

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELLE CRISTINA TONELLO PEQUITO

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DO ÓLEO DE PEIXE E
METFORMINA EM CAMUNDONGOS COM OBESIDADE-INDUZIDA PELA DIETA**



CURITIBA

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELLE CRISTINA TONELLO PEQUITO

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DO ÓLEO DE PEIXE E
METFORMINA EM CAMUNDONGOS COM OBESIDADE-INDUZIDA PELA DIETA**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de doutor em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

CURITIBA

2013

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Pequito, Danielle Cristina Tonello

Investigação dos efeitos da associação do óleo de peixe e metformina em camundongos com obesidade-induzida pela dieta. / Danielle Cristina Tonello Pequito. – Curitiba, 2013.

107 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Luiz Cláudio Fernandes

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Oleo de peixe 2. Obesidade 3. Diabetes 4. Tecido adiposo I. Título II. Fernandes, Luiz Cláudio III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.87

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

ATA DA TRECENTÉSIMA QUATRAGÉSIMA QUINTA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Aos dezanove dias do mês de Novembro de dois mil e treze, às 14h00min, nas dependências do Setor de Ciências Biológicas, reuniu-se a banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, composta pelos Profs: Drs. Dorly de Freitas Buchi(UFPR), Anderson Joel Martino Andrade (UFPR), Roberto Barbosa Bazotte (UEM), Luiz Fernando Pereira (PUCPR), e Luiz Cláudio Fernandes (Orientador e presidente da banca examinadora da UFPR), com a finalidade de julgar a Tese da candidata **Danielle Cristina Tonello Pequeto**, intitulada: "Investigação dos efeitos da associação do óleo de peixe e metformina em camundongos com obesidade induzida pela dieta", para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular. A candidata teve em torno de 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação e cada examinador, teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de mais 30 (trinta) minutos para resposta da candidata ou de 60 (sessenta) minutos, quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo orientador, Dr. Luiz Cláudio Fernandes. Após analisar a tese e arguida a candidata, os membros da banca examinadora deliberaram pela **APROVAÇÃO** habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Fisiologia. A emissão do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Examinador/Afiliação

Parecer

Assinatura

Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Profa. Dra. Dorly de Freitas Buchi
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Prof. Dr. Roberto Barbosa Bazotte
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof. Dr. Luiz Fernando Pereira
Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR

“O amor jamais acabará. As profecias desaparecerão, as línguas cessarão, a ciência desaparecerá. Atualmente, permanecem estas três: a fé, a esperança, o amor. Mas a maior delas é o amor.” Primeira Carta de São Paulo aos Coríntios, Capítulo 13.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais, à minha irmã e sua família, à minha nona, vó e à família Mazzardo Veloso por todo amor, carinho e apoio. Amo todos vocês.

Ao Uiliam, meu companheiro e amor de longa data, muito obrigada por me ajudar a ser uma pessoa cada vez melhor e mais forte. Muito obrigada por estar sempre presente. Amo você.

Ao Professor Dr. Luiz Cláudio Fernandes, pela oportunidade de trabalhar em uma área tão fascinante e pela orientação, sempre pronto a atender todos os seus alunos e pelo exemplo de profissional. Obrigada.

À Isa, pelo companheirismo nestes 8 anos de lab, muita coisa aprendemos juntas!

Aos colegas do laboratório de Metabolismo Celular (não citarei nomes, pra não correr o risco de esquecer alguém, todos foram muito importantes), pela companhia, pela amizade e pelos momentos de descontração, bem como por todo auxílio e empenho nos experimentos. Serei eternamente grata a todos.

Aos meus amigos sempre presentes, Marianna e Cassius, pela amizade, apoio e broncas necessárias. E agora Heleninha.

À todos os citados acima, sem vocês este trabalho nunca aconteceria, meus sinceros agradecimentos!

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Aos professores da banca.

Aos funcionários do biotério.

Aos animais utilizados nas pesquisas.

À Capes, Fundação Araucária e CNPQ pelo financiamento da pesquisa.

RESUMO

Obesidade e resistência à insulina são condições que apresentam como fator-chave o desenvolvimento do processo inflamatório. Dietas ricas em gordura saturada e/ou carboidratos de alto índice glicêmico promovem efeitos obesogênico e indutor de resistência à insulina. AGPI n-3 possui efeito antiaterogênico, antiinflamatório e sensibilizador à insulina. Metformina representa fármaco amplamente utilizado no tratamento da diabetes e é sensibilizador à insulina. O objetivo do presente trabalho foi avaliar se a suplementação com óleo de peixe e o tratamento com metformina são capazes de reverter resistência à insulina pré-estabelecida. Camundongos com seis semanas de idade foram alimentados com ração regular (R), hiperlipídica (HFD) ou rica em carboidratos (C) por período de 8 semanas para indução de obesidade e resistência à insulina. Após, foram divididos em 8 grupos: ração regular (R), ração regular suplementado com óleo de peixe (ROP), ração rica em carboidrato (C), ração rica em carboidrato suplementado com óleo de peixe (COP), ração hiperlipídica (HFD), ração hiperlipídica suplementado com óleo de peixe (HOP), ração hiperlipídica com administração de metformina (HFDMET) e ração hiperlipídica suplementado com óleo de peixe mais administração de metformina (HOPMET). Os respectivos tratamentos ocorreram por período de 4 semanas. Após 8 semanas, os grupos C e HFD desenvolveram ganho excessivo de massa corporal. O grupo HFD ainda foi intolerante à glicose. Óleo de peixe em associação com metformina não foi capaz de reverter estado de resistência à insulina, entretanto o grupo HFDMET apresentou redução da hiperinsulinemia. Os grupos HFD e C apresentaram aumento na taxa lipolítica basal, enquanto o grupo HFD mostrou menor resposta lipolítica frente ao estímulo com adrenalina. Acúmulo de lipídios hepáticos (triacilglicerol e colesterol) foi observado no grupo C, enquanto no grupo HFD ocorreu depósito somente de triacilglicerol, além de acúmulo de glicogênio hepático. Óleo de peixe (HOP), isoladamente foi capaz de reduzir a concentração plasmática de TNF- α , mas não em associação com metformina. Adiponectina foi aumentada pela associação de óleo de peixe com metformina (HOPMET). Infiltração de linfócitos T CD4 foi aumentada por óleo de peixe (ROP), acompanhada de redução na razão CD4/CD8, no tecido adiposo epididimal. Ração hiperlipídica (HFD) resultou em redução no número de linfócitos T CD4, no tecido adiposo retroperitoneal. Óleo de peixe isoladamente (HOP) foi capaz de aumentar macrófagos positivos para CD11c, bem como aumentar a razão CD11c/CD206 no tecido adiposo epididimal. A associação de óleo de peixe e metformina (HOPMET) também resultou em aumento no número de macrófagos positivos para CD11c, bem como a razão CD11c/CD206 no tecido adiposo epididimal. Incorporação de EPA e DHA foi melhor no tecido adiposo epididimal do grupo ROP quando comparado à dos grupos COP e HOP. Assim, óleo de peixe isoladamente ou em associação com metformina não foi capaz de reverter resistência à insulina pré-estabelecida.

Palavras-chave: óleo de peixe, obesidade, diabetes, metformina, tecido adiposo, resistência à insulina.

ABSTRACT

Obesity and insulin resistance are conditions that present the inflammatory process as a key factor. High fat and/or high glycemic index carbohydrate diets promote obesogenic effects and induce insulin resistance. N-3 PUFA has anti-atherogenic, anti-inflammatory and insulin sensitizing effects. Metformin has been widely used for the treatment of diabetes and acts as an insulin sensitizer. The objective of this study was to evaluate whether fish oil supplementation and metformin treatment are able to reverse preexisting insulin resistance. Six weeks old mice were fed with regular (R), high fat (HFD) or high carbohydrate (C) for 8 weeks to induce obesity and insulin resistance. Animals were divided into 8 groups: regular diet (R), regular diet supplemented with fish oil (ROP), high carbohydrate diet (C), high carbohydrate supplemented with fish oil (COP), high fat diet (HFD), high fat diet supplemented with fish oil (HOP), high fat diet treated with metformin (HFDMET) and high fat diet supplemented with fish oil and treated with metformin (HOPMET). The respective treatments lasted 4 weeks. After 8 weeks, C and HFD group developed excessive gain body mass. The HFD group was glucose intolerant. Fish oil in association with metformin were not able to reverse insulin resistance, however HFDMET group reduced hyperinsulinemia. C and HFD groups showed an increase in lipolytic basal rate, while HFD group demonstrated lower lipolytic response to epinephrine stimulation. Hepatic lipids accumulation (triacylglycerol and cholesterol) was observed in C group while HFD group only demonstrated triacylglycerol deposit and hepatic glycogen accumulation. Fish oil (HOP) was able to reduce plasma TNF- α concentration but not in combination with metformin. Adiponectin was increased by the combination of fish oil with metformin (HOPMET). T CD4 lymphocytes infiltration was increased by fish oil (ROP) accompanied by a reduction in the CD4/CD8 ratio in epididymal adipose tissue. High fat diet resulted in a reduction in T CD4 lymphocytes in retroperitoneal adipose tissue. Fish oil alone (HOP) was able to increase macrophages CD11c positives and increased CD11c/CD206 ratio in epididymal adipose tissue. Fish oil and metformin association also increased CD11c macrophages, as well CD11c/CD206 ratio in epididymal adipose tissue. EPA and DHA incorporation in ROP group was higher when compared to COP and HOP groups in epididymal adipose tissue. Thus, fish oil alone or in association with metformin was not able to reverse preexisting insulin resistance.

Key words: fish oil, obesity, diabetes, metformin, adipose tissue, insulin resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 – Via de sinalização da insulina (SALTIEL; KHAN, 2001).23
- FIGURA 2 – Ganho de massa corporal dos animais alimentados com ração regular (R), rica em carboidrato (C) e rica em lipídios (HFD), após o período inicial de 8 semanas. ^ap<0,001 versus grupo R. ^bp<0,0001 versus grupo C. ^cp<0,0001 versus R.42
- FIGURA 3 – Teste de tolerância á glicose intraperitoneal (ipGTT) dos animais alimentados com ração regular (R), rica em carboidratos (C) e rica em lipídios (HFD) realizado 8 semanas após o início do experimento. ^ap<0,05 versus grupo R. ^bp<0,05 versus grupo C.43
- FIGURA 4 – Área sob a curva (AUC) glicêmica após teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT) dos animais alimentados com ração regular (R), rica em carboidratos (C) e rica em lipídios (HFD). ^ap<0,0001 versus grupo R. ^bp<0,0001 versus grupo C.44
- FIGURA 5 - Teste de tolerância á glicose intraperitoneal (ipGTT) após período de tratamento (4 semanas) dos animais, suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^ap<0,05 versus R. ^bp<0,0001 versus R. ^cp<0,0001 versus C. ^dp<0,0001 versus ROP. ^ep<0,0001 versus COP. ^fp<0,05 versus HOP. ^gp<0,001 versus C. ^hp<0,01 versus R. ⁱp<0,05 versus C. ^jp<0,001 versus C. ^kp<0,01 versus COP. ^lp<0,01 versus ROP. ^mp<0,001 versus COP. ⁿp<0,05 versus HFD.46
- FIGURA 6 - Área sob a curva glicêmica (AUC) dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET), após período de tratamento (4 semanas). ^ap<0,0001 vs R ^bp<0,0001 vs ROP ^cp<0,001 vs C ^dp<0,0001 vs COP.47
- FIGURA 7 – Insulinemia dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^ap<0,05 vs R; ^bp<0,05 vs COP; ^cp<0,05 vs HFD.48
- FIGURA 8 – Colesterol hepático (mg/g tecido) dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^ap<0,001 vs R; ^bp<0,05 vs C.51
- FIGURA 9 – Triacilglicerol hepático (mg/g tecido) referente aos animais suplementados

ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^ap<0,0001 vs R; ^bp<0,001 vs R; ^cp<0,05 vs C; ^dp<0,001 vs ROP; ^ep<0,0001 vs ROP.51

FIGURA 10 – Glicogênio hepático ($\mu\text{mol/g}$ tecido) dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^ap<0,01 vs R; ^bp<0,01 vs C.52

FIGURA 11 – Lipólise (mg/dL/mg tecido) na ausência e presença de adrenalina à partir do tecido adiposo incubado dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). [#]p<0,05 vs seu controle não estimulado; ^ap<0,05 vs R; ^bp<0,05 vs ROP; ^cp<0,01 vs R; ^dp<0,05 vs R+A; ^ep<0,01 vs ROP+A; ^fp<0,001 vs C+A; ^gp<0,05 vs ROP+A.53

FIGURA 12 – Concentração plasmática de TNF- α dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^ap<0,05 vs ROP, ^bp<0,05 vs HFD; ^cp<0,05 vs HOP.55

FIGURA 13 – Concentração plasmática de adiponectina dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^ap<0,05 vs ROP; ^bp<0,05 vs HFDMET.56

FIGURA 14 – Infiltração de linfócitos no tecido adiposo epididimal dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). **A** ^ap<0,05 vs R. ^bp<0,001 vs ROP. **C** ^ap<0,05 vs R. ^bp<0,0001 vs ROP.57

FIGURA 15 – Infiltração de macrófagos no tecido adiposo epididimal dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). **A** ^ap<0,01 vs ROP. ^bp<0,0001 vs HFD. ^cp<0,05 vs HFDMET. **C** ^ap<0,05 vs R. ^bp<0,05 vs HFDMET.59

FIGURA 16 – Infiltração de linfócitos no tecido adiposo retroperitoneal dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica

em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). **C**^a $p < 0.05$ vs R. ^b $p < 0.05$ vs ROP.61

FIGURA 17 – Infiltração de macrófagos no tecido adiposo retroperitoneal dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). **A**^a $p < 0,05$ vs C. **C**^a $p < 0,05$ vs C ^b $p < 0,05$ vs HFD.62

FIGURA 18 – Razão n6/n3 de ácidos graxos no tecido adiposo epididimal de animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP) e hiperlipídica (HFD, HOP). Os animais alimentados com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe também receberam metformina (HFDMET, HOPMET).64

FIGURA 19 – Razão n6/n3 de ácidos graxos no tecido adiposo retroperitoneal de animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP) e hiperlipídica (HFD, HOP). Os animais alimentados com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe também receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^a $p < 0,01$ vs R; ^b $p < 0,05$ vs R; ^c $p < 0,05$ vs C.65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Composição das dietas rica em carboidratos e hiperlipídica, em g/kg.	34
TABELA 2 – Conteúdo calórico das dietas rica em carboidrato e hiperlipídica (kcal%). ..	34
TABELA 3 – Conteúdo calórico da ração regular Nuvilab CR1 (Quimtia [®]) (kcal%).	34
TABELA 4 – Ganho de massa dos animais, suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^a p<0,05 versus R. ^b p<0,01 versus ROP. ^c p<0,001 versus ROP.....	45
TABELA 5 – Massa dos tecidos (g) dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^a p<0,0001 vs R. ^b p<0,0001 vs ROP. ^c p<0,05 vs COP. ^d p<0,0001 vs COP. ^e p<0,05 vs HFD.	49
TABELA 6 – Diâmetro médio dos adipócitos (µm) dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). Tecido adiposo epididimal – ^a p<0,0001 vs R; ^b p<0,01 vs ROP; ^c p<0,05 vs ROP; ^d p<0,001 vs R; ^e p<0,05 vs C; ^f p<0,05 vs HFD; ^g p<0,05 vs HFDMET. Tecido adiposo retroperitoneal – ^a p<0,0001 vs R; ^b p<0,001 vs ROP; ^c p<0,0001 vs HFD; ^d p<0,001 vs COP; ^e p<0,05 vs HFD; ^f p<0,05 vs HFDMET.....	50
TABELA 7 – Perfil de ácidos graxos no tecido adiposo epididimal de animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP) e hiperlipídica (HFD, HOP). Os animais alimentados com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe também receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^a p<0,05 vs HFD; ^b p<0,05 vs R; ^c p<0,01 vs C; ^d p<0,0001 vs R; ^e p<0,0001 vs ROP; ^f p<0,001 vs C; ^g p<0,001 vs COP; ^h p<0,001 vs ROP; ⁱ p<0,01 vs ROP; ^j p<0,0001 vs C; ^k p<0,0001 vs COP; ^l p<0,05 vs ROP.	63
TABELA 8 – Perfil de ácidos graxos no tecido adiposo retroperitoneal de animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP) e hiperlipídica (HFD, HOP). Os animais alimentados com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe também receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^a p<0,05 vs HFD; ^b p<0,05 vs R; ^c p<0,0001 vs R; ^d p<0,05 vs ROP; ^e p<0,05 vs C; ^f p<0,05 vs COP.	65

LISTA DE SIGLAS

ACC – acetyl Coa carboxylase
PUFA – polyunsaturated fatty acids
AMPK – 5' AMP-activated protein kinase
AIN – american institute of nutrition
AUC – area under curve
CCR – C-C chemokine receptor
ChREBP – carbohydrate-responsive element-binding protein
CVD – cardiovascular disease
DHA – docosahexaenoic acid
EPA – eicosapentaenoic acid
ERK – extracellular signal-regulated kinases
FAS – fatty acids synthase
G6Pase – glucose-6-fosfatase
GLUT4 – glucose transporter type 4
Grb2 – growth factor receptor-bound protein-2
GSK3 – glycogen synthase kinase-3
IFN γ - interferony
IKK β – IkappaB kinase β
IL – interleukin
IR – insulin receptor
IRS-1 – insulin receptor substrate type 1
JNK – c-jun N-terminal kinase
HSL – hormone-sensitive lipase
LPL – lipase lipoprotein
LPS – lipopolysaccharide
LXR – liver X receptor
MCP-1 – monocyte chemotactic protein-1
NF κ B – nuclear factor κ B
NLRP3 – NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3

P38MAPK – p38 mitogen-activated protein kinase

PAI-1 – plasminogen activator inhibitor-1

PCR – protein C reative

PEPCK – phosphoenolpiruvate carboxikinase

PI3K – phosphoinositide-3 kinase

PKC – protein kinase C

PPAR – peroxissome proliferator-activated receptor

SH2 – Src homology-2 domain

SOCS – supressor of cytokine signaling proteins

SREBP1c – steroidal regulatory element-binding proteins 1c

TLR4 – toll-like receptor-4

TNF- α – tumoral necrose factor- α

UCP – uncoupling proteins

VLDL – very low density lipoprotein

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1 OBESIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA	16
1.2 INFLAMAÇÃO: LIGAÇÃO ENTRE OBESIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA.....	23
1.3 ÓLEO DE PEIXE	26
1.4 METFORMINA	28
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 ANIMAIS.....	33
4.2 INDUÇÃO DA OBESIDADE	33
4.3 INTERVENÇÕES TERAPÊUTICAS.....	34
4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	35
4.5 TESTE INTRAPERITONEAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (ipGTT)	36
4.6 INCUBAÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO.....	36
4.7 ATIVIDADE LIPOLÍTICA DO TECIDO ADIPOSEO.....	37
4.8 ISOLAMENTO DE ADIPÓCITOS E DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO	37
4.9 IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS IMUNITÁRIAS NO ESTROMA VASCULAR DO TECIDO ADIPOSEO.....	37
4.10 PRODUÇÃO DE CITOCINAS	38
4.11 CONTEÚDO DE LIPÍDIOS NO TECIDO HEPÁTICO (LIPOGÊNESE HEPÁTICA).....	38
4.12 GLICOGÊNIO HEPÁTICO	39
4.13 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)	40
4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5 RESULTADOS	42
5.1 INDUÇÃO DA OBESIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA.....	42
5.2 EFEITOS DAS INTERVENÇÕES TERAPÊUTICAS EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	45
5.3 EFEITOS DO ÓLEO DE PEIXE E METFORMINA NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA ASSOCIADA À OBESIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA....	54
6 DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÃO	92
REFERÊNCIAS	94
ANEXOS	107

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 OBESIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA

Obesidade, considerada epidemia, está crescendo de forma preocupante e representa um problema de saúde pública em países industrializados (PEREIRA-LANCHETA *et al.*, 2010). Obesidade é fator de risco para diversas comorbidades, tais como dislipidemias, doença aterosclerótica, resistência à insulina e diabetes *mellitus* tipo 2 (WIESER *et al.*, 2013). Existe estreita relação entre obesidade e resistência à insulina, o que explicaria a ocorrência de diabetes tipo 2. Durante a resistência à insulina, o pâncreas do indivíduo obeso ainda é capaz de produzir insulina, a qual pode compensar a reduzida tolerância à glicose, permanecendo o indivíduo com glicemia normal, entretanto quando as células beta-pancreáticas falham (exaustão) ocorre incapacidade destas células secretarem insulina, assim aparecendo o quadro de diabetes e, como consequência hiperglicemia (KAHN *et al.*, 2006).

Obesidade é compreendida como depósito excessivo de gordura corporal, principalmente no tecido adiposo (TCHERNOF; DESPRÉS, 2013), sendo doença complexa desenvolvendo-se de interações genéticas, ambientais, metabólicas, culturais e sociais (REMESH, 2013). O ambiente desempenha fator mais importante no aparecimento da obesidade (PERSSON; PERSSON, 2013). A importância metabólica do tecido adiposo pode ser vista através de sua contribuição para a massa corporal, a qual pode atingir até 40% em indivíduos obesos (TRAYHURN, 2013). O excesso de calorias dietéticas promove balanço energético positivo associado com estoque de triacilglicerol no tecido adiposo. De maneira simplista, foi considerada como única função do tecido adiposo, o armazenamento de gordura. Hoje, se sabe que este tecido possui importante função endócrina de controle do metabolismo.

