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

Thereza Cristina Lonzetti Bargut

Efeito antiobesogênico do óleo de peixe: função do tecido adiposo marrom e branco

Rio de Janeiro
2015

Thereza Cristina Lonzetti Bargut

Efeito antiobesogênico do óleo de peixe: função do tecido adiposo marrom e branco

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

Orientadora: Prof.ª Dra. Márcia Barbosa Águila

Rio de Janeiro

2015

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

B251 Bargut, Thereza Cristina Lonzetti.
Efeito antiobesogênico do óleo de peixe: função do tecido adiposo marrom e branco / Thereza Cristina Lonzetti Bargut. – 2015
93 f.

Orientadora: Márcia Barbosa Águila.

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

1. Obesidade - Teses. 2. Óleo de peixe - Teses. 3. Tecido adiposo marrom - Teses. 4. Termogênese. 5. Tecido Adiposo Branco. 6. Ácidos graxos insaturados - Teses. I. Águila, Márcia Barbosa. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. III. Título.

CDU 613.24

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

Assinatura Data

Thereza Cristina Lonzetti Bargut

Efeito antiobesogênico do óleo de peixe: função do tecido adiposo marrom e branco

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

Aprovada em 24 de fevereiro de 2015.

Banca Examinadora:

_____

Prof.ª Dra. Márcia Barbosa Águila (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Tania Maria Ruffoni Ortiga

Universidade Federal do Rio do Janeiro

_____

Prof.ª Dra. Patrícia Torres Bozza

Fundação Oswaldo Cruz

_____

Prof.ª Dra. Elaine de Oliveira

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____

Prof. Dr. Luiz Eduardo de Macedo Cardoso

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, meus maiores incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, aos meus pais, Maria da Glória e Mauricio, por estarem sempre ao meu lado. Obrigada por tudo que vocês fizeram por mim, por todo incentivo, toda a ajuda e todo o carinho. Se eu cheguei aqui hoje foi porque vocês estiveram comigo o tempo todo, sem desistir nunca. Obrigada pelo apoio nessa reta final, ele foi e está sendo muito importante. Vocês são minha maior inspiração e meu maior exemplo. Amo muito vocês.

Ao meu namorado, Daniel Figueiredo, por todo apoio e companhia. Agradeço a você por compartilhar comigo os momentos de medo e angústia e também os de alegria e celebração. Você me acompanhou nesses últimos dois anos e sonhou comigo todos os meus sonhos e desejos, portanto, vencemos juntos essa etapa. Obrigada por ser meu companheiro. Te amo pra sempre.

Á minha orientadora, Prof.ª Dra. Márcia Barbosa Águila, por esses mais de oito anos de parceria profissional, desde a iniciação científica. Obrigada por toda a confiança que a senhora depositou em mim. Com a sua ajuda, aprendi, cresci e amadureci muito, foram anos muito proveitosos. Espero que essa parceria permaneça por vários anos e dê ainda muitos frutos.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim de Lacerda, por todas as oportunidades que me foram dadas. Obrigada por abrir as portas do LMMC para mim e, a partir daí, me estimular e incentivar a aprender e sempre melhorar. Agradeço a confiança depositada e todo o investimento feito em mim.

Ás minhas grandes amigas Eliete Dalla Corte Frantz e Aline Penna de Carvalho. O que seria de mim sem vocês? Não existem palavras que consigam agradecer tudo que fizeram por mim. Vocês são meus pilares profissionais. Eli, acho que a vida conspirou para que fossemos amigas (trabalhamos juntas, moramos perto, dividimos cargos, somos da família BB...rsrs) e eu agradeço por isso todos os dias. Você é uma referência para mim. Line, como já disse, você é muito iluminada. Sua amizade me torna uma pessoa melhor e sem a sua companhia diária tudo seria muito mais difícil. Obrigada por tudo, meninas!! Admiro demais vocês, gurias!!

Às também muito amigas Tamiris Rachid, Fernanda Ornellas e Celina Borges, obrigada pelo carinho e companhia de vocês. Tatá, obrigada pelas discussões científicas, pelos almoços, pelas conversas e pelo carinho. Ah, e pelas pizzas

também!! Obrigada por me ouvir sempre e dar atenção aos meus conselhos (às vezes idiotas). Você é demais. Fê, você sempre será minha veterana. Tem sido um prazer muito grande estar com você nessa jornada desde a iniciação científica, e especialmente compartilhar esses últimos meses com você. Cê, obrigada pela convivência do dia-a-dia, pelas risadas, distrações e por dividir comigo lembranças da adolescência.

À minha aluna de iniciação científica Anna Carolina Alves Gomes da Silva e Silva, que me ajudou, ou melhor, me aturou durante os últimos anos. Obrigada por toda sua colaboração e pela amizade que desenvolvemos. Tudo que foi realizado nesse trabalho tem o seu toque e a sua influência; ele também é seu. Obrigada mesmo, por tudo! Aproveito para agradecer também à IC “anexo” Thais Duarte (Diva!), que veio como um pacote e fez meus dias muito mais divertidos.

Aos queridos André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna e Jorge Alves, por fazerem os meus dias mais divertidos. As implicâncias e brincadeiras de vocês alegram minha jornada e me garantem boas risadas.

À Prof.ª Dra. Vanessa Souza-Mello, por toda ajuda nesses anos de pós-graduação. Agradeço por ter me ajudado com muito afinco sempre que eu pedi e por ter me feito muito bem-vinda dentro da sua família de orientados, mesmo sem ser formalmente parte do grupo.

Aos demais colegas do LMMC e do BHEx, Prof.ª Cristiane Ramos, Prof.ª Tatiane Faria, Prof.ª Sandra Barbosa, Prof.ª Cristiane Matsuura, Prof Luiz Eduardo Cardoso, Isabele Bringhenti, Dan Magliano, Flavia Gombar, Eduardo Leze, Fabiane Martins, Paula Fontoura, Helder Gonçalves, Francielle Graus, Victor Motta, Thais Ceciliano, Verônica Aiceles, Iara Karise, Milton Costa, Jorge Medeiros, Carolina Chamma, Guilherme Sá, Carolline Miranda, Brenda Akemi, Isiyara Pimenta, Aline Barreto, Fernanda Schanuel, Vanessa de Góes-Herdy, Frederico Wallace, Marcela Anjos, Wanda Vianna, Daniel Medeiros e Marcus Bryntensson.

Aos técnicos do LMMC Thatiany Marinho, Gezileia Lau, Michele Soares e Wilian Lannes. Quando terminei o mestrado, prometi que ia tentar precisar menos de vocês. Falhei, ainda dou muito trabalho. Obrigada por sempre me ajudarem e me aturarem.

Aos secretários do BHEx, Zé Carlos, Carol e Izabel. Peço desculpas por todo trabalho e incômodo que dei e agradeço por toda atenção que vocês me deram e por me ajudarem sempre a resolver meus problemas.

Às minhas grandes amigas de faculdade Aline Cardozo, Priscila Guyt, Raquel Couto e Roberta Amaral. Fico muito feliz em saber que, apesar dos anos que se passaram desde que estudamos juntas, nossa amizade permanece a mesma. Tenho muito orgulho de onde todas nós chegamos desde que nos conhecemos, é bom saber que estamos crescendo juntas. Obrigada pela força de sempre.

Às minhas irmãs gêmeas, Luana e Mariana Trino, que estão comigo há quase 20 anos. Devo a vocês grande parte do meu desenvolvimento pessoal e intelectual durante a infância e adolescência, época em que eu era peça de decoração do apartamento. Com certeza, vocês contribuíram imensuravelmente para que hoje eu estivesse aqui (seja lendo Jorge Amado, Isabel Allende, Harry Potter e os Karas comigo, discutindo questões (pseudo)filosóficas, fazendo vestibular juntas ou até zerando Mario no Nintendo 64 ou brincando de pique-canto na piscina). Longe ou perto, estamos sempre juntas e sei que posso contar com vocês.

Às minhas amigas, que de alguma forma fizeram parte dessa jornada, Anajara Moura e Juliana Menezes. Vocês cuidam muito bem de mim. Obrigada pelo carinho de vocês.

...e a única maneira de estar verdadeiramente satisfeito é fazendo aquilo que você acredita ser um ótimo trabalho. E a única maneira de fazer um ótimo trabalho é fazendo o que você ama fazer.

Steve Jobs

RESUMO

BARGUT, Thereza Cristina Lonzetti. *Efeito antiobesogênico do óleo de peixe*: função do tecido adiposo marrom e branco. 2015. 93 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

A modulação do tecido adiposo marrom (TAM) e do tecido adiposo branco (TAB) está associada à prevenção ou redução do ganho de massa corporal. O óleo de peixe possui diversos efeitos benéficos que podem estar relacionados a esses tecidos. Dessa forma, objetivou-se avaliar os efeitos antiobesogênicos de diferentes dietas hiperlipídicas com óleo de peixe na termogênese do TAM e na lipogênese e beta-oxidação do TAB. Para isso, foram utilizados camundongos machos C57BL/6, com três meses de idade, que foram divididos em quatro grupos experimentais: um que recebeu dieta *standard-chow* (SC, 10% kcal de lipídios) e outros três que receberam dieta hiperlipídica (HL, 50% kcal de lipídios). Obtivemos os grupos HL com banha de porco (HL-B), HL com banha de porco mais óleo de peixe (HL-B+Px) e HL com óleo de peixe (HL-Px). As dietas foram administradas por um período de oito semanas, sendo que a ingestão alimentar foi avaliada diariamente e a massa corporal, semanalmente. Na última semana de experimento, realizou-se a calorimetria indireta e o teste oral de tolerância à glicose. No sacrifício, a glicemia foi aferida, o sangue foi puncionado para obtenção do plasma e o TAM interescapular e o TAB epididimário foram dissecados e armazenados. A leptina, os triglicerídeos e a insulina foram mensurados no plasma. O índice de adiposidade e o HOMA-IR foram calculados. O TAM e o TAB foram avaliados por microscopia confocal e de luz. Realizou-se RT-qPCR e *Western blot* para avaliação de marcadores termogênicos, da captação e oxidação de ácidos graxos e glicose e de PPAR no TAM, e para a avaliação da lipogênese e beta-oxidação e de PPAR no TAB. Com relação aos resultados, o grupo HL-B apresentou ganho de massa corporal e elevação da adiposidade, associado com hipertrofia dos adipócitos, hiperleptinemia, hipertrigliceridemia, intolerância à glicose e resistência à insulina, reproduzindo um quadro de obesidade e síndrome metabólica. Por outro lado, a ingestão de óleo de peixe nos dois grupos (HL-B+Px e HL-Px) foi capaz de reduzir o ganho de massa corporal e a adiposidade, sem alterar a ingestão alimentar. Essa ingestão também aumentou o gasto energético dos animais, regularizou a leptina e os triglicerídeos plasmáticos, bem como a tolerância à glicose e a resistência à insulina. Esses efeitos foram associados ao aumento de marcadores termogênicos no TAM, bem como da captação e oxidação de ácidos graxos e glicose e da expressão de PPAR nesse tecido. No TAB, houve redução de marcadores da lipogênese e aumento de marcadores da beta-oxidação, juntamente com elevação na expressão de PPAR. Em conclusão, nossos resultados mostram que a ingestão de óleo de peixe tem efeitos antiobesogênicos em camundongos através da modulação benéfica do TAM e do TAB e pode, portanto, representar uma terapia auxiliar alternativa contra a obesidade e suas comorbidades.

Palavras-chave: Obesidade. Tecido adiposo marrom. Termogênese. Tecido adiposo branco. Óleo de peixe. Ácidos graxos poli-insaturados n-3.

ABSTRACT

BARGUT, Thereza Cristina Lonzetti. *Anti-obesity effect of fish oil*: brown and white adipose tissue functions. 2015. 93 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

Brown adipose tissue (BAT) and white adipose tissue (WAT) modulation is associated with prevention or reduction of body mass gain. Fish oil has several beneficial effects which can be related to these tissues. Thus, we aimed to evaluate the anti-obesity effects of different high-fat diets with fish oil on BAT thermogenesis and WAT lipogenesis and beta-oxidation. For this, we used 3-mo-old C57BL/6 male mice that were divided into four groups: one that received a standard-chow diet (SC, 10% kcal of lipids) and three that received a high-fat diet (HF, 50% kcal of lipids). We obtained the HF with lard group (HF-L), the HF with lard plus fish oil group (HF-L+FO), and the HF with fish oil group (HF-FO). Diets were administrated for eight weeks, and food intake was evaluated daily and the body mass, weekly. At the end of the experiment, we performed indirect calorimetry and an oral glucose tolerance test. At sacrifice, glycemia was assessed, the blood was punctured to obtain plasma and interscapular BAT and epididymal WAT were dissected and stored. Plasmatic leptin, triglycerides and insulin were analyzed. Adiposity index and HOMA-IR were calculated. BAT and WAT were evaluated through confocal and light microscopy. RT-qPCR and Western blot were performed for analyses of thermogenic markers, fatty acids and glucose uptake and oxidation, and PPAR in BAT, and lipogenesis, beta-oxidation and PPAR in WAT. In relation to the results, the HF-L group presented elevated body mass gain and adiposity, associated with adipocyte hypertrophy, hyperleptinemia, hypertriglyceridemia, glucose intolerance and insulin resistance, displaying a condition that simulates obesity and metabolic syndrome. On the contrary, fish oil intake in both groups (HF-L+FO and HF-FO) was able to reduce body mass gain and adiposity, without affecting food intake. It also increased energy expenditure, normalized plasmatic leptin and triglycerides as well as glucose tolerance and insulin resistance. These effects were associated with increases in thermogenic markers, in uptake and oxidation of fatty acids and glucose and in PPAR expression in BAT. In WAT, lipogenesis was reduced and beta-oxidation and PPAR expression were increased. In conclusion, our results demonstrated that fish oil intake has anti-obesity effects in mice through beneficial modulation of BAT and WAT and can, therefore, represent an auxiliary alternative therapy against obesity and its comorbidities.

Keywords: Obesity. Brown adipose tissue. Thermogenesis. White adipose tissue. Fish oil. N-3 polyunsaturated fatty acids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Obesidade e síndrome metabólica..... 20
Figura 2 – Comparação entre o tecido adiposo marrom e o tecido adiposo branco..... 23
Figura 3 – Resumo simplificado da termogênese no tecido adiposo marrom..... 26
Figura 4 – Resumo simplificado da lipogênese e beta oxidação no tecido adiposo branco..... 30
Figura 5 – Biossíntese de ácidos graxos poli-insaturados n-3..... 33
Figura 6 – Mecanismos de ação dos ácidos graxos poli-insaturados n-3..... 34
Figura 7 – Evolução da massa corporal..... 50
Figura 8 – Teste oral de tolerância à glicose..... 51
Figura 9 – Marcadores termogênicos no TAM..... 57
Figura 10 – Microscopia de luz e confocal no TAM..... 60
Figura 11 – PPAR no TAM..... 61
Figura 12 – Captação e oxidação de ácidos graxos no TAM..... 62
Figura 13 – Captação de glicose no TAM 63
Figura 14 – Morfometria de adipócitos 65
Figura 15 – PPAR no TAB..... 67
Figura 16 – Lipogênese e beta-oxidação no TAB..... 68
Figura 17 – Comparação dos resultados dos três grupos hiperlipídicos 71
Figura 18 – Efeitos das três dietas hiperlipídicas no TAM 74
Figura 19 – Efeitos das três dietas hiperlipídicas no TAB 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição e conteúdo energético das dietas..... 40
Tabela 2 – Primers de RT-qPCR e respectivas sequências..... 46
Tabela 3 – Comportamento alimentar e gasto energético..... 53
Tabela 4 – Adiposidade e análises plasmáticas..... 55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	*American Diabetes Association*
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
AHA	*American Heart Association*
AIN	*American Institute of Nutrition*
AL	Ácido linoleico
ALN	Ácido alfa-linolênico
AMPc	Adenosina 3’,5’-monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ASC	Área sob a curva
aP2	*Adipocyte protein* 2
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
CD36	Cluster de diferenciação 36
CPT-1	Carnitina palmitoil transferase-1
DHA	Ácido docosahexaenoico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPA	Ácido docosapentaenoico
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ETA	Ácido eicosatetraenoico
FABP	Proteína ligante de ácidos graxos
FAS	Ácido graxo sintase
GE	Gasto energético
GLUT-4	Transportador de glicose-4
GPR120	Receptor associado à proteína G 120
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HL-B	Grupo hiperlipídico-banha
HL-B+Px	Grupo hiperlipídico-banha mais óleo de peixe
HL-Px	Grupo hiperlipídico-óleo de peixe
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IL-6	Interleucina-6
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MAPK	Proteína kinase ativada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
Myf5	Fator miogênico 5
NFκB	Fator nuclear kapa B
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato
PGC1	Coativador 1 do receptor ativador de proliferação peroxissomal gama
PKA	Proteína kinase A
PPAR ( )	Receptor ativador de proliferação peroxissomal ( )
Qa	Densidade numérica por área
QA	Quociente alimentar
QR	Quociente respiratório
RA-β3	Receptor adrenérgico beta 3
RIPA	Tampão de lise radioimunoprecipitação
RNA	Ácido ribonucleico
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SC	Grupo *standard-chow*
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TBS	Tampão salina com Tris
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
u.a.	Unidades arbitrárias
UCP1	Proteína desacopladora de elétrons 1
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VCO_2	Dispêndio de gás carbônico
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VO_2	Consumo de oxigênio

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	16
1	**REVISÃO DE LITERATURA**.....	18
1.1	**Obesidade e síndrome metabólica**.....	18
1.2	**Tecido adiposo**.....	22
1.2.1	Tecido adiposo marrom e termogênese.....	23
1.2.2	Tecido adiposo branco.....	27
1.3	**Ácidos graxos poli-insaturados n-3**.....	31
1.4	**Óleo de peixe**.....	36
2	**OBJETIVOS**.....	38
2.1	**Geral**.....	38
2.2	**Específicos**.....	38
3	**MATERIAL E MÉTODOS**.....	39
3.1	**Animais e dieta**.....	39
3.2	**Massa corporal e ingestão alimentar**.....	41
3.3	**Teste oral de tolerância à glicose**.....	41
3.4	**Calorimetria indireta e quociente alimentar**.....	41
3.5	**Sacrifício**.....	43
3.6	**Índice de adiposidade**.....	43
3.7	**Análises plasmáticas**.....	43
3.8	**Microscopia de luz e confocal**.....	44
3.9	**Morfometria de adipócitos**.....	44
3.10	**RT-PCR em tempo real**.....	46
3.11	***Western blot***.....	47
3.12	**Análise estatística**.....	48
4	**RESULTADOS**.....	49
4.1	**Massa corporal e ingestão alimentar**.....	49
4.2	**Teste oral de tolerância à glicose**.....	51
4.3	**Calorimetria indireta e quociente alimentar**.....	52
4.4	**Adiposidade**.....	52
4.5	**Análises plasmáticas**.....	54

4.6 **Tecido adiposo marrom**..... 56
4.6.1 Expressão gênica e proteica de marcadores termogênicos..... 56
4.6.2 Microscopia de luz e confocal..... 58
4.6.3 Expressão gênica e proteica de PPAR..... 58
4.6.4 Expressão gênica da captação e oxidação de ácidos graxos..... 59
4.6.5 Expressão proteica da captação de glicose..... 62
4.7 **Tecido adiposo branco**..... 64
4.7.1 Morfometria de adipócitos..... 64
4.7.2 Expressão gênica e proteica de PPAR..... 64
4.7.3 Expressão gênica da lipogênese e beta-oxidação..... 66
5 **DISCUSSÃO**..... 69
CONCLUSÕES..... 79
REFERÊNCIAS..... 80
APÊNDICE A - Comitê de ética em experimentação animal..... 91
APÊNDICE B - Artigo científico publicado..... 92
APÊNDICE C - Artigo científico submetido..... 93

INTRODUÇÃO

A obesidade é caracterizada pelo aumento da gordura corporal e está associada ao desenvolvimento de um conjunto de comorbidades, como dislipidemia e resistência à insulina, caracterizando a síndrome metabólica (Masoodi *et al.*, 2014). Ela é atualmente considerada uma epidemia mundial. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2030 estimam-se em torno de 3,3 bilhões de pessoas com sobrepeso ou obesidade em todo o mundo, o que representa 57,8% da população mundial adulta, sendo que um terço desses encontra-se nos países em desenvolvimento[1].

No contexto da obesidade, o tecido adiposo tem um papel chave no desenvolvimento da doença e de suas comorbidades. Nos mamíferos, existem dois tipos diferentes de tecido adiposo: tecido adiposo marrom (TAM) e tecido adiposo branco (TAB) (Rosell *et al.*, 2012). O TAM tem o importante papel de gerar calor através do desacoplamento da oxidação mitocondrial da formação de adenosina trifosfato (ATP), levando à termogênese adaptativa (Richard *et al.*, 2010). Essa habilidade é conferida pela proteína desacopladora de elétrons (UCP1) específica desse tecido e é controlada pela via do receptor adrenérgico beta 3 (RA-β3) (Kajimura e Saito, 2014). A ativação do TAM pode ser conseguida através do frio ou por hiperalimentação, essa última chamada de termogênese induzida por dieta. Em relação a ela, a composição da dieta, mais especificamente o tipo de gordura da dieta, modula cronicamente a termogênese (Morrison *et al.*, 2014).

Por outro lado, o TAB tem como função chave estocar energia na forma de triglicerídeos e liberar ácidos graxos para o organismo quando necessário, em resposta a estímulos nutricionais e endócrinos (Lee *et al.*, 2008). As duas principais atividades metabólicas relacionadas a esse papel do TAB são a lipogênese e a lipólise, referentes à síntese e quebra de ácidos graxos, respectivamente (Proenca *et al.*, 2014). O substrato da lipogênese, ou seja, os ácidos graxos, podem tanto ser obtidos através da circulação, com a ajuda de receptores de membrana como o cluster de diferenciação 36 (CD36) (Yang *et al.*, 2013) ou através da lipogênese *de novo*, cuja principal enzima é a ácido graxo sintase (FAS) (Berndt *et al.*, 2007). Em

[1] World Health Organization. Programme and Projects: Diabetes in World. Disponível em: <http://www.who.int/diabetes/en/>. Acesso em: 15 dez. 2014.

sentido oposto, a lipólise libera ácidos graxos que alternativamente, ao invés de se destinarem a outros órgãos, podem ser utilizados para a beta-oxidação no próprio TAB, com a coordenação da carnitina palmitoil transferase-1 (CPT-1), enzima chave presente na mitocôndria (Brown *et al.*, 1997).

Considerando-se o fato de que os tratamentos não farmacológicos propostos para combate à obesidade, como mudança dos hábitos alimentares e prática de exercício físico, tem se mostrado ineficientes em longo prazo, torna-se evidente a necessidade de terapias alternativas que sejam complementares a essas já bem estabelecidas (Buckley e Howe, 2010).

O óleo de peixe é rico em ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) n-3, especialmente em ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA). Primeiramente descrito para o tratamento da hipertrigliceridemia, o óleo de peixe também é agora reconhecido com efeitos benéficos em doenças cardiovasculares e inflamatórias, além daquelas relacionadas à síndrome metabólica, como resistência à insulina e doença hepática gordurosa não alcoólica (Saraswathi *et al.*, 2009; Calder, 2012; Monk *et al.*, 2012; Bargut *et al.*, 2013; Bargut *et al.*, 2014). Um dos mecanismos pelo qual o óleo de peixe exerce seus efeitos positivos é pela ativação dos receptores ativadores de proliferação peroxissomal (PPAR), que são fatores de transcrição envolvidos na regulação da expressão gênica (Calder, 2012).

Apesar das evidências em modelos humanos (Couet *et al.*, 1997; Kabir *et al.*, 2007) e experimentais (Liu *et al.*, 2013a; Liu *et al.*, 2013b; Lionetti *et al.*, 2014) de que esses AGPI n-3 têm efeito no metabolismo dos nutrientes, pouco se sabe sobre os efeitos antiobesogênicos do óleo de peixe (Buckley e Howe, 2010). Poucos estudos até o momento demonstraram que o óleo de peixe (AGPI n-3) exerce efeito na termogênese do TAM (Sadurskis *et al.*, 1995; Takahashi e Ide, 2000) e na lipogênese e beta-oxidação do TAB (Flachs *et al.*, 2005), porém os mecanismos ainda precisam ser melhor elucidados.

Portanto, o presente estudo tem como hipótese que dietas ricas em óleo de peixe, mesmo sendo hiperlipídicas e hiperenergéticas, têm a capacidade de prevenir ou reduzir a obesidade e suas comorbidades, através da modulação da termogênese no TAM e da lipogênese e da beta-oxidação no TAB.

1. **REVISÃO DE LITERATURA**

1.1 **Obesidade e síndrome metabólica**

A obesidade é definida como o aumento da adiposidade, que é resultado do excesso crônico de nutrientes, em que o aumento da ingestão alimentar excede o gasto energético. Dieta inadequada e sedentarismo são apontados como as principais causas da obesidade, podendo-se destacar também um componente genético (Renne *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014).

A obesidade é agora considerada uma pandemia, sendo particularmente problemática em países ocidentais. Nos Estados Unidos, estima-se que mais da metade da população já esteja acima do peso (2000), representando um excesso de 100 bilhões de dólares por ano em gastos com perda de produtividade e atendimento em saúde (Zamosky, 2013). No Brasil, esse panorama não é muito diferente. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), cerca de 40% da população adulta brasileira possui sobrepeso (índice de massa corporal $\geq$ 25 kg/m^2) e 12,4% dos homens e 16,9% das mulheres apresentam obesidade[2] (índice de massa corporal $\geq$ 30 kg/m^2).

O excesso do acúmulo de gordura é uma característica chave da obesidade, ocorrendo não só no tecido adiposo como também em órgãos periféricos (gordura ectópica) (Goto *et al.*, 2011). Esse depósito ectópico de gordura faz com que a obesidade seja associada ao desenvolvimento de uma gama de comorbidades, que levam especialmente a uma diminuição na qualidade e expectativa de vida (Switzer *et al.*, 2013).

