HFD) e Hiperlipídica + óleo de Chia (HFDC).
Nota: Valores estão expressos como média ± desvio padrão, n=6 animais por grupo. Letras distintas denotam significância estatística.

A expressão de Nrf2, responsável regulação da transcrição de genes codificantes de proteínas antioxidantes, no tecido hepático dos animais, foi significativamente maior ($p<0,05$) no grupo CC quando comparado ao C e no grupo HDFC quando comparado ao grupo HFD (Figura 15).

Figura 15 - Expressão de Nrf2 em tecido hepático dos grupos:



Legenda:Grupo controle (C), Controle + óleo de Chia (CC), Hiperlipídica (HFD) e Hiperlipídica + óleo de Chia (HFDC).
Nota: Valores estão expressos como média ± desvio padrão, n=6 animais por grupo. Letras distintas denotam significância estatística.

5 **DISCUSSÃO**

A obesidade é uma doença crônica com alta prevalência em países ocidentais. A ingestão excessiva de gordura, principalmente saturada, gera um desequilíbrio energético e é considerada uma das principais causas de obesidade (DINDO et al., 2003; ROMERO; ZANESCO, 2006). O consumo de dietas ricas em gordura aumenta significativamente o peso corporal e o acúmulo de lipídios hepáticos, levando a obesidade, dislipidemias e esteatose hepática (CARMIEL-HAGGAI, 2004). Estudos tem demonstrado o potencial dos ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 na prevenção da obesidade e comorbidades associadas (FLACHS et al., 2009). No presente trabalho foi observado que as alterações metabólicas e no sistema antioxidante ocasionados pela obesidade induzida pela dieta hiperlipídica foram minimizados pelo consumo do óleo de chia.

Em animais e humanos obesos a suplementação de EPA e DHA vem demostrando ser uma ferramenta protetora contra os agravos causados pela obesidade, principalmente por reduzir o ganho de massa corporal (BUCKLEY; HOWE, 2009). Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar o efeito dos AGPI n-3 na perda de massa corporal, como por exemplo, aumento da lipólise e redução da lipogênese. Em roedores e humanos os AGPI n-3 estimulam a β-oxidação, e inibem a síntese de ácidos graxos e a secreção da lipoproteína de densidade muito baixa, parcialmente, pela regulação da expressão gênica (BENDER et al., 2014). Apesar disso, grande parte dos estudos ainda não é conclusivo em relação a influência de ácidos graxos poli-insaturados e o ganho de massa corporal. Em nosso estudo, o consumo de 1,5% de óleo de chia (contendo 60% de ALA) não influenciou a variação de massa corporal nos animais, assim como o obervado por YANG et al., 2005 utilizando dieta com ácido linolênico conjugado e ALA. Corroborando com estes dados, o uso de semente ou o óleo de Chia não atenuou o ganho de peso dos animais, independentemente do tempo de tratamento, quando comparado aos que consumiram dieta hiperlídica com alto teor de frutose (MARINELI et al., 2015). O uso de semente de chia (50 g/dia) também não promoveu alteração no peso de indivíduos com sobrepeso (NIEMAN et al., 2009).

Em nosso trabalho os animais que consumiram dieta hiperlipídica apresentaram maiores concentrações plasmáticas de colesterol, uma vez que dietas

com alto teor de lipídios favorecem o desenvolvimento de dislipidemias (XAVIER et al., 2013). O consumo de óleo de Chia não alterou a concentração plasmática de colesterol dos animais que consumiram dieta HFDC, resultado similar ao encontrado por POUDYAL et al., 2012 em um modelo animal com dietas hiperlipídia e hiperglicídica (frutose) associada ao consumo da semente de Chia. No estudo realizado por AYERZA & COATES, 2007, em modelo animal com o objetivo de comparar a influência do consumo da semente inteira, da farinha de semente e do óleo de Chia também não foi observada diferença na concentração de plasmática de colesterol dos animais.