1.1.1 Tecido adiposo na obesidade

O tecido adiposo é constituído de adipócitos e de células do estroma vascular. Este tecido apresenta a função básica de armazenamento de ácidos graxos dietéticos

na forma de triacilglicerol, um importante papel de controle da homeostasia energética (PUGLISI *et al.*, 2011). A fração de células que compõem o estroma vascular é formada por pré-adipócitos, células-tronco mesenquimais, macrófagos, células mesenquimais e fibroblastos (STRYJECKI; MUTCH, 2011). É reconhecido que algumas destas células apresentam importantes funções no metabolismo.

O tecido adiposo apresenta, como uma de suas funções mais reconhecidas, o equilíbrio energético. Isto pode ser observado pelos processos de lipogênese e lipólise. O balanço entre estes dois processos promove o armazenamento de lipídios em situações de balanço energético positivo (alimentado) e a degradação dos mesmos quando há balanço energético negativo (jejum) (ZECHNER *et al.*, 2012). Este processo é controlado por diversos hormônios, como a insulina e a adrenalina. Insulina representa hormônio anabólico envolvido com estímulo da lipogênese, enquanto a adrenalina promove a lipólise. É sabido que as taxas de lipólise no tecido adiposo obeso são maiores, inclusive com diferenças entre o tecido adiposo visceral e subcutâneo, sendo o primeiro com maior taxa lipolítica (PATEL; ABATE, 2013; PUGLISI *et al.*, 2011). Isto pode ser decorrente de menor sensibilidade à insulina, reconhecida por regular para baixo as enzimas envolvidas na lipólise, como lipase hormônio sensível. Além disso, estudos têm demonstrado que o estado obeso pode ser acompanhado por redução da sensibilidade à adrenalina, resultando em menor efeito lipolítico (LANGIN *et al.*, 2005). O aumento da lipólise no indivíduo obeso e resistente à insulina é capaz de aumentar a liberação de ácidos graxos livres para a circulação, os quais podem ativar vias de sinalização pró-inflamatórias, principalmente por meio do receptor Toll-like. Assim, a maior atividade lipolítica do tecido adiposo pode ser um dos mecanismos pelos quais a obesidade se associa à resistência à insulina (COELHO *et al.*, 2013).

O papel endócrino do tecido adiposo foi avaliado através da descoberta de uma molécula anteriormente reconhecida como sinal lipostático. A injeção desta molécula, hoje sabidamente confirmada como leptina (*leptos* significa fino) em camundongos geneticamente obesos (*ob/ob*) é capaz de restaurar a homeostasia energética, por promover redução da ingestão alimentar e da massa de gordura dos animais (GALIC *et al.*, 2010). Isto foi associado com a observação pelo experimento de Hostamiligil *et al.*

(1993) de que um importante mediador inflamatório, fator- α de necrose tumoral (TNF- α), é secretado e tem o seu RNAm expresso pelo tecido adiposo de animais obesos e contribui para o desencadeamento da resistência à insulina pela regulação “pra baixo” do RNAm de GLUT4 no mesmo tecido. Além da leptina e TNF- α , sabe-se agora que o tecido adiposo é capaz de secretar diversas moléculas de sinalização, chamadas de adipocinas. Assim, fica clara a função endócrina deste tecido (STRYJECKI; MUTCH, 2011). Estas adipocinas atuam em diversos processos, como regulação da pressão arterial, metabolismo lipídico, imunidade, inflamação, sensibilidade à insulina, homeostasia energética e apetite (STRYJECKI; MUTCH, 2011). Na obesidade, o excesso de calorias armazenadas acarreta alterações funcionais do adipócito, processo de disfunção do adipócito associado com hipertrofia e hiperplasia. Dentre as modificações relacionadas estão a alteração da expressão gênica, que resulta em resistência à insulina do adipócito, produção de adipocinas, ácidos graxos livres e mediadores inflamatórios (ATTIE; SCHERER, 2009; FERRANTI; MOZAFFARIAN, 2008). Além desta reconhecida capacidade secretória, os diferentes tipos de tecido adiposo possuem funções diferenciadas.

Diferentes tipos de tecido adiposo apresentam perfis metabólicos diferentes. Isto fica evidente quando se compara tecido adiposo visceral e subcutâneo. O primeiro está mais positivamente envolvido com as alterações metabólicas da obesidade, principalmente pela sua localização. Sua proximidade com o fígado permite que os ácidos graxos livres liberados entrem diretamente na veia porta hepática, tendo acesso direto ao fígado, promovendo maior deposição de triacilgliceróis hepáticos além da ativação que causam no processo inflamatório. Além disso, este tecido apresenta maiores concentrações de IL6 e do inibidor-1 do ativador do plasminogênio (PAI-1). (PATEL; ABATE, 2013; COELHO *et al.*, 2013). Entretanto, tecido adiposo subcutâneo também possui importante papel no desenvolvimento de resistência à insulina. Neste tecido há maiores concentrações de leptina e adiponectina (COELHO *et al.*, 2013). Na verdade, o excesso de gordura depositada nos dois tipos de tecido adiposo correlaciona-se positivamente com resistência à insulina, principalmente pela maior liberação de ácidos graxos livres por estes tecidos. Como citado anteriormente, quando o adipócito torna-se resistente à insulina ocorre aumento na taxa lipolítica, uma vez que

insulina inibe a enzima lipase hormônio-sensível (LHS), acarretando em maior liberação destes ácidos graxos livres na circulação. Isto desencadeia a geração de metabólitos tóxicos, como ceramidas, que juntamente com os ácidos graxos livres depositam-se no músculo e fígado, aonde reduzem a sinalização da insulina, gerando resistência à insulina nestes tecidos. Uma das formas que ácidos graxos livres induzem resistência à insulina é através do estímulo de vias inflamatórias, como do IKK β e, conseqüentemente NF κ B e da JNK. Ativação do receptor Toll-Like 4 é responsável por este efeito. (KASHYAP; DEFRONZO, 2007; KIM *et al.*, 2007).

O aumento da massa do tecido adiposo durante a obesidade decorre principalmente da hipertrofia do adipócito, entretanto é possível que a diferenciação de pré-adipócitos também ocorra (adipogênese). Adipócitos hipertrofiados normalmente apresentam estresses celulares, como do retículo endoplasmático e da mitocôndria, promovendo a ativação de vias de sinalização de resposta ao estresse, como as vias da quinase N-terminal de c-jun (JNK) e da quinase ativada por mitógeno (p38MAPK), as quais estão envolvidas na geração de resistência à insulina nos adipócitos (BLÜHER, 2013; FERRANTI; MOZAFFARIAN, 2008). Dentro do adipócito, JNK é capaz de reduzir a ação da insulina pela fosforilação de IRS-1 em resíduos serina. O mesmo ocorre no músculo esquelético e fígado (FERRANTI; MOZAFFARIAN, 2008). Em adição a isso, estresse oxidativo também está presente no tecido adiposo obeso e, é observado em nível sistêmico, caracterizando este estado (BLÜHER, 2013; FERRANTI; MOZAFFARIAN, 2008).

Acompanhando este processo de hipertrofia do adipócito, ocorrem alterações do padrão de secreção de adipocinas, as quais são caracterizadas por padrão pró-inflamatório, aterogênico e diabetogênico. Assim, a mudança do padrão de secreção de adipocinas relacionam a disfunção do tecido adiposo obeso aos resultados indesejáveis no metabolismo, sendo estas adipocinas consideradas biomarcadores pois estão ligadas com inflamação e sensibilidade à insulina (BLÜHER, 2013). Além disso, certas adipocinas podem também induzir resistência à insulina estimulando vias pró-inflamatórias pelos próprios adipócitos ou pelos macrófagos residentes, como o TNF- α , IL-6 e MCP-1 (BLÜHER, 2013).

Adiponectina é uma abundante proteína plasmática secretada exclusivamente pelo tecido adiposo que apresenta capacidade de melhorar a sensibilidade à insulina pela ativação da quinase ativada por AMP (AMPK). Os efeitos metabólicos desta adipocina consistem em aumento da β -oxidação de ácidos graxos e da captação de glicose no músculo esquelético e tecido adiposo (GALIC *et al.*, 2010). Existe forte correlação negativa entre as concentrações plasmáticas de adiponectina e o conteúdo de massa de gordura. Adiponectina atua via ligação com dois tipos de receptores, chamados de AdipoR1 e AdipoR2. Sendo o primeiro expresso predominantemente no músculo esquelético, e o segundo expresso em maiores concentrações no fígado (BONNARD *et al.*, 2008). Esta adipocina apresenta, ainda, efeitos antiinflamatórios que justificam seus efeitos benéficos na resistência à insulina, além de seus efeitos metabólicos nas vias de sinalização da insulina. Alguns estudos mostram que existe forte correlação positiva entre as concentrações de RNAm da adiponectina e do PPAR γ , sugerindo que PPAR γ pode regular a expressão de adiponectina (LI, 2008). Além do efeito da adiponectina de reduzir a produção de TNF- α por macrófagos, explicando seu efeito anti-inflamatório e anti-aterogênico (BASTARD *et al.*, 2006; TRAYHURN, 2005).

TNF- α é uma citocina pró-inflamatória relacionada, positivamente, com a resistência à insulina, principalmente por sua capacidade de afetar as vias de sinalização da insulina em tecidos-alvo, como tecido adiposo e músculo esquelético. O tecido adiposo obeso apresenta elevadas concentrações de RNAm de TNF- α , associado com maior secreção desta citocina. Ao mesmo tempo, há menor secreção de adiponectina. Assim, existe relação inversa entre TNF- α e adiponectina. É reconhecido que adipócitos podem secretar esta citocina, mas acredita-se que a principal fonte sejam os macrófagos que residem no tecido adiposo. Foi após a observação da produção de mediadores inflamatórios pelo tecido adiposo, que postulou-se a existência de quadro de inflamação crônica associado com a obesidade, sendo relacionada com a resistência à insulina (COELHO *et al.*, 2013; OTA, 2013).

Obesidade e diabetes tipo 2 são associados pela resistência à insulina e representam importantes fatores de risco para doenças cardiovasculares (CVD). Indivíduos com dislipidemia, hipertensão e demais fatores de risco para CVD possuem

como fator central resistência à insulina (DEFRONZO, 2010). Este é um conceito amplo que abrange a interligação entre o elevado consumo de nutrientes e o desencadeamento de vias inflamatórias que afetam negativamente as vias de sinalização insulínicas.

Uma das formas de entender a ligação entre obesidade e resistência à insulina é pela sinalização realizada por lipídios, principalmente por meio de seus intermediários (diacilgliceróis e ceramidas) depositados no músculo esquelético e fígado. Estes intermediários lipídicos tóxicos agem como segundos mensageiros. Diacilgliceróis são capazes de ativar proteínas quinases C (PKC), uma família de serina/treonina quinases. A ativação de PKC é capaz de afetar, negativamente, a sinalização insulínica. (SAMUEL; SHULMAN, 2012).

Toll-Like 4 é receptor de reconhecimento padrão (reconhece padrões moleculares conservados associados a patógenos) capaz de ligar a porção lipídica (lipídio A) do lipopolissacarídeo (LPS), desencadeando a ativação de moléculas envolvidas com vias de sinalização inflamatória, tais como IKK β e NF κ B, além de JNK. Entretanto, é reconhecido que este receptor é também capaz de ligar-se à ácidos graxos saturados, tais como ácido láurico e ácido palmítico, promovendo assim ligação entre excesso de nutrientes dietéticos, inflamação e resistência à insulina. Inclusive, a perda de função deste receptor previne o desenvolvimento de obesidade e resistência à insulina induzida pela dieta (KIM *et al.*, 2007; TSUKUMO *et al.*, 2007; SAMUEL; SHULMAN, 2012). Assim, pode-se observar a estreita ligação entre obesidade, resistência à insulina e inflamação.

1.1.2 Vias de Sinalização Insulínicas

Por ser hormônio protéico, a insulina deve-se ligar em receptores de membrana plasmática para exercer seu efeito. Esse receptor de membrana é uma glicoproteína heterotetramérica que possui atividade quinase, formada por duas subunidades α , que apresentam o sítio de ligação à insulina e duas β , responsáveis pela atividade tirosina quinase, sendo que ambas são unidas por ligações dissulfeto (CARVALHEIRA *et al.*, 2002; HABER *et al.*, 2001). Após esta ligação, é ativada uma cascata de sinalização no

interior das células iniciando-se pela autofosforilação do receptor acompanhada da fosforilação de diversas moléculas. Um componente desta via é o substrato do receptor da insulina-1 (IRS-1), o qual participa como mediador-chave dos efeitos metabólicos da insulina, como na homeostasia glicêmica. Em situações fisiológicas, IRS-1 é fosforilado em resíduos tirosina pela atividade quinase do receptor da insulina (IR). Após sua fosforilação, IRS-1 atua como sítio de ancoragem para substratos citosólicos que contém domínios específicos de reconhecimento SH2 (reconhecem resíduos tirosina fosforilados). Um destes substratos reconhecidos inclui a subunidade regulatória (p85) da enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) que é capaz de fosforilar o anel inositol de fosfatidilinositóis presentes na membrana plasmática, além de ligar-se à enzima proteína quinase B (Akt). Isto resulta em translocação de vesículas contendo o transportador de glicose 4 (GLUT4) para a membrana plasmática e aumento da síntese de glicogênio, por meio da inativação da enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK3). Além deste efeito no metabolismo da glicose, insulina também ativa a sintase de óxido nítrico, regulando a produção deste importante vasodilatador com propriedades anti-aterogênicas (SCHENK, SABERI, OLEFSKY, 2008; MUOIO; CEFALU, 2001; DEFRONZO, 2010; CARVALHEIRA *et al.*, 2002; HABER *et al.*, 2001).

Além deste efeito metabólico, insulina também é capaz de afetar vias de crescimento e diferenciação celular, pela ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), por meio da interação de IRS-1 com Grb2, ativando o complexo Ras. O efeito final é a promoção do crescimento, proliferação e diferenciação celular (DEFRONZO, 2010).

O conhecimento do mecanismo de ação molecular da insulina é de suma importância, visto a alta prevalência de doenças como diabetes *mellitus* tipo 2 e obesidade, entre outras, que têm como um dos fatores desencadeantes a resistência à insulina (HABER *et al.*, 2001).

As vias de sinalização da insulina podem ser resumidas no esquema abaixo:

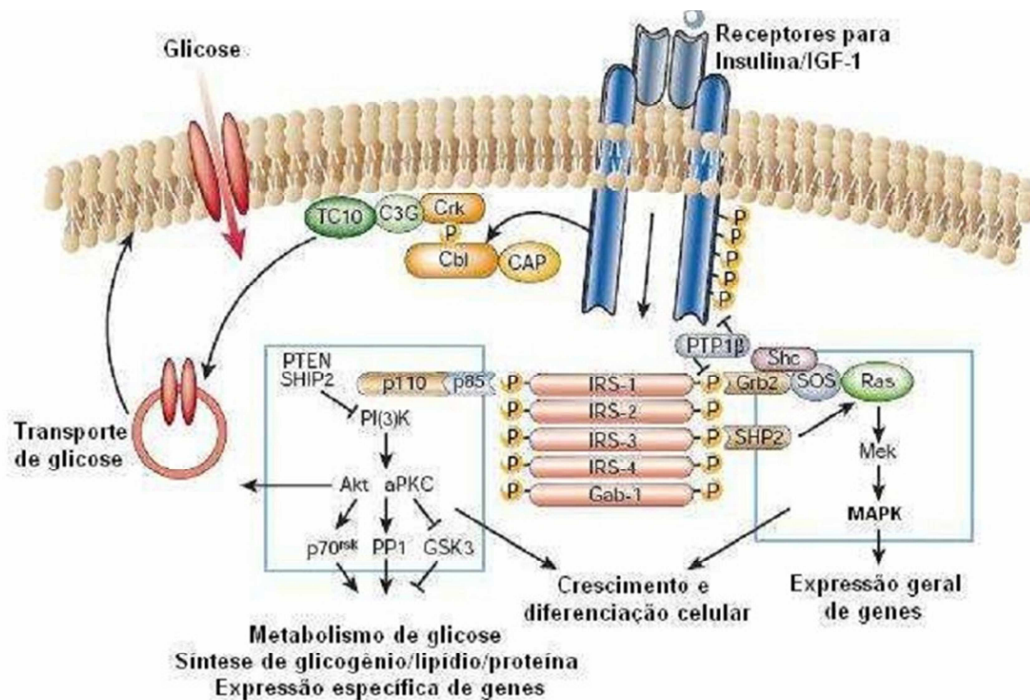


FIGURA 1 – Via de sinalização da insulina (SALTIEL; KHAN, 2001).

1.2 INFLAMAÇÃO: LIGAÇÃO ENTRE OBESIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA

Obesidade está associada à condição inflamatória crônica no tecido adiposo caracterizada por produção anormal de adipocinas e mediadores pró-inflamatórios pelo próprio adipócito ou pelos macrófagos e linfócitos T infiltrados no tecido adiposo obeso (GUTIERREZ *et al.*, 2009; LUMENG *et al.*, 2007). Esta infiltração de células imunitárias bem como a disfunção dos adipócitos possui importante papel no desencadeamento da resistência à insulina e doenças cardiovasculares associadas à obesidade (SULTAN *et al.*, 2009; BASTARD *et al.*, 2006).

O principal mecanismo pelo qual a insulina pode ser negativamente regulada consiste na fosforilação de certos resíduos serina do IRS-1, impedindo *downstream* a via de sinalização insulínica. Alguns sinais pró-inflamatórios existentes na obesidade, tais como ácidos graxos, algumas citocinas e adipocinas podem estimular quinases

capazes de fosforilar resíduos serina, chamadas de serina quinases. Dentre elas, pode-se citar a quinase do I κ B (IKK) responsável pela ativação do fator κ B nuclear (NF κ B) e a quinase N-terminal do fator de transcrição c-jun (JNK). IKK e JNK são componentes de duas das principais vias de sinalização pró-inflamatórias e, portanto permitem ligação entre obesidade, inflamação e resistência à insulina (SCHENK, SABERI, OLEFSKY, 2008; SULTAN *et al.*, 2009).

As principais fontes destas citocinas pró-inflamatórias derivadas do tecido adiposo são as células imunitárias infiltradas, principalmente linfócitos T e macrófagos. É reconhecido que o padrão de citocinas liberadas pelos linfócitos pode resultar no recrutamento e polarização de macrófagos. Diversas quimiocinas têm envolvimento neste recrutamento de células imunitárias, como MCP-1 (proteína-1 quimiotática de monócitos) que, após ligação ao seu receptor CCR2 atrai monócitos da circulação para os tecidos. A quimiocina CCR5 também é capaz de promover este recrutamento, além de outras que ainda serão identificadas. Assim, estes macrófagos que infiltram o tecido adiposo são recrutados à partir de monócitos circulantes por meio das quimiocinas (OTA, 2013; ATTIE; SCHERER, 2009). A expansão do tecido adiposo na obesidade resulta em redução do fornecimento de oxigênio levando à morte do adipócito. Neste caso, o recrutamento de macrófagos ocorre com o objetivo de remover os restos celulares e remodelar o tecido (SCHENK, SABERI, OLEFSKY, 2008).

Linfócitos T podem ser classificados em linfócitos T citotóxicos (linfócitos T CD8) ou linfócitos T helper (linfócitos T CD4). Os últimos dividem-se, ainda, em linfócitos Th1 (caracterizados pela produção de interferon- γ) e Th2 (caracterizados pela produção de IL4, IL13 e IL10). Por outro lado, os macrófagos residentes no tecido adiposo podem também ser classificados em dois tipos, baseado no perfil de citocinas que produzem. Assim, macrófagos do tipo M1 (classicamente ativados) são caracterizados pela produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL6 e MCP-1. Enquanto os macrófagos do tipo M2 (alternativamente ativados) são caracterizados pela produção de citocinas antiinflamatórias, principalmente IL10. Macrófagos M1 apresentam o marcador CD11c na superfície celular, enquanto os macrófagos M2 são reconhecidos pela ausência deste marcador (FUJISAKA *et al.*, 2009; STRISSEL *et al.*, 2010).

A polarização M1/M2 depende do microambiente do tecido adiposo e é regulada por sinais. O acúmulo de lipídios nos macrófagos favorece a polarização destes em M1, enquanto a redistribuição destes lipídios favorece a polarização M2. Do mesmo modo, ativação de PPAR- γ auxilia neste processo de redistribuição por meio da ativação do coativador 1 β de PPAR- γ . Adiponectina é considerada promover a polarização M2 também. Na obesidade induzida pela dieta hiperlipídica ocorre troca de fenótipo de M2 para M1 (LOLMÈDE *et al.*, 2011; LUMENG *et al.*, 2007).