A obesidade é considerada fator de risco para diversas outras doenças, pois vem sendo associada a um estado de inflamação crônica de baixa intensidade. Esse estado é predominantemente gerado e reside no tecido adiposo (uma melhor descrição da inflamação gerada pelo tecido adiposo pode ser encontrada no item 1.2.2 dessa revisão de literatura). Na obesidade, há elevada produção de citocinas inflamatórias pelos adipócitos hipertrofiados (por exemplo, fator de necrose tumoral

[2] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares POF 2008-2009: despesas, rendimento e condições de vida. Rio de Janeiro: IBGE; 2010.

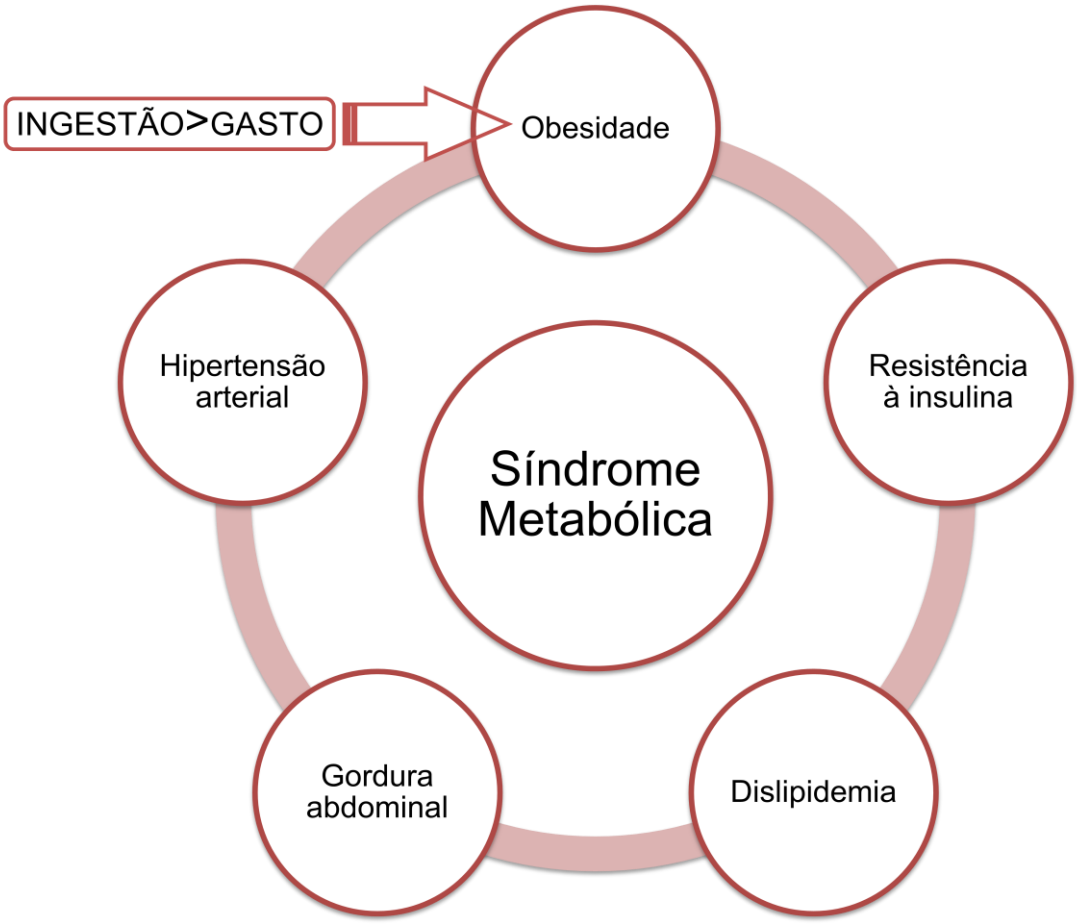
alfa – TNFα e interleucina-6 – IL-6), com ativação de diversas vias pró-inflamatórias e elevada presença de infiltrado de macrófagos no tecido. Esse estado está intimamente relacionado ao desenvolvimento da síndrome metabólica (Perez-Matute *et al.*, 2007; Barbosa-da-Silva *et al.*, 2012; Fuentes *et al.*, 2013).

A síndrome metabólica foi primeiramente descrita na década de 20, pelo médico Sueco Kylin e seu conceito vem sendo revisado a ampliado desde então (Kylin, 1923). Ela pode ser considerada como um conglomerado de alterações cardiometabólicas que, por definição, inclui resistência à insulina (e/ou intolerância à glicose), dislipidemia, obesidade abdominal e hipertensão arterial, como observado na Figura 1, que levam em médio prazo ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e ao diabetes melito tipo 2 (Eckel *et al.*, 2005; Fuentes *et al.*, 2013).

A resistência à insulina é indicada por muitos autores como o fenômeno central na fisiopatologia da síndrome metabólica (Eckel *et al.*, 2005; Frantz *et al.*, 2014). Ela é caracterizada por um defeito na via de sinalização da insulina que leva a um estado de hiperinsulinemia para manter níveis normais de glicose circulante. Quando esses níveis de insulina não são mais capazes de manter a glicemia normal, instala-se a intolerância à glicose, com consequente hiperglicemia. A disfunção do tecido adiposo, ocasionada pela obesidade, gera uma diminuição da sensibilidade à insulina nesse tecido, com consequente aumento da lipólise e liberação excessiva de ácidos graxos. O aumento dos ácidos graxos livres na corrente sanguínea tanto eleva a disponibilidade de substrato nos tecidos bem como interfere diretamente na via de sinalização da insulina, levando a um quadro sistêmico de resistência à insulina (Eckel *et al.*, 2005; Murali *et al.*, 2014).

A dislipidemia é caracterizada por quantidades anormais de lipídios na corrente sanguínea, como triglicerídeos e colesterol. O aumento do fluxo de ácidos graxos vindos do tecido adiposo para o fígado ocasiona elevada produção de apolipoproteína B contendo lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), que favorece o surgimento da hipertrigliceridemia. Essa, por sua vez, gera distúrbios na composição e no metabolismo da lipoproteína de alta densidade (HDL), que se torna menor e mais densa e tem uma depuração aumentada na corrente sanguínea. A lipoproteína de baixa densidade (LDL) também sofre alterações de forma e densidade, ficando menor e mais densa e, portanto, mais aterogênica. Todos esses fatores convergem, então, para gerar o quadro de dislipidemia (Eckel *et al.*, 2005; Jung e Choi, 2014).

Figura 1 - Obesidade e síndrome metabólica



Legenda: A obesidade se desenvolve quando a ingestão alimentar excede o gasto energético, levando ao acúmulo excessivo de gordura corporal. Ela desencadeia uma série de comorbidades que interagem entre si, formando um circulo vicioso que culmina na síndrome metabólica.

Fonte: A autora, 2015.

A obesidade abdominal vem sendo considerada uma característica da síndrome metabólica, embora indivíduos eutróficos também possam apresentar resistência à insulina e outras comorbidades características da síndrome. O acúmulo de gordura visceral é mais deletério do que o acúmulo de gordura subcutânea porque o primeiro apresenta maior taxa de lipólise e os ácidos graxos liberados na região visceral vão diretamente para o fígado através da veia porta (Johnson *et al.*, 2001; Goodpaster *et al.*, 2003).

Com relação à hipertensão arterial, os mecanismos que ligam essa condição à obesidade ainda não estão completamente descritos. É possível que haja um efeito direto, através da superexpressão dos componentes do sistema renina-angiotensina local no tecido adiposo, o que se converte em um aumento da expressão sistêmica desse sistema e moderada elevação da pressão arterial (Boustany *et al.*, 2004).

Além dessas comorbidades clássicas presentes na síndrome metabólica, outras alterações também merecem ser mencionadas. Primeiramente, o próprio estado inflamatório gerado pela obesidade, pode ser considerado uma manifestação da síndrome, com efeitos prejudiciais importantes em todos os outros componentes, como, por exemplo, na resistência à insulina (Barbosa-da-Silva *et al.*, 2012). Mais recentemente, tem-se discutido também sobre o componente hepático da síndrome metabólica: a doença hepática gordurosa não alcoólica. Ela é caracterizada pelo acúmulo de gordura no fígado (esteatose), podendo evoluir para a esteatohepatite e fibrose. Essa doença está intimamente relacionada com a resistência à insulina e talvez seja o primeiro evento na patogênese da síndrome metabólica (Barbosa-da-Silva *et al.*, 2013; Frantz *et al.*, 2014).

Considerando-se a grande prevalência de obesidade e síndrome metabólica em todo o mundo e o papel chave do acúmulo excessivo de tecido adiposo no desenvolvimento e agravamento dessas morbidades, estratégias de combate que tenham como alvo esse tecido precisam ser desenvolvidas e aprimoradas.

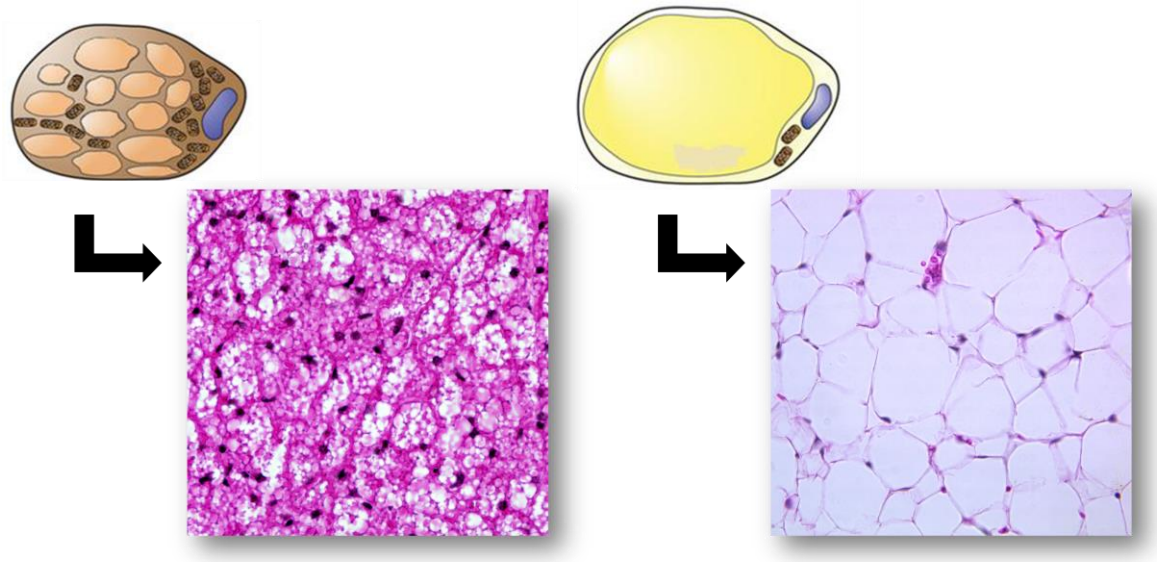
1.2 **Tecido adiposo**

O tecido adiposo está distribuído por todo o corpo em diversos depósitos localizados principalmente na região subcutânea (gordura subcutânea) e na cavidade torácica e abdominal (gordura visceral) (Masoodi *et al.*, 2014). Em mamíferos, é possível encontrar dois tipos principais de tecido adiposo, TAM e TAB, que tem fundamentalmente papeis opostos no balanço energético. Enquanto o TAB é um tecido de reserva energética, o TAM tem a capacidade de dissipar energia através da termogênese (Rosell *et al.*, 2012).

O TAM tem aparência poligonal e contém vários pequenos vacúolos de gordura (por isso chamado multilocular), cercados por um citoplasma perceptível com abundantes mitocôndrias (Richard *et al.*, 2010). O TAB, por sua vez, é representado por uma única gotícula de gordura (por isso chamado unilocular), cercada por uma pequena quantidade de citoplasma e com algumas poucas mitocôndrias (Peirce *et al.*, 2014). Tais características podem ser visualizadas na Figura 2.

Apesar da quantidade de TAB superar em muito a quantidade de TAM no organismo (principalmente humano), ambos os órgãos podem ser considerados essenciais na divisão e utilização dos nutrientes, bem com na regulação da massa corporal (Peirce *et al.*, 2014).

Figura 2 - Comparação entre o tecido adiposo marrom e o tecido adiposo branco



Legenda: O adipócito marrom (à esquerda) é caracterizado por várias gotículas de gordura, cercadas por um citoplasma perceptível e grande número de mitocôndrias. O adipócito branco (à direita) é caracterizado por uma única gotícula de gordura que ocupa grande parte da célula, pequena quantidade de citoplasma e poucas mitocôndrias.

Fonte: A autora, 2015.

1.2.1 Tecido adiposo marrom e termogênese

O TAM foi primeiramente descrito no século XVI como “nem gordura nem carne” (“*nec pinguitudo nec caro*”) pelo naturalista suíço Conrad Gesner. Apesar disso, a percepção de que o TAM está presente em todos os mamíferos só ocorreu no último século, tornando esse tecido um alvo de estudo científico relativamente recente. De fato, algumas importantes descobertas, como a identificação da UCP1, só aconteceram nas últimas décadas (Cannon e Nedergaard, 2004; Richard *et al.*, 2010).

O TAM é abundante em roedores, nos quais aparece como pequenos depósitos encontrados principalmente nas regiões interescapular, subescapular, axilar, perirrenal e periaórtica (os chamados depósitos clássicos). Em humanos, ele pode ser encontrado nas regiões cervical, supraclavicular, paravertebral, mediastinal e perirrenal. Nesse sentido, enquanto antes se acreditava que o TAM era perdido

após a infância, só recentemente comprovou-se que esse tecido pode ser ativado no organismo humano adulto (Cypess *et al.*, 2009; Richard *et al.*, 2010).

As células adiposas dos depósitos clássicos de TAM, ao contrário do esperado, não tem origem semelhante à do TAB, mas sim às células musculares. Elas se originam de células progenitoras de miócitos, chamadas de mioblastos que expressam o fator miogênico 5 (Myf5+). A constatação de que a proteômica do TAM corresponde mais à do músculo do que à do TAB confirma essa ideia (Cannon e Nedergaard, 2004; Richard *et al.*, 2010).

Nesse contexto, uma nova linhagem de células adiposas, com aspecto multilocular e alta capacidade de termogênese, chamada de células *bege* ou *bright* foi recentemente descrita. Apesar de advirem de uma linhagem celular diferente das células adiposas marrons, ainda não se sabe ao certo se são fruto da transdiferenciação de pré-adipócitos ou adipócitos brancos ou de uma terceira linhagem celular adiposa, sendo diferente tanto do TAM quanto do TAB. Ao fenômeno de surgimento desses depósitos de células adiposas *bright* dá-se o nome de *browning* (Richard *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2012; Kajimura e Saito, 2014).

O TAM é um tecido especializado na produção de calor, que é chamada termogênese e que pode ser dividida em duas classes distintas. A primeira delas, a termogênese obrigatória, é fruto da energia liberada das reações exotérmicas que ocorrem em todos os órgãos. A segunda, a termogênese adaptativa ou facultativa, é desenvolvida como uma resposta de adaptação à exposição ao frio ou a alterações na dieta, sendo o TAM o principal órgão responsável por esse tipo de termogênese, pelo menos em roedores (Lowell e Spiegelman, 2000; Cannon e Nedergaard, 2004).

A habilidade do TAM de dissipar energia é provida pela presença singular da UCP1 (também chamada termogenina), que é a marca registrada desse tecido. A UCP1 está localizada na membrana interna da mitocôndria e é capaz de dissipar energia através do desacoplamento da oxidação mitocondrial de substratos da produção de ATP, consequentemente gerando calor (Lowell e Spiegelman, 2000).

A estimulação do TAM ocorre principalmente pela ação da norepinefrina, liberada pelo sistema nervoso simpático, nos receptores adrenérgicos, mais especificamente, no RA-β3, o mais significativo nesse tecido (Festuccia *et al.*, 2010). Essa ligação leva à formação de adenosina 3’,5’-monofosfato cíclico (AMPc), que ativa a proteína kinase A (PKA) que fosforila a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) p38α, ativando-a. Essa, por sua vez, ativa uma gama de proteínas

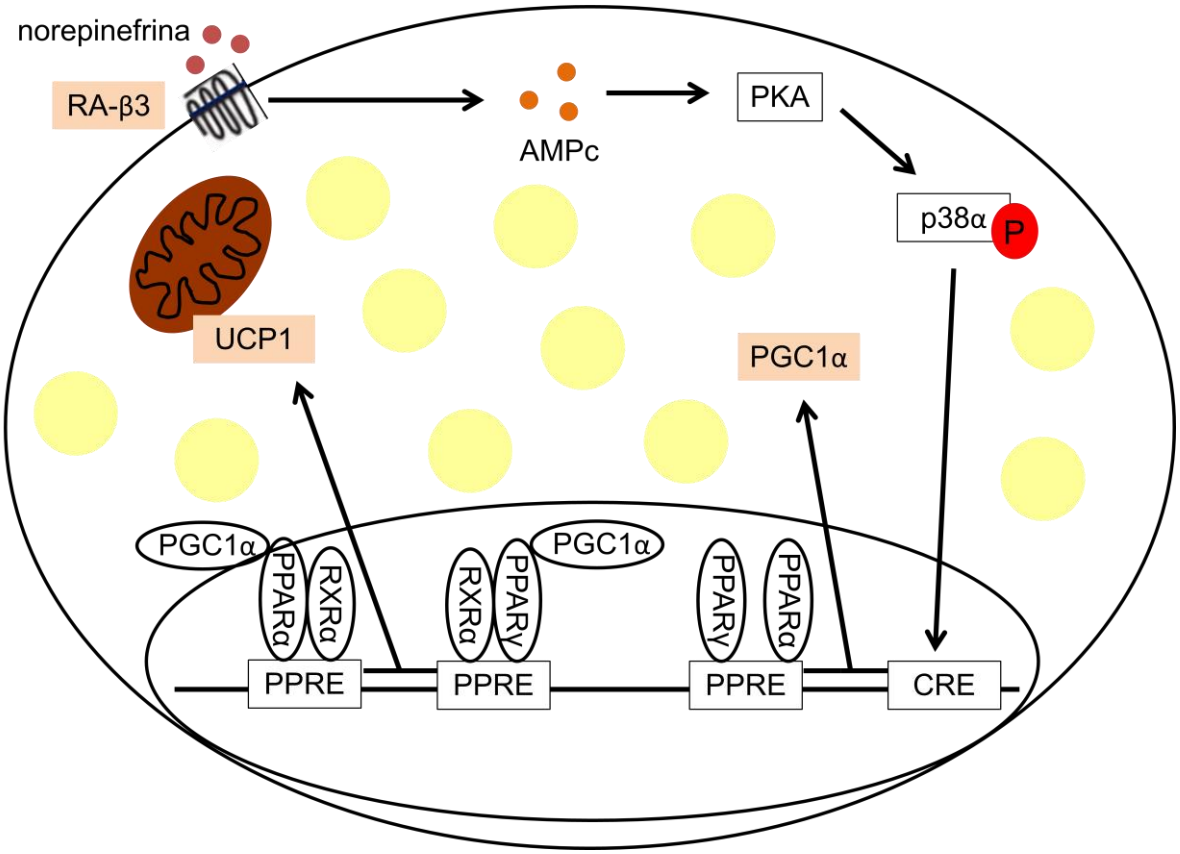
nucleares e citoplasmáticas, tendo destaque a ativação da via lipolítica e da atividade termogênica (Figura 3) (Cannon e Nedergaard, 2004; Hondares *et al.*, 2011). Nesse contexto, tem papel importante a leptina, que atua nos seus receptores centrais no hipotálamo, aumentando a atividade simpática para o TAM e, dessa forma, estimulando a termogênese (Enriori *et al.*, 2011).

Dentre as vias reguladas por AMPc/PKA, encontra-se a de regulação positiva da expressão gênica do coativador 1 alfa do PPARγ (PGC1α). O PGC1α é altamente expresso no TAM, induzindo a expressão de UCP1 e aumentando a capacidade oxidativa mitocondrial (Figura 3), sendo, portanto, fundamental para a termogênese (Hondares *et al.*, 2011).

Os PPAR também parecem estar envolvidos na termogênese. PPARα, PPARβ/δ e PPARγ são altamente expressos no TAM e têm efeito no aumento dos genes relacionados à oxidação de lipídios, que é fundamental para prover substrato para a termogênese, e da UCP1 (Figura 3) (Wang *et al.*, 2003; Festuccia *et al.*, 2010; Rosell *et al.*, 2012).

Para que a termogênese ocorra no TAM, é necessária a presença de substrato que será utilizado no processo. Nesse contexto, sabe-se que o TAM pode utilizar tanto ácidos graxos, de triglicerídeos captados da corrente sanguínea através do receptor CD36 ou previamente estocados no tecido, quanto glicose, captada da corrente sanguínea, através do transportador de glicose-4 (GLUT-4) (Komatsu *et al.*, 2010).

Figura 3 - Resumo simplificado da termogênese no tecido adiposo marrom



Legenda: Catecolaminas, especialmente norepinefrina, liberadas pelo sistema nervoso simpático se ligam ao seu receptor adrenérgico do tipo beta 3 (RA-β3), levando à liberação de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) e consequente à ativação da proteína kinase A (PKA), que fosforila a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) p38α. A p38α, por sua vez, inicia diversas vias intracelulares, sendo de especial interesse a de ativação da expressão gênica do coativador 1 alfa do PPARγ (PGC1α). Posteriormente, PGC1α se liga ao receptor ativador de proliferação peroxissomal alfa (PPARα) ou PPARγ para iniciar a transcrição gênica da proteína desacopladora de elétrons 1 (UCP1), a proteína chave da termogênese. Alternativamente, tanto PPARα quanto PPARγ também podem transcrever PGC1α.

Fonte: Adaptado de Richard *et al.*, 2010.

A termogênese adaptativa do TAM parece ter dois propósitos fisiológicos diferentes: (1) manter a temperatura corporal e (2) permitir a queima do excesso de energia ingerida. No primeiro caso, temos a termogênese induzida pelo frio (também chamada termogênese termorregulatória) que visa manter a temperatura corporal regulada. Embora a exposição aguda ao frio promova a termogênese através da contração involuntária da musculatura esquelética (termogênese *shivering*), quando essa exposição se torna crônica, o mecanismo de dissipação de energia sem tremor

se instala no TAM (termogênese *non-shivering*) (Cannon e Nedergaard, 2004; Lee *et al.*, 2014).

No segundo caso, temos a termogênese induzida por dieta (ou termogênese metabolorregulatória), que é pouco estudada e tem objetivos ainda pouco esclarecidos (Cannon e Nedergaard, 2004). No final da década de 70, a primeira grande descoberta nesse sentido demonstrou que a dieta tipo cafeteria (rica em gordura saturada e açúcares simples), que favorece o desenvolvimento de obesidade em modelos animais, estava associada a um recrutamento do TAM (Rothwell e Stock, 1979). Desde então, discute-se sua função. Embora não faça sentido evolucionário que ela tenha se desenvolvido para queimar o excesso de calorias, mantendo a homeostase energética, estudos atuais apontam para um possível dispêndio de energia com o objetivo de manter a ingestão de proteínas e o aporte de aminoácidos constantes (Lowell e Spiegelman, 2000; Kozak, 2010).

.

1.2.2 Tecido adiposo branco

O TAB é o principal local de reserva de energia do corpo e foi, por muito tempo, considerado como simples depósito de gordura e energia. Nas últimas décadas, no entanto, o aumento dos estudos envolvendo o TAB, graças aos níveis alarmantes de obesidade, revelou um novo papel para esse tecido. Ele é agora reconhecido como um tecido endócrino com grande relevância metabólica com repercussões importantes em todo o corpo, sendo que sua falta ou seu excesso trazem consequências metabólicas adversas para o organismo (Lee *et al.*, 2008; Proenca *et al.*, 2014).

Duas atividades metabólicas primárias podem ser destacadas no TAB: a lipogênese, que se refere à síntese e estoque de triglicerídeos a partir de ácidos graxos e a lipólise, que se refere à mobilização ou hidrólise desses triglicerídeos. Sendo assim, através da lipogênese ele estoca energia e através da lipólise ele libera ácidos graxos para o organismo, em resposta a alterações no balanço energético. Esses dois processos são regulados por mecanismos endócrinos e neuronais (Flachs *et al.*, 2009; Proenca *et al.*, 2014).

Como já mencionado, o principal local de reserva de triglicerídeos é o TAB, em que uma única gotícula de gordura ocupa 80 a 90% da célula, deslocando o núcleo e as organelas para a periferia celular. No entanto, também é possível o armazenamento desses triglicerídeos em outros tecidos como músculo e fígado, o que leva à lipotoxicidade, resistência à insulina e diversos outros efeitos deletérios (Proenca *et al.*, 2014).

A síntese de triglicerídeos no TAB consiste na união de três moléculas de ácidos graxos com uma de glicerol, sendo que esses ácidos graxos podem se originar tanto da corrente sanguínea (na forma de VLDL, por exemplo) quanto internamente através da formação de malonil-CoA a partir de acetil-CoA. Vários transportadores localizados na membrana celular estão envolvidos no transporte desses ácidos graxos da circulação para o interior da célula e, dentre eles, destaca-se o CD36 (Yang *et al.*, 2013).

Após entrar nos adipócitos, os ácidos graxos precisam se ligar a transportadores específicos, uma vez que não são solúveis no meio aquoso do citoplasma e podem ser tóxicos para as membranas. Esses transportadores são as proteínas ligantes de ácidos graxos (FABP), que incluem a FABP4, também conhecida como *adipocyte protein* 2 (aP2). A aP2 transporta os ácidos graxos da membrana até o local de ação da enzima acil-CoA sintase, onde os ácidos graxos são ligados à coenzima-A para posterior ligação com o glicerol e formação de triglicerídeos (Figura 4) (Garin-Shkolnik *et al.*, 2014).

É possível também observar no TAB o mecanismo de lipogênese *de novo*, que consiste na produção de ácidos graxos a partir de substratos que não são lipídios. De forma sucinta, a acetil-CoA é carboxilada em malonil-CoA que, então, através da atividade da enzima FAS fornece unidades de carbono até a formação de ácido palmítico, o primeiro ácido graxo sintetizado (Figura 4) (Berndt *et al.*, 2007).