Em relação aos TG, o consumo de óleo de chia reduziu a concentração plasmática de triacilglicerol dos animais que consumiram dieta hiperlipídica adicionada de óleo de Chia, o que também foi observado por AYERZA & COATES, 2007 e em um estudo com semente de Chia realizado por CHICCO et al., 2009 . Um possível mecanismo para elucidar o efeito do consumo de óleo de Chia na redução plasmática de TG seria que o aumento dietético de ALA, resultaria e um aumento significativo nos níveis de AGPI-CL n-3, EPA e DHA. O aumento do consumo dietético de ALA reflete uma maior conversão de EPA e DHA (RINCÓN-CERVERA et al., 2016).

Estudos fornecem evidências convincentes de que o EPA e o DHA interagem com fatores de transcrição que regulam a expressão de enzimas envolvidas com a síntese e a degradação de ácidos graxos. De forma resumida, os AGPI n-3 ativam os receptores retinóide X (RXR) e farnesóide X (FXR) que, por sua vez, inibem o receptor X do fígado (LXR), inibindo seu efeito na ativação da proteína ligada ao elemento regulado por esterol 1c (SREBP-1c), que modula a expressão de enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos. Os AGPI n-3 também ativam os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) que, além de modularem a expressão de enzimas envolvidas na oxidação dos ácidos graxos, também atuam inibindo a SREBP-1c.(DAVIDSON, 2006; FERNANDEZ; WEST, 2005; SCHMITZ; ECKER, 2008). O conjunto de ações dos AGPI n-3 sobre esses fatores de transcrição, resulta na redução da síntese de AG e no aumento de sua degradação pela via da β-oxidação hepática (HARRIS et al., 2008).

Em relação aos marcadores de dano oxidativo, nosso estudo demostrou que a dieta HFD aumentou a peroxidação lipídica tanto em plasma, com aumento da formação de F2-isoprostana (8-epi PGF2α), quanto no tecido hepático, com

aumento nos níveis de TBARS e que o consumo de óleo de Chia foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica. Resultado semelhante ao encontrado foi observado no estudo com animais diabéticos que consumiram dieta hiperlipídica associada à linhaça moída, as concentrações de TBARS tanto em plasma quanto em fígado foram reduzidas com o consumo de linhaça (fonte de ALA) (HALIGA; MOCANU; BADESCU, 2014). Também foi observado a redução dos níveis de TBARS em plasma de animais que consumiram dieta hiperlipídica e rica em frutose, acrescidas tanto com semente quanto com óleo de Chia (13,3% g/g de semente, 4%m/m de óleo, por 6 e 12 semanas), contudo o mesmo efeito não foi observado no tecido hepático dos animais (MARINELI et al., 2015b). De acordo com os autores, a deposição de lipídios poli-insaturados no tecido hepático pode proporcionar, de forma mais critica a deterioração dos lipídios presentes nas estruturas celulares. De forma interessante, em nosso estudo também houve melhora dos parâmetros de dano oxidativo no tecido hepático dos animais. A redução do dano oxidativo no fígado também foi observado em um estudo com a ingestão de 0,5-1,0% ALA, extraído do óleo de linhaça onde o estresse oxidativo induzido por mercúrio foi atenuado não só no fígado, mas também nos rins e plasma dos animais (PAL; GHOSH, 2012).

No presente estudo, a redução do dano oxidativo no tecido hepático e no plasma foi acompanhada do aumento na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx nos animais que consumiram dieta hiperlipídica associada ao óleo de Chia. Corroborando com este achado, já foi observado que o ALA é capaz de restaurar atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx em modelo animal de estresse induzido por mercúrio (PAL; GHOSH, 2012). Resultado similar ao estudo com que avaliou o efeito protetor dos ACPI-n3 na toxicidade induza por chumbo no fígado de animais (ABDOU; HASSAN, 2014). Já no estudo de MARINELI et al. (2015b) os animais que consumiram semente de chia e óleo de chia apresentaram aumento da atividade da CAT e GPx no plasma, sem alteração na atividade hepática, enquanto a SOD não apresentou nenhuma alteração.

Dados da literatura demonstram que diferentes tipos de ácidos graxos têm efeitos variáveis sobre a produção de radicais livres e cada ácido graxo age de forma direta ou indireta através da indução de enzimas antioxidantes (BULLÓ; LAMUELA-RAVENTÓS; SALAS-SALVADÓ, 2011).