Linfócitos T podem ser as primeiras células imunitárias a infiltrarem o tecido adiposo, entretanto ainda não é exatamente reconhecido que tipo de linfócito T (CD4 ou CD8) participa deste evento inicial. KINTSCHER *et al.* (2008) mostraram que linfócitos T CD4 foram precocemente infiltrados no tecido adiposo obeso, produzindo citocinas tipo linfócito Th1 (IFN- γ), que poderia induzir a liberação de MCP-1 pelos pré-adipócitos, promovendo o recrutamento de monócitos ou até mesmo ativando macrófagos. Por outro lado, NISHIMURA *et al.* (2009) mostraram que são os linfócitos T CD8 que precedem o acúmulo de macrófagos no tecido adiposo obeso. Assim, ainda não está claro o papel dos subtipos de linfócitos T envolvidos na resistência à insulina induzida pela obesidade.

O TNF- α e a IL-6 são moléculas pró-inflamatórias que podem ser produzidas tanto por células imunitárias quanto adipócitos. A primeira é uma das principais responsáveis pela resistência à insulina, pois atua na fosforilação de resíduos serina do substrato do receptor da insulina-1 (IRS-1) em importante etapa da via de sinalização insulínica, pela ativação da via da JNK. A IL-6 é capaz de induzir a produção de proteína C reativa (PCR) pelo fígado, um dos principais marcadores de complicações cardiovasculares. Além disso, IL-6 pode também afetar o metabolismo hepático das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), induzindo sua secreção e, conseqüentemente hipertriacilglicerolemia. Seu efeito na redução da ação da insulina pode ocorrer pela interação entre os supressores da sinalização das citocinas (SOCS) e o receptor da insulina (IR). As proteínas SOCS bloqueiam a ligação do IR com IRS (BASTARD *et al.*, 2009; TRAYHURN, 2005).

1.3 ÓLEO DE PEIXE

Ácidos graxos ômega 3 (PUFA n-3) consistem em ácidos graxos poliinsaturados com a primeira dupla ligação no carbono 3, contado à partir do carbono ômega da cadeia de ácido graxo. Ácido eicosapentaenóico (EPA C20:5n-3) e ácido docosahexaenóico (DHA C22:6n-3) são ácidos graxos essenciais pela incapacidade dos mamíferos em adicionar duplas ligações no carbono 3, portanto devem ser obtidos pela dieta. Ácido alfa-linolênico (C18:3n-3) é um exemplo de PUFA n-3 que por meio de reações de alongamento e desaturação pode ser convertido em ácido eicosapentaenóico (EPA C20:5n-3) e ácido docosahexaenóico (DHA C22:6n-3). Óleo de peixe é rico nestes PUFA n-3. Consumo de dietas ricas em PUFA n-3 são reconhecidas por seu potencial antiaterogênico, antitrombótico e antiinflamatório (CALDER, 2012; KROMHOUT *et al.*, 2012; LOMBARDO; CHICCO, 2006).

PUFA n-3 é capaz de reduzir o conteúdo de triacilglicerol no músculo esquelético, melhorar a ação insulínica e prevenir o desenvolvimento de resistência à insulina. Vários são os mecanismos de ação propostos para estes ácidos graxos, como a alteração da produção de mediadores celulares ou da composição de fosfolipídios da membrana plasmática. PUFA n-3 atuam em receptores de membrana acoplados à proteína G, mais especificamente GPR120. Pela ligação a este receptor, PUFA n-3 é capaz de estimular a via da quinase estimulada por sinal extracelular (ERK), além de reduzir a ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias, como a do NFκB e TLR4 (CAMPBELL; BELLO, 2012; CALDER, 2012).

Outra forma de atuação de PUFA n-3 é por meio do fator de transcrição PPAR, tanto do PPARα (expresso predominantemente no fígado) quanto do PPARγ (expresso nos adipócitos e células inflamatórias). EPA e DHA são agonistas de PPAR. PPARα está envolvido com a regulação “pra cima” de enzimas envolvidas na β-oxidação de ácidos graxos e do metabolismo das lipoproteínas. Já PPARγ possui importante papel nos efeitos metabólicos e inflamatórios de AGPI n-3. Após a ligação de EPA e DHA, PPARγ promove regulação “pra cima” das enzimas responsáveis pela adipogênese e captação de ácidos graxos. Assim, há aumento na deposição de ácidos graxos no

tecido adiposo associada com aumento do conteúdo de triacilglicerol dos adipócitos e redução na lipólise. Pode-se considerar que PUFA n-3, ao agir em conjunto com PPAR γ , melhora a função de “tamponamento” do excesso de ácidos graxos dietéticos, promovendo o acúmulo destes ácidos graxos, prevenindo assim seu depósito em tecidos não-adiposos, como fígado e músculo esquelético. Isto reduziria a ocorrência de resistência à insulina nestes tecidos. Ainda, a ligação com PPAR γ é responsável por aumentar as concentrações de adiponectina e, talvez de leptina. Quando se observa os macrófagos, a ligação de PPAR γ nestas células é capaz de reduzir a troca do fenótipo antiinflamatório (M2) para pró-inflamatório (M1) no tecido adiposo (CALDER, 2012; PUGLISI *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2007).

Estes ácidos graxos agem, também, alterando a composição dos fosfolipídios de membrana, aumentando assim sua fluidez e modificando processos de transdução de sinais. Seu efeito anti-inflamatório também se correlaciona com a modulação que provocam na síntese de eicosanóides, promovendo a produção daqueles com maior potencial anti-inflamatório em detrimento dos pró-inflamatórios. Eles promovem a troca de fosfolipídios de membrana, promovendo redução de ácido araquidônico e, conseqüentemente dos mediadores derivados deste ácido graxo ômega-6 (como prostaglandina E₂ e tromboxano B₂). Ocorre aumento na produção de mediadores, como os eicosanóides da série 3, derivados de PUFA n-3, que apresentam menor potencial pró-inflamatório. Além disso, PUFA n-3 pode produzir as chamadas resolvinas à partir de EPA ou DHA que apresentam efeitos antiinflamatórios (SIJBEN; CALDER, 2007; KROMHOUT *et al.*, 2012; CALDER, 2012).

Além disso, PUFA n-3 também suprime o fator de transcrição SREBP-1 (proteína 1 ligante do elemento regulatório esterol), reduzindo assim a expressão das enzimas acetil CoA carboxilase (ACC) e ácido graxo sintase (FAS), ambas envolvidas na síntese de ácidos graxos, sendo sugerido que todos estes efeitos ocorram por meio da ativação de AMPK (SUCHANKOVA *et al.*, 2005).

Estudos também mostram que PUFA n3 mantém a atividade do receptor de insulina, de IRS-1 e, conseqüentemente da PI3K e GLUT4, assim ocasionando aumento de glicose-6-fosfato acompanhado por maior síntese de glicogênio (CORCORAN *et al.*, 2007). Ainda, AGPI n3 é capaz de reduzir a taxa de conversão de

intolerância à glicose para diabetes tipo 2 (CORCORAN *et al.*, 2007). Com relação aos possíveis efeitos indesejáveis, estudo conduzido por 10 anos de seguimento ao uso de óleo de peixe em diabéticos tipo 2 não mostrou nenhum evento cardiovascular nestes pacientes (MONTORI *et al.*, 2000).

1.4 METFORMINA

Metformina é um fármaco da classe das biguanidas, de uso oral e com atividade anti-hiperglicêmica muito utilizado para tratamento da resistência à insulina e diabetes tipo 2, derivado da planta *Galega officinalis*. Este fármaco possui efeitos importantes na homeostase energética, principalmente por ativar a via da quinase ativada por AMP (AMPK), importante sensor energético. Em situações de necessidade energética (ATP), AMPK promove a degradação de substratos e, na situação oposta de excesso de ATP há o estímulo de vias anabólicas (LIU *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2011; SANTOMAURO JÚNIOR *et al.*, 2008). AMPK atua aumentando a captação de glicose pelo músculo esquelético pela promoção de maior translocação de GLUT4 à membrana plasmática (SANTOMAURO JÚNIOR *et al.*, 2008).

Metformina age, principalmente através da inibição da gliconeogênese hepática, o que explica sua habilidade em reduzir eficazmente a concentração plasmática de glicose e a hiperinsulinemia. Uma das formas pelas quais a metformina reduz a produção hepática de glicose é via ativação de AMPK, resultando em redução do conteúdo de ATP celular com consequente aumento de AMP, ou seja, promovendo regulação alostérica de enzimas da via gliconeogênica, como a frutose-1,6-bifosfatase. Ela é considerada droga anti-hiperglicêmica, sem efeito hipoglicemiante por não estimular a secreção de insulina, como fazem as clássicas sulfonilurías. Metformina apresenta efeito sensibilizador à insulina, principalmente por sua capacidade de reduzir a produção hepática de glicose e a concentração de insulina plasmática. Além disso, ela é capaz de melhorar a sensibilidade à insulina em outros tecidos. BIKMAN *et al.* (2010) mostraram que metformina reduziu a atividade de IKK β no músculo esquelético

acompanhada de menor fosforilação em resíduos serina de IRS-1 (SANTOMAURO JÚNIOR *et al.*, 2008; CATON *et al.*, 2010; MILLER; BIRNBAUM, 2010; VIOLLET *et al.*, 2012).

Além do efeito bem estabelecido na gliconeogênese, metformina também afeta o metabolismo hepático de lipídios. Este efeito também é mediado via ativação de AMPK. Por esta via, metformina promove redução da expressão de genes envolvidos na lipogênese, como da ácido graxo sintase e acetil CoA carboxilase, assim reduzindo a síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis ao mesmo tempo que aumenta a taxa de oxidação destes ácidos graxos. Estes efeitos citados acima são promovidos pela regulação “pra baixo” de SREBP-1c (proteína ligadora do elemento regulatório estero) (VIOLLET *et al.*, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

A obesidade tem se tornado grande problema de saúde pública. Esta questão envolve não apenas prejuízos ao indivíduo, o qual tem riscos muito maiores para doenças relacionadas à obesidade, tais como resistência à insulina e diabetes tipo 2, arteriosclerose e hipertensão entre outras, como também para os órgãos públicos que sofrem com o impacto econômico gerado pela doença. Os gastos com obesidade incluem os tratamentos médicos, compra de medicamentos e hospitalizações, além da perda de mão-de-obra por invalidez decorrente das comorbidades relacionadas (KOTTKE *et al.*, 2003; BJORK, 2001).

As tentativas de tratamento da doença devem se focar em intervenções seguras e eficazes. Para isso, a pesquisa acerca dos tratamentos que melhorem a qualidade de vida do indivíduo devem se voltar não somente às drogas que permitem a rápida perda de peso com muitos efeitos colaterais, mas em tratamentos de menor custo e efeitos indesejáveis, e que sejam de fácil obtenção. Importantes alvos terapêuticos estão sendo descobertos e necessitam de mais estudo. Um desses alvos inclui o próprio tecido adiposo, o qual é um dos objetos da presente pesquisa (PI-SUNIER, 2003).

Recentes estudos demonstraram que o tecido adiposo não é um simples tecido armazenador de lipídios e, sim um importante regulador endócrino. Ele secreta uma grande diversidade de substâncias, como as adipocinas que são moléculas produzidas e secretadas pelo tecido adiposo e que desempenham importantes papéis na regulação do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, como também em processos inflamatórios. Porém, na obesidade todo este processo é alterado e inicia-se um desequilíbrio do metabolismo energético e da inflamação, que contribui para o surgimento de diversas doenças relacionadas, principalmente resistência à insulina, diabetes tipo 2 e arteriosclerose (TILG; MOSCHEN, 2006; MATFIN, 2007).

A metformina é uma biguanida utilizada como sensibilizadora à insulina. É medicamento útil no tratamento da resistência à insulina e diabetes tipo 2 relacionadas à obesidade (BLACKBURN, 2010). O óleo de peixe é rico em ácidos graxos ômega-3, que são ácidos graxos poliinsaturados com efeitos anti-inflamatórios e anti-

aterogênicos, além de aumentarem a sensibilidade à insulina em tecidos-alvo, como tecido adiposo e músculo esquelético. É encontrado em peixes de águas frias, como a sardinha e atum, alimentos relativamente de baixo custo (LOMBARDO; CHICCO, 2006).

Assim, a demonstração dos efeitos hipolipemiantes, anti-inflamatórios e sensibilizadores à insulina do óleo de peixe em comparação com medicamentos atualmente disponíveis para uso, podem aumentar as perspectivas na utilização de uma intervenção mais econômica, naturalmente obtida e com menores efeitos colaterais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da suplementação com óleo de peixe e administração de metformina sobre processos metabólicos e inflamatórios no tecido adiposo e fígado de camundongos obesos e resistentes à insulina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Indução de obesidade e resistência à insulina pelas dietas hipercalóricas;
- Determinação do ganho de massa corporal;
- Avaliação da presença de resistência à insulina por teste de tolerância intraperitoneal à glicose e dosagem de insulina plasmática;
- Determinação dos pesos dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal+inguinal;
- Determinação da produção de lipídios e glicogênio hepáticos;
- Incubação do tecido adiposo epididimal na ausência e presença de adrenalina e avaliação da atividade lipolítica do tecido;
- Dosagem de citocinas plasmáticas (TNF- α e adiponectina);
- Determinação do tamanho médio dos adipócitos isolados dos tecido adiposos epididimal e retroperitoneal+inguinal por microscopia óptica;
- Determinação de células imunitárias infiltradas nos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal+inguinal por citometria de fluxo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Todos os procedimentos envolvendo animais, assim como o estudo foram submetidos à Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas (SCB) – Universidade Federal do Paraná (UFPR) (CEUA 511B). Foram utilizados camundongos machos Swiss com 6 semanas de idade obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR – Campus do Centro Politécnico, Curitiba, PR.

4.2 INDUÇÃO DA OBESIDADE

Obesidade foi induzida fornecendo aos animais ração hiperlipídica, contendo 53,09 kcal% de lipídios obtidos da gordura de porco (banha) e rica em carboidratos (75,81 Kcal% de carboidratos). A dieta hiperlipídica foi preparada de acordo com ARAÚJO *et al.* (2007), e os animais receberam estas dietas por um período de 8 semanas. Os animais dos grupos controle receberam ração regular Nuvilab CR1 (Quimtia). Os componentes das rações estão mostrados nas tabelas abaixo:

TABELA 1 – Composição das dietas rica em carboidratos e hiperlipídica, em g/kg.

Ingredientes	Ração rica em carboidrato (g/kg)	Ração Hiperlipídica (g/kg)
Amido de milho	465.7	115.5
Caseína	140	200
Amido dextrinizado	155	132
Sacarose	100	100
Óleo de soja	4	35
Banha de suínos	36	315
Celulose microfina	50	50
Mix de minerais	35	35
Mix de vitaminas	10	10
L-cistina	1.8	3
Bitartarato de colina	2.5	2.5

TABELA 2 – Conteúdo calórico das dietas rica em carboidrato e hiperlipídica (kcal%).

Ingredientes	Ração Rica em carboidratos (%kcal)	Ração Hiperlipídica (%kcal)
Amido	65.29	18.54
Caseína	14.73	15
Sacarose	10.52	7.491
Óleo de soja	0.947	5.899
Banha de suínos	8.52	53.09

TABELA 3 – Conteúdo calórico da ração regular Nuvilab CR1 (Quimtia®) (kcal%).

Ingredientes	kcal%
Carboidratos	67,3
Proteínas	23,5
Lipídios	9,2

4.3 INTERVENÇÕES TERAPÊUTICAS

O óleo de peixe foi gentilmente doado pela Fundação Herbarium e administrado via oral. As cápsulas continham 1g de óleo de peixe, na proporção de 0,192 g de EPA (ácido eicosapentaenóico) e 0,124g de DHA (ácido docosahexaenóico). A metformina (Medley®) foi adquirida em farmácia comercial e administrada aos animais na dose de

300mg/kg/dia de massa corporal diluídos em água destilada, via gavagem (QUAILE *et al.*, 2010; TONG *et al.*, 2011). A suplementação com óleo de peixe (1g/kg) e a administração de metformina foram realizadas durante 30 dias consecutivos, após o período necessário para indução da obesidade. A dose de óleo de peixe utilizada é capaz de ser incorporada na membrana plasmática após os 30 dias de suplementação, a qual foi realizada por meio de pipeta. A dose de metformina foi escolhida por não causar efeitos colaterais evidentes nos animais.

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo possui delineamento do tipo experimental. Foram realizados 7 experimentos com, no mínimo, 5 animais por grupo em cada experimento. Foram utilizados 8 grupos experimentais:

- controle: animais recebendo ração regular (R);
- controle + óleo de peixe: animais recebendo ração regular mais suplementação com óleo de peixe (ROP);
- obesos: animais recebendo ração rica em carboidratos (C);
- obesos + óleo de peixe: animais recebendo ração rica em carboidratos mais suplementação com óleo de peixe (COP);
- obesos: animais recebendo ração hiperlipídica (HFD);
- obesos + óleo de peixe: animais recebendo ração hiperlipídica mais suplementação com óleo de peixe (HOP);
- obesos + metformina: animais recebendo ração hiperlipídica mais metformina (HFDMET);
- obesos + óleo de peixe + metformina: animais recebendo ração hiperlipídica mais suplementação com óleo de peixe e administração de metformina (HOPMET).

Após período de 8 semanas em suas respectivas dietas, aos animais se iniciou a suplementação com óleo de peixe e administração de metformina, diariamente, por 30

dias consecutivos, de acordo com cada grupo. Em seguida, os animais foram ortotanaziados para coleta e análise das amostras.

4.5 TESTE INTRAPERITONEAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (ipGTT)

O ipGTT foi realizado através de injeção intraperitoneal (i.p.) de solução de glicose a 20% (2g/kg de massa corporal) (ARAÚJO *et al.*, 2007), após o período de indução da obesidade. Glicemia foi determinada nos tempos zero (antes da ip), 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção, utilizando-se glicosímetro e fitas para glicemia da marca One Touch Ultra[®] (Johnson & Johnson[®]). Este teste foi repetido após o período de suplementação com óleo de peixe e administração de metformina para avaliação do estado de tolerância à glicose. Os animais receberam pentobarbital como anestésico na dose de 45 mg/kg peso corporal antes dos procedimentos. Após a confecção da curva, foi analisada a área sob a curva glicêmica (AUC) pelo método trapezoidal dos respectivos grupos.

4.6 INCUBAÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO

Para os ensaios de incubação, tecido adiposo epididimal foi isolado. O restante do tecido foi rapidamente congelado e armazenado a -80°C para posteriores análises. O tecido adiposo epididimal foi pesado (100 mg) e dividido em várias partes, a fim de aumentar a superfície de contato com o tampão. Depois, foi transferido para erlenmeyers contendo 1 mL de tampão Krebs-Ringer (NaCl 0,9% + HEPES 10mM, CaCl₂ 0,11M, KH₂PO₄ 2,11%, MgSO₄ 3,82%, KCl 1,15%, NaHCO₃ 1,3% e água q.s.p) previamente gaseificado em atmosfera de O₂/CO₂ (95%/5%), contendo albumina sérica bovina (BSA) a 1% e glicose a 56 mM. O tecido foi incubado por 1 hora, sob agitação constante, sem gaseificação.

4.7 ATIVIDADE LIPOLÍTICA DO TECIDO ADIPOSEO

Lipólise foi avaliada pela liberação de glicerol após incubação do tecido adiposo nas condições anteriores por 1 hora. Adrenalina (10µg/mL) foi utilizada para estimulação da lipólise. Glicerol foi mensurado através de kit enzimático colorimétrico GPO-Trinder® e absorvância lida em espectrofotômetro a 500 nm.

4.8 ISOLAMENTO DE ADIPÓCITOS E DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO

Cerca de 2 g de tecido adiposo epididimal e retroperitoneal+inguinal foi cortado em pedaços e adicionado em meio (DMEM 1%, HEPES 0,6%, BSA 4%, NaHCO₃ 4,2 mM), contendo collagenase tipo II 1 mg/mL, a 37°C por 30 minutos, sob agitação contínua para digestão. Após, foi filtrado em malha fina (100 µm). Em seguida, após centrifugação foram obtidas as células estromais vasculares (*pellet*) e adipócitos (sobrenadante). Para avaliação do tamanho médio do adipócito, alíquota do sobrenadante foi colocada em lâmina e analisada em microscópio óptico com objetiva graduada em escala micrométrica.

4.9 IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS IMUNITÁRIAS NO ESTROMA VASCULAR DO TECIDO ADIPOSEO

Após isolamento dos adipócitos descrito acima, foi feita centrifugação e coleta do infranadante para obtenção da fração de células estromais vasculares, com posterior incubação em solução hemolítica por 30 minutos, a 37°C. Em seguida, as células foram marcadas utilizando-se os anticorpos específicos. Foi avaliada a infiltração de macrófagos no estroma vascular do tecido adiposo (ATM) por meio de anticorpo anti-F4/80 marcado com PE (o antígeno F4/80 é expresso por ATM) e de linfócitos por meio de anticorpo anti-CD3 marcado com FITC, com o intuito de diferenciar esses dois tipos

celulares. A diferenciação do fenótipo de macrófagos em M1 (pró-inflamatório) e M2 (anti-inflamatório) foi avaliada com anticorpo anti-CD11c marcado com ALEXA FLUOR 488 (marcador de M1) e anticorpo anti-CD206 marcado com ALLEXA FLUOR 647 (marcador de M2). As populações de linfócitos foram distinguidas por meio de anticorpo anti-CD4 marcado com PE (para linfócito T *helper*) e anticorpo anti-CD8 marcado com FITC (para linfócito T citotóxico). As incubações com os respectivos anticorpos ocorreram por 30 minutos a 4°C. Análise posterior foi realizada por citometria de fluxo (FACSCALIBUR BD Biosciences®).