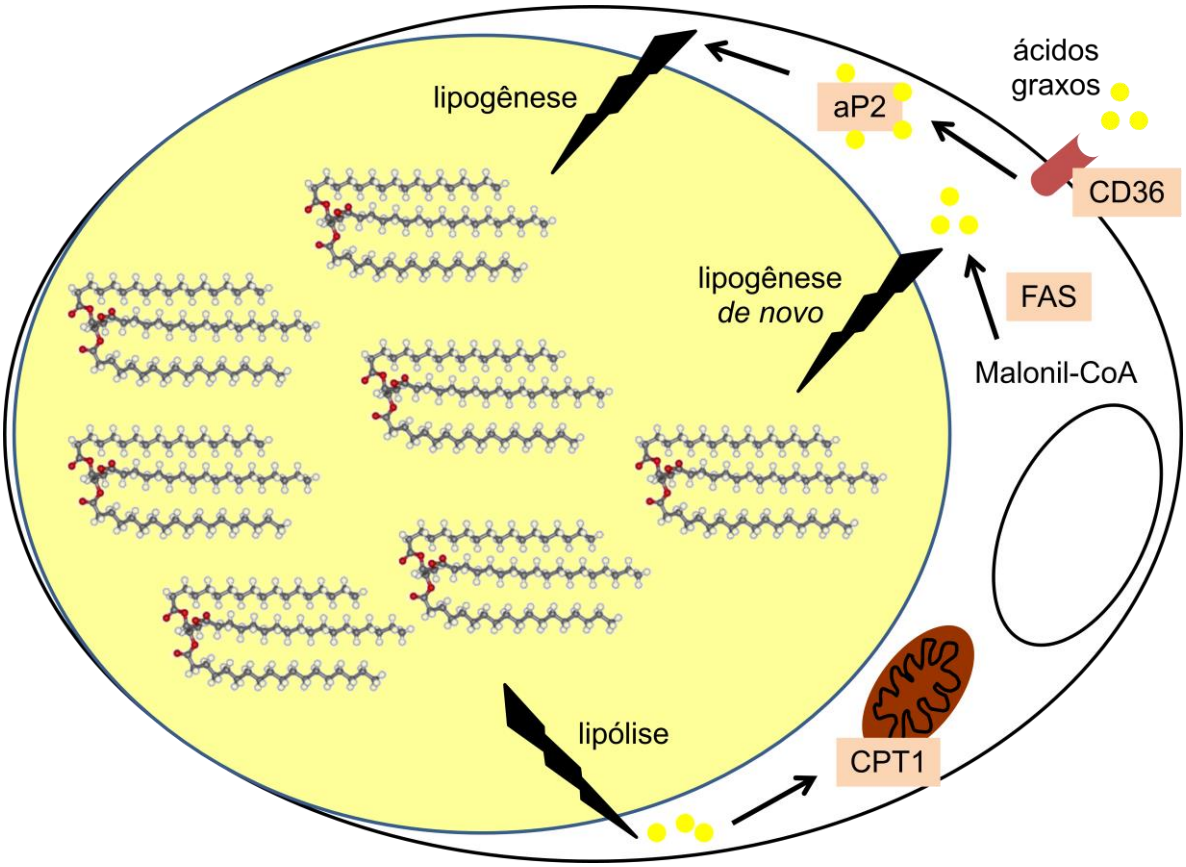
Já com relação à lipólise, ela é ativada em períodos de privação de nutrientes, estresse ou atividade física, consistindo na liberação de ácidos graxos que serão usados por outros tecidos para a produção de energia. O estímulo para a lipólise é majoritariamente fornecido pelas catecolaminas, que no TAB, assim como no TAM, atuam principalmente pelo RA-β3. Essa ligação desencadeia uma série de reações que culminam na hidrólise dos triglicerídeos em diacilglicerois, depois em monoacilglicerois até ácidos graxos. Como já descrito, esses ácidos graxos caem na circulação e são direcionados a outros tecidos (Proenca *et al.*, 2014).

Alternativamente, esses ácidos graxos liberados pela lipólise podem entrar na mitocôndria servindo como fonte de energia para o próprio adipócito através da beta-oxidação. A CPT-1 está localizada na membrana externa da mitocôndria e é a enzima limitante para a beta-oxidação dos ácidos graxos. A reação promovida por ela é a etapa inicial para a entrada dos ácidos graxos de cadeia longa do citoplasma para a matriz mitocondrial onde a oxidação ocorre. De forma interessante, o malonil-CoA atua como inibidor da CPT-1, impedindo sua ação em estados de alimentação, sendo, portanto, um regulador da beta-oxidação e do metabolismo do TAB (Figura 4) (Brown *et al.*, 1997).

Como já mencionado, atualmente reconhece-se o TAB como um órgão metabolicamente ativo, que secreta citocinas (TNFα e IL-6, por exemplo) e adipocinas (como adiponectina e leptina), sendo, portanto, considerado um tecido endócrino. Em situações fisiológicas, os adipócitos brancos são pequenos e insulino-sensíveis, com a presença de macrófagos do tipo M2, que protegem as células da inflamação. Por outro lado, na obesidade, os adipócitos se tornam hipertrofiados, insulino-resistentes e com a presença de macrófagos do tipo M1. Todas essas mudanças levam a uma alteração no perfil secretório dessas células, com aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios tanto pelos adipócitos hipertrofiados quanto pelos macrófagos ativados e com diminuição de mediadores anti-inflamatórios. Cria-se então o estado de inflamação sistêmica de baixa intensidade (Flachs *et al.*, 2009; Peirce *et al.*, 2014).

As principais citocinas e adipocinas liberadas em situações de obesidade incluem TNFα, IL-6, proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), resistina, dentre outros. Esses mediadores provocam o desenvolvimento da resistência à insulina em diversos tecidos, como o próprio TAB, o fígado e o músculo esquelético (Barbosa-da-Silva *et al.*, 2012; Catta-Preta *et al.*, 2012). De forma oposta, a adiponectina é a principal adipocina anti-inflamatória e tem sua secreção e níveis plasmáticos diminuídos com a hipertrofia dos adipócitos. A adiponectina é capaz de melhorar a sensibilidade à insulina e estimular a oxidação de ácidos graxos (Shetty *et al.*, 2012).

Figura 4 - Resumo simplificado da lipogênese e beta-oxidação no tecido adiposo branco



Legenda: As atividades básicas do tecido adiposo branco incluem a lipogênese e a lipólise. No primeiro caso, os ácidos graxos são obtidos da corrente sanguínea através de receptores como o cluster de diferenciação 36 (CD36) e são transportados pelo citoplasma pela *adipocyte protein* 2 (aP2) até o local da reação de ligação deles com o glicerol, formando os triglicerídeos que serão estocados na gotícula de gordura. Nos adipócitos, ainda pode ocorrer a lipogênese *de novo* em que os ácidos graxos são sintetizados a partir de acetil-CoA, que é convertido em malonil-CoA e então através de sucessivas reações pela enzima ácido graxo sintase (FAS), em ácidos graxos que também serão armazenados na forma de triglicerídeos. Por outro lado, a lipólise resulta na quebra desses triglicerídeos e liberação de ácidos graxos. De forma alternativa, essas moléculas podem ser utilizadas para produção de energia através da beta-oxidação, que ocorre na mitocôndria e tem como principal enzima a carnitina palmitoil transferase-1 (CPT-1).

Fonte: A autora, 2014.

Outra adipocina que merece destaque é a leptina, que tem papel central na homeostase energética. Sua função é comunicar o sistema nervoso central sobre a quantidade de gordura estocada, para controle da massa corporal. Assim, a ativação de seus receptores centrais diminui o apetite bem como ativa o sistema nervoso simpático (aumentando inclusive a termogênese, como previamente descrito) (Enriori *et al.*, 2011). Conforme a massa de tecido adiposo aumenta, também se elevam os níveis de leptina circulante, o que poderia parecer paradoxal, uma vez que na obesidade não há diminuição de apetite nem redução da massa corporal. Esse fato, no entanto, é explicado pelo aparecimento de hiperleptinemia e posterior falha na ação da leptina, devido a defeitos na sua sinalização. Portanto, a obesidade também é marcada por um estado de resistência à leptina (Kshatriya *et al.*, 2011).

Por todo o exposto, torna-se evidente que o tecido adiposo (tanto marrom quanto branco) exerce papel fundamental na obesidade e síndrome metabólica, sendo, portanto, um alvo importante nas terapias alternativas de combate a essas doenças.

1.3 **Ácidos graxos poli-insaturados n-3**

Os ácidos graxos podem ser divididos em saturados ou insaturados, dependendo da ausência ou presença de dupla ligação entre os carbonos, respectivamente. Os ácidos graxos insaturados podem ainda ser divididos em monoinsaturados e poli-insaturados, de acordo com o número de insaturações presentes na molécula (Schachter *et al.*, 2004). Com base nessa característica, os ácidos graxos insaturados podem ser denominados de acordo com o local em que apresentam a dupla ligação. Sendo assim, os ácidos graxos monoinsaturados são comumente denominados n-9 ou ômega-9, pois possuem a primeira dupla ligação no carbono 9 (contando a partir da terminação metil da cadeia acil) e os AGPI podem ser chamados de n-3 (ou ômega-3) ou n-6 (ou ômega-6), dependendo do local da primeira insaturação (Lamping *et al.*, 2012).

Dentre os AGPI, dois merecem especial atenção: ácido linoleico (AL - um ácido graxo n-6) e ácido alfa-linolênico (ALN - um ácido graxo n-3). AL e ALN são os ácidos graxos n-6 e n-3 mais simples e não podem ser sintetizados pelo organismo.

Dessa forma, eles são também chamados de essenciais, pois devem ser obtidos a partir da dieta (Schachter *et al.*, 2004).

No organismo, ALN, quando ingerido, é convertido, no fígado, em outros AGPI, dentre eles, EPA e DHA, que são comumente referidos como AGPI de cadeia muito longa (Valenzuela e Videla, 2011). A via completa de biossíntese dos AGPI a partir do ALN pode ser visualizada na Figura 5.

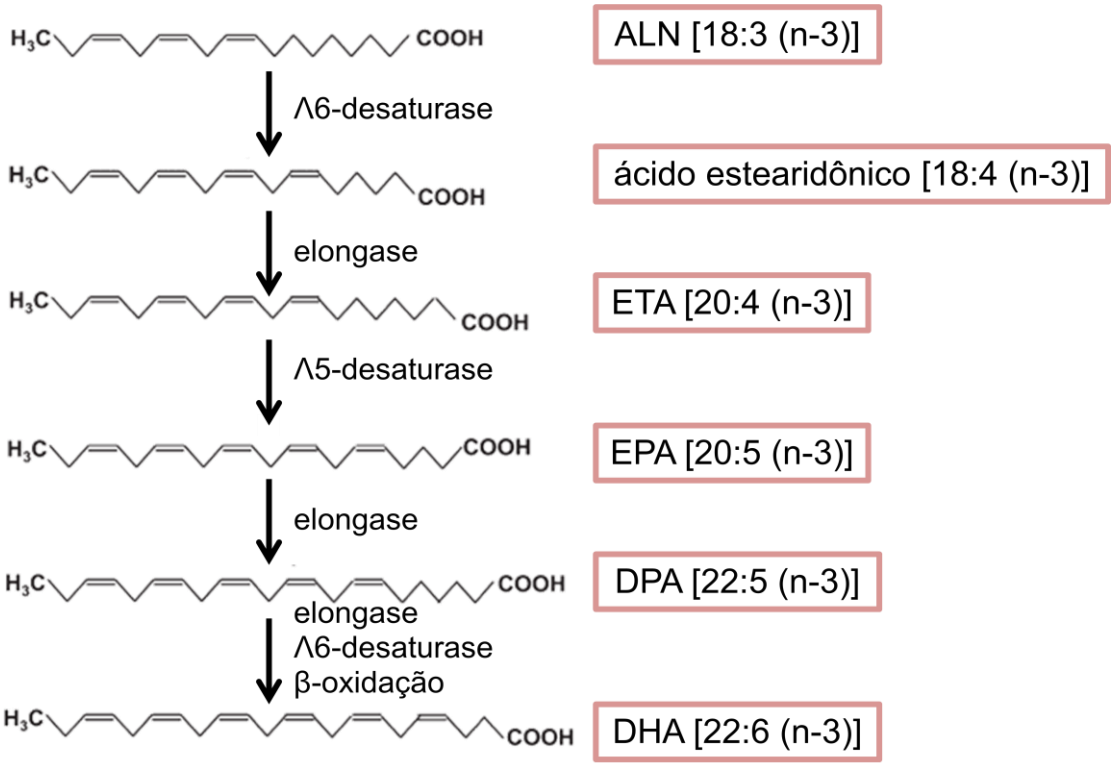
No entanto, a habilidade do organismo em converter ALN em EPA e, especialmente DHA é limitada (Smink *et al.*, 2012). Tal explicação se baseia no fato de que λ6-desaturase é uma enzima limitante e, portanto ela restringe a produção de AGPI de cadeia longa mesmo em altas concentrações de ALN (Gregory *et al.*, 2011). De fato, a conversão de ácido estearidônico em EPA parece ser mais eficiente quando comparado com o ALN, uma vez que não há necessidade da participação da λ6-desaturase nesse processo (James *et al.*, 2003).

Hoje em dia, EPA e DHA são considerados os ácidos graxos com os maiores efeitos benéficos (Stoeckel *et al.*, 2011). Os efeitos desses AGPI n-3 de cadeia muito longa são mediados principalmente por dois grupos de mecanismos (Figura 6): (1) mudança na composição dos fosfolipídios das membranas plasmáticas e (2) interação com receptores ou sensores de superfície ou intracelulares (Calder, 2012).

Com relação à membrana celular, os AGPI n-3 são capazes de alterar a composição dos fosfolipídios, passando de um predomínio de AGPI n-6 (principalmente ácido aracdônico) para um de n-3 (Stoeckel *et al.*, 2011). Estudos demonstram que a ingestão de ALN, EPA e/ou DHA diminui a presença de ácido aracdônico nas membranas plasmáticas (Gibson *et al.*, 2012; Smink *et al.*, 2012).

Os AGPI n-3 (principalmente EPA) assim como os n-6 presentes nas membranas plasmáticas, são alvos das enzimas de degradação ciclo-oxigenase e lipoxigenase. No entanto, no primeiro caso, há formação de eicosanoides de série impar, que englobam prostaglandinas e tromboxanos de série 3 e leucotrienos de série 5, que apresentam menor ação pró-inflamatória (Lamping *et al.*, 2012). Além disso, tal substituição faz com que esses ácidos graxos entrem em competição com os n-6 pelas enzimas de degradação, diminuindo a produção dos mediadores pró-inflamatórios derivados dos AGPI n-6 (Gonzalez-Periz *et al.*, 2009). EPA e DHA também parecem servir de substratos para a produção de mediadores lipídicos denominados resolvinas e protectinas, que ajudam na resolução do processo inflamatório (Gonzalez-Periz *et al.*, 2009).

Figura 5 - Biossíntese de ácidos graxos poli-insaturados n-3

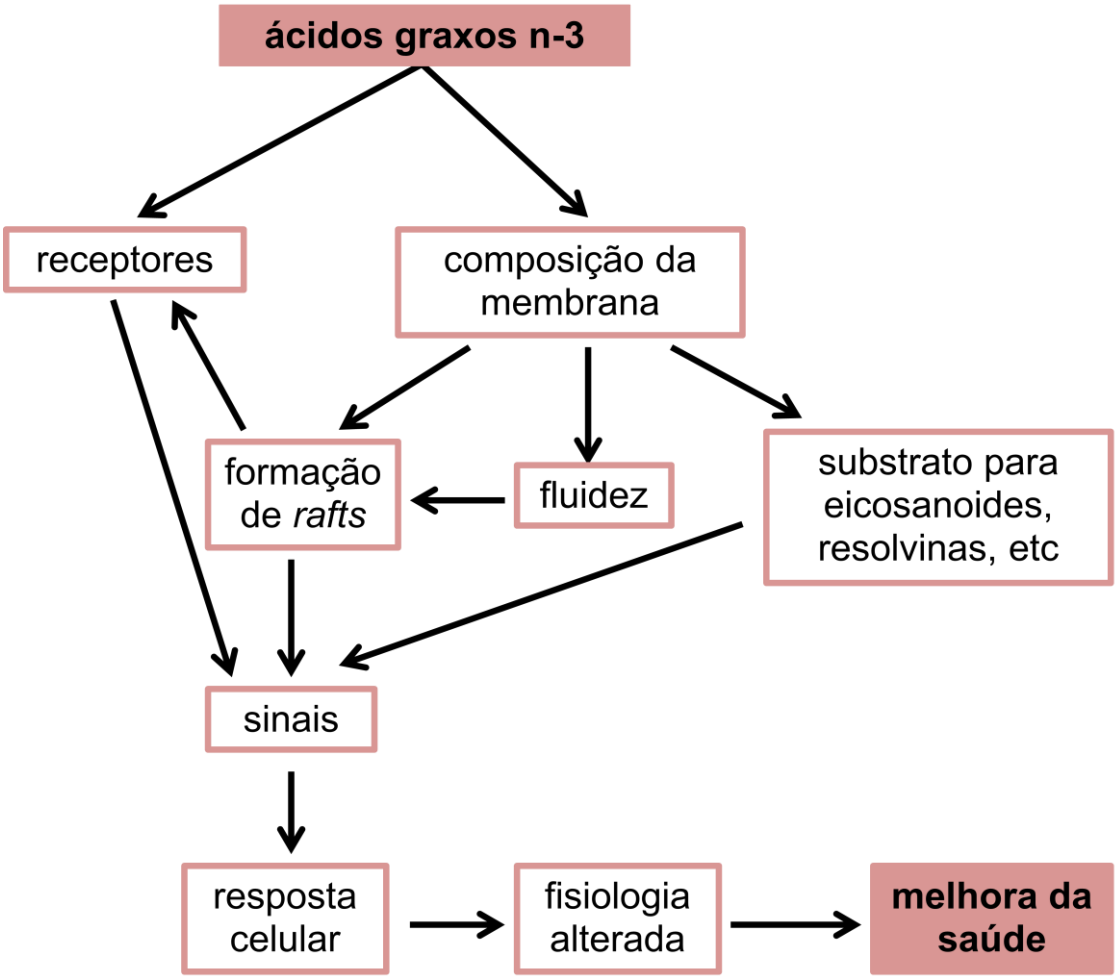


Legenda: Ácido alfa-linolênico (ALN) é desaturado pela enzima λ6-desaturase a ácido estearidônico que, por sua vez, sofre ação da elongase para formação de ácido eicosatetraenoico (ETA). Esse sofre a ação da λ5-desaturase para produção de ácido eicosapentaenoico (EPA) que, então, sofre ação da elongase para formação de ácido docosapentaenoico (DPA) que, por último, é metabolizado a ácido docosahexaenoico (DHA).

Fonte: Adaptado de Calder, 2012.

Atualmente sabe-se que os AGPI n-3 tem influência na formação e funcionalidade dos *rafts* das membranas celulares. Esses *rafts* correspondem a microdomínios ricos em colesterol e esfingolipídios em que há ancoragem de moléculas de sinalização e estão, portanto, envolvidos em diversos processos como ativação celular e transdução de sinal. Apesar de não participarem na composição dos *rafts* (por causa da baixa afinidade com o colesterol), os ácidos graxos são incorporados em regiões de não-*raft* e parecem modular esses microdomínios, levando a uma alteração positiva na sua funcionalidade (Chapkin *et al.*, 2008; Turk e Chapkin, 2013).

Figura 6 - Mecanismos de ação dos ácidos graxos poli-insaturados n-3



Legenda: Os dois principais mecanismos de ação dos ácidos graxos poli-insaturados n-3 envolvem: (1) a substituição dos fosfolipídios de membrana, levando à alteração de sua fluidez e da formação de *rafts,* e à produção de eicosanoides e outros mediadores inflamatórios; e (2) a interação com receptores de superfície e intracelulares. Esses processos levam a alterações na transdução dos sinais e, consequentemente, a mudanças na resposta celular, contribuindo para a melhora na saúde.

Fonte: Adaptado de Calder, 2011.

No que tange à participação dos AGPI n-3 na interação com receptores ou sensores celulares, sabe-se que EPA e DHA são capazes de atuar diretamente sobre diversas moléculas (Wakutsu *et al.*, 2010). Nesse sentido, vale destacar a ligação desses ácidos graxos ao receptor associado à proteína G 120 (GPR 120), que desencadeia diversas respostas celulares, que incluem mecanismos anti-inflamatórios (Oh *et al.*, 2010). Os AGPI n-3 também parecem modular a atividade do fator nuclear kapa B (NFκB), que é um fator de transcrição responsável pela expressão gênica de diversas citocinas, e, consequentemente, diminuir a resposta pró-inflamatória (Hsueh *et al.*, 2011). Por último, EPA e DHA são considerados agonistas PPARα, PPARβ/δ e PPARγ, uma vez que eles ativam essas isoformas (Yu *et al.*, 2010; Calder, 2012).

PPARα e PPARβ/δ estão relacionados à regulação de genes envolvidos na beta-oxidação lipídica, principalmente no fígado, mas também no tecido adiposo, enquanto PPARγ atua na diferenciação de adipócitos e na transcrição de genes lipogênicos e de transporte de ácidos graxos. Dessa forma, grande parte dos efeitos observados dos AGPI n-3 na obesidade e suas comorbidades pode ser explicada pela ativação desses fatores de transcrição (Flachs *et al.*, 2014).

Diversas sementes e seus óleos, além de algumas frutas oleaginosas, contêm quantidades consideráveis de ALN. Linhaça e óleo de linhaça possuem, em média, 45% a 55% dos ácidos graxos na forma de ALN enquanto outras sementes, como soja, apresentam apenas 10%. A ingestão média de ALN nas populações ocidentais gira em torno de 0,5 a 2 gramas/dia (Burdge e Calder, 2006).

Com relação aos AGPI n-3 de cadeia muito longa, eles podem ser obtidos na dieta a partir da ingestão de peixes, principalmente. No entanto, a quantidade desses ácidos graxos nos peixes e a razão EPA:DHA são bem variáveis e dependem de diversos fatores, tais como as características metabólicas dos peixes e a estação do ano. Além disso, a concentração também varia de acordo com o tipo de peixe. Peixes magros, como o bacalhau, apenas armazenam lipídios no fígado, enquanto peixes gordurosos, como cavala, arenque, salmão, atum e sardinha, armazenam lipídios por toda sua carne. Uma porção de peixe magro pode fornecer de 0,2 a 0,3 gramas de AGPI de cadeia muito longa e uma porção de peixes oleosos pode fornecer entre 1,5 a 3,5 gramas desses ácidos graxos. Como forma de

maximizar a ingestão, principalmente de EPA e DHA, é possível consumir óleo de peixe, obtido da carne ou do fígado dos animais (Calder, 2012).

1.4 **Óleo de peixe**

O óleo de peixe é rico em AGPI n-3 de cadeia muito longa, contendo geralmente em torno de 25% a 30% de seus lipídios sob a forma de EPA e DHA. No entanto, essa composição é variável pelos fatores já mencionados anteriormente. Dessa forma, a proporção desses ácidos graxos nos óleos de peixe reflete o peixe utilizado para obtenção do óleo. Assim, óleo de fígado de bacalhau, por exemplo, é mais rico em EPA do que DHA, enquanto óleo de sardinha é mais rico em DHA do que EPA (Calder, 2012). O óleo de *menhaden* (em português, savelha ou saboga), por sua vez, apresenta mais EPA do que DHA em proporções que variam entre 12,8% a 15,4% e entre 6,9% e 9,1%, respectivamente (Yin e Sathivel, 2010).

A ideia de que o óleo de peixe pudesse ter algum efeito benéfico sobre a saúde se iniciou a partir de observações sobre a população de esquimós da Groenlândia. Nessas populações, foi possível associar o alto consumo de alimentos ricos nos ácidos graxos n-3 com baixa incidência de doenças cardiovasculares, diabetes melito tipo 2, doenças inflamatórias e autoimunes (Kromann e Green, 1980).

Desde então, diversos estudos experimentais demonstram efeito da ingestão de óleo de peixe sobre os parâmetros da síndrome metabólica como resistência à insulina, dislipidemia e doença hepática gordurosa não alcoólica (Saraswathi *et al.*, 2009; Arai *et al.*, 2013; Bargut *et al.*, 2014). Além disso, ele parece ter efeito não só no processo inflamatório relacionado à obesidade (Saraswathi *et al.*, 2007; Cintra *et al.*, 2012) como também em diversas doenças de base inflamatória como asma (Yin *et al.*, 2009; Bargut *et al.*, 2013) e colite ulcerativa (Monk *et al.*, 2012).

Em humanos, diversos estudos vêm demonstrando efeito benéfico do óleo de peixe, embora ainda não haja consenso, muito provavelmente pelo emprego de diferentes doses, composições e formas de ingestão nos trabalhos disponíveis (Galli e Calder, 2009). Há evidências de que sua ingestão está associada à diminuição do risco de doenças como síndrome metabólica (Ruidavets *et al.*, 2007), diabetes melito

tipo 2 (Djousse *et al.*, 2011), Doença de Crohn (Nielsen *et al.*, 2005), artrite reumatoide (Dawczynski *et al.*, 2011), entre outros.

Nesse sentido, o óleo de peixe também parece proteger contra e reduzir o ganho de massa corporal, em modelos experimentais e em humanos (Couet *et al.*, 1997; Kabir *et al.*, 2007; Bargut *et al.*, 2014; Lionetti *et al.*, 2014). Os principais efeitos antiobesogênicos do óleo de peixe parecem estar relacionados à sua capacidade de modular genes envolvidos na oxidação lipídica em uma gama de órgãos, como fígado e intestino delgado, e também modular a adipogênese no tecido adiposo (Flachs *et al.*, 2005; van Schothorst *et al.*, 2009; Buckley e Howe, 2010). Além disso, estudos também apontam sua participação na expressão de UCP1 no TAM e no recrutamento de células *brite* no TAB subcutâneo, sugerindo modulação da termogênese (Takahashi e Ide, 2000; Zhao e Chen, 2014).