Nos mamíferos, as enzimas antioxidantes mais importantes incluem SOD que converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogénio, GPx, e CAT que são responsáveis pela conversão de peróxido de hidrogênio em produtos não tóxicos (SALVI et al., 2007). Em nosso estudo o consumo de uma fonte de ALA aumentou a atividade hepática de GPx, CAT e SOD e reduziu a peroxidação lipídica de forma significativa. O aumento significativo nas atividades da SOD e GPx pode estar relacionado com diminuição conteúdo TBARS do fígado e F2-isoprostana (8-epi PGF2α) no plasma.

Em nosso estudo houve ainda, aumento da expressão gênica das enzimas antioxidantes, com aumento significativo ($p<0,05$) da expressão de proteína da SOD2, CAT e com uma tendência de aumento na expressão de GPx, mas sem uma diferença significativa, nos animais que consumiram dieta hiperlipídica acrescida de óleo de Chia. Nesses animais, também foi observado um aumento na expressão do fator de transcrição eritróide 2, Nrf2. Em estudo de modelo animal, com óleo e semente de Chia associado a dieta hiperlipídica com alto teor de frutose , o consumo de óleo de Chia (4%m/m por 6 e 8 semanas) aumentaram a expressão de SOD e GPx em músculo esquelético (MARINELI et al., 2015). De forma interessante, apenas a expressão da enzima SOD 2, fração mitocondrial, sofreu alteração com o consumo do óleo de Chia. Uma possível explicação para este achado, seria excesso de produção de superóxido nas mitocôndrias com instauração do quadro de obesidade. Em modelo animal, a obesidade induzida pela dieta hiperlipídica está correlacionada com a disfunção mitocondrial e aumento do estresse oxidativo no músculo esquelético e fígado (YUZEFOVYCH et al., 2013). Os ácidos graxos livres, derivados da lipólise estariam associados à desordem no metabolismo mitocondrial, o que resulta em aumento da produção de superóxido através da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (MARSEGLIA et al., 2014).

Em concordância, alguns estudos também demostraram o aumento da expressão de enzimas antioxidantes associado ao aumento da expressão de NRF2. O DHA (pré-tratamento com 50 e 100 μM de DHA) aumentou a expressão de heme oxigenase-1 (HO-1) de um modo dependente-Nrf2 em células humanas EAhy926 (YANG et al., 2013). Animais C57BL/6 em comparação com Nrf2-/-alimentados com dieta acrescida de óleo de peixe, durante 3 semanas, apresentaram aumento significativamente na expressão de HO-1 na aorta torácica. Em células endoteliais humanas incubadas com DHA ou EPA. O DHA, mas não EPA, aumentou a

expressão do Nrf2 e seus genes alvo, incluindo HO-1(ISHIKADO et al., 2013). Um experimento em modelo murino avaliou a capacidade protetora do ALA (500 mg/kg), sobre cardiotoxicidade induzida por doxorrubicina (DOX), uma droga anti-tumoral. A utilização da droga associada ao ALA aumentou a atividade SOD, CAT e GPx, bem como a expressão de mRNA SOD e do Nrf2 (YU et al., 2013).

De forma geral, a expressão das enzimas antioxidantes é regulada pelo Nrf2, este importante fator de transcrição encontra-se ligado a sua proteína repressora KEAP1 no citoplasma. A ativação do fator de transcrição Nrf2 é regulada por uma série de fatores, sendo um destes a sua própria repressão pela proteína Keap 1(SURH, 2003). Já foi demonstrado que o fator de transcrição Nrf2 pode ser ativado não somente pelo seu ligante clássico, sulforafano, mas também por diversos compostos bioativos e medicamentos (CARMONA-RAMÍREZ et al., 2013; CHENG et al., 2012; SRIRAM; KALAYARASAN; SUDHANDIRAN, 2009). Alguns componentes dietéticos, tais como os AGPI-n3, DHA e EPA atuariam aumentando a expressão de Nrf2 através da ação de produtos derivados da sua oxidação (4-hydroxyhexenal, 17-oxo-DHA, 17-oxo-DPA, A_3J_3-IsoPs - electrophilic cyclopentenone isoprostanes) (CIPOLLINA, 2015; CIPOLLINA et al., 2014).