*tecido adiposo retroperitoneal+inguinal será referido, no restante do texto, somente como tecido adiposo retroperitoneal.

4.10 PRODUÇÃO DE CITOCINAS

A mensuração da concentração plasmática de: TNF- α (INVITROGEN®), adiponectina (INVITROGEN®) e insulina (MILLIPORE® e ALPCO IMMUNOASSAYS®). Alíquotas de plasma foi submetido a ensaio imunoenzimático (ELISA) e as concentrações de TNF- α expressas em pg/mL, a de adiponectina em μ g/mL e a de insulina em ng/mL. Para a mensuração foi seguida todas as instruções dos fabricantes.

4.11 CONTEÚDO DE LIPÍDIOS NO TECIDO HEPÁTICO (LIPOGÊNESE HEPÁTICA)

4.11.1 Extração Lipídica Hepática

Foram pesados 100 mg de tecido hepático e homogeneizados com 700 μ L de NaCl 1M. Em seguida, procedeu-se a extração lipídica com 3 mL de clorofórmio/metanol (2:1). Após centrifugação (4.000 rpm por 5 minutos) separou-se as fases aquosa (superior) e orgânica contendo os lipídios extraídos do tecido (fase inferior). Nitrogênio gasoso foi utilizado para secagem das amostras (evaporação dos

solventes orgânicos), as quais foram ressuspensas em 500 uL de Tritonx100/metanol (2:1).

4.11.2 Dosagem de lipídios

O conteúdo de lipídios hepáticos obtidos após a extração lipídica (triacilglicerol e colesterol) foi obtido por meio de ensaio enzimático colorimétrico para glicerol (GPO-Trinder) e colesterol (Laborclin®).

4.12 GLICOGÊNIO HEPÁTICO

Foi determinado de acordo com LEIGHTON & COOPER (1989). Pedaco de fígado foi pesado (cerca de 90 mg) e adicionado a tubo de ensaio contendo 500 µL de KOH 1M e mantido em banho-maria a 37°C durante 30 minutos para digestão do tecido. Após isso, 100 µL do tecido digerido foi colocado em tubo de ensaio contendo 500 µL de tampão acetato pH 4,8 (ácido acético glacial 0,48%, acetato de sódio 12 mM, amiloglucosidase 0,1% e água destilada q.s.p) e 17,5 µL de ácido acético glacial. Em seguida, as amostras foram mantidas em estufa (37°C) durante 2 horas e, depois centrifugadas a 15000g por 5 minutos. 100µL do sobrenadante foram colocados em outro tubo contendo 1mL de tampão TEA (trietanolamina) pH 7,5 (37 mM TEA, MgSO₄ 0,6mM, sal dissódico de ATP 0,96 mM, sal sódico de NADP 0,07 mM, hexoquinase/glicose 6-fosfato desidrogenase e água destilada q.s.p). Após incubação de 40 minutos, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 340 nm.

4.13 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)

4.13.1 Extração Lipídica

Foi realizada de acordo com FOLCH *et al* (1956). Cerca de 30 mg de tecido adiposo foram pesados, adicionado em tubos de vidro contendo 1,33mL de clorofórmio:metanol (2:1 v/v) e homogenizados. A seguir, foram transferidos 480µL metanol e o material foi centrifugado a 5000 g durante 10 minutos. Após a transferência do sobrenadante a outro tubo foi adicionado 960 µL de clorofórmio. Em seguida, foi adicionado 550 µL de água. Após agitação e formação espontânea do sistema bifásico, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 1 mL de solução de Folch (metanol 48,98%; água 47,96%; clorofórmio 3,06%; MgCl₂ 0,017%; CaCl₂ 0,02%; NaCl 0,37%) e o sobrenadante removido. O processo foi repetido mais duas vezes. O infranadante foi submetido à secagem em nitrogênio gasoso em banho-maria.

4.13.2 Saponificação

Aos extratos lipídicos foi adicionado 100 µL de metanol e 2 mL de solução contendo NaOH 0,5M em 90% de metanol, para saponificação. As amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C sob agitação contínua durante 2 horas (BEYER; JENSEN, 1989; NISHIYAMA-NARUKE, *et al.*, 1998). Em seguida, 1,5 mL de HCl foi adicionado para acidificação e logo depois foi adicionado 1 mL de hexano para extração dos ácidos graxos. Sobrenadante foi coletado e a etapa anterior repetida mais duas vezes. O solvente foi evaporado em nitrogênio gasoso.

4.13.3 Derivatização

Foi realizada de acordo com ABUSHUFA *et al* (1994). Amostras foram reconstituídas com 100 μ L de acetonitrila e homogenizadas em vórtex. Foi adicionado 150 μ L de reagente A, BMMC (bromo-metil-metóxi-coumarina) preparado com 10 mg de BMMC dissolvidos em 10 mL de acetonitrila. Logo em seguida, foram adicionados 150 μ L de reagente B, composto de 26,5 mg de 18-crown-6-éter em 5 mL de acetonitrila, com 100mg de carbonato de potássio e 50 μ L de água miliQ. Por fim, foram adicionados 150 μ L de acetonitrila e, após as amostras foram homogenizadas e incubadas por 15 minutos em estufa a 60°C. Esta solução foi transferidas para tubos de HPLC para detecção em HPLC Varian com bomba ProStar 230, autoinjeter ProStar 410 e detector de fluorescência ProStar 363 e utilizando-se coluna C-8 de fase reversa.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) dos grupos experimentais e submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) com o pós teste de Bonferroni. Os testes ANOVA foram utilizados para populações com distribuição gaussiana. A análise da normalidade dos dados foi realizada pelo teste de Komolgorov-Smirnov. Para populações que não seguiram distribuições gaussianas, foi utilizada análise de variância não-paramétrica (teste de Kruskal-Wallis), seguido de pós-teste de Dunn. Teste “t” de Student foi utilizado quando indicado. $p < 0,05$ foi usado para indicar significância estatística. As análises e os gráficos foram realizados com o auxílio do software GraphPad Prism® (GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California EUA).

5 RESULTADOS

5.1 INDUÇÃO DA OBESIDADE E RESISTÊNCIA Á INSULINA

5.1.1 Ganho de Massa

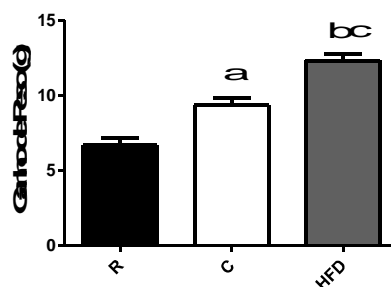


FIGURA 2 – Ganho de massa corporal dos animais alimentados com ração regular (R), rica em carboidrato (C) e rica em lipídios (HFD), após o período inicial de 8 semanas. ^a $p < 0,001$ versus grupo R. ^b $p < 0,0001$ versus grupo C. ^c $p < 0,0001$ versus R.

Ganho de Massa Corporal (g)		
R	C	HFD
6,661±0,51 (n=59)	9,330±0,47 (n=100) ^a	12,34±0,42 (n=179) ^{bc}

O ganho de massa corporal dos animais dos 3 grupos experimentais (antes dos tratamentos), durante o período inicial de indução de obesidade e resistência á insulina (8 semanas) está mostrado na figura 2. O grupo alimentado com dieta rica em gordura (HFD) apresentou aumento de 32,3% ($p < 0,0001$) e 85,3% ($p < 0,0001$) na massa corporal, quando comparado aos dos grupos C e R, respectivamente. Já o grupo C apresentou aumento de 40,1% na massa corporal quando comparado ao do grupo R. Os animais que receberam ração rica em carboidrato (C) ou hiperlipídica (HFD) ganharam massa em relação aos animais que receberam ração regular (R), confirmando que ambas as rações apresentaram potencial obesogênico.

Durante este período de indução, observou-se que os animais alimentados com ração hiperlipídica apresentaram menor consumo alimentar (g) quando comparados aos animais do grupo alimentado com ração regular ($4,067 \pm 0,12$ (n=24) versus $9,638 \pm 0,53$ (n=8), $p < 0,0001$). O mesmo foi encontrado para animais alimentados com ração rica em

carboidratos, os quais também apresentaram menor consumo alimentar (g) quando comparados aos animais do grupo controle ($7,925 \pm 0,20$ (n=12) versus $9,638 \pm 0,53$ (n=8), $p < 0,0001$). Isto seria esperado, com base na maior densidade calórica das rações hiperlipídica (cerca de 5340 Kcal/kg) e rica em carboidrato (3802,8 Kcal/kg), quando comparadas com a densidade calórica da ração regular (3000 kcal/kg).

5.1.2 Teste de Tolerância à Glicose Intraperitoneal (ipGTT)

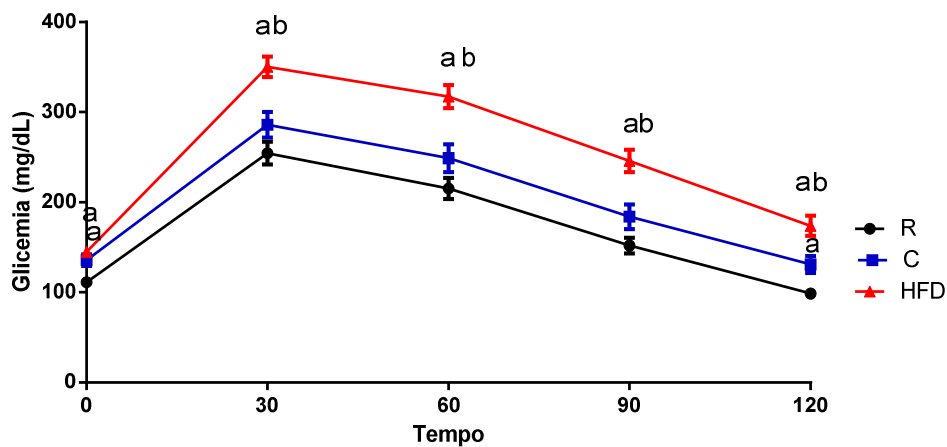


FIGURA 3 – Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT) dos animais alimentados com ração regular (R), rica em carboidratos (C) e rica em lipídios (HFD) realizado 8 semanas após o início do experimento. ^a $p < 0,05$ versus grupo R. ^b $p < 0,05$ versus grupo C.

Tempo (min)	Glicemia (mg/dL)		
	Controle (R)	Obeso (C)	Obeso (HFD)
Zero	111,2±4,63 (n=32)	135,7±6,40 (n=34) ^a	145,0±3,60 (n=60) ^a
30	254,5±12,64 (n=32)	285,9±14,23 (n=34)	350,4±11,37 (n=60) ^{ab}
60	215,3±11,75 (n=32)	248,8±15,35 (n=34)	317,4±13,05 (n=60) ^{ab}
90	152,0±8,84 (n=32)	184,0±13,67 (n=34)	245,8±12,32 (n=60) ^{ab}
120	98,53±4,04 (n=32)	131,0±9,47 (n=34) ^a	173,8±11,07 (n=60) ^{ab}

Os animais do grupo obeso recebendo dieta hiperlipídica (HFD) apresentaram aumento de 30,4% na glicemia no tempo zero, comparados ao grupo R ($p < 0,05$). Já os animais obesos recebendo dieta rica em carboidrato (C) mostraram aumento de 22% na glicemia do tempo zero, comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). No tempo 30 minutos, o grupo HFD apresentou glicemia 22,5% e 37,7% maior ($p < 0,05$), no tempo 60 minutos 27,6% e 47,4% ($p < 0,05$), no tempo 90 minutos 33,6% e 61,7% ($p < 0,05$), no tempo 120

minutos 32,7% e 76,4% ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos C e R, respectivamente. O grupo C apresentou glicemia 33% maior que o grupo R ($p < 0,05$), no tempo 120 minutos.

5.1.3 Área sob a curva (AUC)

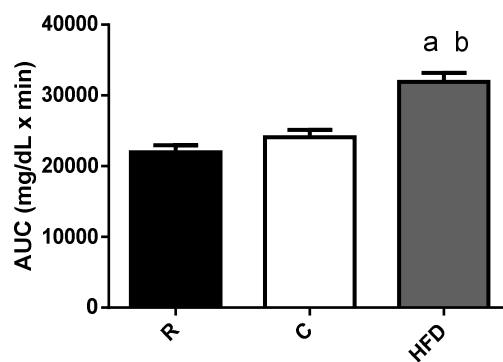


FIGURA 4 – Área sob a curva (AUC) glicêmica após teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT) dos animais alimentados com ração regular (R), rica em carboidratos (C) e rica em lipídios (HFD). ^a $p < 0,0001$ versus grupo R. ^b $p < 0,0001$ versus grupo C.

AUC (mg/dL x min)		
Controle (R)	Obesos (C)	Obeso (HFD)
21953±1032 (n=31)	24079±1024 (n=32)	31909±1270 (n=54) ^{ab}

Os animais do grupo HFD apresentaram valor de AUC 32,5% e 45,3% maior que os grupos C e R, respectivamente ($p < 0,0001$).

Os resultados acima indicam que, somente os animais do grupo HFD tornaram-se intolerantes à glicose, como observado pela maior área sob a curva glicêmica deste grupo, quando comparado ao grupo R. Os animais do grupo C, mesmo tendo apresentado glicemias maiores do que dos animais do grupo R nos tempos 0 e 120 minutos, não apresentaram aumento na área sob a curva glicêmica, indicando que estes animais, embora obesos, não estão intolerantes à glicose. Por outro lado, os animais do grupo HFD confirmam a instalação do quadro de obesidade e intolerância à glicose.

5.2 EFEITOS DAS INTERVENÇÕES TERAPÊUTICAS EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

5.2.1 Ganho de Massa Corporal

TABELA 4 – Ganho de massa dos animais, suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^ap<0,05 versus R. ^bp<0,01 versus ROP. ^cp<0,001 versus ROP.

Ganho de Massa Corporal (g)							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
2,241±0,30 9 (n=29)	0,793±0,37 9 (n=29) ^a	2,929±0,41 9 (n=42)	2,867±0,3 3 (n=45) ^b	2,979±0,54 1 (n=47)	3,022±0,45 6 (n=45) ^c	3,194±0,56 6 (n=34)	2,938±0,70 3 (n=32)

Os animais do grupo controle suplementados com óleo de peixe (ROP) apresentaram redução de 64,6% no ganho de massa quando comparados aos animais sem suplementação (R) ($p<0,05$). Os animais do grupo C não mostraram alteração no ganho de massa ($p>0,05$), entretanto a suplementação com óleo de peixe no grupo COP promoveu 261,5% de aumento quando comparado ao grupo ROP ($p<0,01$). O grupo HFD também não mostrou variação no ganho de massa, porém o grupo HOP apresentou aumento de 281,1% quando comparado ao grupo ROP ($p<0,001$).

O consumo alimentar dos animais após as 4 semanas não foi alterado pelas intervenções terapêuticas. Os animais alimentados com ração rica em carboidratos não apresentaram consumo alimentar (em gramas) diferente quando comparados aos animais alimentados com ração regular. Já os animais alimentados com ração hiperlipídica apresentaram menor consumo alimentar quando comparados aos animais alimentados com a ração regular, semelhante ao que foi encontrado durante o período de indução. Entretanto, as intervenções terapêuticas não alteraram este parâmetro.

5.2.2 Teste de tolerância á glicose intraperitoneal (ipGTT)

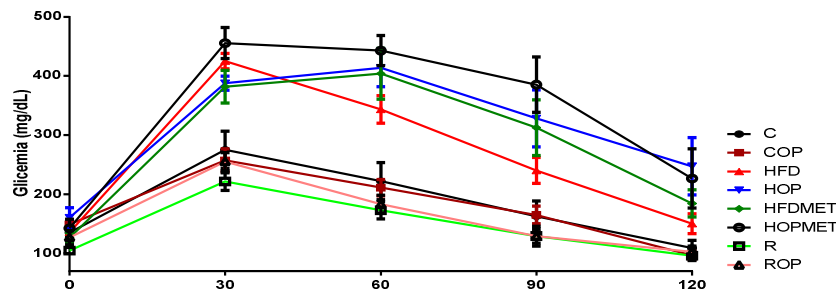


FIGURA 5 - Teste de tolerância á glicose intraperitoneal (ipGTT) após período de tratamento (4 semanas) dos animais, suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^ap<0,05 versus R. ^bp<0,0001 versus R. ^cp<0,0001 versus C. ^dp<0,0001 versus ROP. ^ep<0,0001 versus COP. ^fp<0,05 versus HOP. ^gp<0,001 versus C. ^hp<0,01 versus R. ⁱp<0,05 versus C. ^gp<0,001 versus C. ^jp<0,01 versus COP. ^kp<0,01 versus ROP. ^lp<0,001 versus COP. ^mp<0,05 versus HFD.

Glicemia (mg/dL)								
Tempo (min)	R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
Zero	104,5±5,48 (n=13)	126,6±12,11 (n=8)	135,2±11,46 (n=11) ^a	149,2±7,055 (n=12)	135,3±7,183 (n=15) ^a	160,4±16,97 (n=11)	126,5±8,732 (n=6)	142,2±15,47 (n=5)
30	221,5±14,95 (n=13)	254,9±15,32 (n=8)	274,9±31,70 (n=11)	256,9±19,55 (n=12)	425,9±13,81 (n=15) ^{bc}	387,7±11,89 (n=11) ^{de}	381,7±27,46 (n=6)	455,4±26,2 (n=5) ^f
60	172,6±14,78 (n=13)	183,3±15,16 (n=8)	222,1±31,42 (n=11)	211,9±14,33 (n=12)	343,3±23,20 (n=15) ^{bg}	413,9±32,35 (n=11) ^{de}	403,7±43,12 (n=6)	442,6±25,39 (n=5)
90	129,2±12,31 (n=13)	129,0±16,66 (n=8)	162,6±26,19 (n=11)	164,9±14,74 (n=12)	240,5±22,51 (n=15) ^{hi}	328,0±48,22 (n=11) ^{gj}	312,5±47,25 (n=6)	385,2±46,74 (n=5)
120	95,92±8,221 (n=13)	102,4±9,580 (n=8)	109,1±12,88 (n=11)	96,42±7,137 (n=12)	150,4±17,23 (n=15) ^a	247,0±48,58 (n=11) ^{klm}	184,3±23,15 (n=6)	226,6±50,19 (n=5)

5.2.3 Área sob a curva (AUC)

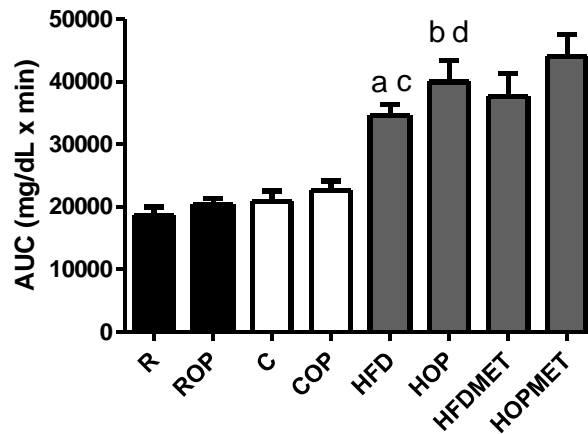


FIGURA 6 - Área sob a curva glicêmica (AUC) dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET), após período de tratamento (4 semanas). ^ap<0,0001 vs R ^bp<0,0001 vs ROP ^cp<0,001 vs C ^dp<0,0001 vs COP.

AUC (mg/dL x min)							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
18707±128 2 (n=13)	20449±823 ,5 (n=8)	20952±157 5 (n=10)	22696±148 4 (n=12)	34579±187 6 (n=15) ^{ac}	40000±341 1 (n=11) ^{bd}	37598±367 0 (n=6)	44028±354 6 (n=5)

Os resultados acima indicam que os animais que receberam ração regular (grupos R e ROP) continuaram tolerantes à glicose, não sendo notado efeito da suplementação com óleo de peixe nesses animais ($p>0,05$). Os animais recebendo ração rica em carboidrato (C e COP) também não apresentaram alteração na tolerância à glicose ($p>0,05$). Entretanto, animais recebendo ração hiperlipídica sem suplementação (HFD) apresentaram intolerância à glicose quando comparados com os animais do grupo R ($p<0,0001$), como esperado. Interessantemente, a suplementação destes animais com óleo de peixe (HOP) não promoveu melhora deste parâmetro quando comparados com o grupo HFD ($p>0,05$). Assim, pode-se notar que a suplementação com óleo de peixe não melhorou a intolerância à glicose, em um quadro pré-instalado. Intolerância à glicose associada com hiperinsulinemia indica resistência à insulina. Para melhor avaliação, analisou-se a concentração de insulina plasmática, como mostrado abaixo.