Para obter os benefícios do óleo de peixe, a *American Diabetes Association* (ADA) recomenda a ingestão de peixe, duas a três vezes por semana[3]. Já a *American Heart Association* (AHA) e a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) recomendam duas porções, principalmente de peixes gordurosos, por semana, para indivíduos saudáveis, um grama de EPA mais DHA por dia para indivíduos com doença coronariana, e de dois a quatro gramas de EPA mais DHA para combate da hipertrigliceridemia[4,5].

Dessa forma, o óleo de peixe parece ser uma potencial terapia alternativa no combate à obesidade e síndrome metabólica, não só pelos efeitos nas diversas comorbidades associadas, mas pela influência direta no tecido adiposo e na modulação da massa corporal e adiposidade.

---

[3] American Diabetes Association. Food and Fitness. Fats. Healthy Fats. Disponível em: <http://www.diabetes.org/food-and-fitness/>. Acesso em: 20 dez. 2014.

[4] American Heart Association. Getting Health. Nutrition Center. Healthy Eating. Fish 101. Disponível em: http://www.heart.org/HEARTORG/GettingHealthy/. Acesso em: 20 dez. 2014.

[5] Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. Arquivos brasileiros de cardiologia, v.100, n.1, suplemento 3. Rio de Janeiro: SBC; 2013.

2 **OBJETIVOS**

2.1 **Geral**

Considerando todo o exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos antiobesogênicos de diferentes dietas hiperlipídicas com óleo de peixe na termogênese do TAM e na lipogênese e beta-oxidação do TAB.

2.2 **Específicos**

Avaliar o efeito de diferentes dietas hiperlipídicas com óleo de peixe sobre:

a) a massa corporal, gordura epididimária e índice de adiposidade;
b) a ingestão alimentar, quociente respiratório e gasto energético;
c) a intolerância à glicose e resistência à insulina;
d) o perfil plasmático de leptina e triglicerídeos;
e) os marcadores termogênicos no TAM;
f) a expressão de PPAR no TAM;
g) a captação e oxidação de lipídios no TAM;
h) a captação de glicose no TAM;
i) o remodelamento do TAB;
j) a expressão de PPAR no TAB;
k) a lipogênese e beta-oxidação no TAB.

3 **MATERIAL E MÉTODOS**

3.1 **Animais e dieta**

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com os guias convencionais para experimentação em animais (Publicação número 85-23 do NIH, revisada em 1996). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal local (Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes) sob o protocolo CEUA/018/2013.

Camundongos C57BL/6 machos, obtidos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), foram mantidos em condições controladas de temperatura, umidade e ciclo de luz (21±2º C, umidade 60 ± 10%, ciclo claro-escuro 12:12 horas), com livre acesso à ração e à água. Com 12 semanas de vida (três meses), os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais: um grupo que recebeu dieta padrão de manutenção para roedores de acordo com o *American Institute of Nutrition* (AIN-93M; *standard-chow*, SC; 10% da energia proveniente dos lipídios) (Reeves *et al.*, 1993) e três grupos que receberam dieta hiperlipídica (HL; 50% da energia proveniente dos lipídios). As dietas foram administradas durante um período de oito semanas. Os grupos foram assim compostos (n=10 por grupo):

a) grupo SC;
b) grupo HL-B: hiperlipídico-banha, lipídios provenientes da banha de porco;
c) grupo HL-B+Px: hiperlipídico-banha mais óleo de peixe, lipídios provenientes da banha de porco e do óleo de peixe;
d) grupo HL-Px: hiperlipídico-óleo de peixe, lipídios provenientes do óleo de peixe.

As dietas foram elaboradas com nutrientes purificados pela PragSoluções (Jaú, São Paulo, Brasil, www.pragsolucoes.com.br) e sua composição detalhada pode ser vista na Tabela 1. Foi utilizado óleo de peixe de *menhaden* (Santa Cruz *Biotechnology*).

Tabela 1 - Composição e conteúdo energético das dietas (baseadas na AIN-93M)

Ingredientes (g/kg)	SC	HL-B	HL-B+Px	HL-Px
Caseína (≥ 85% de proteína)	140,0	175,0	175,0	175,0
Amido de milho	620,692	347,692	347,692	347,692
Sacarose	100,0	100,0	100,0	100,0
Óleo de soja	40,0	40,0	40,0	40,0
Banha de porco	-	238,0	119,0	-
Óleo de peixe	-	-	119,0	238,0
Fibra	50,0	50,0	50,0	50,0
Mix de vitaminas[a]	10,0	10,0	10,0	10,0
Mix de minerais[a]	35,0	35,0	35,0	35,0
L-Cistina	1,8	1,8	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Antioxidantes	0,008	0,060	0,060	0,060
Total gramatura	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0
Proteínas (% Energia)	14	14	14	14
Carboidratos (% Energia)	76	36	36	36
Lipídios (% Energia)	10	50	50	50
Total energia (kcal/kg)	3811	5000	5000	5000

Legenda: [a] Mix de minerais e vitaminas estão de acordo com as recomendações da AIN-93M. Grupos *standard-chow* (SC); hiperlipídico-banha (HL-B); hiperlipídico-banha mais óleo de peixe (HL-B+Px) e hiperlipídico-óleo de peixe (HL-Px).

3.2 **Massa corporal e ingestão alimentar**

A massa corporal foi aferida semanalmente em balança de precisão 0,1 g (Marte A-1500).

A ingestão alimentar média dos animais (em gramatura), representada pela diferença entre o que foi ofertado e o que sobrou na gaiola após 24 horas, foi aferida diariamente. A ingestão energética média foi obtida através da ingestão em gramatura multiplicada pelo valor energético da respectiva dieta (em kcal).

3.3 **Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)**

O TOTG foi realizado na última semana de experimento. Para isso, os animais ficaram em jejum durante seis horas e depois foi administrada, por gavagem orogástrica, solução contendo glicose (25% em solução salina estéril – 0,9% NaCl) na dosagem de 1 g/kg. O sangue dos animais foi coletado por ordenha da veia caudal nos tempos zero, 15, 30, 60 e 120 minutos depois da sobrecarga de glicose, com o auxílio de um glicosímetro (Accu-Chek, Roche, SP, Brasil). A área sob a curva (ASC) foi calculada, em unidades arbitrárias (u.a.) usando a ferramenta trapezoidal do programa GraphPad Prisma versão 6.05 para Windows (GraphPad *Software*, San Diego, CA, EUA).

3.4 **Calorimetria indireta e quociente alimentar**

Na última semana de experimento, o quociente respiratório (QR) e o gasto energético (GE) foram medidos utilizando-se o sistema Oxylet (Panlab/Harvard, Barcelona, Espanha). O sistema avalia o metabolismo respiratório por meio da calorimetria indireta, medindo o consumo de oxigênio (VO_2) e o dispêndio de gás carbônico (VCO_2). Os dados foram coletados em um período de 48 horas e as médias foram calculadas para todo o período do teste. Durante todo o procedimento,

os animais tiverem livre acesso à água e à ração. Os dados de aclimatação foram excluídos das análises.

O quociente alimentar (QA) foi calculado usando a equação: (0,835 * % proteína da dieta) + (1,000 * % carboidrato da dieta) + (0,710 * % gordura da dieta) (Livesey e Elia, 1988).

3.5 **Sacrifício**

Ao final da oitava semana de experimento, os animais foram deixados em jejum alimentar por seis horas, tiveram a glicemia aferida pela veia caudal e, logo após, receberam por via intraperitoneal administração de heparina sódica (0,03 ml), seguida por sobredose de pentobarbital sódico (150 mg/kg). Os animais profundamente anestesiados foram colocados em decúbito dorsal e sua cavidade torácica foi exposta. O sangue foi coletado por punção cardíaca e o plasma foi separado por centrifugação (120 g por 15 minutos) em temperatura ambiente e imediatamente estocado em freezer a -80º C para posteriores analises.

O TAM interescapular e o TAB epididimário (depósito de gordura da parte baixa do abdômen, conectada aos epidídimos), retroperitoneal (ligado à parede abdominal posterior perto dos rins e à porção abdominal dos ureteres) e inguinal (localizada entre a parte inferior da caixa torácica e o meio da coxa) foram cuidadosamente dissecados, pesados e armazenados em freezer a -80º C para posteriores análises de biologia celular. Alternativamente, amostras de TAM interescapular e TAB epididimário foram armazenadas em solução de fixação (4% formaldeído p/v, 0,1 M tampão fosfato, pH 7,2) para posteriores análises de microscopia de luz e confocal.

3.6 **Índice de adiposidade**

O índice de adiposidade foi determinado como a razão entre o somatório dos três compartimentos de TAB (epididimário, retroperitoneal e inguinal) dividido pela massa corporal, apresentado como percentual.

3.7 **Análises plasmáticas**

As concentrações plasmáticas de leptina e insulina foram mensuradas através de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando kit SinglePlex EZML-82K e EZRMI-13K, respectivamente (Millipore, Billerica, MA, EUA).

Os triglicerídeos plasmáticos foram determinados através de espectofotômetro automatizado (Bioclin System II, Quibasa Ltda., Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil).

O cálculo do HOMA-IR ("*homeostasis model assessment-insulin resistance*") foi realizado com a glicemia de jejum multiplicada pelo nível de insulina, dividido por 22,5 (Matthews *et al.*, 1985).

3.8 **Microscopia de luz e confocal**

O TAM interescapular fixado foi incorporado em Paraplast (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), seccionado em 5 µm e corado com hematoxilina e eosina. Imagens digitais foram capturadas em microscópio de luz (microscópio Nikon eclipse T5100, Nikon eclipse 90i, Nikon *Instruments*, Inc., NY, EUA; formato TIFF, cor de 36 bits, 1280 × 1024 pixels)

Para marcação de UCP1 por imunofluorescência, secções desparafinizadas e hidratadas de tecido (5 µm) foram tratadas com tampão citrato (pH 6,0, a 60º C por 20 minutos) para recuperação antigênica e, então, com glicina 2% e tampão de bloqueio (tampão fosfato (PBS)/5% albumina sérica bovina (BSA)). As secções

foram incubadas *overnight* a 4º C com anticorpo anti-UCP1 (SC-6529; Santa Cruz *Biotechnology*), na diluição 1:50 em PBS/1%BSA e, em seguida, foram incubadas por 1 hora, em temperatura ambiente, com anticorpo secundário conjugado com fluorocromo anti-*goat* IgG-Alexa 488 (Invitrogen, CA, EUA), na diluição 1:50 em PBS/1%BSA. Depois de lavagem com PBS, os cortes foram tratados com *SlowFade Antifade* (Invitrogen, CA, EUA). Imagens digitais imunofluorescentes foram obtidas utilizando-se microscopia confocal (Microscópio Confocal de Varredura a Laser – Modelo C2; Nikon *Instruments*, Inc., NY, EUA).

3.9 **Morfometria de adipócitos**

O TAB epididimário fixado foi incorporado em Paraplast (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), seccionado em 5 µm e corado com hematoxilina e eosina. Dez campos microscópicos não consecutivos foram analisados por animal usando um microscópio de luz (Olympus BX51, Olympus America Inc., Miami, EUA) e imagens digitais foram capturadas (formato TIFF, cor de 36 bits, 1280 × 1024 pixels). Foram medidos pelo menos 50 adipócitos por animal para calcular o diâmetro médio (Imagem Pro *software* versão 7.01, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). A densidade numérica por área (Qa[adipócitos]) foi avaliada pela contagem do número de adipócitos que não tocavam duas linhas consecutivas (linhas proibidas) num quadro de área conhecida (Barbosa-da-Silva *et al.*, 2012). O sistema-teste foi construído pelo *software* STEPanizer (www.stepanizer.com) (Tschanz *et al.*, 2011).

3.10 **RT-PCR em tempo real**

Parte do TAM interescapular (50 mg) e do TAB epididimário (50 mg) tiveram seu RNA total extraídos utilizando 700 µl de Trizol (Invitrogen, CA, EUA). Em seguida, adicionaram-se 100 µL de clorofórmio, seguido de centrifugação (11200 rpm, durante 10 minutos a 4° C), o que resultou no aparecimento de quatro fases, das quais se retirou o sobrenadante da fase aquosa, que correspondia ao RNA. A

esse, adicionaram-se 250 µL de isopropanol para precipitação do RNA, com posterior centrifugação (11200 rpm, durante 10 minutos a 4 °C) e formação de um precipitado de RNA. Então, retirou-se totalmente o isopropanol, ressuspendendo com 500 µL de etanol 75% e seguido de centrifugação (11200 rpm, durante cinco minutos a 4° C). O etanol foi totalmente retirado e o pellet ressuspendido em 10 µL de água deionizada (MilliQ).

A concentração de RNA foi determinada através de espectroscopia utilizando o equipamento Nanovue (GE Life Sciences). Apenas 1 µg de RNA foi separado e acrescentado de DNAse I (Invitrogen, CA, EUA). O cDNA foi sintetizado utilizando primers Oligo (dT) para RNAm e kit Superscript III (Invitrogen, CA, EUA). O PCR em tempo real foi realizado utilizando o termociclador BioRad CFX96 (BioRad, Hercules, CA, EUA) e mix SYBR Green (Invitrogen, CA, EUA).

Os primers foram gerados utilizando o software online Primer3, e estão indicados na Tabela 2. A β-actina foi utilizada como controle endógeno para corrigir a expressão dos genes-alvo.

No TAM foram avaliados os seguintes primers: RA-β3, PGC1α, UCP1, PPAR*α*, PPARβ/δ, PPAR*γ*, CD36 e CPT-1.

No TAB foram avaliados os seguintes primers: PPAR*α*, PPARβ/δ, PPARγ, CD36, aP2, FAS e CPT-1.

A eficiência da corrida dos genes-alvo e dos genes endógenos foram aproximadamente iguais, sendo calculada através de diluições em série do cDNA. As reações de amplificação seguiram as seguintes condições: pré-desnaturação e ativação da polimerase (4 minutos a 95° C), seguido de 44 ciclos, cada um consistindo em 95° C durante 10 segundos e 60º C durante 15 segundos, e depois por uma curva de melting (60 a 95º C, com taxa de aquecimento de 0,1º C/segundo). Os controles negativos consistiram de poços em que cDNA foi substituído por água deionizada. A razão de expressão relativa de RNAm foi calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, em que ΔCT expressa a diferença entre o número de ciclos dos genes-alvo e dos controles endógenos (Bustin *et al.*, 2009).

Tabela 2 - Primers de RT-qPCR e respectivas sequências

Primer	Sentido 5'-3'	Anti-sentido
aP2	TGGAAGCTTGTCTCCAGTGA	AATCCCCATTTACGCTGATG
β-actina	CTCCGGCATGTGCAA	CCCACCATCACACCCT
CD36	TGCATTTGCCAATGTCTAGC	CCCTCCAGAATCCAGACAAC
CPT-1	AAGGAATGCAGGTCCACATC	CCAGGCTACAGTGGGACATT
FAS	CACCCACTGGAAGCTGGTAT	TCGAGGAAGGCACTACACCT
PGC1α	GTGTGAGGAGGGTCATCGTT	GTCAACAGCAAAAGCCACAA
PPARα	TCGGACTCGGTCTTCTTGAT	TCTTCCCAAAGCTCCTTCAA
PPARβ/δ	GGTTGACCTGCAGAYGGAAT	TGGAGCTCGATGACAGTGAC
PPARγ2	ACGATCTGCCTGAGGTCTGT	CATCGAGGACATCCAAGACA
RA-β3	AAGGAGACGGAGGAGGAGAG	ACAGGAATGCCACTCCAATC
UCP1	TCTCAGCCGGCTTAATGACT	TGCATTCTGACCTTCACGAC

Legenda: *Adipocyte protein* 2, aP2; Cluster de diferenciação 36, CD36; Carnitina palmitoil transferase-1 (CPT-1); Ácido graxo sintase, FAS; Coativador 1 alfa do receptor ativador de proliferação peroxissomal gama (PCG1α); Receptor ativador de proliferação peroxissomal alfa (PPARα); Receptor ativador de proliferação peroxissomal beta/delta (PPARβ/δ); Receptor ativador de proliferação peroxissomal gama (PPARγ); Receptor adrenérgico beta 3, RA-β3; Proteína desacopladora de elétrons 1 (UCP1).

3.11 ***Western blot***

Os depósitos de TAM interescapular (50 mg) e TAB epididimário (100 mg) foram adicionados ao tampão de lise RIPA (radioimunoprecipitação) com inibidor de protease, homogeneizados e centrifugados (10000 g durante 30 minutos a 4º C) para posterior quantificação das concentrações proteicas (Pierce BCA *Protein Assay* Kit, ThermoScientific). Após desnaturação (cinco minutos a 100° C), quantidades iguais de proteínas (~20-80 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas do gel para uma membrana de PVDF (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) por eletrotransferência. A membrana foi então bloqueada por incubação em 5% (p/v) de leite em pó desnatado, diluído em tampão salina com Tris (TBS-T [20 mmol/L de Tris/HCl (pH 7,4) e 500 mmol/L de NaCl]) em temperatura ambiente, durante uma hora para evitar ligações inespecíficas. Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo primário *overnight*, a 4° C.

No TAM foram avaliadas as seguintes proteínas: RA-β3 (44 kDa; SC-1473; Santa Cruz *Biotechnology*), PGC1α (91 kDa; SC-5816; Santa Cruz *Biotechnology*), UCP1 (33 kDa; SC-6529; Santa Cruz *Biotechnology*), PPAR*α* (52 kDa; SC-9000; Santa Cruz *Biotechnology*), PPAR*γ* (67 kDa; SC-7273; Santa Cruz *Biotechnology*), TC10 (24 kDa; T 8950; Sigma) e GLUT-4 (55 kDa; 07-1404; Millipore).

No TAB foram avaliadas as seguintes proteínas: PPAR*α* (52 kDa; SC-9000; Santa Cruz *Biotechnology*) e PPAR*γ* (67 kDa; SC-7273; Santa Cruz *Biotechnology*).

No dia seguinte, a membrana foi incubada com anticorpo secundário específico para sua origem. A reação foi revelada por quimioluminescência e as imagens obtidas com o sistema ChemiDoc (BioRad, Hercules, CA, EUA). A intensidade das bandas foi quantificada usando o *software* ImageJ (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://imagej.nih.gov/ij/, 1997-2014). A β-actina (SC-81178, Santa Cruz *Biotechnology*) foi utilizada como fator de correção.

3.12 **Análise estatística**

Os dados foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade das variâncias e são apresentados como media ± desvio padrão da média. As diferenças entre os grupos foram testadas pela análise de variância (ANOVA) de um fator, seguida pelo pós-teste de Holm-Sidak, considerando estatisticamente significante $P \leq 0{,}05$. A estatística foi realizada com auxilio do programa GraphPad Prisma (GraphPad *Software*, versão 6.05 para Windows, LaJolla, CA, EUA) que também foi utilizado para confecção dos gráficos.

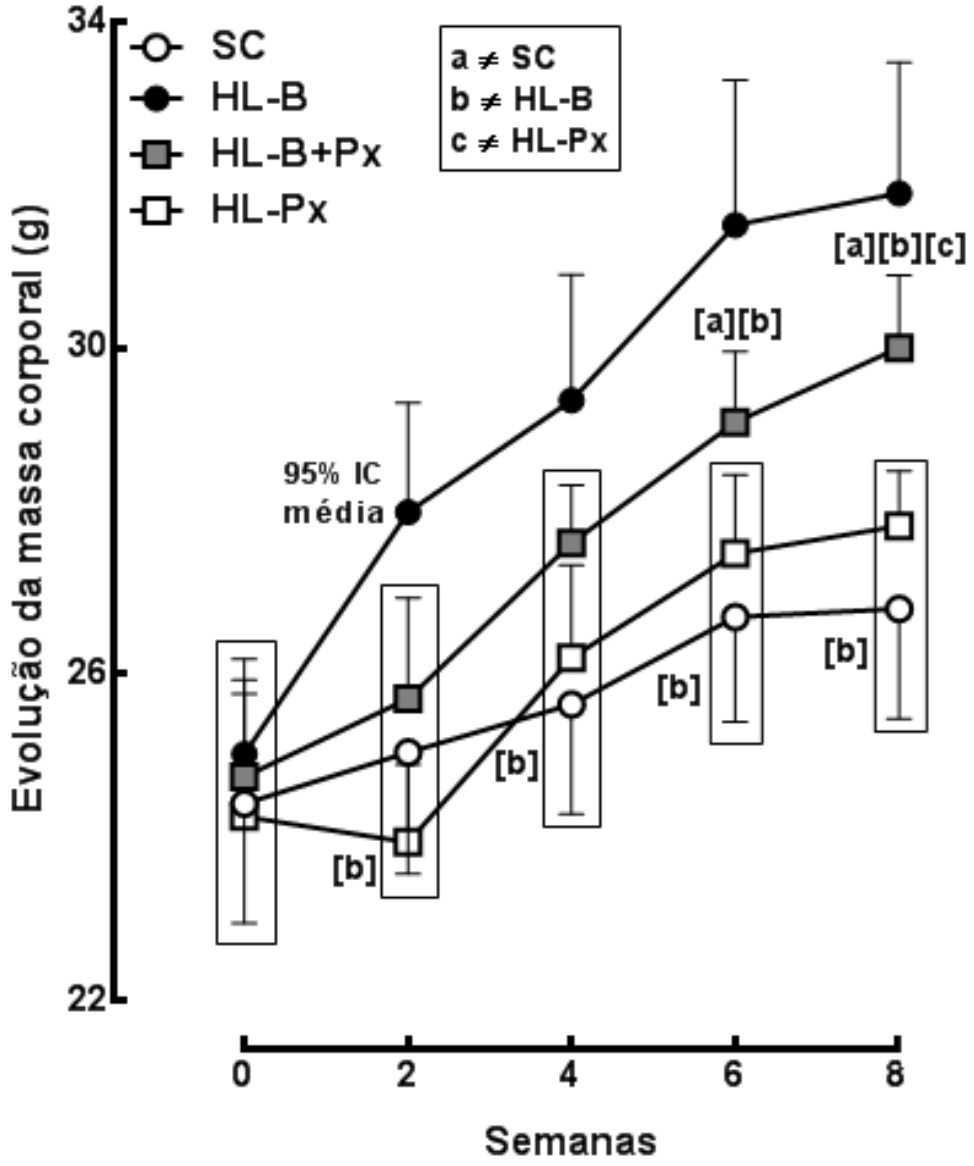
4 **RESULTADOS**

4.1 **Massa corporal e ingestão alimentar**

Todos os animais iniciaram o experimento com massa corporal similar. Após duas semanas de dieta, o grupo HL-B se mostrou mais pesado que os outros três grupos (+25%, *P*=0,0057, comparado com o grupo SC) e essa diferença perdurou até o final do experimento (+19%, *P*<0,0001, comparado com o grupo SC). Após as oito semanas, o grupo HL-B+Px demonstrou maior massa corporal do que o grupo SC (+12%, *P*=0,0003) e menor massa corporal do que o grupo HL-B (-6%, *P*=0,0222), permanecendo, portanto, em posição intermediária. O grupo HL-Px permaneceu similar ao grupo SC durante todo o experimento. A evolução da massa corporal pode ser vista na Figura 7.

Os quatro grupos experimentais apresentaram ingestão alimentar similar (Tabela 3). Considerando que os grupos HL ingeriram dietas hiperenergéticas, esses animais apresentaram elevada ingestão energética quando comparados com o grupo SC (+26%, *P*=0,0005, para o grupo HL-B; +31%, *P*<0,0001, para o grupo HL-B+Px; +34%, *P*<0,0001, para o grupo HL-Px). Não houve diferença na ingestão energética entre os três grupos que receberam dieta HL.

Figura 7 - Evolução da massa corporal

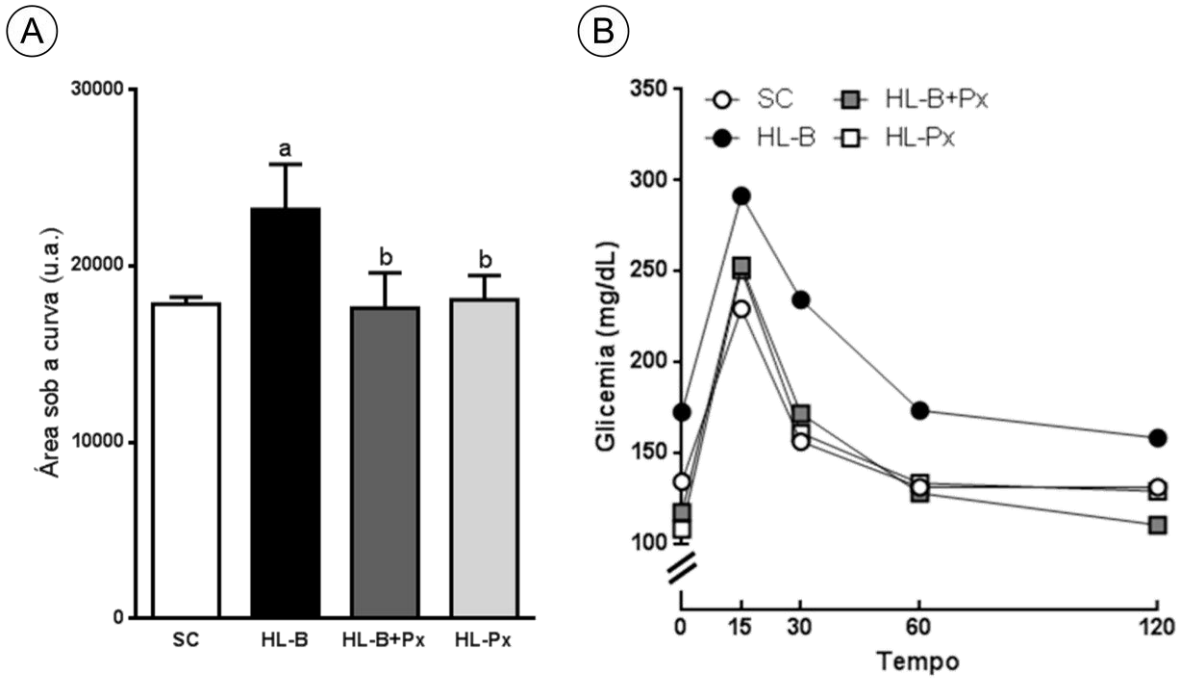


Legenda: Grupos *standard-chow* (SC); hiperlipídico-banha (HL-B); hiperlipídico-banha mais óleo de peixe (HL-B+Px) e hiperlipídico-óleo de peixe (HL-Px). Dados apresentados como média ± 95% intervalo de confiança (n=10 por grupo). Nível de significância adotado $P \leq 0,05$, sendo [a] ≠ SC; [b] ≠ HL-B e [c] ≠ HL-Px (*one-way* ANOVA, com pós-teste de Holm-Sidak).