Em condições basais, o Nrf2 está ligado a sua proteína repressora, Keap1, um adaptador para o ubiquitina ligase Cul3, que tem como alvo Nrf2 para ubiquitinação e degradação proteossómica. Em resposta a lipídios eletrofílicos reagem com cisteínas alvo na proteína Keap1 inibindo a ubiquitinação do Nrf2, promovendo seu acúmulo no núcleo. Após translocação nuclear, o Nrf2 forma heterodímeros com pequenas proteínas MAF e outros fatores de transcrição necessários para a sua interação com o elemento responsivo a antioxidante (ARE), e ativação de genes alvo (CIPOLLINA, 2015). Assim, possível mecanismo pelos quais os AGPI-n3 exerceriam efeitos protetores ao estresse oxidativo estaria relacionado com a ativação Nrf2 no tecido vascular, acompanhado por aumento da atividade das enzimas antioxidantes.

CONCLUSÃO

- A adição do óleo de chia na dieta não influenciou o consumo de ração, e o ganho de peso corporal nos grupos experimentais;
- O consumo do óleo de Chia foi capaz de atuar como agente protetor no desenvolvimento da hipetriglireridemia no grupo que recebeu dieta rica em lipídios.
- O consumo do óleo de chia reduziu a formação de F2-isoprostana (8-epi PGF2α) no grupo de recebeu dieta hiperlipídica. Em tecido hepático, o consumo de óleo de chia preveniu a peroxidação lipídica representada pela formação de MDA.
- Na atividade enzimática antioxidante, o consumo de chia influenciou positivamente a atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutationa peroxidase, tanto no grupo controle quanto na dieta hiperlipídica. Na expressão das proteínas envolvidas na atividade antioxidante, o óleo de chia modulou de forma positiva a expressão da fração mitocondrial da enzima superóxido dismutase (SOD2), não influenciando a isoforma citoplasmática (SOD1). Também modulou a expressão proteica da enzima catalase nos animais que consumiram dieta hiperlipídica acrescida de óleo de chia (HFDC). Em relação à expressão da GPx, a chia restaurou a expressão de forma semelhante ao grupo controle no grupo HFDC.
- O óleo de chia promoveu melhora no perfil do dano oxidativo causadas pela obesidade, que foi acompanhado pelo aumento da atividade e da expressão proteica das enzimas antioxidantes reguladas pelo aumento da expressão do fator de transcrição Nrf2.

REFERÊNCIAS

ABDOU, H. M.; HASSAN, M. A. Protective Role of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid against Lead Acetate-Induced Toxicity in Liver and Kidney of Female Rats. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.

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

AYERZA, R.; COATES, W. Dietary levels of chia: influence on yolk cholesterol, lipid content and fatty acid composition for two strains of hens. **Poultry Science**, v. 79, n. 5, p. 724–739, maio 2000.

AYERZA, R.; COATES, W. Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. **Nutrition Research**, v. 25, n. 11, p. 995–1003, nov. 2005.

AYERZA, R.; COATES, W. Effect of dietary alpha-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 & 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, jun. 2002.

AYERZA (H), R. Oil content and fatty acid composition of chia (Salvia hispanica L.) from five northwestern locations in Argentina. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 9, p. 1079–1081, set. 1995.

AYERZA (H), R.; COATES, W. Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (Salvia hispanica L.). **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 2, p. 1366–1371, set. 2011.

BANNISTER, J. V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 32, p. 279–312, 1987.

BEŁTOWSKI, J. et al. The effect of dietary-induced obesity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and total plasma antioxidant capacity. **Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society**, v. 51, n. 4 Pt 2, p. 883–896, dez. 2000.

BENDER, N. et al. Fish or n3-PUFA intake and body composition: a systematic review and meta-analysis. **Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 15, n. 8, p. 657–665, ago. 2014.

BETTI, M. et al. Omega-3-enriched broiler meat: 3. Fatty acid distribution between triacylglycerol and phospholipid classes. **Poultry Science**, v. 88, n. 8, p. 1740–1754, 1 ago. 2009.