5.2.4 Insulinemia

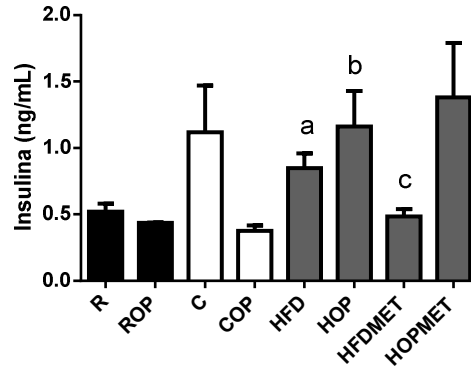


FIGURA 7 – Insulinemia dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^a $p < 0,05$ vs R; ^b $p < 0,05$ vs COP; ^c $p < 0,05$ vs HFD.

Insulinemia (ng/mL)							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
0,522±0,0 58 (n=9)	0,435±0 0,003 (n=7)	1,119± 0,35 (n=10)	0,376±0,0 423 (n=9)	0,849±0,1 10 (n=11) ^a	1,162±0,2 7 (n=10) ^b	0,485±0,0 56 (n=8) ^c	1,383± 0,409 (n=9)

Pode-se observar que os animais controle (grupos R e ROP) não apresentaram variações na insulinemia ($p > 0,05$), como seria esperado pelos seus valores normais de área sob a curva glicêmica. Os animais recebendo ração rica em carboidratos sem suplementação (C) também não tiveram insulinemia diferente quando comparada à do grupo controle (R) ($p > 0,05$), sendo que também apresentaram valores de AUC semelhantes à do grupo R (figura 6). Os animais do grupo HFD apresentaram maior insulinemia quando comparados à do grupo controle (R) (62,6%; $p < 0,05$), a qual, associada com o quadro de intolerância à glicose observado na figura 6, sugere resistência à insulina. A suplementação com óleo de peixe nos animais com ração hiperlipídica (HOP) não promoveu alteração com relação à do grupo HFD, somente quando comparada à do grupo COP (209,04%; $p < 0,05$), o que indica efeito da ração e não da suplementação. O tratamento com metformina (HFDMET) embora não tenha alterado AUC, foi capaz de reduzir a insulinemia quando comparada à do grupo HFD (42,9%; $p < 0,05$).

5.2.5 Massa dos Tecidos

TABELA 5 – Massa dos tecidos (g) dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^ap<0,0001 vs R. ^bp<0,0001 vs ROP. ^cp<0,05 vs COP. ^dp<0,0001 vs COP. ^ep<0,05 vs HFD.

Grupo	TA Epididimal (g)	TA Retroperitoneal (g)
R	0,929±0,088 (n=40)	0,414±0,0417 (n=39)
ROP	0,742±0,061 (n=34)	0,336±0,0287 (n=34)
C	2,021±0,124 ^a (n=45)	0,932±0,066 ^a (n=44)
COP	1,725±0,096 ^b (n=50)	0,797±0,055 ^b (n=50)
HFD	2,253±0,118 ^a (n=53)	0,977±0,071 ^a (n=53)
HOP	2,252±0,129 ^{bc} (n=50)	1,256±0,064 ^{bde} (n=50)
HFDMET	2,292±0,143 (n=33)	1,046±0,091 (n=30)
HOPMET	2,392±0,143 (n=33)	1,195±0,082 (n=30)

No que diz respeito à massa dos tecidos, o grupo C apresentou aumento de 117,5% no peso do tecido adiposo epididimal e 125,1% no retroperitoneal, quando comparado ao do controle, R (p<0,0001). O grupo com ração hiperlipídica também mostrou aumento no peso destes tecidos, com 142,5% no epididimal e 136% no retroperitoneal, em relação ao do controle (R) (p<0,0001). Os grupos suplementados com óleo de peixe também apresentaram aumento no peso destes tecidos. O grupo COP mostrou aumentos de 132,5% no epididimal e 137,2% no retroperitoneal comparados ao do grupo ROP (p<0,0001). Já o grupo HOP também apresentou aumento e de 203,5% no epididimal e de 273,8% no retroperitoneal, em relação ao mesmo do grupo ROP (p<0,0001). Além disso, o grupo HOP também teve maior peso do tecido adiposo epididimal quando comparado ao do grupo COP (30,5%; p<0,05) e aumento maior ainda no tecido adiposo retroperitoneal em relação ao do mesmo grupo anterior (57,6%; p<0,0001). Interessantemente, a suplementação com óleo de peixe no grupo com ração hiperlipídica (HOP) promoveu aumento de 28,5% no peso do tecido adiposo retroperitoneal quando comparado ao do grupo com a mesma ração, porém sem suplementação (HFD) (p<0,05), indicando efeito da suplementação.

5.2.6 Diâmetro Médio dos Adipócitos

TABELA 6 – Diâmetro médio dos adipócitos (μm) dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). Tecido adiposo epididimal – ^a $p < 0,0001$ vs R; ^b $p < 0,01$ vs ROP; ^c $p < 0,05$ vs ROP; ^d $p < 0,001$ vs R; ^e $p < 0,05$ vs C; ^f $p < 0,05$ vs HFD; ^g $p < 0,05$ vs HFDMET. Tecido adiposo retroperitoneal – ^a $p < 0,0001$ vs R; ^b $p < 0,001$ vs ROP; ^c $p < 0,0001$ vs HFD; ^d $p < 0,001$ vs COP; ^e $p < 0,05$ vs HFD; ^f $p < 0,05$ vs HFDMET.

Grupos	TA Epididimal	TA Retroperitoneal
R	14,91 \pm 0,639 (n=100)	7,920 \pm 0,374 (n=25)
ROP	18,82 \pm 0,738 (n=100) ^d	26,52 \pm 1,961 (n=25) ^a
C	23,86 \pm 0,772 (n=99) ^a	13,08 \pm 1,474 (n=25)
COP	22,09 \pm 0,512 (n=99) ^{be}	15,50 \pm 0,846 (n=50) ^b
HFD	26,68 \pm 0,756 (n=96) ^a	14,92 \pm 0,927 (n=25) ^a
HOP	23,07 \pm 1,047 (n=99) ^{cf}	25,48 \pm 1,931 (n=25) ^{cd}
HFDMET	24,23 \pm 0,669 (n=99) ^f	22,48 \pm 1,458 (n=50) ^e
HOPMET	25,28 \pm 0,756 (n=100) ^g	26,96 \pm 1,466 (n=50) ^f

Observa-se que o diâmetro médio dos adipócitos acompanha o apresentado na tabela do peso dos tecidos. Assim, os grupos C e HFD apresentaram maior diâmetro médio dos adipócitos em relação ao do controle (R), indicando efeito das rações. O grupo C mostrou aumento de 60% no diâmetro médio dos adipócitos epididimais em relação ao grupo do R ($p < 0,0001$). Já o grupo HFD mostrou aumento de 78,9% no epididimal e 88,4% no retroperitoneal em relação ao grupo R ($p < 0,0001$). Interessantemente, o grupo ROP mostrou aumento de 26,2% no diâmetro médio dos adipócitos epididimais ($p < 0,001$) e 234,8% nos adipócitos retroperitoneais em relação ao do grupo R ($p < 0,0001$), indicando efeito da suplementação. A suplementação com óleo de peixe nos animais recebendo ração hiperlipídica (HOP) também resultou em aumento do diâmetro médio dos adipócitos retroperitoneais (70,8%) em relação ao grupo recebendo a mesma dieta mas sem suplementação (HFD) ($p < 0,0001$). Mais interessante ainda é o fato do tratamento com metformina no grupo recebendo ração hiperlipídica (HFDMET) ter apresentado aumento no diâmetro médio dos adipócitos retroperitoneais de 50,7% em relação ao grupo sem qualquer tratamento recebendo a mesma ração (HFD) ($p < 0,05$) e uma redução de 9,2% nos adipócitos epididimais em relação ao grupo HFD ($p < 0,05$), indicando efeito do fármaco.

5.2.7 Conteúdo de Lipídios Hepáticos

5.2.7.1 Colesterol Hepático

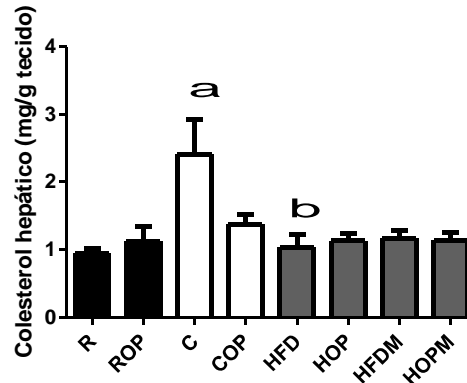


FIGURA 8 – Colesterol hepático (mg/g tecido) dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^ap<0,001 vs R; ^bp<0,05 vs C.

Colesterol Hepático (mg/g tecido)							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
0,937±0,084 (n=16)	1,119±0,228 (n=9)	2,414±0,507 (n=10) ^a	1,370±0,151 (n=10)	1,033±0,190 (n=10) ^b	1,127±0,108 (n=8)	1,163±0,123 (n=10)	1,137±0,121 (n=10)

5.2.7.2 Triacilglicerol Hepático

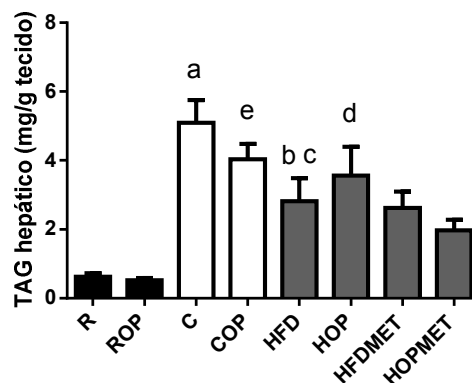


FIGURA 9 – Triacilglicerol hepático (mg/g tecido) referente aos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam

metformina (HFDMET, HOPMET). ^ap<0,0001 vs R; ^bp<0,001 vs R; ^cp<0,05 vs C; ^dp<0,001 vs ROP; ^ep<0,0001 vs ROP.

Triacilglicerol Hepático (mg/g tecido)							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
0,621±0,103 (n=16)	0,523±0,063 (n=9)	5,092±0,659 (n=10) ^a	4,031±0,452 (n=10) ^e	2,819±0,666 (n=10) ^{bc}	3,566±0,831 (n=9) ^d	2,622±0,475 (n=10)	1,967±0,309 (n=10)

Como forma de avaliação do efeito lipogênico das rações, avaliou-se a deposição de lipídios no fígado, pela análise de colesterol e triacilglicerol hepáticos. Pode-se notar o efeito lipogênico da ração rica em carboidrato (C) quando comparada às outras duas rações. Com base na figura 7, observa-se que o grupo C apresentou 157% mais deposição de colesterol hepático do que o grupo R (p<0,001) e 133,7% mais que o grupo HFD (p<0,05). Enquanto na figura 8 pode-se notar que a deposição de triacilglicerol hepático no grupo C foi 720% maior que no grupo R (p<0,0001) e 80% maior que o grupo HFD (p<0,05). O grupo HFD também apresentou aumento na deposição de triacilglicerol hepático comparado ao grupo R (354%; p<0,001).

5.2.8 Glicogênio Hepático

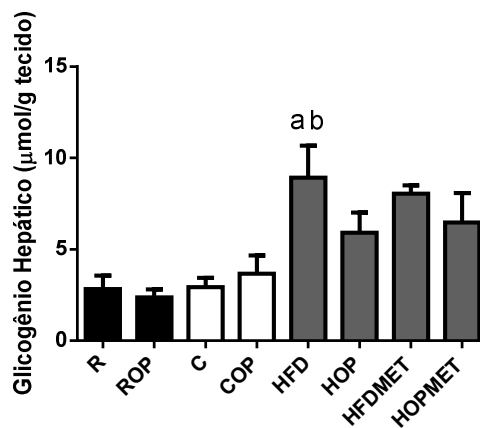


FIGURA 10 – Glicogênio hepático (µmol/g tecido) dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^ap<0,01 vs R; ^bp<0,01 vs C.

Glicogênio Hepático (µmol/g tecido)							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
2,826±0,744 (n=12)	2,368±0,446 (n=9)	2,928±0,514 (n=12)	3,674±0,994 (n=11)	8,925±1,749 (n=12) ^{ab}	5,922±1,081 (n=14)	8,056±0,455 (n=7)	6,470±1,617 (n=8)

A figura acima demonstra que o único grupo com alteração na deposição de glicogênio hepático foi o dos animais recebendo ração hiperlipídica (HFD), com 216% e 205% maior acúmulo de glicogênio hepático, comparado ao dos grupos R ($p < 0,01$) e C ($p < 0,01$), respectivamente.

5.2.9 Lipólise

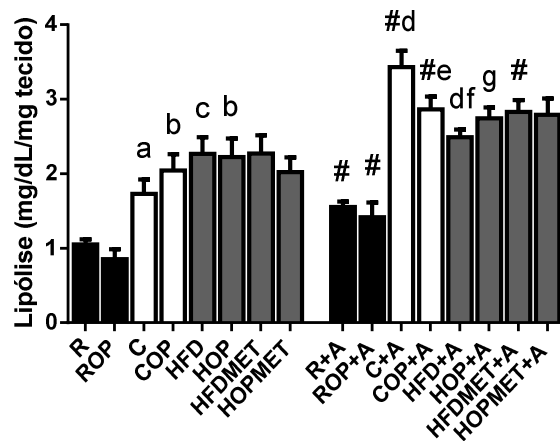


FIGURA 11 – Lipólise (mg/dL/mg tecido) na ausência e presença de adrenalina à partir do tecido adiposo incubado dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). # $p < 0,05$ vs seu controle não estimulado; ^a $p < 0,05$ vs R; ^b $p < 0,05$ vs ROP; ^c $p < 0,01$ vs R; ^d $p < 0,05$ vs R+A; ^e $p < 0,01$ vs ROP+A; ^f $p < 0,001$ vs C+A; ^g $p < 0,05$ vs ROP+A.

Lipólise sem Estímulo (mg/dL/mg tecido)							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
1,053 ± 0,064 (n=8)	0,856 ± 0,130 (n=5)	1,729 ± 0,194 (n=8) ^a	2,046 ± 0,216 (n=7) ^b	2,269 ± 0,221 (n=8) ^c	2,224 ± 0,249 (n=8) ^b	2,273 ± 0,242 (n=9)	2,022 ± 0,198 (n=8)
Lipólise com Estímulo (mg/dL/mg tecido)							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
1,556 ± 0,071 (n=8) [#]	1,415 ± 0,199 (n=5) [#]	3,432 ± 0,219 (n=24) ^{#d}	2,866 ± 0,170 (n=21) ^{#e}	2,491 ± 0,103 (n=24) ^{df}	2,746 ± 0,144 (n=23) ^g	2,827 ± 0,162 (n=27) [#]	2,793 ± 0,217 (n=24)

Os animais dos grupos controle (R, ROP) não mostraram alteração na lipólise basal ($p > 0,05$). Animais alimentados com ração rica em carboidratos (C, COP) apresentaram aumento na lipólise basal quando comparados aos grupos R (64,2%) e

ROP (139%), respectivamente ($p < 0,05$). O mesmo ocorreu para os animais alimentados com ração hiperlipídica (HFD, HOP), que mostraram maior lipólise quando comparados aos grupos R (115,5%; $p < 0,01$) e ROP (159,8%; $p < 0,05$), respectivamente.

A adição de adrenalina promoveu aumento na lipólise dos animais do grupo R, ROP, C, COP e HFDMET, quando comparados aos seus respectivos controles não estimulados ($p < 0,05$). Animais do grupo C (120,6%) e HFD (60,1%) estimulados apresentaram maior lipólise quando comparados ao grupo controle estimulado (R+A) ($p < 0,05$). A suplementação com óleo de peixe nos animais dos grupos COP+A (102,5%) e HOP+A (94,1%) promoveu aumento na lipólise, quando comparados ao grupo ROP+A ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). Os animais do grupo HFD+A (27,4%) apresentaram, ainda menor lipólise quando comparados ao grupo C+A ($p < 0,001$).

5.3 EFEITOS DO ÓLEO DE PEIXE E METFORMINA NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA ASSOCIADA À OBESIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA

A fim de relacionar os efeitos da obesidade no desencadeamento da resistência à insulina, objetivou-se também estudar a resposta inflamatória neste quadro, a qual sabe-se apresenta papel chave. Assim, a concentração plasmática de citocinas, como o TNF- α (próinflamatório) e adiponectina (antiinflamatória e sensibilizadora à insulina) foram mensuradas, além da infiltração de células imunitárias em dois tipos diferentes de tecido adiposo, epididimal e retroperitoneal.

5.3.1 Concentração Plasmática de TNF- α e Adiponectina

5.3.1.1 TNF- α

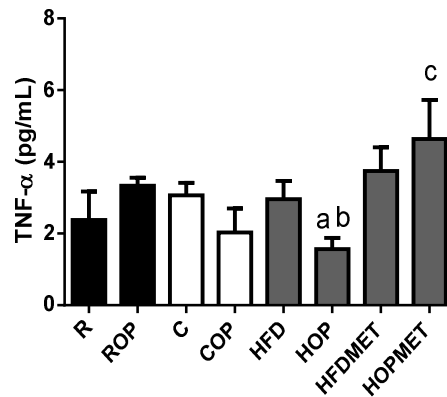


FIGURA 12 – Concentração plasmática de TNF- α dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^a $p < 0,05$ vs ROP, ^b $p < 0,05$ vs HFD; ^c $p < 0,05$ vs HOP.

TNF- α Plasmático (pg/mL)							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
2,379±	3,334±	3,069±	2,031±	2,955±	1,564±	3,744±	4,634±
0,799	0,223	0,347	0,669	0,508	0,311	0,663	1,095
(n=7)	(n=5)	(n=8)	(n=6)	(n=8)	(n=8) ^{ab}	(n=8)	(n=5) ^c

Os grupos controle (R, ROP) não apresentaram alteração na produção desta citocina ($p > 0,05$). Animais alimentados com ração rica em carboidratos (C, COP) também não mostraram alteração ($p > 0,05$). Animais alimentados com ração hiperlipídica (HFD) também não apresentaram alteração ($p > 0,05$), entretanto a suplementação com óleo de peixe (HOP) reduziu em 47,1% a produção de TNF- α quando comparada à do grupo HFD ($p < 0,05$). O mesmo grupo (HOP) também apresentou 53,1% de redução quando comparado ao grupo ROP ($p < 0,05$). O grupo HOPMET apresentou 196,3% de aumento quando comparado ao grupo HOP ($p < 0,05$).

5.3.1.2 Adiponectina

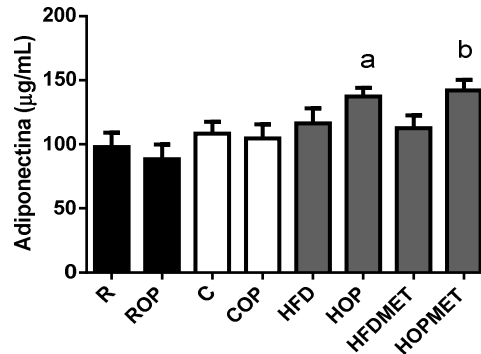


FIGURA 13 – Concentração plasmática de adiponectina dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^a $p < 0,05$ vs ROP; ^b $p < 0,05$ vs HFDMET.

Adiponectina Plasmática (µg/mL)							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
97,87±	88,35±	108,5±	104,6±	116,3±	137,4±	112,6±	142,1±
11,17	11,60	9,249	11,23	11,89	6,637	10,05	8,216
(n=10)	(n=9)	(n=9)	(n=9)	(n=10)	(n=9) ^a	(n=9)	(n=9) ^b

Os animais alimentados com ração regular (R, ROP) não mostraram alteração na concentração plasmática de adiponectina ($p > 0,05$). A alimentação com ração rica em carboidrato (C) ou hiperlipídica (HFD) também não promoveu alteração nesta citocina ($p > 0,05$). A suplementação com óleo de peixe não causou alterações no grupo COP, porém o grupo HOP mostrou 55,5% de aumento quando comparado ao grupo ROP ($p < 0,05$). O tratamento com metformina não promoveu alteração ($p > 0,05$), enquanto a associação de óleo de peixe e metformina no grupo HOPMET resultou em aumento de 26,2%, quando comparado ao grupo HFDMET ($p < 0,05$).