4.2 **Teste oral de tolerância a glicose**

O grupo HL-B foi o único que apresentou aumento na área sob a curva no TOTG, sendo 30% maior que o grupo SC (*P*<0,0001). Os grupos HL-B+Px e HL-Px tiveram áreas sob a curva similares ao grupo SC (Figura 8).

Figura 8 - Teste oral de tolerância à glicose



Legenda: Área sob a curva (A) e evolução da glicemia (B). Grupos *standard-chow* (SC); hiperlipídico-banha (HL-B); hiperlipídico-banha mais óleo de peixe (HL-B+Px) e hiperlipídico-óleo de peixe (HL-Px). Dados apresentados como média ± desvio padrão da média (n=5 por grupo). Nível de significância adotado *P*≤0,05, sendo [a] ≠ SC e [b] ≠ HL-B (*one-way* ANOVA, com pós-teste de Holm-Sidak).

4.3 **Calorimetria indireta e quociente alimentar**

Como esperado, os três grupos HL tiveram QR reduzido, comparados com o grupo SC: -9%, *P*=0,0297, para o grupo HL-B; -10%, *P*=0,0240, para o grupo HL-B+Px; e -12%, *P*=0,0105, para o grupo HL-Px. Não houve diferença entre esses três grupos, como demonstrado na Tabela 3.

O QA calculado foi igual a 0,95 para a dieta SC e 0,83 para as dietas HL.

Em relação ao GE, que também pode ser observado na Tabela 3, os animais do grupo HL-B demonstraram valores reduzidos em comparação ao grupo SC (-10%, *P*=0,0005). Por outro lado, o grupo HL-B+Px demonstrou resultados similares ao grupo SC e o grupo HL-Px demonstrou valores elevados em comparação ao grupo SC (+6%, *P*=0,0183).

4.4 **Adiposidade**

A gordura epididimária e o índice de adiposidade, demonstrados na Tabela 4, estavam elevados no grupo HL-B (+81%, *P*<0,0001 e +73%, *P*<0,0001; respectivamente), em comparação com o grupo SC. Assim como visto na massa corporal, o grupo HL-B+Px apresentou índices maiores que os do grupo SC (+43%, *P*=0,0026 e +39%, *P*=0,0186; respectivamente), mas menores que os do grupo HL-B (-21%, *P*=0,0059 e -19%, *P*=0,0276; respectivamente). Por outro lado, o grupo HL-Px foi similar ao grupo SC nos dois parâmetros.

Tabela 3 - Comportamento alimentar e gasto energético

Dados	Grupos			
	SC	HL-B	HL-B+Px	HL-Px
Comportamento alimentar				
Ingestão alimentar (g)	2,97 ± 0,11	2,87 ± 0,20	2,97 ± 0,31	3,02 ± 0,38
Ingestão energetica (kcal)	11,31 ± 0,41	14,28 ± 0,99[a]	14,87 ± 1,55[a]	15,11 ± 1,92[a]
QR	0,95 ± 0,04	0,86 ± 0,05[a]	0,85 ± 0,04[a]	0,83 ± 0,03[a]
QA	0,95	0,83	0,83	0,83
Gasto energético				
GE (kcal/dia/kg^{0,75})	195,70 ± 1,48	176,20 ± 8,95[a]	197,30 ± 4,20[b]	207,50 ± 2,58[a,b,c]

Legenda: Quociente respiratório, QR; Quociente alimentar, QA; Gasto energético, GE. Grupos *standard-chow* (SC); hiperlipídico-banha (HL-B); hiperlipídico-banha mais óleo de peixe (HL-B+Px) e hiperlipídico-óleo de peixe (HL-Px). Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão da média (n = 5 por grupo). $P \leq 0,05$ quando comparado com os grupos SC [a], HL-B [b] e HL-B+Px [c] (*one-way* ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak).

4.5 **Análises plasmáticas**

A leptina plasmática estava elevada no grupo HL-B, comparada com o grupo SC (*P*<0,0001). O óleo de peixe foi capaz de normalizar esse parâmetro nos grupos HL-B+Px e HL-Px, que foram similares ao grupo SC (Tabela 4).

O triglicerídeo plasmático (Tabela 4) estava elevado no grupo HL-B (+11%, *P*=0,0163) e regularizado nos grupos HL-B+Px e HL-Px, comparado com o grupo SC.

O grupo HL-B apresentou aumento da glicemia de jejum (+18%, *P*=0,0130) e da insulina plasmática (+209%, *P*=0,0013), o que resultou em elevação do HOMA-IR (+227%, *P*=0,0103), comparado com o grupo SC. Por outro lado, os grupos HL-B+Px e HL-Px apresentaram normalização desses parâmetros (Tabela 4).

Tabela 4 - Adiposidade e análises plasmáticas

Dados	Grupos			
	SC	HL-B	HL-B+Px	HL-Px
Adiposidade				
Gordura epididimária (g)	0,30 ± 0,03	0,54 ± 0,11[a]	0,43 ± 0,04[a,b]	0,25 ± 0,05[b,c]
Índice de adiposidade (%)	1,92 ± 0,07	3,34 ± 0,73[a]	2,69 ± 0,60[a,b]	1,43 ± 0,22[b,c]
Análises plasmáticas				
Leptina (pg/mL)	1063,00 ± 355,80	18357,00 ± 2281,00[a]	4291,00 ± 1761,00[b]	1560,00 ± 283,70[b]
Triglicerídeos (mg/dL)	71,50 ± 3,60	79,21 ± 3,69[a]	72,22 ± 3,96[b]	68,22 ± 3,27[b]
Glicemia de jejum (mg/dL)	145,50 ± 11,20	172,00 ± 21,61[a]	123,00 ± 28,85[a,b]	111,30 ± 13,60[a,b]
Insulina (pg/ mL)	640,30 ± 341,40	1979,00 ± 373,50[a]	1077,00 ± 394,70[b]	1139,00 ± 423,90[b]
HOMA-IR	5,64 ± 3,81	18,46 ± 7,15[a]	8,49 ± 3,33[b]	8,02 ± 3,49[b]

Legenda: *Homeostasis model assessment-insulin resistance*, HOMA-IR. Grupos *standard-chow* (SC); hiperlipídico-banha (HL-B); hiperlipídico-banha mais óleo de peixe (HL-B+Px) e hiperlipídico-óleo de peixe (HL-Px). Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão da média (n = 5 por grupo). $P \leq 0,05$ quando comparado com os grupos SC [a], HL-B [b] e HL-B+Px [c] (*one-way* ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak).

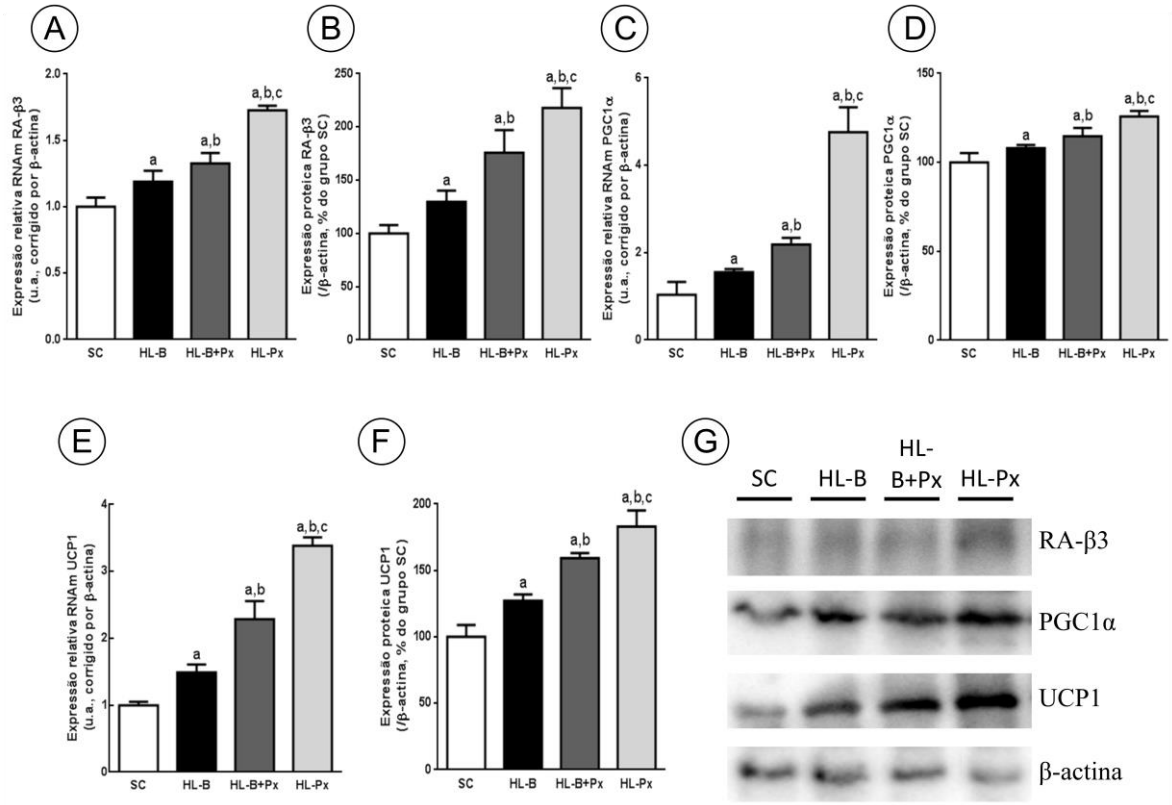
4.6 **Tecido adiposo marrom**

4.6.1 Expressão gênica e proteica de marcadores termogênicos

Com relação à expressão gênica de RA-β3, PGC1α e UCP1, os grupos HL-B (+19%, *P*=0,0067; +50%, *P*=0,0489; +49%, *P*=0,0015; respectivamente), HL-B+Px (+33%, *P*<0,0001; +111%, *P*=0,0012; +129%, *P*<0,0001; respectivamente) e HL-Px (+73%, *P*<0,0001; +359, *P*<0,0001; +239%, *P*<0,0001; respectivamente) estavam elevados em comparação ao grupo SC. Além disso, o grupo HL-B+Px estava aumentado comparado com o grupo HL-B (+12%, *P*=0,0209; +41%, *P*=0,0398; +53%, *P*<0,0001; respectivamente) e o grupo HL-Px também estava elevado em comparação com o grupo HL-B (+45%, *P*<0,0001; +206%, *P*<0,0001; +127%, *P*<0,0001) e em comparação ao grupo HL-B+Px (+30%, *P*<0,0001; +118%, *P*<0,0001; +48%, *P*<0,0001) para todas as três análises (Figura 9 A, C e E).

A expressão proteica de RA-β3, PGC1α e UCP1 estava levemente aumentada no grupo HL-B (+30%, *P*=0,0347; +8%, *P*=0,0286; +27%, *P*=0,0080; respectivamente), comparada com o grupo SC. Em contrapartida, tais expressões estavam bastante elevadas no grupo HL-B+Px (+76%, *P*=0,0003; +15%, *P*=0,0008; +59%, *P*<0,0001; respectivamente) e ainda mais elevadas no grupo HL-Px (+118%, *P*<0,0001; +26%, *P*<0,0001; +83%, *P*<0,0001; respectivamente), comparadas com o grupo SC. A resposta das proteínas termogênicas à ingestão de óleo de peixe, assim como a resposta gênica, se comportou de forma dependente da dose, como observado na Figura 9 B, D, F e G.

Figura 9 - Marcadores termogênicos no TAM



Legenda: Expressão gênica e proteica do receptor adrenérgico beta 3 (RA-β3 - A, B), coativador 1 alfa do receptor ativador de proliferação peroxissomal gama (PGC1α - C, D), proteína desacopladora de elétrons 1 (UCP1 – E, F), e bandas representativas (G). Grupos *standard-chow* (SC); hiperlipídico-banha (HL-B); hiperlipídico-banha mais óleo de peixe (HL-B+Px) e hiperlipídico-óleo de peixe (HL-Px). Dados apresentados como média ± desvio padrão da média (n=5 por grupo). Nível de significância adotado $P \leq 0,05$, sendo [a] ≠ SC; [b] ≠ HL-B e [c] ≠ HL-B+Px (*one-way* ANOVA, com pós-teste de Holm-Sidak).

4.6.2 Microscopia de luz e confocal

As imagens do TAM obtidas por microscopia de luz indicam tecido preservado nos grupo SC e HL-Px. Em sentido oposto, o grupo HL-B apresenta elevada deposição de gordura nos adipócitos, que foi ligeiramente reduzida no grupo HL-B+Px (Figura 10 A-D).

Em relação à microscopia confocal, as fotomicrografias do grupo HL-B revelaram uma marcação para UCP1 mais intensa que as do grupo SC. Os grupos com óleo de peixe apresentaram marcação ainda mais intensa quando comparados com os grupos SC e HL-B. Finalmente, a intensidade da marcação revelou uma resposta dose-dependente do óleo de peixe (como já observado pelas análises de expressão gênica e proteica de UCP1), ou seja, a marcação no grupo HL-Px foi mais intensa que no grupo HL-B+Px. Fotomicrografias representativas dos quatro grupos podem ser observadas na Figura 10 A'-D'.

4.6.3 Expressão gênica e proteica de PPAR

A expressão gênica de PPARβ/δ estava diminuída no grupo HL-B em comparação com o grupo SC (-76%, P=0,0399). A resposta observada nos grupos que receberam óleo de peixe foi dose-dependente: o grupo HL-B+Px foi 66% maior para PPARα (P=0,0394), 82% maior para PPARβ/δ (P=0,0399) e 109% maior para PPARγ (P=0,0104) e o grupo HL-Px foi 413% maior para PPARα (P<0,0001), 227% maior para PPARβ/δ (P<0,0001) e 284% maior para PPARγ (P<0,0001), em comparação ao grupo SC (Figura 11 A, C e D).

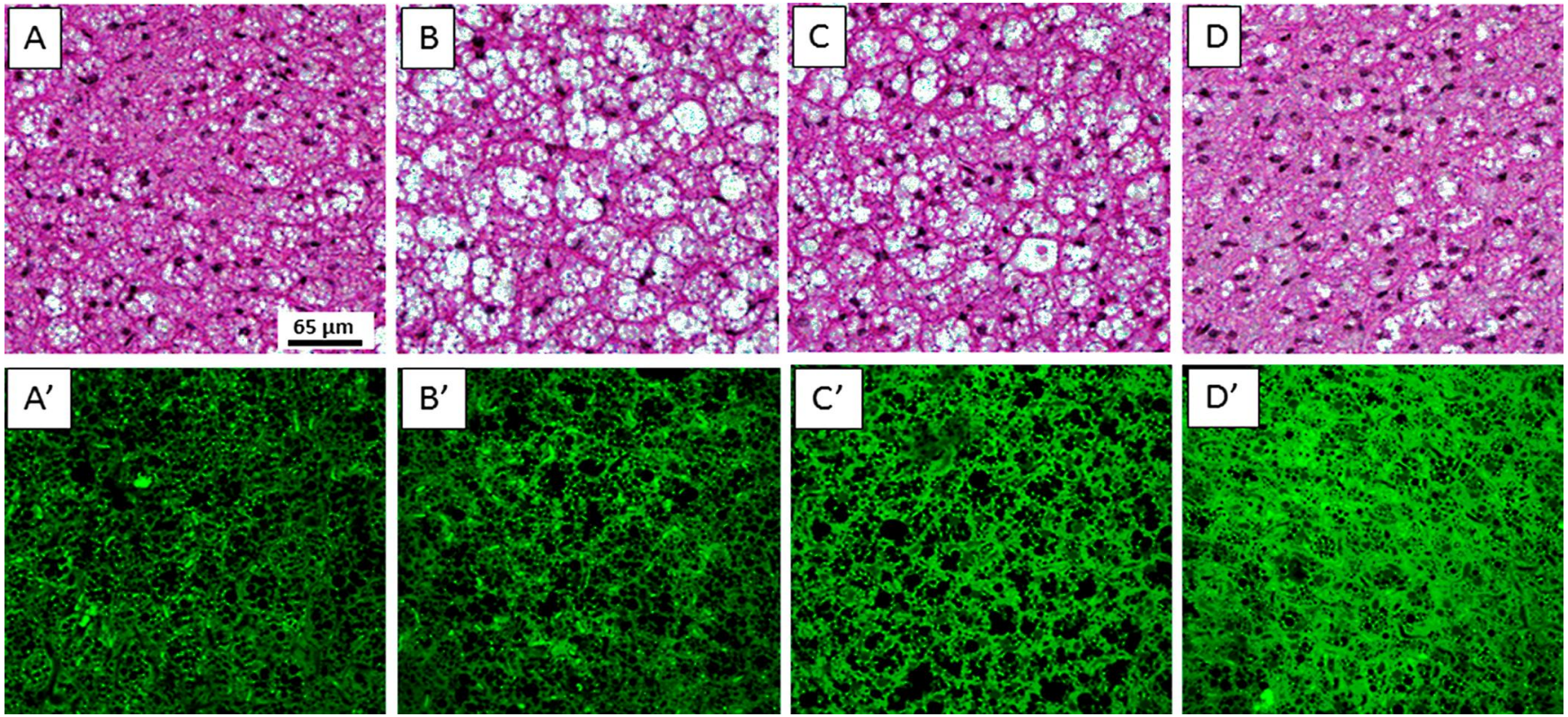
A expressão proteica de PPARα e PPARγ foi diminuída no grupo HL-B (-21%, P=0,0459; -16%, P=0,0458; respectivamente) e aumentada nos outros dois grupos HL, como demonstrado na Figura 11 B, E e F. De forma interessante, mais uma vez, a resposta dessas proteínas nos dois grupos com óleo de peixe foi dose-dependente e, consequentemente, o grupo HL-B+Px foi 24% maior para PPARα (P=0,0459) e 29% maior para PPARγ (P=0,0021) e o grupo HL-Px foi 47% maior para PPARα (P=0,0009) e 100% maior para PPARγ (P<0,0001), em comparação ao grupo SC.

4.6.4 Expressão gênica da captação e oxidação de ácidos graxos

A expressão gênica de CD36 se mostrou elevada nos três grupos HL, comparada com o grupo SC: +72%, para o grupo HL-B; +70%, para o grupo HL-B+Px; e +72%, para o grupo HL-Px; *P*=0,0343 para as três análises. Não houve diferença entre esses três grupos (Figura 12 A).

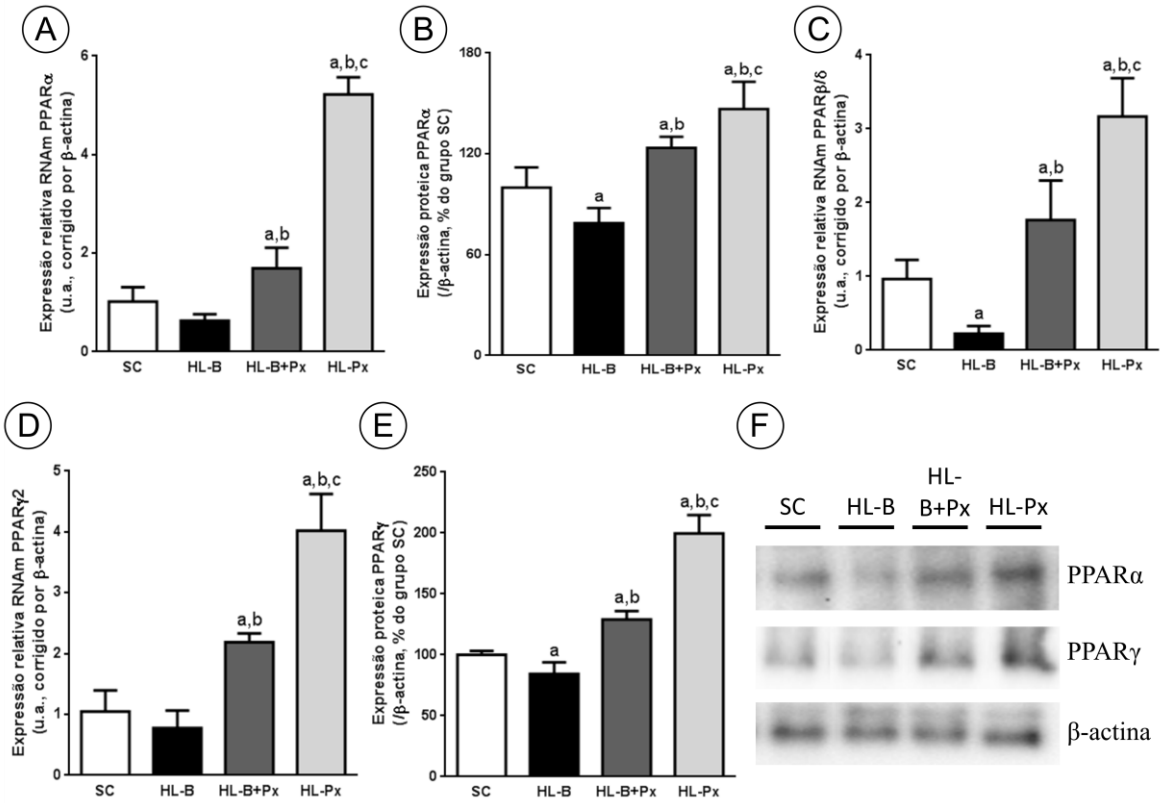
Por outro lado, a expressão gênica de CPT-1 estava reduzida no grupo HL-B (-28%, *P*=0,0015) e elevada nos grupos HL-B+Px (+28%, *P*=0,0019) e HL-Px (+22%, *P*=0,0060), em comparação ao grupo SC. Esses resultados podem ser observados na Figura 12 B.

Figura 10 - Microscopia de luz e confocal no TAM



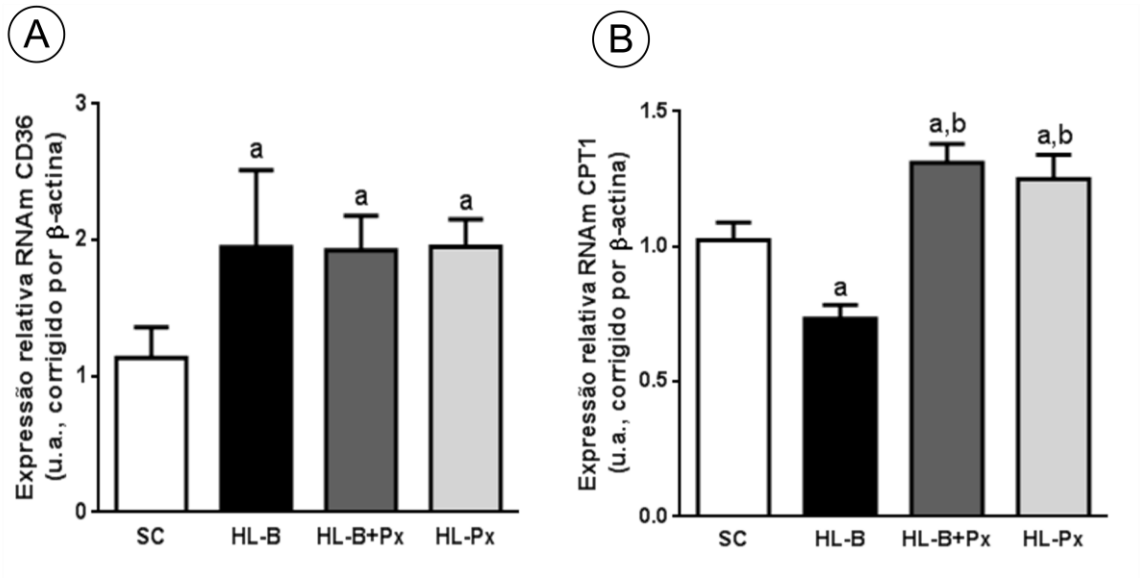
Legenda: Fotomicrografias obtidas por microscopia de luz e coradas com hematoxilina e eosina (A-D) e microscopia confocal, com marcação para proteína desacopladora de elétrons 1 (UCP1; A'-D') do tecido adiposo marrom, com a mesma ampliação. As fotomicrografias do grupo SC (A e A') demonstram histoarquitetura preservada com adipócitos multiloculares e expressão de UCP1. Já o grupo HL-B (B e B'), apresenta adipócitos com elevada deposição de gordura e aumento na expressão de UCP1. O grupo HL-B+Px (C e C') mostra deposição levemente aumentada de gordura nos adipócitos e expressão ainda mais aumentada de UCP1. Por último, o grupo HL-Px (D e D') demonstra reduzidas gotículas de gordura nas células e a maior expressão de UCP1 dentre os grupos.

Figura 11 - PPAR no TAM



Legenda: Expressão gênica e proteica do receptor ativador de proliferação peroxissomal alfa (PPARα - A, B), receptor ativador de proliferação peroxissomal beta/delta (PPARβ/δ - C), receptor ativador de proliferação peroxissomal gama (PPARγ – D, E), e bandas representativas (F). Grupos *standard-chow* (SC); hiperlipídico-banha (HL-B); hiperlipídico-banha mais óleo de peixe (HL-B+Px) e hiperlipídico-óleo de peixe (HL-Px). Dados apresentados como média ± desvio padrão da média (n=5 por grupo). Nível de significância adotado $P \leq 0,05$, sendo [a] ≠ SC; [b] ≠ HL-B e [c] ≠ HL-B+Px (*one-way* ANOVA, com pós-teste de Holm-Sidak).