BONDIA-PONS, I.; RYAN, L.; MARTINEZ, J. A. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 68, n. 4, p. 701–711, dez. 2012.

BOURRE, J.-M. Effets des nutriments sur les structures et les fonctions du cerveau : le point sur la diététique du cerveau. **Revue Neurologique**, v. 160, n. 8–9, p. 767–792, set. 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRENNA, J. T.; DIAU, G.-Y. The influence of dietary docosahexaenoic acid and arachidonic acid on central nervous system polyunsaturated fatty acid composition. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 77, n. 5–6, p. 247–250, dez. 2007.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813–820, 13 dez. 2001.

BUCKLEY, J. D.; HOWE, P. R. C. Anti-obesity effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 10, n. 6, p. 648–659, nov. 2009.

BULLÓ, M.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; SALAS-SALVADÓ, J. Mediterranean diet and oxidation: nuts and olive oil as important sources of fat and antioxidants. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 14, p. 1797–1810, 2011.

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

CALDER, P. C. Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids. **Journal of Nutrition**, v. 142, n. 3, p. 592S–599S, 1 mar. 2012.

CALDER, P. C.; YAQOOB, P. Understanding omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Postgraduate Medicine**, v. 121, n. 6, p. 148–157, nov. 2009.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 277–359, jan. 2004.

CARDOZO, L. F. M. F. et al. Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. **Biochimie**, v. 95, n. 8, p. 1525–1533, ago. 2013.

CARMIEL-HAGGAI, M. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. **The FASEB Journal**, 26 out. 2004.

CARMONA-RAMÍREZ, I. et al. Curcumin restores Nrf2 levels and prevents quinolinic acid-induced neurotoxicity. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 14–24, jan. 2013.

CASTEILLA, L. et al. Choosing an adipose tissue depot for sampling: factors in selection and depot specificity. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 456, p. 23–38, 2008.

CHAISWING, L.; OBERLEY, T. D. Extracellular/Microenvironmental Redox State. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, n. 4, p. 449–465, 15 ago. 2010.

CHAN, R. S. M.; WOO, J. Prevention of Overweight and Obesity: How Effective is the Current Public Health Approach. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 3, p. 765–783, 26 fev. 2010.

CHENG, A.-S. et al. Resveratrol upregulates Nrf2 expression to attenuate methylglyoxal-induced insulin resistance in Hep G2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 9180–9187, 12 set. 2012.

CHICCO, A. G. et al. Dietary chia seed (Salvia hispanica L.) rich in alpha-linolenic acid improves adiposity and normalises hypertriacylglycerolaemia and insulin resistance in dyslipaemic rats. **The British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 1, p. 41–50, jan. 2009.

CIPOLLINA, C. et al. Generation and dietary modulation of anti-inflammatory electrophilic omega-3 fatty acid derivatives. **PloS One**, v. 9, n. 4, p. e94836, 2014.

CIPOLLINA, C. Endogenous Generation and Signaling Actions of Omega-3 Fatty Acid Electrophilic Derivatives. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–13, 2015.

CRISTANCHO, A. G.; LAZAR, M. A. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 11, p. 722–734, nov. 2011.

DAVÌ, G. et al. Platelet activation in obese women: role of inflammation and oxidant stress. **JAMA**, v. 288, n. 16, p. 2008–2014, 23 out. 2002.

DAVIDSON, M. H. Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. **The American Journal of Cardiology**, v. 98, n. 4A, p. 27i–33i, 21 ago. 2006.

DE ASSIS, A. M. et al. Ω3-Polyunsaturated fatty acids prevent lipoperoxidation, modulate antioxidant enzymes, and reduce lipid content but do not alter glycogen metabolism in the livers of diabetic rats fed on a high fat thermolyzed diet. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 361, n. 1–2, p. 151–160, fev. 2012.

DINDO, D. et al. Obesity in general elective surgery. **Lancet (London, England)**, v. 361, n. 9374, p. 2032–2035, 14 jun. 2003.