5.3.2 Infiltração de Células Imunitárias no Tecido Adiposo Epididimal

5.3.2.1 Linfócitos

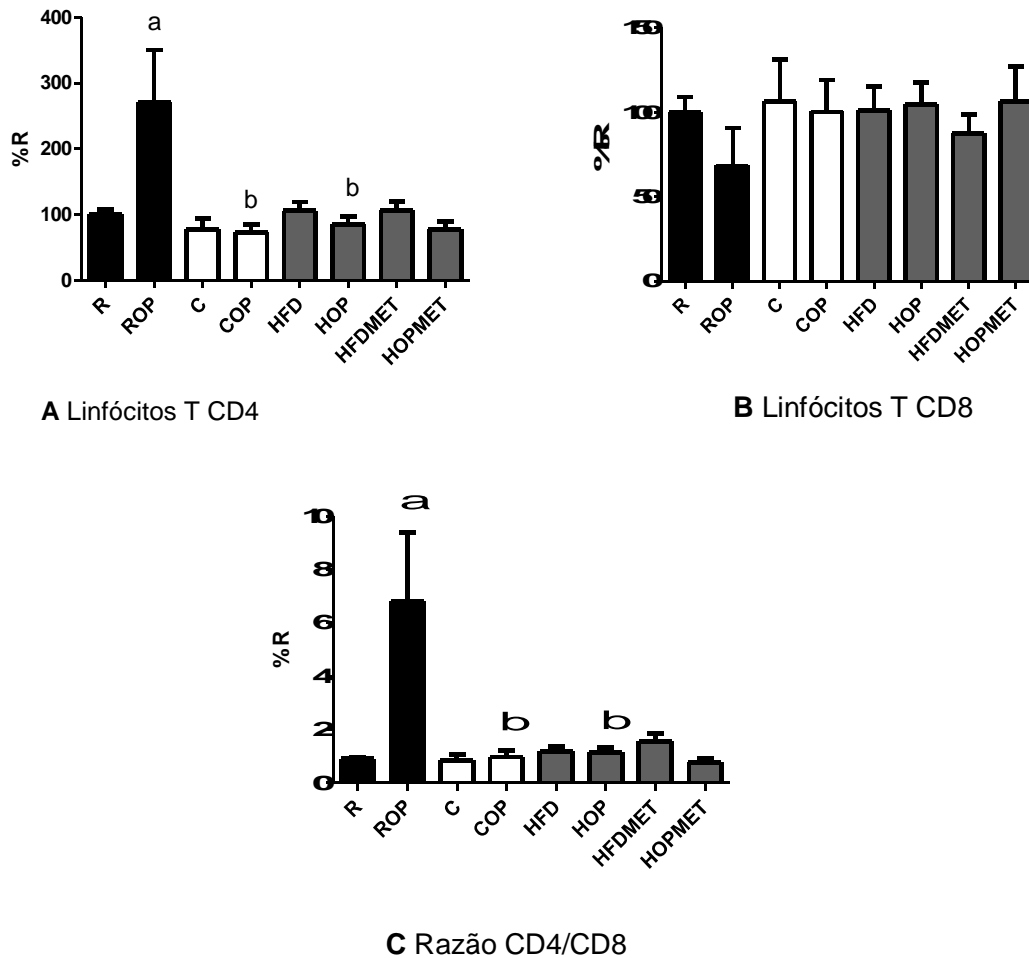


FIGURA 14 – Infiltração de linfócitos no tecido adiposo epididimal dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). **A** ^a $p < 0,05$ vs R. ^b $p < 0,001$ vs ROP. **C** ^a $p < 0,05$ vs R. ^b $p < 0,0001$ vs ROP.

Infiltração de linfócitos T CD4 no TA epididimal (%R)							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
100,0±7,6 22 (n=6)	309,2± 85,25 (n=5) ^a	77,50± 16,83 (n=12)	72,74± 12,98 (n=9) ^b	105,5± 14,49 (n=12)	84,97± 12,25 (n=9) ^b	106,6± 12,58 (n=10)	78,00±10, 91 (n=10)
Infiltração de linfócitos T CD8 no TA epididimal (%R)							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
100,0±8,9 33 (n=6)	68,61± 22,09 (n=6)	106,7± 24,62 (n=13)	100,6± 18,47 (n=10)	101,0± 14,55 (n=12)	104,5± 12,92 (n=10)	87,37± 11,60 (n=10)	106,7±20, 54 (n=11)
Razão CD4/CD8 no TA epididimal							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
0,893± 0,072 (n=5)	8,039± 2,789 (n=5) ^a	0,850± 0,205 (n=11)	0,979± 0,253 (n=9) ^b	1,188± 0,166 (n=12)	1,136± 0,199 (n=11) ^b	1,542± 0,335 (n=10)	0,771± 0,161 (n=9) ^c

Nos animais alimentados com ração regular, a suplementação com óleo de peixe (ROP) promoveu aumento de 209,2% nas células positivas para CD4 ($p < 0,05$), o que foi acompanhado por aumento de 800,2% na razão CD4/CD8 ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo R. A suplementação com óleo de peixe nos grupos COP e HOP promoveu reduções no número de linfócitos positivos para CD4 de 76,5% e 72,5% quando comparadas às do grupo ROP, respectivamente ($p < 0,001$), o que também foi acompanhado por reduções na razão CD4/CD8 de 87,8% e 85,7% quando comparadas às do grupo ROP, respectivamente ($p < 0,0001$). Não foi observadas alterações nas células positivas para CD8 ($p > 0,05$).

5.3.2.2 Macrófagos

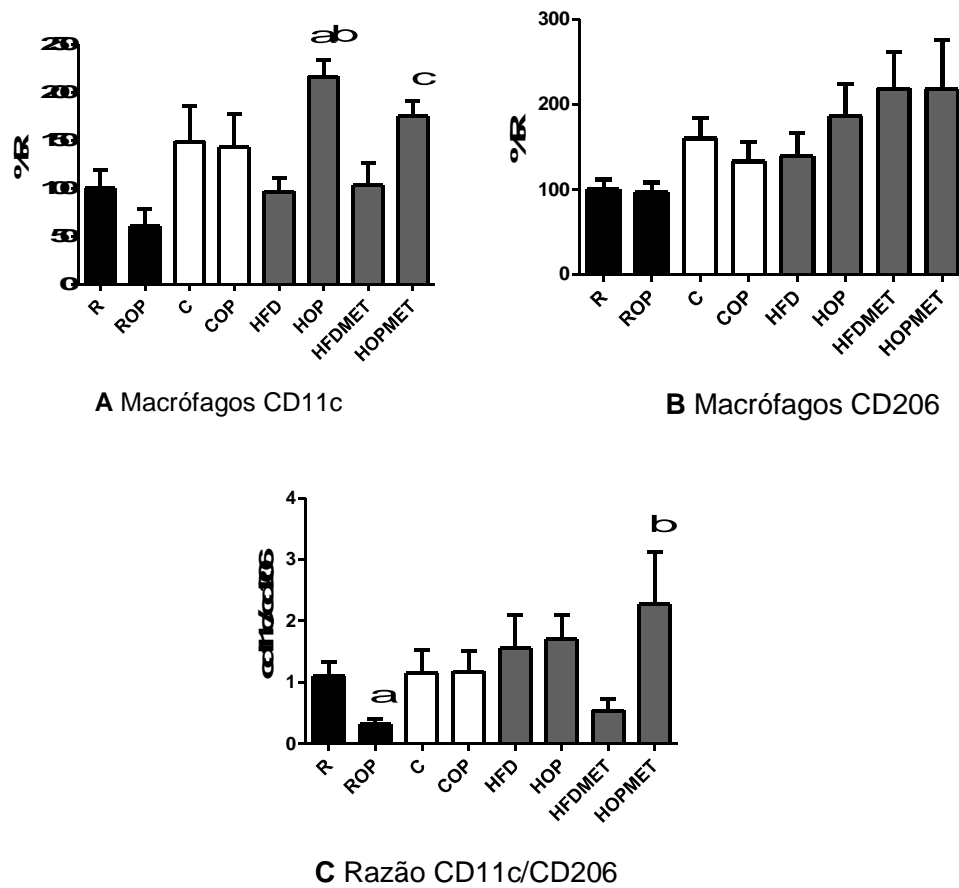


FIGURA 15 – Infiltração de macrófagos no tecido adiposo epididimal dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). **A** ^ap<0,01 vs ROP. ^bp<0,0001 vs HFD. ^cp<0,05 vs HFDMET. **C** ^ap<0,05 vs R. ^bp<0,05 vs HFDMET.

Infiltração de macrófagos CD11c no TA epididimal (%R)							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
100,0± 19,14 (n=6)	60,78± 17,26 (n=5)	148,8± 37,66 (n=10)	142,9± 34,64 (n=8)	96,61± 14,62 (n=9)	216,6± 16,81 (n=9) ^{ab}	103,5± 23,54 (n=9)	175,4±16, 12 (n=8) ^c

Infiltração de macrófagos CD206 no TA epididimal (%R)							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
100,0± 11,28 (n=6)	96,72± 11,15 (n=4)	160,5± 23,53 (n=9)	132,8± 22,99 (n=8)	139,1± 27,07 (n=10)	186,4± 37,72 (n=9) ^{ab}	218,3± 43,29 (n=9)	217,7± 57,63 (n=9) ^c

Razão CD11c/CD206 no TA epididimal							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
1,094±0,2 42 (n=6)	0,326± 0,068 (n=4) ^a	1,146± 0,379 (n=9)	1,172± 0,343 (n=7)	1,560± 0,541 (n=10)	1,705± 0,400 (n=9)	0,538± 0,194 (n=8)	2,275± 0,844 (n=9) ^b

Observa-se que ocorre relação inversa entre os dois tipos celulares infiltrados no tecido adiposo epididimal. Situação inversa daquela obtida para linfócitos foi observada para células positivas para CD11c e CD206. Animais alimentados com ração regular (R, ROP) não mostraram alteração nas células positivas para CD11c e nem para CD206 ($p>0,05$), entretanto houve redução de 70,2% na razão CD11c/CD206 quando comparada à do grupo R ($p<0,05$). Não foram observadas alterações nos animais alimentados com ração rica em carboidratos (C, COP) ($p>0,05$). Interessantemente, a suplementação com óleo de peixe no grupo HOP resultou em 256,4% de aumento quando comparado ao do grupo ROP ($p<0,01$) e 124,2% quando comparado ao do grupo HFD ($p<0,0001$). O tratamento com metformina não promoveu alterações nas populações de macrófagos ($p>0,05$), entretanto a associação de metformina e óleo de peixe no grupo HOPMET resultou em aumento de 69,5% ($p<0,05$) nas células positivas para CD11c, acompanhado de aumento de 322,8% ($p<0,05$) na razão CD11c/CD206 quando comparado ao grupo HFDMET.

5.3.3 Infiltração de Células Imunitárias no Tecido Adiposo Retroperitoneal

5.3.3.1 Linfócitos

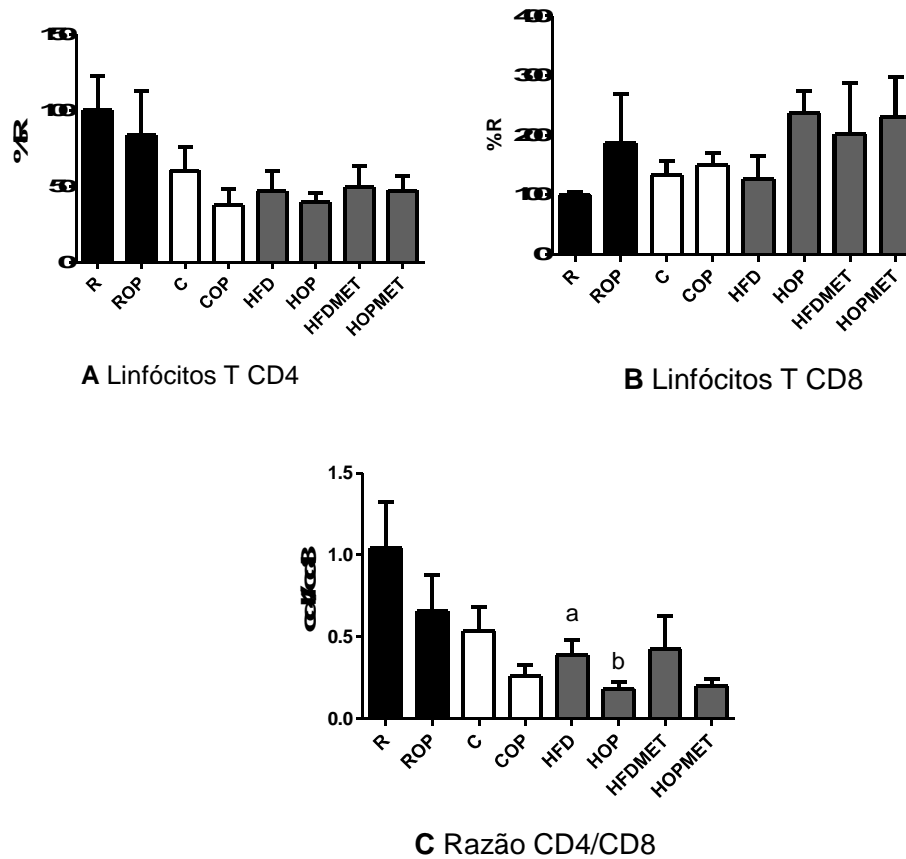


FIGURA 16 – Infiltração de linfócitos no tecido adiposo retroperitoneal dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). C^ap<0.05 vs R. C^bp<0.05 vs ROP.

Linfócitos T CD4 no TA retroperitoneal (%R)							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
100,0±	83,58±	60,39±	37,50±	46,90±	39,51±	49,51±	47,07±9,3
22,28	28,98	15,33	10,99	13,49	6,278	13,87	21 (n=7)
(n=4)	(n=4)	(n=7)	(n=6)	(n=5)	(n=6)	(n=5)	
Linfócitos T CD8 no TA retroperitoneal (%R)							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
100,0±	186,3±	133,8±	150,4±	126,5±	237,1±	202,4±	230,2±
5,325	83,00	23,57	20,43	38,08	36,01	85,22	67,72
(n=4)	(n=4)	(n=7)	(n=6)	(n=5)	(n=6) ^a	(n=5)	(n=7)

Razão Linfócitos CD4/CD8 no TA retroperitoneal

R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
1,045±	0,661±	0,536±	0,261±	0,388±	0,182±	0,426±	0,199±
0,282	0,217	0,146	0,064	0,092	0,042	0,198	0,040
(n=4)	(n=4)	(n=7)	(n=6)	(n=5) ^a	(n=6) ^b	(n=5)	(n=6)

5.3.3.2 Macrófagos

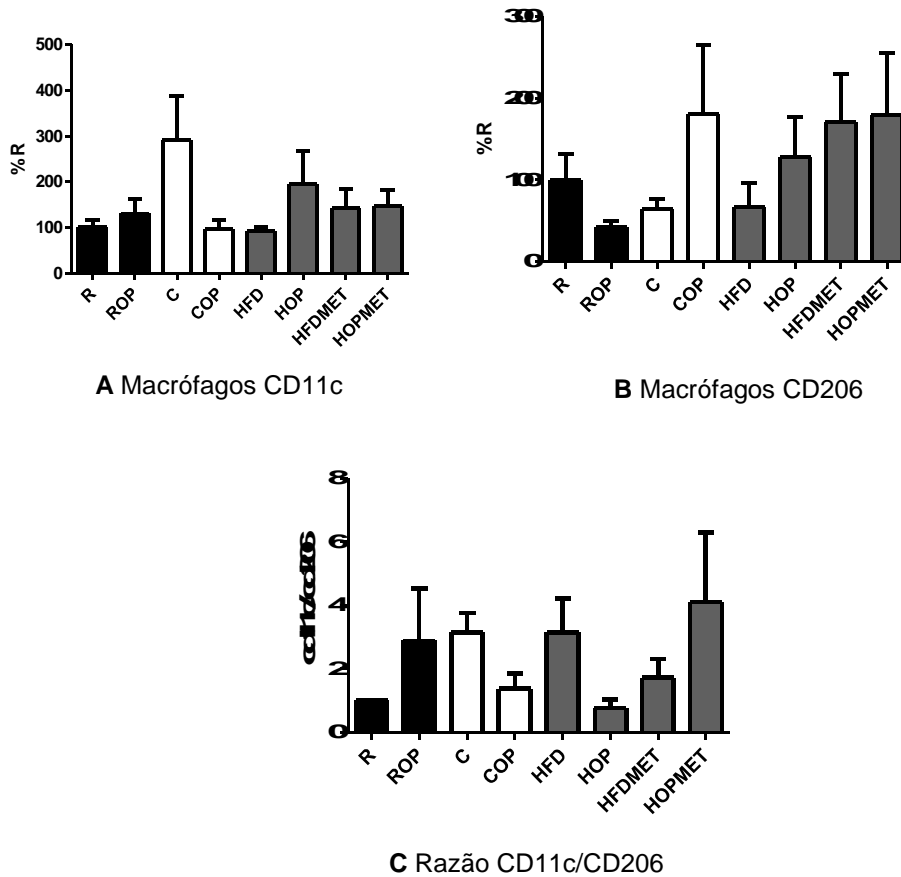


FIGURA 17 – Infiltração de macrófagos no tecido adiposo retroperitoneal dos animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP), rica em lipídios (HFD, HOP). Os animais com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe ainda receberam metformina (HFDMET, HOPMET). **A** ^ap<0,05 vs C. **C** ^ap<0,05 vs C ^bp<0,05 vs HFD.

Macrófagos CD11c no TA retroperitoneal (%R)

R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
100,0±	131,0±	290,8±	96,43±	92,32±	196,1±	142,7±	147,0±
16,23	30,31	97,03	20,31	8,399	71,27	42,10	34,36
(n=4)	(n=4)	(n=7)	(n=6) ^a	(n=3)	(n=6)	(n=6)	(n=6)

Macrófagos CD206 no TA retroperitoneal (%R)

R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
100,0±	42,20±	64,42±	180,4±	66,51±	127,5±	170,8±	179,3±
31,62	7,425	12,33	84,80	30,12	49,49	58,10	75,95
(n=4)	(n=3)	(n=6)	(n=6)	(n=4)	(n=6)	(n=6)	(n=7)

Razão CD11c/CD206 no TA retroperitoneal							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
1,000± 0,0 (n=2)	2,882± 1,661 (n=4)	3,129± 0,623 (n=7)	1,370± 0,477 (n=6) ^a	3,140± 1,055 (n=4)	0,756± 0,268 (n=4) ^b	1,711± 0,598 (n=6)	4,087±2,1 91 (n=7)

Observa-se que não houve alterações na infiltração de linfócitos e macrófagos para os animais dos grupos R, ROP, C e COP ($p>0,05$). Entretanto, o grupo HFD mostrou redução de 62,9% na razão CD4/CD8 quando comparado ao grupo R ($p<0,05$), não havendo alteração nos outros parâmetros ($p>0,05$). O grupo HOP apresentou redução de 72,5% quando comparado ao grupo ROP ($p<0,05$). Não foram observadas alterações nos demais grupos ($p>0,05$).

5.3.4 Perfil de ácidos graxos do tecido adiposo

5.3.4.1 Tecido adiposo epididimal

TABELA 7 – Perfil de ácidos graxos no tecido adiposo epididimal de animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP) e hiperlipídica (HFD, HOP). Os animais alimentados com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe também receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^a $p<0,05$ vs HFD; ^b $p<0,05$ vs R; ^c $p<0,01$ vs C; ^d $p<0,0001$ vs R; ^e $p<0,0001$ vs ROP; ^f $p<0,001$ vs C; ^g $p<0,001$ vs COP; ^h $p<0,001$ vs ROP; ⁱ $p<0,01$ vs ROP; ^j $p<0,0001$ vs C; ^k $p<0,0001$ vs COP; ^l $p<0,05$ vs ROP.

	R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
Láurico (C12:0)	0,256±0,1 84 (n=4)	0,173±0,0 72 (n=5)	0,443±0,2 01 (n=4)	0,181±0,09 5 (n=5)	0,121±0,0 74 (n=4)	Não detectado (n=3)	0,182±0,13 3 (n=5)	0,092±0,0 66 (n=5)
Mirístico (C14:0)	1,277±0,1 89 (n=4)	1,557±0,1 78 (n=5)	1,929±0,2 12 (n=4)	2,294±0,25 7 (n=5)	1,309±0,1 33 (n=4)	0,975±0,3 07 (n=4)	1,402±0,09 4 (n=5)	0,977±0,2 49 (n=5)
Palmítico (C16:0)	11,40±0,8 90 (n=4)	11,03±1,4 36 (n=5)	13,11±1,7 99 (n=4)	13,73±0,86 4 (n=5)	13,00±0,4 34 (n=4)	10,69±1,2 87 (n=4)	8,970±0,87 0 (n=5) ^a	10,64±1,3 61 (n=4)
Esteárico (C18:0)	1,093±0,1 31 (n=4)	0,812±0,0 94 (n=4)	0,597±0,0 96 (n=3) ^b	1,521±0,38 0 (n=5) ^c	1,233±0,0 58 (n=4)	1,180±0,1 21 (n=4)	0,818±0,11 3 (n=5) ^a	0,843±0,2 86 (n=5)
Oléico (C18:1n9)	29,46±0,3 06 (n=4)	29,44±0,7 59 (n=5)	48,22±1,2 79 (n=4) ^d	45,54±0,71 2 (n=5) ^e	49,09±1,4 60 (n=4) ^d	47,91±2,2 99 (n=4) ^e	49,47±0,84 5 (n=5)	48,92±0,3 69 (n=5)
Linoléico (C18:2n6)	47,45±0,8 23 (n=4)	46,34±1,1 03 (n=5)	17,87±2,1 19 (n=4) ^d	19,85±1,18 4 (n=5) ^e	26,91±1,3 70 (n=4) ^{df}	29,79±2,9 69 (n=4) ^{eg}	29,35±0,84 2 (n=5)	29,56±0,6 27 (n=5)
Linolênico (C18:3n3)	2,721±0,2 69 (n=4)	2,752±0,2 99 (n=5)	Não detectado (n=3) ^d	0,725±0,13 0 (n=5) ^h	0,960±0,1 63 (n=4) ^{dc}	0,967±0,3 46 (n=4) ⁱ	1,465±0,12 3 (n=5) ^a	0,863±0,3 55 (n=4)
Araquidônico (C20:4n6)	6,200±0,7 57 (n=4)	6,934±0,4 91 (n=5)	16,91±1,4 73 (n=4) ^d	15,92±1,27 8 (n=5) ^e	7,145±0,4 02 (n=4) ^j	8,121±0,3 99 (n=4) ^k	8,129±0,38 3 (n=5)	7,816±0,4 24 (n=5)
EPA (C20:5n3)	0,145±0,0 84 (n=4)	0,415±0,0 11 (n=4)^b	Não detectado (n=3)	0,118±0,04 97 (n=5)^h	0,201±0,1 08 (n=4)	Não detectado (n=3)^h	0,166±0,02 4 (n=5)	0,063±0,0 4 (n=5)
DHA (C22:6n3)	Não detectado (n=4)	0,393±0,0 48 (n=5)	Não detectado (n=3)	0,127±0,05 2 (n=5)^l	Não detectado (n=3)	0,092±0,0 49 (n=3)^l	0,020±0,00 75 (n=4)	0,098±0,0 58 (n=4)

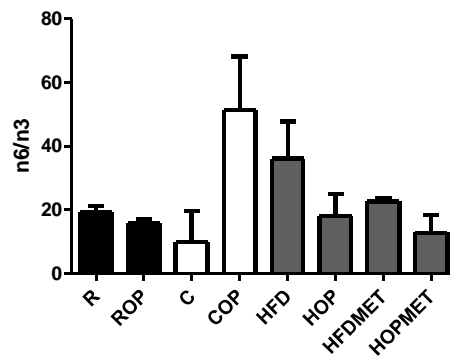


FIGURA 18 – Razão n6/n3 de ácidos graxos no tecido adiposo epididimal de animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP) e hiperlipídica (HFD, HOP). Os animais alimentados com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe também receberam metformina (HFDMET, HOPMET).