Figura 12 - Captação e oxidação de ácidos graxos no TAM

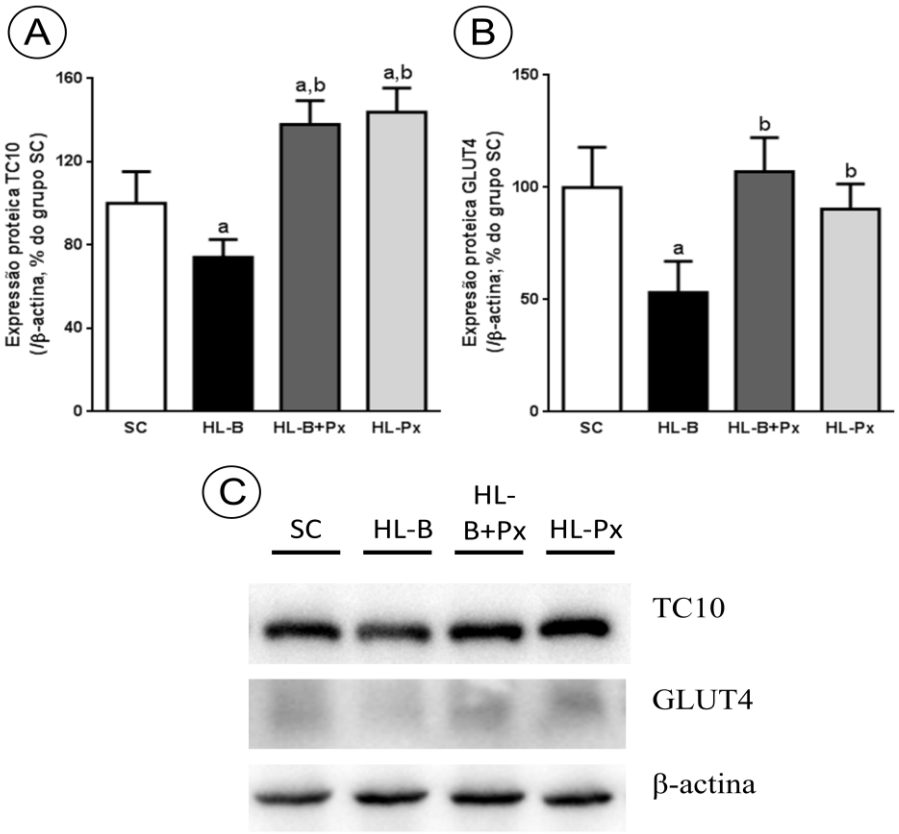


Legenda: Expressão gênica do cluster de diferenciação 36 (CD36 - A) e da carnitina palmitoil transferase-1 (CPT-1 - B). Grupos *standard-chow* (SC); hiperlipídico-banha (HL-B); hiperlipídico-banha mais óleo de peixe (HL-B+Px) e hiperlipídico-óleo de peixe (HL-Px). Dados apresentados como média ± desvio padrão da média (n=5 por grupo). Nível de significância adotado $P \leq 0,05$, sendo [a] ≠ SC; [b] ≠ HL-B e [c] ≠ HL-B+Px (*one-way* ANOVA, com pós-teste de Holm-Sidak).

4.6.5 Expressão proteica da captação de glicose

Em relação à TC10 e GLUT-4, o grupo HL-B apresentou expressão proteica diminuída, comparado com o grupo SC (-26%, *P*=0,0469; -47%, *P*=0,0065; respectivamente). Os grupos HL-B+Px e HL-Px apresentaram elevada expressão proteica de TC 10 (+38%, *P*=0,0057; +44%, *P*=0,0028; respectivamente), mas expressão proteica de GLUT-4 similar à do grupo SC. Esses resultados podem ser visualizados na Figura 13.

Figura 13 - Captação de glicose no TAM



Legenda: Expressão proteica de TC10 (A), transportador de glicose-4 (GLUT-4 - B), e bandas representativas (C). Grupos *standard-chow* (SC); hiperlipídico-banha (HL-B); hiperlipídico-banha+óleo de peixe (HL-B+Px) e hiperlipídico-óleo de peixe (HL-Px). Dados apresentados como média ± desvio padrão da média (n=5 por grupo). Nível de significância adotado $P \leq 0,05$, sendo [a] ≠ SC; [b] ≠ HL-B e [c] ≠ HL-B+Px (*one-way* ANOVA, com pós-teste de Holm-Sidak).

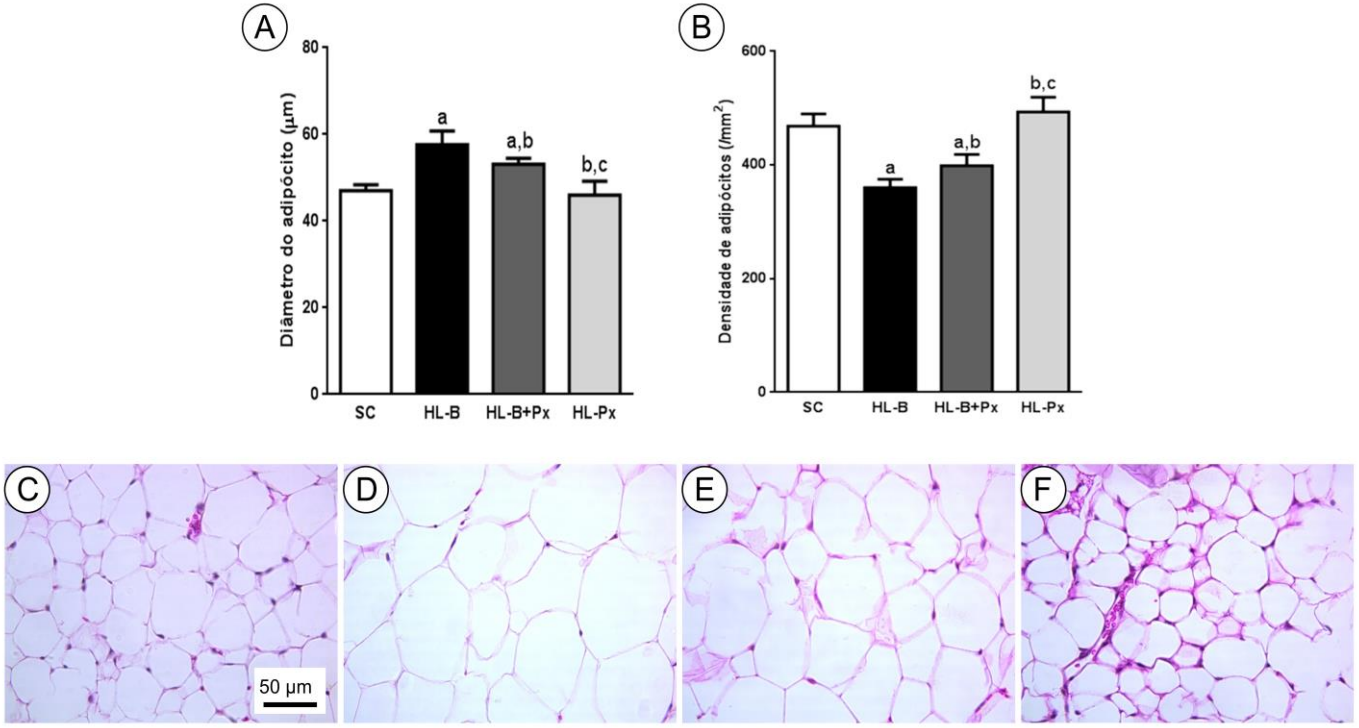
4.7 **Tecido adiposo branco**

4.7.1 Morfometria de adipócitos

O diâmetro de adipócitos (Figura 14 A) estava 23% maior no grupo HL-B (*P*=0,0002), quando comparado ao grupo SC. Corroborando com os resultados anteriores, o grupo HL-B+Px permaneceu elevado (+13%, *P*=0,0132) enquanto o grupo HL-Px permaneceu similar ao grupo SC. Fotomicrografias representativas de cada grupo podem ser vistas na Figura 14 C-F.

Resultados opostos foram vistos na densidade de adipócitos em que o grupo HL-B estava reduzido (-23%, *P*<0,0001) em relação ao grupo SC; o grupo HL-B+Px estava reduzido em relação ao grupo SC (-15%, *P*=0,0015) e elevado em relação ao grupo HL-Px (+11%, *P*=0,0446); e o grupo HL-Px estava similar ao grupo SC (Figura 14 B).

Figura 14 - Morfometria de adipócitos



Legenda: Diâmetro de adipócitos (A), Qa de adipócitos (B) e fotomicrografias representativas (C-F). As imagens foram coradas com hematoxilina e eosina e estão na mesma ampliação. Nas fotomicrografias, percebe-se adipócitos hipertrofiados no grupo HL-B (D) e no grupo HL-B+Px (E). Por outro lado, o grupo HL-Px (F) apresentou adipócitos de tamanho similar aos do grupo SC (C). Grupos *standard-chow* (SC); hiperlipídico-banha (HL-B); hiperlipídico-banha mais óleo de peixe (HL-B+Px) e hiperlipídico-óleo de peixe (HL-Px). Dados apresentados como média ± desvio padrão da média (n=5 por grupo). Nível de significância adotado $P \leq 0,05$, sendo [a] ≠ SC; [b] ≠ HL-B e [c] ≠ HL-B+Px (*one-way* ANOVA, com pós-teste de Holm-Sidak).

4.7.2 Expressão gênica e proteica de PPAR

A expressão gênica e proteica de PPARα (-63%, *P*=0,0109 e -21%, *P*=0,0060, respectivamente), bem como a expressão proteica de PPARγ (-33%, *P*=0,0007) se mostraram reduzidas no grupo HL-B. Todas as três isoformas de PPAR responderam de forma dose-dependente às dietas com óleo de peixe, tanto na expressão gênica quanto na expressão proteica, como mostra a Figura 15. Sendo assim, PPARα estava aumentando no grupo HL-B+Px (+137%, *P*=0,0002, na expressão gênica e +38%, *P*=0,0004, na expressão proteica) assim como PPARβ/δ (+124%, *P*=0,0172, na expressão gênica) e PPARγ (+94%, *P*=0,0137, na expressão gênica e +34%, *P*=0,0007, na expressão proteica). Da mesma forma, PPARα (+312%, *P*<0,0001, na expressão gênica e +65%, *P*<0,0001, na expressão proteica), PPARβ/δ (+348%, *P*<0,0001, na expressão gênica) e PPARγ (+450%, *P*<0,0001, na expressão gênica e +72%, *P*<0,0001, na expressão proteica) estavam ainda mais aumentados no grupo HL-Px.

4.7.3 Expressão gênica da lipogênese e beta-oxidação

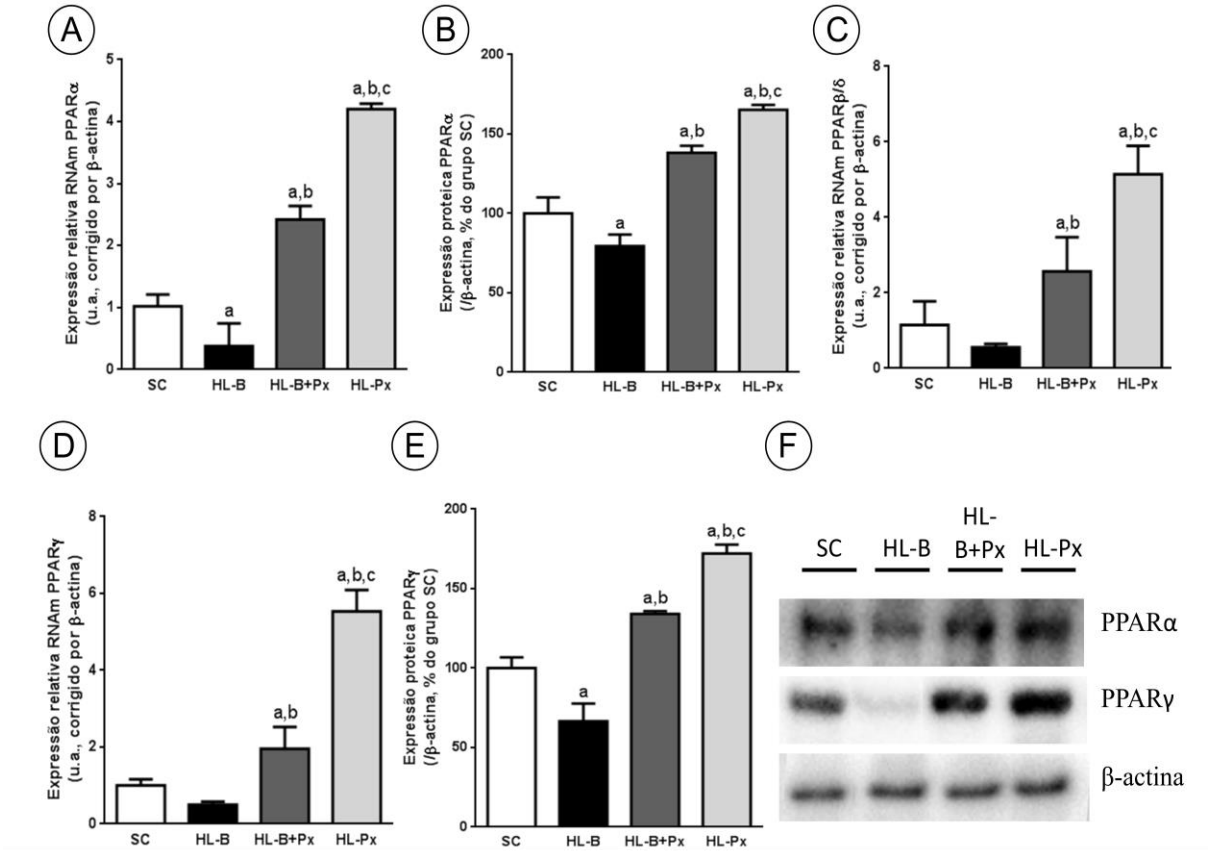
A expressão gênica de CD36 estava elevada nos três grupos HL, quando comparados com o grupo SC (+166%, *P*=0,0031, para HL-B; +209%, *P*=0,0011, para HL-B+Px; e +228%, *P*=0,0004, para HL-Px). Não houve diferença entre esses três grupos (Figura 16 A).

A aP2 se mostrou elevada no grupo HL-B (+370%, *P*<0,0001) e também no grupo HL-B+Px (+124%, *P*=0,0265), em relação ao grupo SC. O grupo HL-B+Px, no entanto, estava menor quando comparado com o grupo HL-B (-52%, *P*=0,0006). O grupo HL-Px foi similar ao grupo SC (Figura 16 B).

No que diz respeito à expressão gênica de FAS, observou-se elevação no grupo HL-B (+56%, *P*=0,0264) e normalização nos dois grupos que receberam óleo de peixe, como mostra a Figura 16 C.

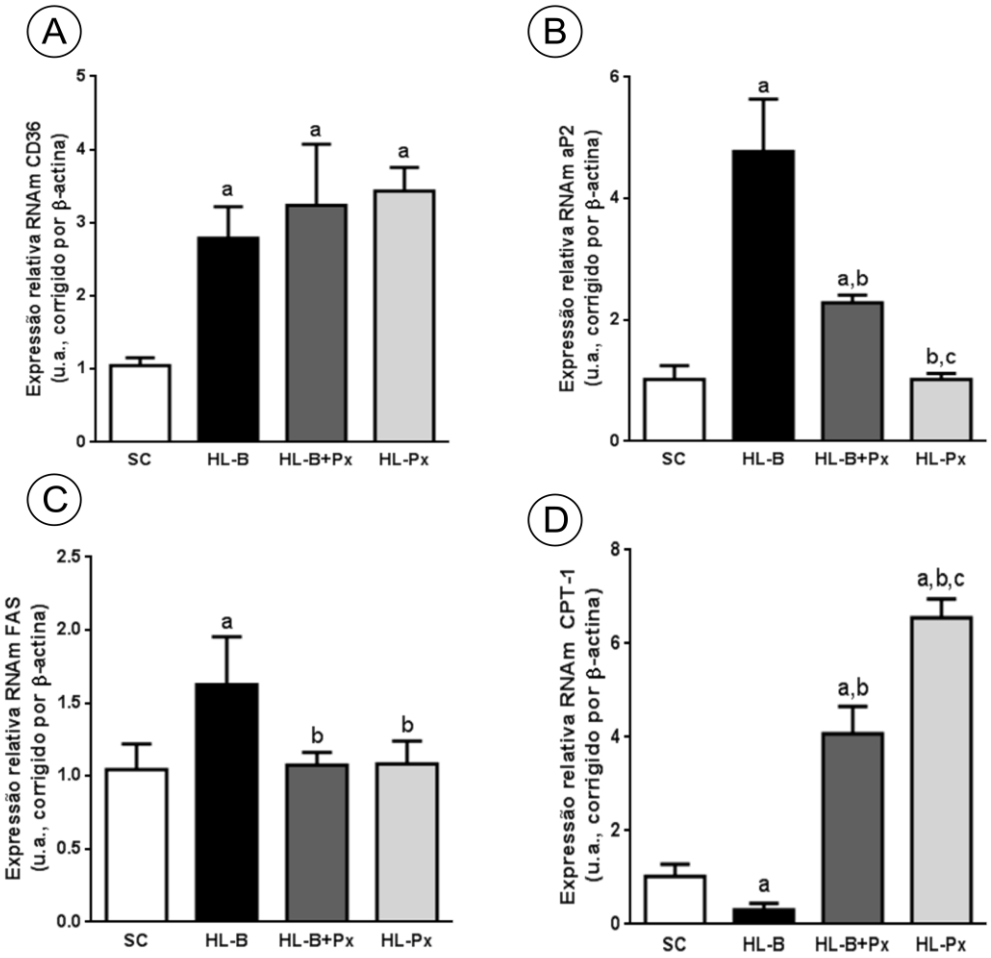
Com relação à expressão gênica de CPT-1, houve redução no grupo HL-B (-70%, *P*=0,0173), elevação no grupo HL-B+Px (+297%, *P*<0,0001) e elevação ainda maior no grupo HL-Px (+539%, *P*<0,0001), comparando com o grupo SC (Figura 16 D).

Figura 15 - PPAR no TAB



Legenda: Expressão gênica e proteica do receptor ativador de proliferação peroxissomal alfa (PPARα - A, B), receptor ativador de proliferação peroxissomal beta/delta (PPARβ/δ - C), receptor ativador de proliferação peroxissomal gama (PPARγ – D, E), e bandas representativas (F). Grupos *standard-chow* (SC); hiperlipídico-banha (HL-B); hiperlipídico-banha mais óleo de peixe (HL-B+Px) e hiperlipídico-óleo de peixe (HL-Px). Dados apresentados como média ± desvio padrão da média (n=5 por grupo). Nível de significância adotado *P*≤0,05, sendo [a] ≠ SC; [b] ≠ HL-B e [c] ≠ HL-B+Px (*one-way* ANOVA, com pós-teste de Holm-Sidak).

Figura 16 - Lipogênese e beta-oxidação no TAB



Legenda: Expressão gênica do cluster de diferenciação 36 (CD36 - A), *adipocyte protein* 2 (aP2 - B), ácido graxo sintase (FAS - C) e carnitina palmitoil transferase-1 (CPT-1 - D). Grupos *standard-chow* (SC); hiperlipídico-banha (HL-B); hiperlipídico-banha mais óleo de peixe (HL-B+Px) e hiperlipídico-óleo de peixe (HL-Px). Dados apresentados como média ± desvio padrão da média (n=5 por grupo). Nível de significância adotado $P \leq 0,05$, sendo [a] ≠ SC; [b] ≠ HL-B e [c] ≠ HL-B+Px (*one-way* ANOVA, com pós-teste de Holm-Sidak).

5 **DISCUSSÃO**

No presente estudo, demonstrou-se que dietas hiperlipídicas com óleo de peixe podem prevenir ou reduzir o ganho de peso e a adiposidade sem afetar a ingestão alimentar. Esse efeito antiobesogênico foi relacionado à ativação de marcadores termogênicos no TAM, à inibição de marcadores da lipogênese e ao aumento de marcadores da beta-oxidação no TAB. Os efeitos do óleo de peixe nesses tecidos foram associados com melhora da tolerância à glicose e resistência à insulina e da hipertrigliceridemia, melhora da captação e oxidação de ácidos graxos e glicose no TAM e elevação da expressão gênica e proteica de PPAR (as três isoformas) no TAM e no TAB.

Nesse trabalho, utilizou-se um modelo experimental para comparar diferentes dietas HL (50% da energia proveniente dos lipídios; 23,8% p/p), variando somente na composição de ácidos graxos. Um estudo similar já foi conduzido em nosso grupo com outras fontes lipídicas, mas com a mesma quantidade de lipídios, comparando parâmetros metabólicos (Catta-Preta *et al.*, 2012). Pimentel *et al*. avaliaram os efeitos de uma dieta HL com óleo de peixe (50% da energia proveniente dos lipídios) sobre a inflamação hipotalâmica (Pimentel *et al.*, 2013). De forma similar, Hashimoto *et al*. usaram diferentes dietas HL, com 23,5% p/p de lipídios (45% da energia total) para comparar o metabolismo da glicose e dos lipídios (Hashimoto *et al.*, 2013). Esses trabalhos justificam e corroboram nosso modelo experimental.

Como esperado, o grupo HL-B demonstrou elevada massa corporal (Barbosa-da-Silva *et al.*, 2012). De forma interessante, a capacidade do óleo de peixe de inibir o ganho de massa corporal foi dose-dependente, ou, em outras palavras, o grupo HL-B+Px (119 g de óleo de peixe/kg de ração) foi mais leve que o grupo HL-B, mas mais pesado que o grupo SC, enquanto que o grupo HL-Px (238 g de óleo de peixe/kg de ração) teve massa corporal similar ao grupo SC. Liu *et al*. demonstraram que ratos alimentados com 83 g de AGPI n-3/kg de ração tiveram massa corporal diminuída em comparação a ratos alimentados com gordura saturada, mas aumentada em relação ao grupo controle (Liu *et al.*, 2013a). Enquanto isso, Lionetti *et al*. forneceram 218 g de óleo de peixe/kg de ração para ratos e observaram ganho de massa corporal reduzido em relação ao grupo que recebeu banha de porco, e

massa corporal similar ao grupo controle (Lionetti *et al.*, 2014). Esses resultados estão de acordos com os vistos no presente estudo e corroboram a ideia de que os efeitos do óleo de peixe sobre o ganho de massa corporal são mais pronunciados conforme a dose aumenta.

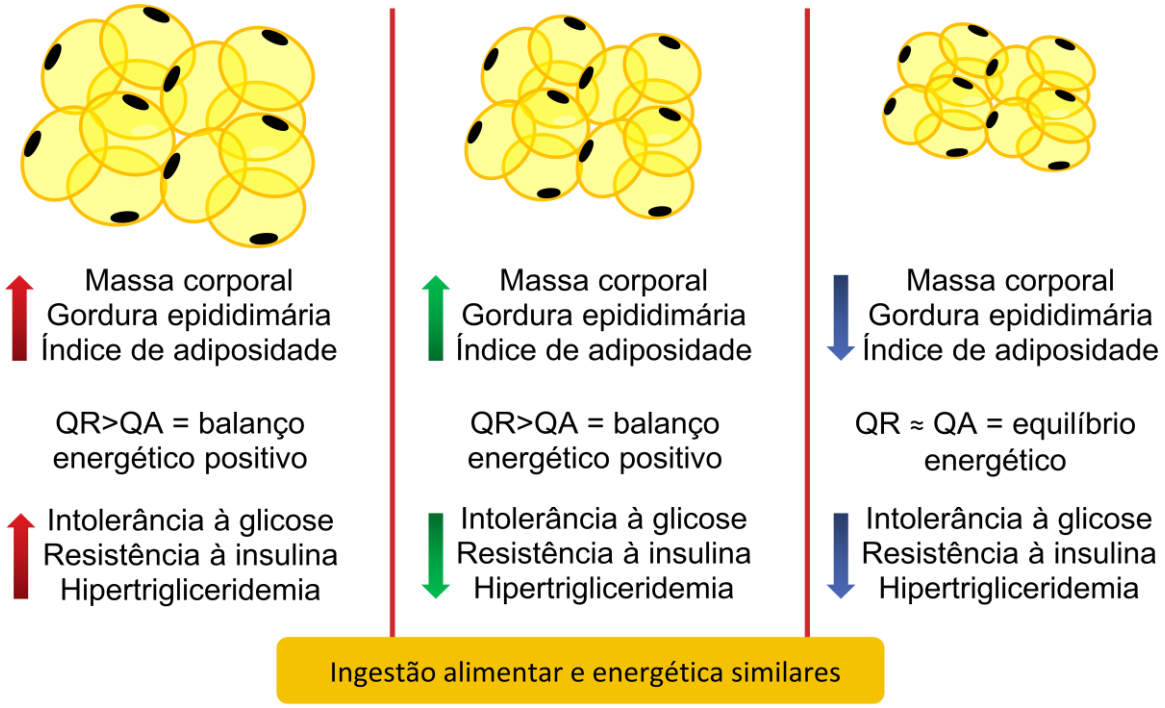
O ganho de massa corporal visto nos animais do grupo HL-B deveu-se a um aumento da gordura epididimária e do índice de adiposidade (Barbosa-da-Silva *et al.*, 2012; Catta-Preta *et al.*, 2012). De forma similar, a redução do ganho de peso nos grupos que ingeriram óleo de peixe também foi consequência de uma diminuição da adiposidade. A substituição parcial de uma dieta HL por AGPI n-3 resultou em redução do ganho de massa corporal, devido principalmente à diminuição na massa de gordura epididimária (Flachs *et al.*, 2006). Animais tratados com EPA e DHA de forma combinada também mostraram redução da gordura epididimária (Ruzickova *et al.*, 2004) e o EPA de forma isolada também foi capaz de reduzir o acúmulo de lipídios em células 3T3-L1 (Lee *et al.*, 2008).