DINIZ, Y. S. et al. Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. **International Journal of Cardiology**, v. 124, n. 1, p. 92–99, fev. 2008.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 421–431, 1990.

DUVNJAK, M. et al. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 34, p. 4539–4550, 14 set. 2007.

ECHTAY, K. S. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, n. 10, p. 1351–1371, 15 nov. 2007.

ESPOSITO, K. et al. Mediterranean diet improves erectile function in subjects with the metabolic syndrome. **International Journal of Impotence Research**, v. 18, n. 4, p. 405–410, ago. 2006.

FERNANDEZ, M. L.; WEST, K. L. Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 9, p. 2075–2078, set. 2005.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A. et al. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 12, p. 3117–3132, 13 maio 2011.

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

FLACHS, P. et al. Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. **Clinical Science (London, England: 1979)**, v. 116, n. 1, p. 1–16, jan. 2009.

FLEGAL, K. M. et al. Prevalence of Obesity and Trends in the Distribution of Body Mass Index Among US Adults, 1999-2010. **JAMA**, v. 307, n. 5, p. 491, 1 fev. 2012.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 114–121, 1984.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal De Pediatria**, v. 83, n. 5 Suppl, p. S192-203, nov. 2007.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499–502, jun. 1972.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752–1761, dez. 2004.

HAJER, G. R.; VAN HAEFTEN, T. W.; VISSEREN, F. L. J. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. **European Heart Journal**, v. 29, n. 24, p. 2959–2971, dez. 2008.

HALIGA, R.; MOCANU, V.; BADESCU, M. Antioxidative and antiatherogenic effects of flaxseed, α-tocopherol and their combination in diabetic hamsters fed with a high-fat diet. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 3 dez. 2014.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231–255, maio 2004.

HARRIS, W. S. et al. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. **Atherosclerosis**, v. 197, n. 1, p. 12–24, mar. 2008.

HE, K. Fish, long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and prevention of cardiovascular disease--eat fish or take fish oil supplement? **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 52, n. 2, p. 95–114, out. 2009.

HIBBELN, J. R. et al. Healthy intakes of n-3 and n-6 fatty acids: estimations considering worldwide diversity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 6 Suppl, p. 1483S–1493S, jun. 2006.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Obesity and oxidative stress: a direct link to CVD? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 3, p. 365–367, 1 mar. 2003.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860–867, 14 dez. 2006.

ISHIKADO, A. et al. 4-Hydroxy Hexenal Derived from Docosahexaenoic Acid Protects Endothelial Cells via Nrf2 Activation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69415, 23 jul. 2013.

KHAN, N. I.; NAZ, L.; YASMEEN, G. Obesity: an independent risk factor for systemic oxidative stress. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n. 1, p. 62–65, jan. 2006.

KOBAYASHI, M.; YAMAMOTO, M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, n. 3–4, p. 385–394, abr. 2005.

KUSUNOKI, C. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid has an anti-oxidant effect via the Nrf-2/HO-1 pathway in 3T3-L1 adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 430, n. 1, p. 225–230, jan. 2013.

LASTRA, G.; MANRIQUE, C. M.; HAYDEN, M. R. The role of beta-cell dysfunction in the cardiometabolic syndrome. **Journal of the Cardiometabolic Syndrome**, v. 1, n. 1, p. 41–46, 2006.

LEE, H.; PARK, W. J. Unsaturated fatty acids, desaturases, and human health. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 2, p. 189–197, fev. 2014.

LEE, J. H. et al. Omega-3 fatty acids: cardiovascular benefits, sources and sustainability. **Nature Reviews. Cardiology**, v. 6, n. 12, p. 753–758, dez. 2009.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**, v. 674, n. 1–2, p. 137–147, 31 mar. 2009.

LOBODA, A. et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 17, p. 3221–3247, set. 2016.

MALTA, D. C. et al. Trends in prevalence of overweight and obesity in adults in 26 Brazilian state capitals and the Federal District from 2006 to 2012. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 17, p. 267–276, 2014.

MARCEAU, P. et al. Liver Pathology and the Metabolic Syndrome X in Severe Obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 5, p. 1513–1517, maio 1999.