Razão n6/n3 no TA epididimal							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
19,23±	15,78±	9,802±	51,47±	36,04±	18,12±	22,59±	12,91±5,4
1,852	1,257	9,802	16,73	11,63	6,904	1,238	73 (n=5)
(n=4)	(n=5)	(n=3)	(n=5)	(n=4)	(n=4)	(n=5)	

Índice de insaturação* no TA epididimal							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
158,05	162,5	151,6	152,6	135,4	143,4	146	142,8

*calculado pela porcentagem de ácidos graxos multiplicada pelo número de duplas ligações.

Observa-se que houve aumento de 186,2% na porcentagem de EPA no grupo ROP, quando comparado ao grupo R ($p < 0,05$), sendo que houve aumento concomitante no índice de insaturação para este grupo. O grupo COP apresentou redução de 71,56% na incorporação de EPA, quando comparado ao grupo ROP ($p < 0,001$), acompanhado de redução da incorporação de DHA (67,7%; $p < 0,05$), isto resultou em menor índice de insaturação para este grupo. O grupo HOP também apresentou reduções na porcentagem de EPA e DHA, quando comparado ao grupo ROP, isto resultou em menor índice de insaturação para este grupo. Estes resultados indicam menor incorporação de EPA e DHA nos animais alimentados com ração hiperlipídica e rica em carboidratos, quando comparados aos animais que receberam ração regular.

5.3.4.2 Tecido adiposo retroperitoneal

TABELA 8 – Perfil de ácidos graxos no tecido adiposo retroperitoneal de animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP) e hiperlipídica (HFD, HOP). Os animais alimentados com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe também receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^ap<0,05 vs HFD; ^bp<0,05 vs R; ^cp<0,0001 vs R; ^dp<0,05 vs ROP; ^ep<0,05 vs C; ^fp<0,05 vs COP.

	R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
Láurico (C12:0)	0,62±0,065 (n=5)	0,841±0,317 (n=4)	1,526±0,819 (n=3)	0,913±0,196 (n=3)	0,618±0,027 (n=5)	0,642±0,235 (n=2)	1,271±0,285 (n=4) ^a	1,137±0,221 (n=4)
Mirístico (C14:0)	0,992±0,254 (n=5)	1,527±0,245 (n=4)	2,736±0,940 (n=3)	2,583±0,514 (n=4)	1,261±0,147 (n=5)	1,379±0,238 (n=2)	2,416±0,416 (n=4) ^a	2,018±0,428 (n=4)
Palmitico (C16:0)	11,35±0,695 (n=5)	13,06±0,997 (n=4)	17,51±4,020 (n=3)	13,43±1,663 (n=4)	12,97±1,524 (n=5)	12,64±3,197 (n=2)	25,36±4,803 (n=4)	22,37±4,388 (n=4)
Estearico (C18:0)	1,025±0,099 (n=5)	1,243±0,164 (n=4)	0,968±0,182 (n=3)	0,767±0,16 (n=4)	1,306±0,204 (n=5)	1,489±0,683 (n=2)	3,043±0,820 (n=4)	2,465±0,499 (n=4)
Oléico (C18:1n9)	30,02±0,624 (n=5)	39,15±3,909 (n=4)	32,51±16,30 (n=3)	46,01±3,360 (n=4)	50,26±1,908 (n=5)	50,58±2,922 (n=2)	11,83±11,83 (n=4) ^a	24,47±14,13 (n=4)
Linoléico (C18:2n6)	46,24±0,973 (n=5)	35,44±4,924 (n=4) ^b	21,35±3,927 (n=3) ^c	17,84±1,128 (n=4) ^d	25,38±0,608 (n=5) ^c	24,69±0,533 (n=2)	43,24±5,507 (n=4) ^a	36,98±6,670 (n=4)
Linolênico (C18:3n3)	2,589±0,134 (n=5)	1,707±0,210 (n=4)	0,978±0,361 (n=3) ^b	0,912±0,073 (n=4) ^d	0,965±0,108 (n=5) ^b	1,057±0,024 (n=2)	1,780±0,121 (n=4) ^a	1,345±0,218 (n=4)
Araquidônico (C20:4n6)	6,931±0,905 (n=5)	6,683±0,597 (n=4)	22,26±6,426 (n=3) ^b	16,17±1,714 (n=4) ^d	7,046±0,518 (n=5) ^e	7,287±1,028 (n=2) ⁱ	10,40±0,798 (n=4) ^a	8,517±1,717 (n=4)
EPA (C20:5n3)	0,219±0,042 (n=5)	0,149±0,057 (n=4)	0,138±0,021 (n=3)	0,187±0,007 (n=3)	0,153±0,008 (n=5)	0,148±0,038 (n=2)	0,698±0,091 (n=3)^a	0,533±0,093 (n=4)
DHA (C22:6n3)	0,02±0,006 (n=5)	0,194±0,079 (n=4)^b	0,023±0,013 (n=3)	0,143±0,005 (n=3)^e	0,0058±0,0034 (n=4)	0,094±0,065 (n=2)	0,105±0,057 (n=4)	0,175±0,059 (n=4)

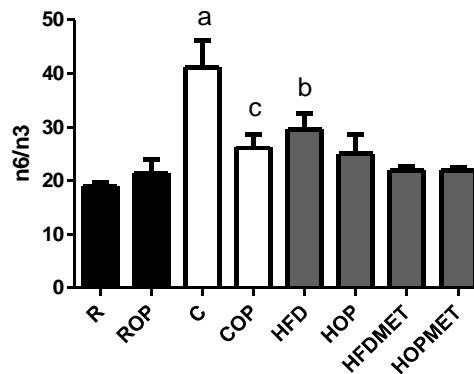


FIGURA 19 – Razão n6/n3 de ácidos graxos no tecido adiposo retroperitoneal de animais suplementados ou não com óleo de peixe alimentados com ração regular (R, ROP), rica em carboidratos (C, COP) e hiperlipídica (HFD, HOP). Os animais alimentados com ração hiperlipídica, suplementados ou não com óleo de peixe também receberam metformina (HFDMET, HOPMET). ^ap<0,01 vs R; ^bp<0,05 vs R; ^cp<0,05 vs C.

Razão n6/n3 no TA retroperitoneal							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
18,97± 0,818 (n=5)	21,37± 2,604 (n=4)	41,11± 5,054 (n=3) ^a	26,20± 2,447 (n=4) ^c	29,58± 2,888 (n=5) ^b	24,98± 3,677 (n=2)	21,96± 0,6925 (n=4)	21,99±0,4 781 (n=4)

Índice de insaturação* no TA retroperitoneal							
R	ROP	C	COP	HFD	HOP	HFDMET	HOPMET
159,2	143,8	168,0	150,9	132,9	133,6	149,4	140,2

*calculado pela porcentagem de ácidos graxos multiplicada pelo número de duplas ligações.

A incorporação de EPA não foi eficiente no tecido adiposo retroperitoneal, não sendo observada diferença na porcentagem deste ácido graxo nos grupo suplementados com óleo de peixe. Somente o grupo HFDMET apresentou aumento de 356,2% na porcentagem de EPA, quando comparado ao grupo HFD ($p < 0,05$), o que foi acompanhado de aumento no índice de instauração para este grupo. Com relação à incorporação de DHA, observa-se que o grupo ROP mostrou aumento de 870% na porcentagem de DHA, quando comparado ao grupo R ($p < 0,05$), entretanto sem aumento no índice de insaturação. Isto pode ser devido à redução de 23,35% na porcentagem de ácido linoléico, quando comparado ao grupo R ($p < 0,05$). O grupo COP também mostrou aumento de 521,7% na porcentagem de DHA, quando comparado ao grupo C ($p < 0,05$), entretanto sem aumento no índice de insaturação para este grupo.

6 DISCUSSÃO

A obesidade, considerada doença, e representada pelo excesso de gordura corporal, pode afetar a saúde do indivíduo portador de diversas maneiras, resultando em menor expectativa de vida. A ingestão hipercalórica é um dos fatores que propiciam o seu aparecimento, sendo os estudos de obesidade induzida pela dieta hiperlipídica úteis na avaliação das comorbidades envolvidas e nas possíveis formas de tratamento (NASCIMENTO *et al.*, 2011).

O uso de modelos animais de obesidade induzida pela dieta é útil, pois permite uma correlação mais exata com a realidade, pelo fato de que o próprio fenótipo obeso é produzido. Estudos mostraram, ao longo de mais de 60 anos de pesquisa com modelos animais de obesidade, que dietas hiperlipídicas acarretam hiperglicemia e resistência à insulina com alterações nas vias de sinalização da insulina, além de alterações no músculo e fígado. Por isso, dietas hiperlipídicas são geralmente aceitas como modelos animais válidos de síndrome metabólica e resistência à insulina (BUETTNER; SCHOLMERICH; BOLLHEIMER, 2007).

Neste estudo, utilizou-se 3 tipos diferentes de rações durante o período experimental. Cada grupo foi submetido à sua respectiva ração por um período inicial de 8 semanas. Este período é considerado suficiente para induzir obesidade em animais submetidos à dieta hiperlipídica (ARAÚJO, *et al.*, 2007). A princípio, a ração considerada controle era normolipídica, porém ao longo do período experimental os animais recebendo esta ração desenvolveram ganho excessivo de peso. Mais tarde, análise da deposição de lipídios hepáticos (discutido adiante) também mostrou maior deposição de gordura hepática nestes animais. Assim, a ração anteriormente considerada normolipídica gerou dúvidas e, foi observado que ela possui maior conteúdo de carboidratos (75,81Kcal%; 720,7g/kg) contra 26Kcal% (347,5g/kg) da ração hiperlipídica. Sabendo-se do potencial lipogênico de carboidratos, considerou-se a adição de terceira ração aos experimentos, a qual consistia na ração padrão do biotério (Nuvilab CR1, Quimtia®). Esta ração padrão possui 67,3%Kcal de carboidratos, entretanto estes carboidratos consistem, em sua maioria, de farelo de soja e trigo, além

de milho integral moído, enquanto a ração normolipídica (que se mostrou rica em carboidratos) consiste basicamente, de sacarose e amido de milho. Interessante notar que as duas rações iniciais utilizadas foram baseadas na formulação indicada pela Associação Internacional de Nutrição, sendo chamada AIN-93, que foi estabelecida com o intuito de padronizar as rações utilizadas em experimentos animais (REEVES, *et al.* 1993; REEVES, 1997). Inicialmente, esta associação havia formulado, em 1976, ração padronizada, chamada de AIN-76. Em 1993, após reunião envolvendo nutricionistas, a padronização AIN-76 foi adaptada, gerando a AIN-93.

Não é só a quantidade de carboidratos, mas também o tipo que irão influenciar os efeitos metabólicos finais (dislipidemia, doenças cardiovasculares e diabetes *mellitus*) (SILVA *et al.*, 2011). O termo índice glicêmico foi estabelecido por JENKINS *et al.* (1981) para caracterizar o perfil de absorção e efeitos metabólicos dos carboidratos após as refeições. Fatores como natureza do amido (amilose ou amilopectina), presença de fibras, entre outros afetam o índice glicêmico (SILVA *et al.*, 2011). Alimentos com maior quantidade de amilose apresentam menor índice glicêmico, pois a amilose é mais lentamente digerida e absorvida do que a amilopectina (os grânulos de amilose agrupam-se em uma estrutura que dificulta a entrada de água, enquanto as moléculas ramificadas de amilopectina permitem a entrada de água, facilitando a digestão e absorção). O resultado é uma liberação mais rápida de glicose à partir da amilopectina. Estes alimentos com elevado índice glicêmico acarretam em pico de glicose e insulina mais rápidos após as refeições, causando sobrecarga pancreática. Nestes casos, a maior secreção de insulina causa hipoglicemia reacional, a qual induz a liberação de hormônios contra-regulatórios, como glucagon que podem promover aumento da concentração plasmática de ácidos graxos livres, fator importante no desencadeamento de resistência à insulina (SARTORELLI; CARDOSO, 2006).

Sabe-se que a presença de fibras pode retardar o esvaziamento gástrico e também interagir com as partículas dos nutrientes, conferindo menor área de contato direto com a parede do intestino delgado, assim havendo menor velocidade de absorção dos nutrientes, tais como os carboidratos (SARTORELLI; CARDOSO, 2006). Também, o maior consumo de fibras obtidas da casca de grãos é inversamente correlacionado com o risco de doenças cardiovasculares (SARTORELLI; CARDOSO,

2006). Assim, a ração padrão do biotério, por seu conteúdo de fibras obtidas dos farelos, deve acarretar menor velocidade de absorção de carboidratos, enquanto que a ração rica em carboidratos possui, além de amido, a sacarose e, ainda não conta com a presença de farelos. Sacarose, especificamente a porção glicose deste dissacarídeo, é responsável por estimular a produção de insulina pelas células beta-pancreáticas, o que acarreta a diferenciação de adipócitos, resultando em expansão do tecido adiposo (HAO *et al.*, 2012). Ainda, dietas com alto conteúdo de carboidratos atuam como possíveis fatores de risco para dislipidemia, da mesma forma que dietas hiperlipídicas, sendo que seu principal efeito metabólico é atribuído à maior lipogênese hepática (SARTORELLI; CARDOSO, 2006). Parece que a diferença na qualidade dos carboidratos pode ser responsável pelo diferente perfil metabólico obtido pelos animais.

Os efeitos destas 3 rações, regular (R), hiperlipídica (HFD) e rica em carboidratos (C) podem ser verificados nas figuras 2, 3 e 4. Como esperado, a ração hiperlipídica resultou em maior ganho de massa corporal e intolerância à glicose quando comparada com a ração regular. Já a ração rica em carboidratos resultou em ganho de massa corporal, porém os animais não tornaram-se intolerantes à glicose. Neste período inicial não foi avaliada a insulinemia, portanto não se pode concluir se existe resistência à insulina nestes animais intolerantes à glicose.

É reconhecido que o melhor modelo animal de síndrome metabólica humana é obtido por meio de dietas ricas em gordura saturada e carboidratos (frutose e sacarose), pois os animais desenvolvem intolerância à glicose, hiperinsulinemia, obesidade, hiperlipidemia e anormalidades cardiovasculares (HARRIS; APOLZAN, 2012; PANCHAL; BROWN, 2011). Uma das explicações para o não desenvolvimento de intolerância à glicose nos animais alimentados com ração rica em carboidratos pode ter sido a quantidade de sacarose (100g/kg; 10%) e o tempo em que estes animais foram submetidos à esta ração (8 semanas). Ainda, há que considerar que a ração hiperlipídica utilizada também possuía 100g/kg de sacarose, além de gordura saturada. Assim, pode ter ocorrido efeito sinérgico entre a sacarose e a gordura nos animais alimentados com ração hiperlipídica. YANG *et al.* (2012) utilizaram modelo animal de indução de síndrome metabólica e obesidade com dieta rica em carboidratos (sacarose) e gordura saturada por período máximo de 4 semanas. A ração utilizada continha

49,1% (m/m) de carboidratos, sendo 34,1% de sacarose e 15% de amido de milho, além de 21,2% (m/m) de gordura. Os autores observaram ganho de massa corporal 1 semana após o início da dieta, com aumento da massa de tecido adiposo branco mesentérico na segunda semana e aumento da insulinemia na quarta semana de dieta. Em outro estudo CHUN *et al.* (2010) alimentaram ratos com ração rica em sacarose (650g/kg) e outra ração rica em amido de milho (500g/kg) durante 4 semanas e encontraram efeito semelhante das dietas em aumentar a gordura visceral (35% de aumento) quando comparado ao grupo controle, além de redução no transporte da glicose estimulado pela insulina no músculo esquelético. As rações utilizadas neste estudo continham amido de milho purificado, rica em carboidrato (620,7g/kg) e a hiperlipídica (247,5g/kg), enquanto a ração regular continha amido de milho, de trigo e de soja obtidos dos farelos dos grãos contendo, assim maior quantidade de fibras. Portanto, a quantidade de sacarose e o tempo de exposição dos animais pode não ter sido suficiente para instalar quadro de intolerância à glicose nos animais alimentados com ração rica em carboidratos, enquanto a presença de sacarose na ração hiperlipídica pode ter contribuído para a instalação deste quadro.

Consumo de dietas ricas em gordura promove balanço positivo para a gordura e, como consequência aumento do tamanho de tecido adiposo, já que o maior consumo de gordura não é acompanhado de aumentos na taxa de oxidação deste macronutriente (PEREIRA-LANCHA *et al.*, 2010). Adiposidade possui papel-chave no desenvolvimento de resistência à insulina, principalmente por atuar nas vias de sinalização insulínicas, como mostrado por YOUNGREN *et al.* (2001) que verificaram redução na autofosforilação do receptor da insulina no músculo esquelético após estímulo com insulina, em ratos alimentados com ração rica em gordura e sacarose. De modo semelhante, ARAÚJO *et al.* (2007) encontraram defeitos em todas as etapas da sinalização da insulina no músculo esquelético, fígado e hipotálamo de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica. Assim, elevado consumo de gordura, principalmente de origem animal, está correlacionado a resistência à insulina e adiposidade, com alterações na ação da insulina em tecidos-alvo.

Após o período inicial de indução de obesidade e intolerância à glicose (8 semanas), iniciou-se o tratamento dos animais com óleo de peixe e metformina que

ocorreu durante as 4 semanas seguintes, totalizando 12 semanas de experimento. Os animais receberam suplementações diárias com óleo de peixe (1g/kg), sendo que alguns animais recebendo ração hiperlipídica também receberam o medicamento metformina (300mg/kg), diariamente por meio de gavagem.

Analisando a tolerância à glicose através da área sob a curva glicêmica (AUC) (Figura 6), observa-se que os animais dos grupos controle (R e ROP) permaneceram tolerantes à glicose, como esperado. O grupo ROP também mostrou redução no ganho de massa corporal, quando comparado ao grupo R (Tabela 4). Os animais recebendo ração rica em carboidratos (C e COP) também permaneceram tolerantes à glicose, ainda que o grupo C tenha mostrado maior glicemia de jejum quando comparado ao grupo R (Figura 5). Porém, os animais recebendo ração hiperlipídica sem qualquer tratamento (HFD) continuaram intolerantes à glicose, além de demonstrarem maior insulinemia quando comparados aos animais do grupo controle (R). Estes animais, quando comparados aos animais do grupo com ração rica em carboidratos (C) também demonstraram maior AUC. Interessantemente, o tratamento com óleo de peixe não promoveu melhora destes parâmetros, já o tratamento com metformina, embora tenha promovido redução da insulinemia, não foi capaz de melhorar a intolerância à glicose.

Insulinemia foi mensurada com o objetivo de confirmar o quadro de resistência à insulina e, de fato os animais do grupo HFD apresentaram maior glicemia (figura 6) e insulinemia (figura 7) quando comparados ao grupo R, confirmando a instalação deste quadro. Hiperinsulinemia é observada em indivíduos resistentes à insulina e, classicamente é considerada como consequência do próprio estado resistente à insulina, com aumento de sua secreção pancreática de forma compensatória à elevada glicemia, decorrente de reduzida sinalização da insulina. Entretanto, IOZZO *et al.* (2001) demonstraram que hiperinsulinemia pode ser causa da resistência à insulina, pois os autores observaram reduzida atividade da enzima glicogênio sintase na hiperinsulinemia fisiológica utilizando indivíduos submetidos à infusão crônica de insulina. De fato, a instalação de resistência à insulina hepática é capaz de reduzir a síntese de glicogênio, entretanto é difícil afirmar que a hiperinsulinemia seja causa ou consequência da resistência à insulina, somente que ela participa da fisiopatologia da doença.