Em relação ao QR, todos os três grupos HL apresentaram diminuição nesse parâmetro. O QR representa a utilização dos combustíveis alimentares e dietas desbalanceadas, como a HL, são capazes de reduzir esse parâmetro representando aumento da oxidação de gordura. QA, em comparação ao QR, é utilizado para prever a homeostase energética. Quando QA e QR são similares, a ingestão energética está balanceada com o gasto energético, sem alterações na adiposidade ou massa corporal, como visto nos grupos SC e HL-Px. Por outro lado, quando o QR é maior do que o QA, o balanço energético é positivo e, portanto, a ingestão alimentar é maior que o gasto energético, levando ao acúmulo de gordura e ao aumento da adiposidade e da massa corporal (Longo *et al.*, 2010), como visto nos grupos HL-B e HL-B+Px. Já foi demonstrado que camundongos alimentados com uma dieta HL com banha de porco tiveram leve aumento do QR em comparação com o QA, indicando balanço energético positivo, como observado no presente estudo (Foucault *et al.*, 2014).

Todos os três grupos HL demonstraram ingestão alimentar similar, mas elevada ingestão energética em comparação com o grupo SC, uma vez que suas dietas eram hiperenergéticas (Catta-Preta *et al.*, 2012). Os AGPI n-3 não interferem com a ingestão alimentar (Flachs *et al.*, 2005), como demonstrado no presente estudo e, por isso, a prevenção do ganho de massa corporal vista nos grupos com óleo de peixe não pode ser associada com alterações na ingestão alimentar, mas

sim com alterações metabólicas. Baseado nisso, prosseguimos então para avaliar as alterações metabólicas no TAM e no TAB que pudessem justificar esse efeito antiobesogênico. Um resumo dos resultados iniciais pode ser observado na Figura 17.

Figura 17 - Comparação dos resultados dos três grupos hiperlipídicos



Legenda: O grupo HL-B (à esquerda) apresentou aumento da massa corporal e da adiposidade (gordura epididimária e índice de adiposidade), que foram refletidos por um quociente respiratório (QR) aumentado em relação ao quociente alimentar (QA), representando balanço energético positivo. Além disso, também foram encontradas: intolerância à glicose, resistência à insulina e hipertrigliceridemia. O grupo HL-B+Px apresentou aumento da massa corporal e da adiposidade, com balanço energético positivo. No entanto, esse grupo não desenvolveu alterações associadas à obesidade, demonstrando efeito protetor do óleo de peixe sobre elas. Por último, o grupo HL-Px não apresentou alterações na massa corporal e adiposidade nem desenvolveu alterações relacionadas às comorbidades associadas à obesidade. Vale ressaltar que não houve diferença na ingestão alimentar nem energética desses grupos. Grupos *standard-chow* (SC); hiperlipídico-banha (HL-B); hiperlipídico-banha mais óleo de peixe (HL-B+Px) e hiperlipídico-óleo de peixe (HL-Px).

Fonte: A autora, 2015.

Como discutido anteriormente, quando a ingestão energética excede o gasto energético (balanço energético positivo), a obesidade se desenvolve. Como a ingestão energética foi similar entre os três grupos HL, nós analisamos o gasto energético desses animais. No presente estudo, o grupo HL-B apresentou gasto energético diminuído, comparado com o grupo SC, justificando o balanço energético positivo e o ganho de massa corporal. Por outro lado, o grupo HL-Px demonstrou

gasto energético aumentado, em comparação ao grupo SC, o que é um indicativo que a termogênese adaptativa estava ativada nesses animais. Há três principais componentes que participam do gasto energético: gasto de energia obrigatório (requerido pelas células e órgãos para seu funcionamento normal), atividade física e termogênese adaptativa. Esse último fator é conhecido por ser induzido tanto pelo frio como pela dieta e, em roedores, é majoritariamente desenvolvido pelo TAM (Lowell e Spiegelman, 2000).

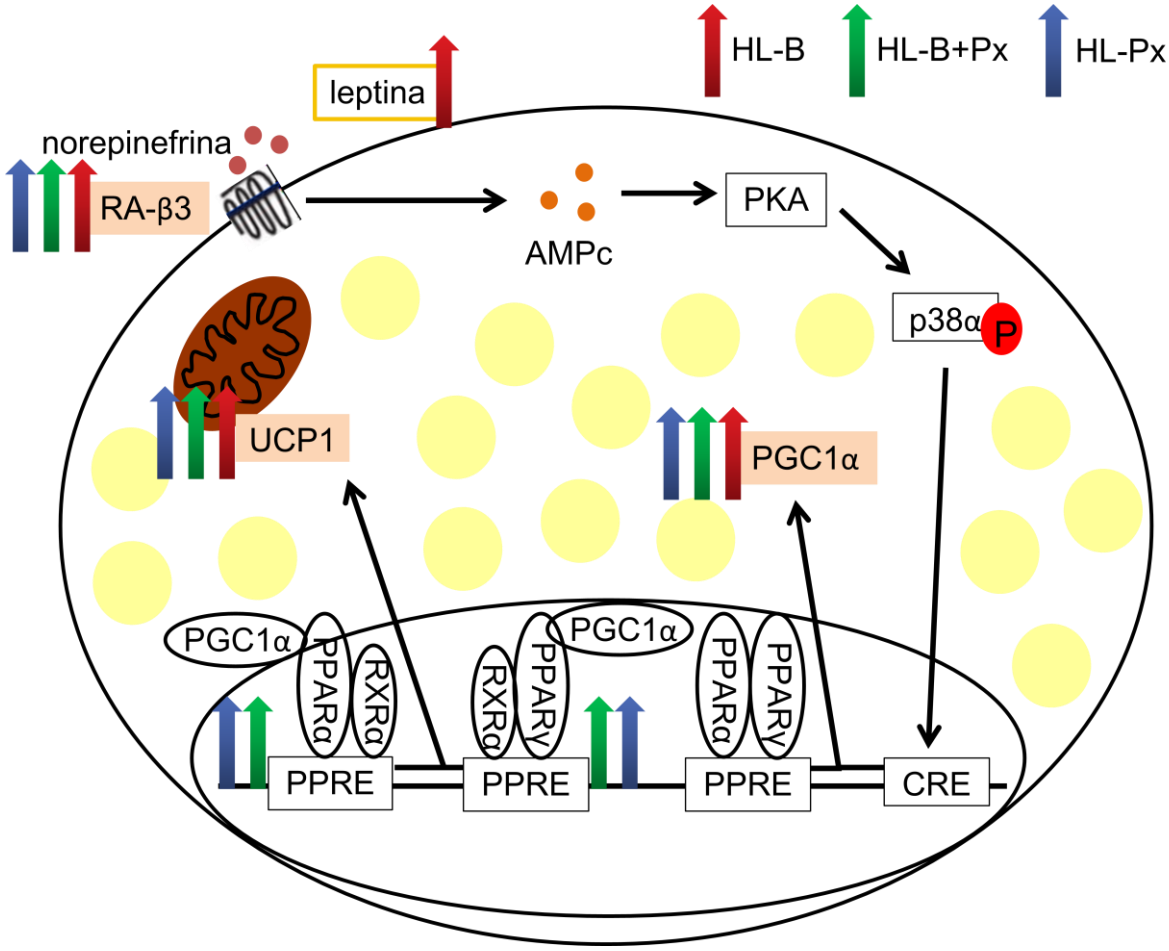
A leptina é produzida e secretada pelos adipócitos, sendo responsável pela homeostase energética. Quanto mais o tecido adiposo aumenta, mais leptina é secretada, levando a uma elevação dos níveis plasmáticos de leptina em animais obesos (como no nosso HL-B) (Enriori *et al.*, 2011; Catta-Preta *et al.*, 2012). As ações centrais da leptina incluem a ativação da atividade do sistema nervoso simpático e, apesar de camundongos obesos serem resistentes à leptina no que diz respeito ao controle do apetite, o mesmo não acontece com o controle da termogênese. Camundongos obesos com hiperleptinemia apresentam aumento do estímulo nervoso no TAM interescapular (Enriori *et al.*, 2011). Corroborando com esse fato, também encontramos expressão aumentada de genes e proteínas termogênicas (RA-β3, PGC1α e UCP1), como demonstrado na Figura 18. A superalimentação é responsável por estimular o sistema nervoso simpático que, por sua vez, libera catecolaminas (norepinefrina, principalmente) que atuam via RA-β3. Esse fato leva a uma gama de alterações intracelulares resultando na transcrição de PGC1α que é altamente expresso no TAM e funciona como um coativador para diversos receptores nucleares que regulam positivamente a expressão gênica de UCP1 (Richard *et al.*, 2010; Sugimoto *et al.*, 2014). De forma semelhante à reportada no presente estudo, camundongos obesos com dieta HL e ratos alimentados com dieta tipo cafeteria apresentaram elevada expressão gênica de RA-β3 e UCP1, quando comparados com animais magros (Margareto *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2009).

Em sentido oposto, apesar de dietas ricas em AGPI n-3 também levarem a um aumento na termogênese adaptativa do TAM, imagina-se que elas modulem esse tecido de uma forma independente da leptina (Cannon e Nedergaard, 2004). Camundongos alimentados com dieta rica em AGPI demonstraram elevada capacidade para termogênese *non-shivering* e uma grande quantidade de UCP1

(Sadurskis *et al.*, 1995). Mesmo considerando que alguns estudos apontam que qualquer ácido graxo insaturado é capaz de induzir a termogênese na mesma magnitude (Takeuchi *et al.*, 1995; Cannon e Nedergaard, 2004), outros estudos afirmam que diferentes tipos de ácidos graxos modulam diferentes respostas de UCP1. Por exemplo, camundongos alimentados com dieta com banha de boi (ácidos graxos saturados e monoinsaturados) tiveram menor estimulo para a termogênese do que animais alimentados com óleo de milho (AGPI) (Mercer e Trayhurn, 1987) e uma dieta HL com óleo de peixe administrada em ratos elevou a expressão gênica de UCP1 de forma muito mais acentuada que uma dieta HL com óleo de cártamo (rica em AGPI n-6) (Takahashi e Ide, 2000). Esses estudos estão de acordo com o padrão de expressão gênica e proteica vista nos nossos grupos HL (Figura 18).

Um dos reguladores potenciais da UCP1 e termogênese adaptativa nas dietas HL alternativas (ou seja, com AGPI n-3) são os PPAR (Margareto *et al.*, 2001). PPARα e PPARγ são alvos do óleo de peixe bem conhecidos (Calder, 2012). PPARα é altamente expresso no TAM e regula a expressão gênica de PGC1α e UCP1 (Hondares *et al.*, 2011). Além disso, PPARα também é responsável pela transcrição de genes relacionados à oxidação de ácidos graxos, processo que é essencial para a termogênese (Iizuka *et al.*, 2013). PPARγ apresenta as mesmas funções do PPARα no TAM: regulação da expressão gênica de PGC1α e UCP1 (Festuccia *et al.*, 2010). Tais fatos corroboram que a ativação dos PPAR pode levar à ativação da termogênese, o que explicaria o que observamos nos grupos HL-B+Px e HL-Px. Em relação ao PPARβ/δ, apesar de já ter sido provado que ele também aumenta a oxidação de ácidos graxos e a termogênese (expressão de UCP1) (Wang *et al.*, 2003), sua regulação positiva pode não estar associada à ingestão de AGPI n-3, mas sim com a união de ligantes endógenos de ácidos graxos gerados na termogênese do TAM (Mottillo *et al.*, 2012).

Figura 18 - Efeitos das três dietas hiperlipídicas no TAM



Legenda: O grupo HL-B apresentou aumento dos três marcadores termogênicos (receptor adrenérgico beta-3, RA-β3; coativador 1 alfa do receptor ativador de proliferação peroxissomal gama, PGC1α; e proteína desacopladora de elétrons 1, UCP1), que foi associado ao aumento da leptina, adipocina capaz de estimular a termogênese. Ambos os grupos HL-B+Px e HL-Px também apresentaram aumento desses marcadores, embora sem associação com hiperleptinemia, mas sim relacionado ao aumento da expressão dos receptores ativadores de proliferação peroxissomal (PPAR). Esses receptores são capazes de transcrever não só UCP1 como também PGC1α. Grupos *standard-chow* (SC); hiperlipídico-banha (HL-B); hiperlipídico-banha mais óleo de peixe (HL-B+Px) e hiperlipídico-óleo de peixe (HL-Px).

Fonte: A autora, 2015.

A termogênese adaptativa requer a utilização de combustíveis oriundos tanto dos ácidos graxos quanto da glicose, que podem ser usados imediatamente ou armazenados para utilização futura. Mais importante, esse uso pode contar para a melhora do metabolismo (Cannon e Nedergaard, 2004; Komatsu *et al.*, 2010). Camundongos *knockout* para CD36, quando expostos ao frio por 12 horas, tem uma drástica redução da temperatura corporal e quando expostos por 24 horas, morrem, demonstrando que o CD36 tem um papel crucial na captação dos ácidos graxos para termogênese no TAM (Bartelt *et al.*, 2011). Da mesma forma, camundongos

submetidos ao frio tiveram aumento da expressão gênica de CPT-1, representando uma melhora na degradação dos ácidos graxos (Komatsu *et al.*, 2010). Esse aumento da disponibilidade de ácidos graxos como substratos para a termogênese foi visto nos grupos HL-B+Px e HL-Px, com melhora dos triglicerídeos plasmáticos. Adicionalmente, já foi provado que o óleo de peixe eleva a expressão gênica de CD36 e CPT-1 no fígado (Yamazaki *et al.*, 2007; Bargut *et al.*, 2014). No entanto, no grupo HL-B, apesar de ocorrer aumento da captação de ácidos graxos (representada pelo aumento de CD36), a entrada desses substratos na mitocôndria estava comprometida (representada pela diminuição de CPT-1) e, portanto, a termogênese não foi efetiva.

Em relação à glicose como substrato, um aumento da captação desse nutriente para oxidação pode ser explicado pela elevação de GLUT-4 (Bartelt *et al.*, 2011), como foi visto nos grupos HL-B+Px e HL-Px, levando a uma melhora na tolerância à glicose e resistência à insulina. Ratos expostos ao frio tiveram aumento da expressão de GLUT-4 e da captação de glicose no TAM (Shimizu *et al.*, 1993). Nesse sentido, TC10 é crucial para a translocação de GLUT-4 para a membrana celular e transporte da glicose para dentro das células (Chiang *et al.*, 2001). Camundongos alimentados com óleo de peixe tiveram aumento da expressão gênica de GLUT-4 na musculatura esquelética com redução associada da glicose plasmática (Yu *et al.*, 2011). Inversamente, uma redução da expressão de GLUT-4, como vista no grupo HL-B, pode representar diminuição no transporte da glicose para dentro da célula e redução desse substrato para a termogênese. Já foi demonstrado que ratas alimentadas com dieta HL apresentaram redução da expressão proteica de GLUT-4 no TAM, levando à resistência à insulina (Nadal-Casellas *et al.*, 2013).

No que diz respeito ao TAB, já está bem descrito que o seu aumento é acompanhado de um aumento do tamanho dos adipócitos (hipertrofia), como visto no grupo HL-B (Barbosa-da-Silva *et al.*, 2012). Esse padrão é responsável por um estado de inflamação de baixa intensidade, no qual a adipocina anti-inflamatória adiponectina está diminuída e as citocinas pró-inflamatórias estão elevadas, culminando em resistência à insulina e intolerância à glicose (Flachs *et al.*, 2009; Barbosa-da-Silva *et al.*, 2012). Foi observado também hiperglicemia, hiperinsulinemia e elevado HOMA-IR no grupo HL-B, corroborando esse fato.

Por outro lado, os grupos que receberam dietas HL com óleo de peixe tiveram resultados opostos, como visto na Figura 19. O grupo HL-B+Px, apesar de ter mantido a ingestão de banha de porco e apresentar moderado grau de adiposidade e hipertrofia de adipócitos, não apresentou nenhum indício de resistência à insulina e nem intolerância à glicose. No mesmo sentido, camundongos que receberam dieta HL parcialmente substituída por EPA, apesar de apresentarem ganho de massa corporal e acúmulo de gordura epididimária, mostraram glicose e insulina plasmáticas, bem como HOMA-IR similares aos do grupo controle (Kalupahana *et al.*, 2010). O grupo HL-Px, por sua vez, permaneceu com diâmetro do adipócito similar ao do grupo SC e sem desenvolver resistência à insulina ou intolerância à glicose. Camundongos alimentados com dieta HL com AGPI n-3 mostraram redução do tecido adiposo associado à prevenção de hiperinsulinemia e melhora da sensibilidade à insulina (Flachs *et al.*, 2006).

A expressão de PPAR se encontra diminuída no TAB de animais obesos (como no grupo HL-B) e o óleo de peixe consegue estimular a expressão desses fatores de transcrição (Calder, 2012; Penna-de-Carvalho *et al.*, 2014). Esses fatores de transcrição têm papeis importantes na regulação do metabolismo de ácidos graxos no TAB e estão, portanto, relacionados aos efeitos antiobesogênicos do óleo de peixe (Siriwardhana *et al.*, 2013) (Figura 19). PPARα, apesar de pouco expresso no TAB, tem papel fundamental na beta-oxidação dos ácidos graxos (Tsuchida *et al.*, 2005). PPARβ/δ, por sua vez, parece ter efeito similar ao de PPARα (Roberts *et al.*, 2011). Por último, PPARγ é altamente expresso no TAB e é capaz de promover apoptose de adipócitos maduros e hipertrofiados e aumentar a população de adipócitos menores, ajudando na melhora da resistência à insulina (Magliano *et al.*, 2013).

Como vimos em nosso estudo, o CD36 está aumentado em animais obesos (Cai *et al.*, 2012). Esse receptor, localizado na membrana celular, facilita a rápida captação e importação de ácidos graxos para dentro dos adipócitos (Yang *et al.*, 2013). Após esse evento, a aP2 inicia o transporte desses ácidos graxos até o local da síntese de triglicerídeos. Assim como o CD36, a aP2 também está relacionado ao desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina (Wu *et al.*, 2014). Vale ressaltar que a aP2 é transcrito de PPARγ, mas uma vez expresso, ele regula negativamente esse fator de transcrição, abolindo seus efeitos benéficos (Garin-

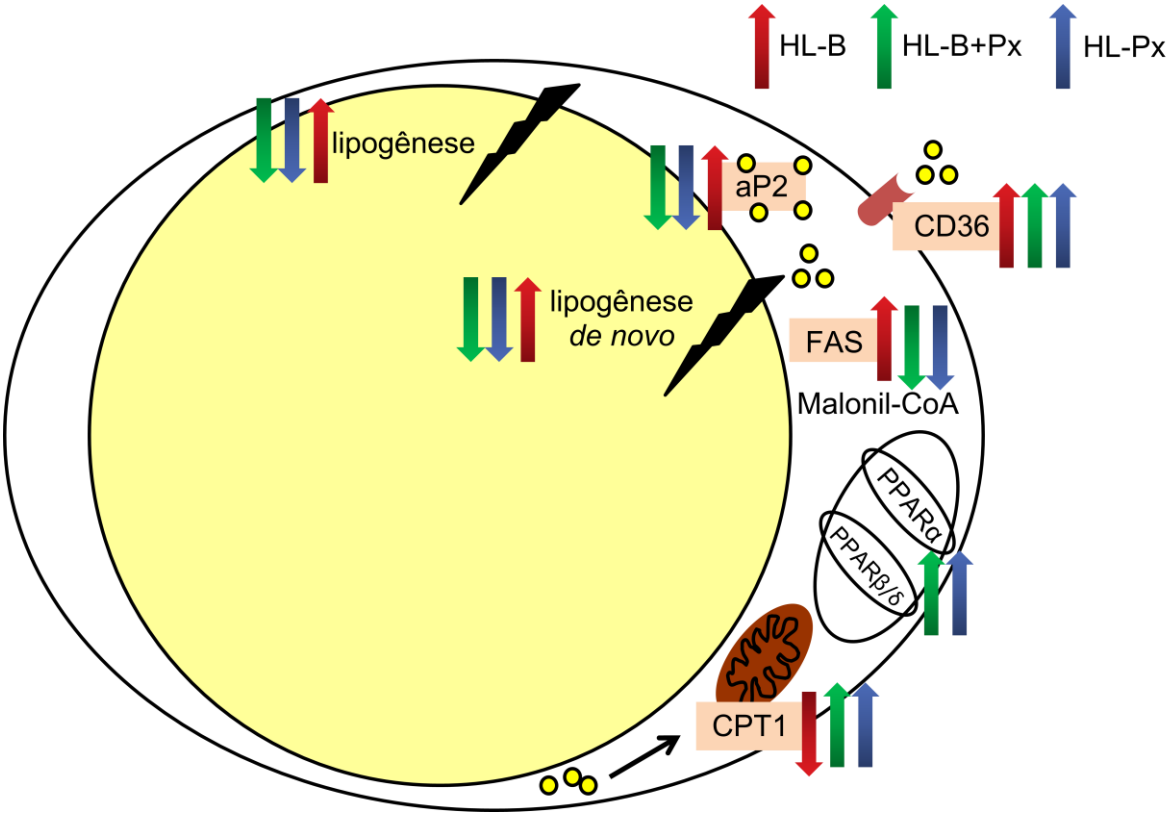
Shkolnik *et al.*, 2014). Essa condição parece elucidar bem o que ocorreu no grupo HL-B.

Adicionalmente, a obesidade também está associada ao aumento da lipogênese *de novo* no TAB, com elevação da FAS, a principal enzima nesse processo. Camundongos tratados com um inibidor da FAS apresentaram redução da massa corporal, demonstrando seu papel na obesidade (Loftus *et al.*, 2000). Dessa forma, podemos imaginar que a lipogênese *de novo* estava aumentada nos animais do grupo HL-B.

Por outro lado, os grupos que se alimentaram com óleo de peixe apresentaram redução de aP2 e FAS, sugerindo que as vias de acúmulo de gordura estavam atenuadas. A suplementação com AGPI n-3 já se mostrou capaz de reduzir a expressão de aP2 (Camargo *et al.*, 2014). No presente estudo, essa redução foi dependente da dose de óleo de peixe fornecida. O óleo de peixe também já foi associado à diminuição de FAS no TAB (Raclot *et al.*, 1997; Muhlhausler *et al.*, 2010).

CPT-1, um transcrito de PPARα e PPARβ/δ, é associado com a utilização de ácidos graxos e com a capacidade oxidativa (Roberts *et al.*, 2011; Magliano *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013). Apesar do grupo HL-B ter apresentado elevada expressão gênica de CD36, esses animais também tiveram reduzida expressão gênica de CPT-1. Dessa forma, o acetil CoA resultante da ação de CD36 não foi capaz de ir para a via de beta-oxidação e pode ter sido desviado para a lipogênese (Magliano *et al.*, 2013). Por outro lado, em adipócitos 3T3-L1, o tratamento com EPA levou ao aumento da lipólise, com concomitante aumento na expressão gênica de CPT-1 (Lee *et al.*, 2008), como vimos nos nossos grupos HL-B+Px e HL-Px. Tal fato também foi visto em camundongos que receberam EPA e DHA na dieta, juntamente com o aumento da beta-oxidação no TAB (Flachs *et al.*, 2005).

Figura 19 - Efeitos das três dietas hiperlipídicas no TAB



Legenda: O grupo HL-B apresentou aumento dos marcadores da lipogênese e diminuição de marcador da beta-oxidação, sugerindo que nesse grupo as vias de reserva energética estavam ativadas (lipogênese e lipogênese *de novo*) e a de beta-oxidação reduzida, justificando a hipertrofia do adipócito e o ganho de adiposidade. Por outro lado, os grupos HL-B+Px e HL-Px apresentaram resultados opostos, representando possível redução nas vias lipogênicas e ativação da beta-oxidação. Essa ativação pode ser em consequência do aumento da expressão dos receptores ativadores de proliferação peroxissomal (PPAR) e provavelmente resultou na diminuição ou prevenção da hipertrofia do adipócito e do ganho de adiposidade. Grupos *standard-chow* (SC); hiperlipídico-banha (HL-B); hiperlipídico-banha mais óleo de peixe (HL-B+Px) e hiperlipídico-óleo de peixe (HL-Px).

Fonte: A autora, 2015.

É importante mencionar que, no presente estudo, escolhemos uma alta dose de óleo de peixe para comparar o efeito de dietas HL semelhantes (mesma quantidade de energia e lipídios), que só variaram na composição de ácidos graxos. Os resultados obtidos com o óleo de peixe em modelos experimentais, apesar de serem extremamente relevantes, precisam de atenção especial quando extrapolados para intervenções em humanos, especialmente por causa das altas doses utilizadas. Vale destacar que os autores do presente trabalho não acreditam que essa dose possa ser transposta para o consumo em humanos e essa é a maior limitação desse estudo. No entanto, os resultados podem dar um bom indicativo dos efeitos benéficos do óleo de peixe e, portanto, são de grande interesse.

CONCLUSÕES

Em resumo, dietas hiperlipídicas ricas em óleo de peixe são capazes de:

a) prevenir ou reduzir o ganho de massa corporal e a adiposidade, sem alterar a ingestão alimentar, prevenindo, consequentemente, o desenvolvimento de intolerância à glicose e resistência à insulina e melhorando o perfil plasmático de leptina e triglicerídeos;

b) elevar a expressão de marcadores termogênicos e de PPAR e melhorar a captação e oxidação de lipídios bem como a captação de glicose no TAM;

c) amenizar o remodelamento do TAB, aumentar a expressão de PPAR e reduzir a expressão de genes lipogênicos e elevar a expressão de gene de beta-oxidação nesse tecido.

Esses resultados indicam, portanto, que a ingestão de óleo de peixe tem efeitos antiobesogênicos através da modulação benéfica do TAM e do TAB de camundongos. Apesar de mais estudos serem necessários para ampliar o entendimento sobre os mecanismos de ação desses AGPI n-3, é possível dizer que o óleo de peixe pode representar uma terapia auxiliar alternativa contra a obesidade e suas comorbidades.

REFERÊNCIAS

American Diabetes Association. Food and Fitness. Fats. Healthy Fats. Disponível em: <http://www.diabetes.org/food-and-fitness/>. Acesso em: 20 dez. 2014.

American Heart Association. Getting Health. Nutrition Center. Healthy Eating. Fish 101. Disponível em: http://www.heart.org/HEARTORG/GettingHealthy/. Acesso em: 20 dez. 2014.

Arai T, Kim HJ, Hirako S, Nakasatomi M, Chiba H, Matsumoto A. Effects of dietary fat energy restriction and fish oil feeding on hepatic metabolic abnormalities and insulin resistance in KK mice with high-fat diet-induced obesity. J Nutr Biochem 2013; 24:267-273.