MARINELI, R. DA S. et al. Chia (Salvia hispanica L.) enhances HSP, PGC-1α expressions and improves glucose tolerance in diet-induced obese rats. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 31, n. 5, p. 740–748, maio 2015a.

MARINELI, R. DA S. 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, out. 2015b.

MARINOU, K. et al. Obesity and cardiovascular disease: from pathophysiology to risk stratification. **International Journal of Cardiology**, v. 138, n. 1, p. 3–8, 7 jan. 2010.

MARSEGLIA, L. et al. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, p. 378–400, 26 dez. 2014.

MARTIN, C. A. et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 6, dez. 2006.

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

MASSIERA, F. et al. Arachidonic acid and prostacyclin signaling promote adipose tissue development: a human health concern? **Journal of Lipid Research**, v. 44, n. 2, p. 271–279, fev. 2003.

MEYER, B. J. et al. Dietary intakes and food sources of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Lipids**, v. 38, n. 4, p. 391–398, abr. 2003.

MITSUISHI, Y.; MOTOHASHI, H.; YAMAMOTO, M. The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. **Frontiers in Oncology**, v. 2, p. 200, 2012.

MOHD ALI, N. et al. The Promising Future of Chia, *Salvia hispanica* L. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–9, 2012.

MOLENDI-COSTE, O.; LEGRY, V.; LECLERCQ, I. A. Why and How Meet n-3 PUFA Dietary Recommendations? **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2011, p. 1–11, 2011.

MORALES, C. R. et al. Oxidative stress and autophagy in cardiovascular homeostasis. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 3, p. 507–518, 20 jan. 2014.

MORROW, J. D. Is oxidant stress a connection between obesity and atherosclerosis? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 3, p. 368–370, 1 mar. 2003.

MUENNIG, P. The body politic: the relationship between stigma and obesity-associated disease. **BMC public health**, v. 8, p. 128, 2008.

MUÑOZ, L. A. et al. Chia Seed (*Salvia hispanica*): An Ancient Grain and a New Functional Food. **Food Reviews International**, v. 29, n. 4, p. 394–408, 2 out. 2013.

NIEMAN, D. C. et al. Chia seed does not promote weight loss or alter disease risk factors in overweight adults. **Nutrition Research (New York, N.Y.)**, v. 29, n. 6, p. 414–418, jun. 2009.

NUNN, A. V.; BELL, J. D.; GUY, G. W. Lifestyle-induced metabolic inflexibility and accelerated ageing syndrome: insulin resistance, friend or foe? **Nutrition & Metabolism**, v. 6, p. 16, 2009.

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

OLSON, M. L. et al. Vitamin D deficiency in obese children and its relationship to glucose homeostasis. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, n. 1, p. 279–285, jan. 2012.

OSBURN, W. O.; KENSLER, T. W. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. **Mutation Research**, v. 659, n. 1–2, p. 31–39, ago. 2008.

OZATA, M. et al. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. **Clinical Biochemistry**, v. 35, n. 8, p. 627–631, nov. 2002.

PAL, M.; GHOSH, M. Studies on comparative efficacy of α-linolenic acid and α-eleostearic acid on prevention of organic mercury-induced oxidative stress in kidney and liver of rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 3–4, p. 1066–1072, mar. 2012.

PALL, M. L.; LEVINE, S. Nrf2, a master regulator of detoxification and also antioxidant, anti-inflammatory and other cytoprotective mechanisms, is raised by health promoting factors. **Sheng Li Xue Bao: [Acta Physiologica Sinica]**, v. 67, n. 1, p. 1–18, 25 fev. 2015.

PAUSOVA, Z. From big fat cells to high blood pressure: a pathway to obesity-associated hypertension. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 15, n. 2, p. 173–178, mar. 2006.

POUDYAL, H. 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, fev. 2012.

REYES-CAUDILLO, E.; TECANTE, A.; VALDIVIA-LÓPEZ, M. A. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (Salvia hispanica L.) seeds. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 656–663, mar. 2008.

RINCÓN-CERVERA, M. Á. et al. Vegetable oils rich in alpha linolenic acid increment hepatic n-3 LCPUFA, modulating the fatty acid metabolism and antioxidant response in rats. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, 17 fev. 2016.