Barbosa-da-Silva S, da Silva NC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Liver damage is not reversed during the lean period in diet-induced weight cycling in mice. Hepatol Res 2014; 44:450-459.

Barbosa-da-Silva S, Fraulob-Aquino JC, Lopes JR, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Weight cycling enhances adipose tissue inflammatory responses in male mice. *PLoS One* 2012; 7:e39837.

Bargut TC, Ferreira TP, Daleprane JB, Martins MA, Silva PM, Aguila MB. Fish oil has beneficial effects on allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in mice. *PLoS One* 2013; 8:e75059.

Bargut TC, Frantz ED, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Effects of a diet rich in n-3 polyunsaturated fatty acids on hepatic lipogenesis and beta-oxidation in mice. Lipids 2014; 49:431-444.

Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. Nat Med 2011; 17:200-205.

Berndt J, Kovacs P, Ruschke K, Kloting N, Fasshauer M, Schon MR, et al. Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. Diabetologia 2007; 50:1472-1480.

Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2004; 287:R943-949.

Brown NF, Hill JK, Esser V, Kirkland JL, Corkey BE, Foster DW, et al. Mouse white adipocytes and 3T3-L1 cells display an anomalous pattern of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I isoform expression during differentiation. Inter-tissue and inter-species expression of CPT I and CPT II enzymes. Biochem J 1997; 327 (Pt 1):225-231.

Buckley JD, Howe PR. Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids may be beneficial for reducing obesity-a review. Nutrients 2010; 2:1212-1230.
Burdge GC, Calder PC. Dietary alpha-linolenic acid and health-related outcomes: a metabolic perspective. Nutr Res Rev 2006; 19:26-52.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem 2009; 55:611-622.

Cai L, Wang Z, Ji A, Meyer JM, van der Westhuyzen DR. Scavenger receptor CD36 expression contributes to adipose tissue inflammation and cell death in diet-induced obesity. PLoS One 2012; 7:e36785.

Calder PC. Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. Eur J Pharmacol 2011; 668 Suppl 1:S50-58.

Calder PC. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. J Nutr 2012; 142:592S-599S.

Camargo A, Meneses ME, Perez-Martinez P, Delgado-Lista J, Jimenez-Gomez Y, Cruz-Teno C, et al. Dietary fat differentially influences the lipids storage on the adipose tissue in metabolic syndrome patients. Eur J Nutr 2014; 53:617-626.

Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. Physiol Rev 2004; 84:277-359.

Catta-Preta M, Martins MA, Cunha Brunini TM, Mendes-Ribeiro AC, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by different high-fat diets. Nutrition 2012; 28:212-219.

Chapkin RS, Wang N, Fan YY, Lupton JR, Prior IA. Docosahexaenoic acid alters the size and distribution of cell surface microdomains. Biochim Biophys Acta 2008; 1778:466-471.

Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT, Neudauer CL, et al. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. Nature 2001; 410:944-948.

Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, Pauli JR, Morari J, Souza CT, et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. PLoS One 2012; 7:e30571.

Couet C, Delarue J, Ritz P, Antoine JM, Lamisse F. Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults. Int J Obes Relat Metab Disord 1997; 21:637-643.

Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. N Engl J Med 2009; 360:1509-1517.

Dawczynski C, Hackermeier U, Viehweger M, Stange R, Springer M, Jahreis G. Incorporation of n-3 PUFA and gamma-linolenic acid in blood lipids and red blood cell lipids together with their influence on disease activity in patients with chronic inflammatory arthritis--a randomized controlled human intervention trial. Lipids Health Dis 2011; 10:130.

Djousse L, Biggs ML, Lemaitre RN, King IB, Song X, Ix JH, et al. Plasma omega-3 fatty acids and incident diabetes in older adults. Am J Clin Nutr 2011; 94:527-533.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. Lancet 2005; 365:1415-1428.

Enriori PJ, Sinnayah P, Simonds SE, Garcia Rudaz C, Cowley MA. Leptin action in the dorsomedial hypothalamus increases sympathetic tone to brown adipose tissue in spite of systemic leptin resistance. J Neurosci 2011; 31:12189-12197.

Festuccia WT, Blanchard PG, Richard D, Deshaies Y. Basal adrenergic tone is required for maximal stimulation of rat brown adipose tissue UCP1 expression by chronic PPAR-gamma activation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2010; 299:R159-167.

Flachs P, Horakova O, Brauner P, Rossmeisl M, Pecina P, Franssen-van Hal N, et al. Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. Diabetologia 2005; 48:2365-2375.

Flachs P, Mohamed-Ali V, Horakova O, Rossmeisl M, Hosseinzadeh-Attar MJ, Hensler M, et al. Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. Diabetologia 2006; 49:394-397.

Flachs P, Rossmeisl M, Bryhn M, Kopecky J. Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. Clin Sci (Lond) 2009; 116:1-16.

Flachs P, Rossmeisl M, Kopecky J. The effect of n-3 fatty acids on glucose homeostasis and insulin sensitivity. Physiol Res 2014; 63 Suppl 1:S93-118.

Foucault AS, Even P, Lafont R, Dioh W, Veillet S, Tome D, et al. Quinoa extract enriched in 20-hydroxyecdysone affects energy homeostasis and intestinal fat absorption in mice fed a high-fat diet. Physiol Behav 2014; 128:226-231.

Frantz ED, Penna-de-Carvalho A, Batista Tde M, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Comparative effects of the renin-angiotensin system blockers on nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance in C57BL/6 mice. Metab Syndr Relat Disord 2014; 12:191-201.

Fuentes E, Fuentes F, Vilahur G, Badimon L, Palomo I. Mechanisms of chronic state of inflammation as mediators that link obese adipose tissue and metabolic syndrome. Mediators Inflamm 2013; 2013:136584.

Galli C, Calder PC. Effects of fat and fatty acid intake on inflammatory and immune responses: a critical review. Ann Nutr Metab 2009; 55:123-139.

Garin-Shkolnik T, Rudich A, Hotamisligil GS, Rubinstein M. FABP4 attenuates PPARgamma and adipogenesis and is inversely correlated with PPARgamma in adipose tissues. Diabetes 2014; 63:900-911.

Gibson RA, Neumann MA, Lien EL, Boyd KA, Tu WC. Docosahexaenoic acid synthesis from alpha-linolenic acid is inhibited by diets high in polyunsaturated fatty acids. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2013; 88:139-146.

Gonzalez-Periz A, Horrillo R, Ferre N, Gronert K, Dong B, Moran-Salvador E, et al. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. FASEB J 2009; 23:1946-1957.

Goodpaster BH, Krishnaswami S, Resnick H, Kelley DE, Haggerty C, Harris TB, et al. Association between regional adipose tissue distribution and both type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in elderly men and women. Diabetes Care 2003; 26:372-379.

Goto T, Lee JY, Teraminami A, Kim YI, Hirai S, Uemura T, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha stimulates both differentiation and fatty acid oxidation in adipocytes. J Lipid Res 2011; 52:873-884.

Gregory MK, Gibson RA, Cook-Johnson RJ, Cleland LG, James MJ. Elongase reactions as control points in long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis. PLoS One 2011; 6:e29662.

Hashimoto Y, Yamada K, Tsushima H, Miyazawa D, Mori M, Nishio K, et al. Three dissimilar high fat diets differentially regulate lipid and glucose metabolism in obesity-resistant Slc:Wistar/ST rats. Lipids 2013; 48:803-815.

Hondares E, Rosell M, Diaz-Delfin J, Olmos Y, Monsalve M, Iglesias R, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) induces PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. J Biol Chem 2011; 286:43112-43122.

Hsueh HW, Zhou Z, Whelan J, Allen KG, Moustaid-Moussa N, Kim H, et al. Stearidonic and eicosapentaenoic acids inhibit interleukin-6 expression in ob/ob mouse adipose stem cells via Toll-like receptor-2-mediated pathways. J Nutr 2011; 141:1260-1266.

Iizuka K, Wu W, Horikawa Y, Saito M, Takeda J. Feedback looping between ChREBP and PPARalpha in the regulation of lipid metabolism in brown adipose tissues. Endocr J 2013; 60:1145-1153.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares POF 2008-2009: despesas, rendimento e condições de vida. Rio de Janeiro: IBGE; 2010.

James MJ, Ursin VM, Cleland LG. Metabolism of stearidonic acid in human subjects: comparison with the metabolism of other n-3 fatty acids. Am J Clin Nutr 2003; 77:1140-1145.

Johnson JA, Fried SK, Pi-Sunyer FX, Albu JB. Impaired insulin action in subcutaneous adipocytes from women with visceral obesity. Am J Physiol Endocrinol Metab 2001; 280:E40-49.

Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. Int J Mol Sci 2014; 15:6184-6223.

Kabir M, Skurnik G, Naour N, Pechtner V, Meugnier E, Rome S, et al. Treatment for 2 mo with n 3 polyunsaturated fatty acids reduces adiposity and some atherogenic factors but does not improve insulin sensitivity in women with type 2 diabetes: a randomized controlled study. Am J Clin Nutr 2007; 86:1670-1679.

Kajimura S, Saito M. A new era in brown adipose tissue biology: molecular control of brown fat development and energy homeostasis. Annu Rev Physiol 2014; 76:225-249.

Kalupahana NS, Claycombe K, Newman SJ, Stewart T, Siriwardhana N, Matthan N, et al. Eicosapentaenoic acid prevents and reverses insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice via modulation of adipose tissue inflammation. J Nutr 2010; 140:1915-1922.

Komatsu M, Tong Y, Li Y, Nakajima T, Li G, Hu R, et al. Multiple roles of PPARalpha in brown adipose tissue under constitutive and cold conditions. Genes Cells 2010; 15:91-100.

Kozak LP. Brown fat and the myth of diet-induced thermogenesis. Cell Metab 2010; 11:263-267.

Kromann N, Green A. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. Acta Med Scand 1980; 208:401-406.

Kshatriya S, Liu K, Salah A, Szombathy T, Freeman RH, Reams GP, et al. Obesity hypertension: the regulatory role of leptin. Int J Hypertens 2011; 2011:270624.

Kylin E. Hypertonie-Hyperglykamie-Hyperurikamiesyndrome. Zentralblatt fur innere Medizin 1923; 44.

Lamping K, Nuno D, Coppey L, Holmes A, Hu S, Oltman C, et al. Modification of high saturated fat diet with n-3 polyunsaturated fat improves glucose intolerance and vascular dysfunction. Diabetes Obes Metab 2013; 15:144-152.

Lee MS, Kwun IS, Kim Y. Eicosapentaenoic acid increases lipolysis through up-regulation of the lipolytic gene expression and down-regulation of the adipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Genes Nutr 2008; 2:327-330.

Lee P, Linderman JD, Smith S, Brychta RJ, Wang J, Idelson C, et al. Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans. Cell Metab 2014; 19:302-309.

Lionetti L, Mollica MP, Sica R, Donizzetti I, Gifuni G, Pignalosa A, et al. Differential effects of high-fish oil and high-lard diets on cells and cytokines involved in the inflammatory process in rat insulin-sensitive tissues. Int J Mol Sci 2014; 15:3040-3063.

Liu HQ, Qiu Y, Mu Y, Zhang XJ, Liu L, Hou XH, et al. A high ratio of dietary n-3/n-6 polyunsaturated fatty acids improves obesity-linked inflammation and insulin resistance through suppressing activation of TLR4 in SD rats. Nutr Res 2013a; 33:849-858.

Liu X, Xue Y, Liu C, Lou Q, Wang J, Yanagita T, et al. Eicosapentaenoic acid-enriched phospholipid ameliorates insulin resistance and lipid metabolism in diet-induced-obese mice. Lipids Health Dis 2013b; 12:109.

Livesey G, Elia M. Estimation of energy expenditure, net carbohydrate utilization, and net fat oxidation and synthesis by indirect calorimetry: evaluation of errors with special reference to the detailed composition of fuels. Am J Clin Nutr 1988; 47:608-628.

Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD, et al. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. Science 2000; 288:2379-2381.

Longo KA, Charoenthongtrakul S, Giuliana DJ, Govek EK, McDonagh T, Distefano PS, et al. The 24-hour respiratory quotient predicts energy intake and changes in body mass. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2010; 298:R747-754.

Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. Nature 2000; 404:652-660.

Magliano DC, Bargut TC, de Carvalho SN, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and gamma are targets to treat offspring from maternal diet-induced obesity in mice. PLoS One 2013; 8:e64258.

Margareto J, Marti A, Martinez JA. Changes in UCP mRNA expression levels in brown adipose tissue and skeletal muscle after feeding a high-energy diet and relationships with leptin, glucose and PPARgamma. J Nutr Biochem 2001; 12:130-137.

Masoodi M, Kuda O, Rossmeisl M, Flachs P, Kopecky J. Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism. Biochim Biophys Acta 2015; 1851:503-518.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from

fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia 1985; 28:412-419.

Mercer SW, Trayhurn P. Effect of high fat diets on energy balance and thermogenesis in brown adipose tissue of lean and genetically obese ob/ob mice. J Nutr 1987; 117:2147-2153.

Monk JM, Jia Q, Callaway E, Weeks B, Alaniz RC, McMurray DN, et al. Th17 cell accumulation is decreased during chronic experimental colitis by (n-3) PUFA in Fat-1 mice. J Nutr 2012; 142:117-124.

Morrison SF, Madden CJ, Tupone D. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. Cell Metab 2014; 19:741-756.

Mottillo EP, Bloch AE, Leff T, Granneman JG. Lipolytic products activate peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and delta in brown adipocytes to match fatty acid oxidation with supply. J Biol Chem 2012; 287:25038-25048.

Muhlhausler BS, Cook-Johnson R, James M, Miljkovic D, Duthoit E, Gibson R. Opposing effects of omega-3 and omega-6 long chain polyunsaturated Fatty acids on the expression of lipogenic genes in omental and retroperitoneal adipose depots in the rat. J Nutr Metab 2010; 2010.

Murali G, Desouza CV, Clevenger ME, Ramalingam R, Saraswathi V. Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in promoting the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2014; 90:13-21.

Nadal-Casellas A, Bauza-Thorbrugge M, Proenza AM, Gianotti M, Llado I. Sex-dependent differences in rat brown adipose tissue mitochondrial biogenesis and insulin signaling parameters in response to an obesogenic diet. Mol Cell Biochem 2013; 373:125-135.

Nielsen AA, Jorgensen LG, Nielsen JN, Eivindson M, Gronbaek H, Vind I, et al. Omega-3 fatty acids inhibit an increase of proinflammatory cytokines in patients with active Crohn's disease compared with omega-6 fatty acids. Aliment Pharmacol Ther 2005; 22:1121-1128.

Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. Cell 2010; 142:687-698.

Overweight, obesity, and health risk. Arch Intern Med 2000; 160:898-904.

Peirce V, Carobbio S, Vidal-Puig A. The different shades of fat. Nature 2014; 510:76-83.

Penna-de-Carvalho A, Graus-Nunes F, Rabelo-Andrade J, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Enhanced pan-peroxisome proliferator-activated receptor gene

and protein expression in adipose tissue of diet-induced obese mice treated with telmisartan. Exp Physiol 2014; 99:1663-1678.

Perez-Matute P, Perez-Echarri N, Martinez JA, Marti A, Moreno-Aliaga MJ. Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha. Br J Nutr 2007; 97:389-398.

Pimentel GD, Lira FS, Rosa JC, Oller do Nascimento CM, Oyama LM, Harumi Watanabe RL, et al. High-fat fish oil diet prevents hypothalamic inflammatory profile in rats. ISRN Inflamm 2013; 2013:419823.

Proenca AR, Sertie RA, Oliveira AC, Campana AB, Caminhotto RO, Chimin P, et al. New concepts in white adipose tissue physiology. Braz J Med Biol Res 2014; 47:192-205.

Raclot T, Groscolas R, Langin D, Ferre P. Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissues. J Lipid Res 1997; 38:1963-1972.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr 1993; 123:1939-1951.

Renne U, Langhammer M, Brenmoehl J, Walz C, Zeissler A, Tuchscherer A, et al. Lifelong obesity in a polygenic mouse model prevents age- and diet-induced glucose intolerance- obesity is no road to late-onset diabetes in mice. PLoS One 2013; 8:e79788.

Richard D, Carpentier AC, Dore G, Ouellet V, Picard F. Determinants of brown adipocyte development and thermogenesis. Int J Obes (Lond) 2010; 34 Suppl 2:S59-66.

Roberts LD, Murray AJ, Menassa D, Ashmore T, Nicholls AW, Griffin JL. The contrasting roles of PPARdelta and PPARgamma in regulating the metabolic switch between oxidation and storage of fats in white adipose tissue. Genome Biol 2011; 12:R75.

Rosell M, Hondares E, Iwamoto S, Gonzalez FJ, Wabitsch M, Staels B, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and -gamma, and cAMP-mediated pathways, control retinol-binding protein-4 gene expression in brown adipose tissue. Endocrinology 2012; 153:1162-1173.

Rothwell NJ, Stock MJ. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. Nature 1979; 281:31-35.

Ruidavets JB, Bongard V, Dallongeville J, Arveiler D, Ducimetiere P, Perret B, et al. High consumptions of grain, fish, dairy products and combinations of these are associated with a low prevalence of metabolic syndrome. J Epidemiol Community Health 2007; 61:810-817.

Ruzickova J, Rossmeisl M, Prazak T, Flachs P, Sponarova J, Veck M, et al. Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. Lipids 2004; 39:1177-1185.

Sadurskis A, Dicker A, Cannon B, Nedergaard J. Polyunsaturated fatty acids recruit brown adipose tissue: increased UCP content and NST capacity. Am J Physiol 1995; 269:E351-360.

Saraswathi V, Gao L, Morrow JD, Chait A, Niswender KD, Hasty AH. Fish oil increases cholesterol storage in white adipose tissue with concomitant decreases in inflammation, hepatic steatosis, and atherosclerosis in mice. J Nutr 2007; 137:1776-1782.

Saraswathi V, Morrow JD, Hasty AH. Dietary fish oil exerts hypolipidemic effects in lean and insulin sensitizing effects in obese LDLR-/- mice. J Nutr 2009; 139:2380-2386.

Schachter HM, Reisman J, Tran K, Dales B, Kourad K, Barnes D, et al. Health effects of omega-3 fatty acids on asthma. Evid Rep Technol Assess (Summ) 2004:1-7.

Shetty S, Ramos-Roman MA, Cho YR, Brown J, Plutzky J, Muise ES, et al. Enhanced fatty acid flux triggered by adiponectin overexpression. Endocrinology 2012; 153:113-122.

Shi H, Akunuru S, Bierman JC, Hodge KM, Mitchell MC, Foster MT, et al. Diet-induced obese mice are leptin insufficient after weight reduction. Obesity (Silver Spring) 2009; 17:1702-1709.

Shimizu Y, Nikami H, Tsukazaki K, Machado UF, Yano H, Seino Y, et al. Increased expression of glucose transporter GLUT-4 in brown adipose tissue of fasted rats after cold exposure. Am J Physiol 1993; 264:E890-895.

Siriwardhana N, Kalupahana NS, Cekanova M, LeMieux M, Greer B, Moustaid-Moussa N. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. J Nutr Biochem 2013; 24:613-623.

Smink W, Gerrits WJ, Gloaguen M, Ruiter A, van Baal J. Linoleic and alpha-linolenic acid as precursor and inhibitor for the synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in liver and brain of growing pigs. Animal 2012; 6:262-270.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. Arquivos brasileiros de cardiologia, v.100, n.1, suplemento 3. Rio de Janeiro: SBC; 2013.

Stoeckel K, Nielsen LH, Fuhrmann H, Bachmann L. Fatty acid patterns of dog erythrocyte membranes after feeding of a fish-oil based DHA-rich supplement with a base diet low in n-3 fatty acids versus a diet containing added n-3 fatty acids. Acta Vet Scand 2011; 53:57.

Sugimoto S, Nakajima H, Kodo K, Mori J, Matsuo K, Kosaka K, et al. Miglitol increases energy expenditure by upregulating uncoupling protein 1 of brown adipose tissue and reduces obesity in dietary-induced obese mice. Nutr Metab (Lond) 2014; 11:14.

Switzer NJ, Mangat HS, Karmali S. Current trends in obesity: body composition assessment, weight regulation, and emerging techniques in managing severe obesity. J Interv Gastroenterol 2013; 3:34-36.

Takahashi Y, Ide T. Dietary n-3 fatty acids affect mRNA level of brown adipose tissue uncoupling protein 1, and white adipose tissue leptin and glucose transporter 4 in the rat. Br J Nutr 2000; 84:175-184.

Takeuchi H, Matsuo T, Tokuyama K, Shimomura Y, Suzuki M. Diet-induced thermogenesis is lower in rats fed a lard diet than in those fed a high oleic acid safflower oil diet, a safflower oil diet or a linseed oil diet. J Nutr 1995; 125:920-925.

Tschanz SA, Burri PH, Weibel ER. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. J Microsc 2011; 243:47-59.

Tsuchida A, Yamauchi T, Takekawa S, Hada Y, Ito Y, Maki T, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPARalpha, PPARgamma, and their combination. Diabetes 2005; 54:3358-3370.

Turk HF, Chapkin RS. Membrane lipid raft organization is uniquely modified by n-3 polyunsaturated fatty acids. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2013; 88:43-47.

Valenzuela R, Videla LA. The importance of the long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in development of non-alcoholic fatty liver associated with obesity. Food Funct 2011; 2:644-648.

van Schothorst EM, Flachs P, Franssen-van Hal NL, Kuda O, Bunschoten A, Molthoff J, et al. Induction of lipid oxidation by polyunsaturated fatty acids of marine origin in small intestine of mice fed a high-fat diet. BMC Genomics 2009; 10:110.

Wakutsu M, Tsunoda N, Shiba S, Muraki E, Kasono K. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)-independent functions of fish oil on glucose and lipid metabolism in diet-induced obese mice. Lipids Health Dis 2010; 9:101.

Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. Cell 2003; 113:159-170.

World Health Organization. Programme and Projects: Diabetes in World. Disponível em: <http://www.who.int/diabetes/en/>. Acesso em: 15 dez. 2014.

Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. Cell 2012; 150:366-376.

Wu LE, Samocha-Bonet D, Whitworth PT, Fazakerley DJ, Turner N, Biden TJ, et al. Identification of fatty acid binding protein 4 as an adipokine that regulates insulin secretion during obesity. Mol Metab 2014; 3:465-473.

Yamazaki T, Nakamori A, Sasaki E, Wada S, Ezaki O. Fish oil prevents sucrose-induced fatty liver but exacerbates high-safflower oil-induced fatty liver in ddy mice. Hepatology 2007; 46:1779-1790.

Yang ZH, Miyahara H, Iwasaki Y, Takeo J, Katayama M. Dietary supplementation with long-chain monounsaturated fatty acids attenuates obesity-related metabolic dysfunction and increases expression of PPAR gamma in adipose tissue in type 2 diabetic KK-Ay mice. Nutr Metab (Lond) 2013; 10:16.

Yin H, Liu W, Goleniewska K, Porter NA, Morrow JD, Peebles RS, Jr. Dietary supplementation of omega-3 fatty acid-containing fish oil suppresses F2-isoprostanes but enhances inflammatory cytokine response in a mouse model of ovalbumin-induced allergic lung inflammation. Free Radic Biol Med 2009; 47:622-628.

Yin H, Sathivel S. Physical properties and oxidation rates of unrefined menhaden oil (Brevoortia patronus). J Food Sci 2010; 75:E163-168.

Yu YH, Wang PH, Cheng WT, Mersmann HJ, Wu SC, Ding ST. Porcine peroxisome proliferator-activated receptor delta mediates the lipolytic effects of dietary fish oil to reduce body fat deposition. J Anim Sci 2010; 88:2009-2018.

Yu YH, Wu SC, Cheng WT, Mersmann HJ, Shen TL, Ding ST. The function of porcine PPARgamma and dietary fish oil effect on the expression of lipid and glucose metabolism related genes. J Nutr Biochem 2011; 22:179-186.

Zamosky L. The obesity epidemic. While America swallows $147 billion in obesity-related healthcare costs, physicians called on to confront the crisis. Med Econ 2013; 90:14-17.

Zhang W, Cline MA, Gilbert ER. Hypothalamus-adipose tissue crosstalk: neuropeptide Y and the regulation of energy metabolism. Nutr Metab (Lond) 2014; 11:27.

Zhao M, Chen X. Eicosapentaenoic acid promotes thermogenic and fatty acid storage capacity in mouse subcutaneous adipocytes. Biochem Biophys Res Commun 2014; 450:1446-1451.

APÊNDICE A – Comitê de ética em experimentação animal

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES

COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEUA/018/2013** sobre **"Efeito antiobesogênico do óleo de peixe: estudo experimental "**, sob a responsabilidade de **Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda,** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **27/05/2013.** Este certificado expira em **27/05/2017.**

Rio de Janeiro, 27 de Maio de 2013.

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Matrícula
(21) 2587-6486 / 2587-5109 - Fax (21) 2294-6749
biologia@uerj.br

APÊNDICE B – Artigo científico publicado

Eur J Nutr
DOI 10.1007/s00394-015-0834-0

ORIGINAL CONTRIBUTION

Mice fed fish oil diet and upregulation of brown adipose tissue thermogenic markers

Thereza Cristina Lonzetti Bargut · Anna Carolina Alves Gomes Silva-e-Silva · Vanessa Souza-Mello · Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda · Marcia Barbosa Aguila

Received: 6 November 2014 / Accepted: 8 January 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

APÊNDICE C – Artigo científico submetido

ScholarOne Manuscripts™ | Carlos Mandarim-de-Lacerda | Instructions & Forms | Help | Log Out

WILEY BioFactors

Main Menu / Authoring Dashboard / Submission Confirmation

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *BioFactors*.

Manuscript ID:	BIOF-15-0014
Title:	Fish oil intake: lesson from the model of diet-induced obesity in mice
Authors:	Bargut, Thereza Souza-Mello, Vanessa Mandarim-de-Lacerda, Carlos Aguila, Marcia
Date Submitted:	18-Feb-2015

Print | Return to Dashboard

SCHOLARONE™ THOMSON REUTERS™

© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2014. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.