ROBERTS, C. K. et al. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. **Metabolism**, v. 55, n. 7, p. 928–934, jul. 2006.

ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**, v. 84, n. 21–22, p. 705–712, 22 maio 2009.

ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 1, fev. 2006.

RUIZ-LÓPEZ, N. et al. Metabolic engineering of the omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway into transgenic plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 7, p. 2397–2410, abr. 2012.

RUPÉREZ, A.; GIL, A.; AGUILERA, C. Genetics of Oxidative Stress in Obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 2, p. 3118–3144, 20 fev. 2014.

RUSSO, G. L. 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, 15 mar. 2009.

SCHMITZ, G.; ECKER, J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 47, n. 2, p. 147–155, mar. 2008.

SCHÖNFELD, P.; WOJTCZAK, L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 45, n. 3, p. 231–241, 1 ago. 2008.

SIMOPOULOS, A. P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 3 Suppl, p. 560S–569S, set. 1999.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. **Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)**, v. 233, n. 6, p. 674–688, jun. 2008.

SIMOPOULOS, A. P. Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, n. 7, p. 785–795, 1 jul. 2010.

SRIRAM, N.; KALAYARASAN, S.; SUDHANDIRAN, G. Epigallocatechin-3-gallate augments antioxidant activities and inhibits inflammation during bleomycin-induced

experimental pulmonary fibrosis through Nrf2-Keap1 signaling. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 22, n. 3, p. 221–236, jun. 2009.

STEINBRENNER, H.; SIES, H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 11, p. 1478–1485, nov. 2009.

SURH, Y.-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 10, p. 768–780, out. 2003.

TOSCANO, L. T. et al. Chia Flour Supplementation Reduces Blood Pressure in Hypertensive Subjects. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, n. 4, p. 392–398, dez. 2014.

TRAYHURN, P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 1–21, jan. 2013.

TURNER, R. et al. Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology. **Hepatology**, v. 53, n. 3, p. 1035–1045, mar. 2011.

ULLAH, R. et al. Nutritional and therapeutic perspectives of Chia (Salvia hispanica L.): a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 4, p. 1750–1758, abr. 2016.

VENEGAS-CALERÓN, M.; SAYANOVA, O.; NAPIER, J. A. An alternative to fish oils: Metabolic engineering of oil-seed crops to produce omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 49, n. 2, p. 108–119, abr. 2010.

VINCENT, H. K.; BOURGUIGNON, C. M.; TAYLOR, A. G. Relationship of the dietary phytochemical index to weight gain, oxidative stress and inflammation in overweight young adults. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 23, n. 1, p. 20–29, fev. 2010.

VINCENT, H. K.; MORGAN, J. W.; VINCENT, K. R. Obesity exacerbates oxidative stress levels after acute exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 36, n. 5, p. 772–779, maio 2004.

VINCENT, H. K.; TAYLOR, A. G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. **International Journal of Obesity (2005)**, v. 30, n. 3, p. 400–418, mar. 2006.

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

WASSMANN, S.; WASSMANN, K.; NICKENIG, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. **Hypertension**, v. 44, n. 4, p. 381–386, out. 2004.

XAVIER, H. T. et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n. 4, p. 01–22, 2013.

YANG, L. et al. Alpha-linolenic acid but not conjugated linolenic acid is hypocholesterolaemic in hamsters. **The British Journal of Nutrition**, v. 93, n. 4, p. 433–438, abr. 2005.

YANG, Y.-C. et al. Docosahexaenoic acid inhibition of inflammation is partially via cross-talk between Nrf2/heme oxygenase 1 and IKK/NF-κB pathways. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 204–212, jan. 2013.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 1, p. 139–162, jan. 1994.

YU, X. et al. α-Linolenic acid attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats through suppression of oxidative stress and apoptosis. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, v. 45, n. 10, p. 817–826, out. 2013.

YUZEFOVYCH, L. V. et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction, and oxidative stress are associated with endoplasmic reticulum stress, protein degradation and apoptosis in high fat diet-induced insulin resistance mice. **PloS One**, v. 8, n. 1, p. e54059, 2013.