Óleo de peixe não foi capaz de melhorar este parâmetro (figura 7). KALUPAHANA *et al.* (2010) demonstraram que camundongos alimentados com ração hiperlipídica por 11 semanas tornaram-se obesos e intolerantes à glicose, sendo que a alimentação dos animais com ração hiperlipídica e EPA simultaneamente por 11 semanas, foi capaz de prevenir a instalação deste quadro. Ainda, a adição de EPA durante 5 semanas à animais submetidos à dieta hiperlipídica por 6 semanas manteve concentrações normais de glicose e insulina plasmáticas. Assim, estes autores mostraram que EPA é capaz de prevenir e reverter quadro de intolerância à glicose. Por outro lado, MUURLING *et al.* (2003) alimentaram camundongos APOE*3 Leiden com ração hiperlipídica (45,3 Kcal%) durante 20 semanas, induzindo resistência à insulina. Após esse período, adicionaram óleo de peixe (3g/100g) à ração hiperlipídica e permaneceram na dieta por 10 semanas. Os autores não observaram melhora na sensibilidade à insulina, porém ocorreu redução das concentrações de TNF- α no tecido adiposo dos animais. Nosso estudo demonstrou que óleo de peixe não é capaz de reverter estado de resistência à insulina pré-existente, entretanto poderia prevenir a instalação deste quadro. De modo interessante, metformina foi capaz de reduzir a insulinemia dos animais (figura 7). Isto pode ser consequência da melhora da sensibilidade à insulina promovida pelo fármaco, acarretando redução da hipersecreção do hormônio. Metformina (320mg/kg/dia) durante 4 semanas foi capaz de melhorar a ação da insulina no músculo sóleo de ratos obesos e resistentes à insulina (Zucker), por meio da ativação de AMPK e redução da fosforilação em serina de IRS-1 (BIKMAN *et al.*, 2010). Metformina representa fármaco amplamente utilizado para o tratamento de diabetes *mellitus* tipo 2. Ela age por meio da ativação da via de sinalização da quinase ativada por AMP (AMPK), porém seu exato mecanismo de ação ainda não é conhecido (CATON *et al.*, 2011). Sabe-se que esta droga alivia a resistência à insulina, suprime a lipólise mediada por TNF- α , reduz as concentrações de ácidos graxos livres circulantes, além de promover o controle da massa corporal e tamanho dos adipócitos (REN *et al.*, 2006). Diferente das clássicas sulfoniluréias que aumentam a secreção de insulina, metformina possui efeito anti-hiperglicemiante, mais do que hipoglicemiante, agindo através do aumento da sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos (REN *et al.*, 2006).

Alterações foram também observadas com relação ao tecido adiposo, na dependência do tipo de tecido. Como será discutido abaixo, óleo de peixe possui diferentes resultados nos adipócitos epididimais e retroperitoneais. Atividade lipolítica no tecido adiposo epididimal também variou, principalmente na dependência do tipo de ração.

Ingestão de rações hipercalóricas resulta em deposição excessiva de gordura, acarretando hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos com conseqüente aumento da massa de tecido adiposo e ganho de massa, principalmente através da perda do equilíbrio energético causada pelo consumo excessivo de energia (KALUPAHANA *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2011). Curiosamente, tem havido interesse na pesquisa relacionando o gasto energético, além do consumo energético envolvidos na obesidade. Assim, foi considerado que roedores obesos apresentam redução na termogênese do tecido adiposo marrom e, que há superexpressão das proteínas desacopladoras UCP1 e UCP2 nos tecidos adiposos marrom e branco, respectivamente, em roedores resistentes à obesidade induzida pela dieta hiperlipídica. Isto demonstra importante papel da termogênese no desenvolvimento da obesidade (RICQUIER; BOUILLAUD, 2000; JANOVSÁ *et al.*, 2013).

Adipócitos possuem funções importantes na regulação do metabolismo energético, que pode ser observado através da importante função endócrina do tecido adiposo. Além disso, o fígado é reconhecido também por seu papel regulador do metabolismo (YANG *et al.*, 2012). Assim, dietas hipercalóricas podem resultar em alterações no metabolismo do tecido adiposo e hepático, causando alterações no metabolismo de lipídios e carboidratos nestes tecidos promovendo dentre outras coisas lipogênese e gliconeogênese hepática, levando como conseqüência, resistência à insulina em todo o organismo.

Neste estudo, as duas rações hipercalóricas (hiperlipídica e rica em carboidratos) resultaram em aumento na massa dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal (Tabela 5), além de aumento no diâmetro dos adipócitos (Tabela 6). Isto caracterizaria quadro de adiposidade relacionado com hipertrofia do adipócito. Esta hipertrofia foi acompanhada de aumento na deposição de triacilglicerol hepático (Figura 9) nos animais recebendo as duas rações. Além disso, ração hiperlipídica acarretou depósito

de glicogênio hepático (Figura 10), o que não foi observado na ração rica em carboidratos.

Quando é adicionada a suplementação com óleo de peixe como único tratamento nos animais (grupos ROP, COP e HOP), há um fato interessante. As respostas obtidas variaram de acordo com a dieta experimental utilizada e com o tipo de tecido adiposo avaliado. Assim, nos animais controle suplementados com óleo de peixe (ROP) observou-se redução do ganho de massa corporal, porém acompanhado de aumento no diâmetro dos adipócitos epididimais e retroperitoneais, sem nenhuma alteração na massa de tecido adiposo. Já nos animais recebendo ração rica em carboidrato (COP), o óleo de peixe foi capaz de reduzir o diâmetro dos adipócitos epididimais, mas não dos retroperitoneais. Por fim, nos animais com ração hiperlipídica (HOP), a suplementação com óleo de peixe acarretou aumento na massa de tecido adiposo retroperitoneal, acompanhado de aumento no diâmetro destes adipócitos, entretanto reduziu o diâmetro dos adipócitos epididimais.

As respostas de diferentes tipos de tecido adiposo não são iguais, em virtude de diferenças nas influências de cada tipo no metabolismo, função endócrina, características dos pré-adipócitos, respostas às dietas hiperlipídicas e expressão gênica, entre outros (SACKMANN-SALA, *et al.*, 2012). Do mesmo modo, a responsividade dos adipócitos de cada tipo de tecido adiposo ao óleo de peixe também varia. LUDWIG *et al.* (2013) mostraram que adipócitos mesentéricos foram mais responsivos ao óleo de peixe, demonstrado pelo seu menor tamanho, quando comparados aos adipócitos epididimais, em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica (48kJ% de gordura) durante 12 semanas. A justificativa destes autores é que a gordura mesentérica possui maior atividade metabólica, como observado pelo seu alto fluxo sanguíneo. SACKMANN-SALA *et al.* (2012) avaliaram as diferenças metabólicas entre 4 diferentes depósitos de tecido adiposo, mostrando que o depósito mesentérico possui maior geração de ATP, maiores concentrações de proteínas antioxidantes, maior transporte de lipídios, maior fluxo sanguíneo, maior conteúdo de proteínas e adipócitos pequenos, enquanto o depósito retroperitoneal possui menor conteúdo de proteínas e adipócitos de tamanho médio a largo. Já o depósito epididimal possui maior metabolismo de glicose/lipídios, menor conteúdo de proteínas e adipócitos

maiores, enquanto a gordura inguinal possui menor metabolismo de glicose/lipídios, menores concentrações de proteínas antioxidantes, menor concentração de proteínas e adipócitos pequenos. Os depósitos utilizados neste estudo consistiam em epididimal e uma mistura de retroperitoneal e inguinal, portanto é notável que apresentariam diferentes respostas.

Óleo de peixe, rico em EPA e DHA, é reconhecido por aumentar a oxidação lipídica e suprimir a lipogênese hepática, principalmente por sua capacidade de aumentar a expressão de enzimas envolvidas com a beta-oxidação e ciclo do ácido tricarbóxico, além de reduzir a expressão das enzimas envolvidas na lipogênese, como a glicerol-3-fosfato desidrogenase (KALUPAHANA *et al.*, 2010). Porém, enquanto os estudos relacionam a maior oxidação de ácidos graxos mitocondrial com a perda de peso e redução de adiposidade, HOEHN *et al.* (2010) mostraram que este aumento nem sempre leva ao maior gasto energético. Os estudos de KALUPAHANA *et al.* (2010) demonstraram que os animais recebendo ração hiperlipídica mostraram peso similar àqueles recebendo também EPA. Assim, no estado de sobrepeso e obesidade já existentes, o óleo de peixe pode ter sua eficiência limitada. Porém, o exato mecanismo através do qual o óleo de peixe atua na redução de lipídios e nos efeitos ateroprotetores ainda não é conhecido, podendo ainda diferenciar de acordo com o animal, dieta e tipo de tecido adiposo utilizado.

O aumento do diâmetro dos adipócitos observado no grupo controle suplementado com óleo de peixe (ROP) pode estar relacionado com efeito positivo, condizente com maior responsividade à insulina. Isto porque uma das mais importantes funções dos adipócitos é atuar com efeito “tamponante” dos lipídios da dieta (SARASWATHI *et al.* 2007; FLACHS *et al.*, 2009; BJØRNDAL *et al.*, 2011). Há muito tempo, é reconhecido o papel armazenador de lipídios do tecido adiposo. Ele promove equilíbrio entre lipogênese quando há excesso de nutrientes e lipólise no jejum, sendo processo regulado por hormônios como insulina e adrenalina. A entrada de ácidos graxos nos adipócitos é dependente da atividade da enzima lipase de lipoproteínas (LPL), que degrada as partículas de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) na circulação. Ácidos graxos disponíveis são reesterificados com o esqueleto de glicerol e armazenados como triacilgliceróis, através do estímulo da lipogênese pela insulina.

Adipócitos sensíveis à insulina possuem a capacidade de armazenar lipídios e impedir a sua degradação, pois a insulina inibe a enzima lipase hormônio-sensível (LHS), ou seja, inibe a lipólise (SETHI; VIDAL-PUIG, 2007; BJØRNDAL *et al.*, 2011; JOCKEN; BLAAK, 2008). Interessantemente, o grupo ROP apresentou menor lipólise (Figura 11) do tecido adiposo epididimal incubado na ausência e presença de adrenalina (agonista adrenérgico) quando comparado aos grupos COP e HOP. Assim, pode-se supor que os adipócitos com diâmetro aumentado no grupo ROP indicam maior responsividade à insulina, observado também pela menor lipólise, atuando no armazenamento de lipídios. Isto evita que ácidos graxos livres sejam enviados para a circulação, aonde atuariam em tecidos-alvo promovendo estímulo de vias pró-inflamatórias e resistência à insulina (FLACHS *et al.*, 2009). E, como será discutido adiante, este grupo (ROP) apresentou redução da infiltração de células positivas para CD8 e para CD11c, reduzindo assim o processo inflamatório no tecido adiposo epididimal. SARASWATHI *et al.* (2007) encontraram aumento na adiposidade total e na massa de tecido adiposo perigonadal após suplementação da dieta com óleo de peixe, em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica por 12 semanas. Entretanto, estes autores observaram redução da esteatose hepática e aterosclerose, além de aumento no depósito de colesterol nestes adipócitos associado com melhora na sinalização da insulina.

O oposto foi observado para os grupos sob rações hipercalóricas. O grupo COP apresentou redução do diâmetro do adipócito epididimal (Tabela 6) acompanhado por maior lipólise (Figura 11) quando comparado ao grupo ROP, na situação basal e estimulada pela adrenalina. Já o grupo HOP demonstrou redução do diâmetro do adipócito epididimal acompanhado de aumento na lipólise basal deste tecido, porém houve aumento no tamanho do adipócito retroperitoneal. Como discutido anteriormente para o grupo controle (ROP), pode-se supor que a redução do tamanho dos adipócitos epididimais nestes dois grupos (COP e HOP) está relacionada com a menor capacidade “tamponante” de lipídios nestes tecidos. Como visto na figura 6, os animais do grupo HOP também estavam intolerantes à glicose, um quadro característico de resistência à insulina. Portanto, é provável que os adipócitos epididimais, que também apresentaram aumento na lipólise, não estejam respondendo tão bem à insulina, mesmo em concentrações mais elevadas deste hormônio. Os ácidos graxos liberados através da

lipólise fluem para outros tecidos, aonde podem ser captados e estocados novamente como triacilglicerol, contribuindo para a lipotoxicidade associada com a resistência à insulina. Realmente, analisando a figura 9, encontra-se maior depósito de triacilglicerol hepático no grupo HOP do que nos animais do grupo ROP, talvez decorrente deste maior fluxo de ácidos graxos à partir do tecido adiposo.

Por outro lado, há o fato de que o óleo de peixe é capaz de aumentar a expressão de enzimas envolvidas na β -oxidação, principalmente por estimular PPAR- α no fígado, embora tecido adiposo e músculo esquelético também possam utilizar ácidos graxos como fonte de energia, enquanto regula para baixo a expressão de enzimas envolvidas na lipogênese hepática, principalmente por meio de SREBP1c (BJØRNDAL *et al.*, 2011). PPAR γ , que é altamente expresso no tecido adiposo obeso e apresenta função lipogênica, também pode estar sendo regulado pelos ácidos graxos ômega 3. YAMAUCHI *et al.* (2001) observaram melhora na obesidade e diabetes tipo 2 em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica, após inibição de PPAR γ .

Interessantemente, o tecido adiposo retroperitoneal mostrou resultados diferenciados. No grupo HOP, houve aumento tanto da massa de tecido adiposo retroperitoneal (Tabela 5) quanto do tamanho destas células (Tabela 6). Ensaios de lipólise não foram feitos para este tipo de tecido adiposo, portanto é difícil associar estes eventos. Assim, observa-se respostas diferenciadas que se dão em parte, pelas diferenças metabólicas entre os dois tecidos. Sabe-se que adipócitos epididimais possuem maior atividade metabólica, principalmente por possuírem maior quantidade de mitocôndrias, que condiz com esta maior atividade. Além disso, depósitos viscerais também possuem maior expressão de RNAm de ppar- γ e srebp1c (BJØRNDAL *et al.*, 2011; VIDAL-PUIG *et al.*, 1997). Porém, seguindo a linha de raciocínio anterior, o maior diâmetro destas células estaria relacionada com menor lipólise e, portanto maior responsividade à insulina. Isto precisaria ser verificado, pois diferenças metabólicas entre os depósitos podem abolir esta idéia.

Pelas figuras 8 e 9 pode-se observar que a ração rica em carboidratos (C) promoveu deposição de colesterol e triacilglicerol hepático, enquanto ração hiperlipídica (HFD) resultou em deposição de triacilglicerol hepático, somente.

YANG *et al.* (2012) mostraram que camundongos recebendo ração rica em lipídios (21,2%) e carboidratos (49,1%) desenvolveram ganho de peso e esteatose hepática após 2 semanas na dieta. Ainda, OBICI *et al.* (2012) demonstraram aumento progressivo na produção hepática de glicose à partir de substratos não-glicogênicos (lactato, glicerol, alanina e glutamina) 7, 14, 56 e 56 dias, respectivamente após a introdução de dieta hiperlipídica (36g/100g de gordura) em camundongos.

Elevado consumo de ácidos graxos saturados são capazes de causar superexpressão da enzima lipoproteína lipase acarretando maior estoque intracelular de triacilgliceróis no músculo esquelético e fígado (YANG *et al.*, 2012). Ainda, dietas hipercalóricas são capazes de aumentar os níveis de RNAm de genes do SREBP1c (proteínas ligadoras do elemento regulatório esterol), o qual participa da regulação da síntese de ácidos graxos por aumentar a expressão de enzimas lipogênicas, como a acetilCoa carboxilase e ácido graxo sintase, além de ser o principal mediador da ação da insulina na enzima glicoquinase (HORTON *et al.*, 2002; DENTIN *et al.*, 2005). SREBP1c é regulado de 3 maneiras, uma delas é pela insulina, outra é pelo glucagon e pelos receptores ativados por X hepático (LXR) (HORTON *et al.*, 2002). LXR promove lipogênese por ativação do promotor de SREBP1c (TONTONNOZ & MANGELSDORF, 2003).

É reconhecido, também que glicose e frutose, em rações ricas em sacarose, são estimuladores de SREBP1c, além da glicose atuar aumentando a atividade transcricional de LXR (receptor hepático X). A proteína ligadora do elemento de resposta ao carboidrato (ChREBP) representa também possível mecanismo pelo qual a glicose atua aumentando a transcrição de genes lipogênicos, já que ChREBP atua no promotor da ácido graxo sintase e acetilCoa-carboxilase (YANG *et al.*, 2012; DENTIN *et al.*, 2005).

Além disso, a ativação de PPAR γ está associado com esteatose hepática. YANG *et al.* (2012) mostraram que ração rica em lipídios e carboidratos promove maior expressão do RNAm do PPAR γ nos hepatócitos. Isto pode explicar os nossos

resultados de elevada lipogênese hepática associada com adiposidade em animais recebendo ração hiperlipídica e rica em carboidratos.

Resistência hepática à insulina é caracterizada por aumentada gliconeogênese. Esta consiste da produção de carboidratos através de moléculas não-carboidratos, tais como alanina, glicerol e lactato. O processo gliconeogênico é estritamente regulado e contribui para o controle do metabolismo da glicose. Dietas hiperlipídicas podem promover resistência à insulina de várias maneiras, sendo que ácidos graxos livres, originados de dietas hiperlipídicas, são potentes ativadores do processo inflamatório, através de sua ligação aos receptores Toll-like, assim estimulando citocinas pró-inflamatórias. Isto contribui para o desequilíbrio na ação da insulina em vários tecidos, incluindo o fígado. Insulina promove a ativação de uma cascata de sinalização envolvendo a enzima fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3K) e proteína quinase B (Akt) que resulta em regulação “prá baixo” nas concentrações das enzimas taxa-limitante da gliconeogênese (WHITEMAN *et al.*, 2002). Na situação de resistência hepática à insulina, observa-se menor atividade da via da PI3K/Akt com maior estímulo de enzimas gliconeogênicas, tais como fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), que catalisa a etapa inicial do processo e glicose-6-fosfatase (G6Pase) que catalisa a etapa final, assim promovendo aumento do processo gliconeogênico (MENG *et al.*, 2013). Além da ativação, através dos próprios ácidos graxos, da enzima glicoquinase, que participa da síntese de glicogênio (HORTON *et al.*, 2002). Os animais no presente estudo alimentados com dieta hiperlipídica desenvolveram acúmulo de glicogênio hepático (figura 10). Os tratamentos com óleo de peixe e metformina não alteraram os parâmetros de depósito de triacilglicerol e glicogênio hepático. HIRAKO *et al.* (2011) encontraram redução do conteúdo de triacilglicerol e colesterol total hepático após suplementação da dieta rica em colesterol com óleo de peixe, durante 8 semanas, além da redução dos níveis de RNAm hepático da ácido graxo sintase (FAS) e aumento da expressão gênica hepática de genes envolvidos com a β -oxidação de ácidos graxos. Este efeito do óleo de peixe será discutido de modo mais detalhado adiante.

De modo inesperado, a associação de metformina com óleo de peixe (HOPMET) nos animais recebendo ração hiperlipídica causou aumento dos adipócitos retroperitoneais quando comparado aos animais tratados somente com metformina

(HFD_{MET}). Pode-se considerar que o efeito do óleo de peixe se sobressai. Por outro lado, óleo de peixe como único tratamento também não foi capaz de melhorar o estado geral de intolerância à glicose dos animais. Isto pode ser observado pela área sob a curva (AUC) e insulinemia que não foram modificadas, pela massa do tecido adiposo retroperitoneal que foi aumentado e a lipólise, a qual não foi alterada quando comparada ao grupo HFD. Assim, pode-se supor que a presença de óleo de peixe nos animais alimentados com ração hiperlipídica tem efeitos limitados.

Os efeitos do óleo de peixe na prevenção da resistência à insulina são bem caracterizados, porém seu efeito na reversão de quadro pré-estabelecido é inconclusivo (MUURLING *et al.*, 2003). Óleo de peixe foi capaz de reduzir a massa de tecido adiposo epididimal e retroperitoneal (CAMPBELL; BELLO, 2012) talvez por redução do depósito de gordura nestas células (PARRISH *et al.*, 1990), ocasionada pela alteração da expressão gênica lipogênica que estes ácidos graxos acarretam (CUNANNE *et al.*, 1986). Resistência à insulina pode ocorrer em diversos tecidos, como fígado, tecido adiposo e músculo esquelético, já que estes são locais para a ação da insulina (KOPÁL *et al.*, 2013). Assim, o efeito dos ácidos graxos ômega 3 na prevenção da resistência à insulina ocorre em todos estes tecidos. No tecido adiposo, após sua ligação ao receptor acoplado à proteína G (GPCR) ocorre aumento da captação de glicose nos adipócitos através da maior translocação de GLUT4 para a membrana plasmática (OH *et al.*, 2010), associado com inibição da via de sinalização do NFκB (KALUPAHANA *et al.*, 2011), além da maior secreção de adiponectina, um ativador do PPARγ (NESCHEN *et al.*, 2006). No músculo esquelético, o principal efeito consiste em reduzir as concentrações de ceramidas, que sabe-se estão relacionadas à menor sensibilidade à insulina (ADAMS *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2006). Enquanto no fígado, o efeito dos ácidos graxos ômega 3 resulta de menor lipogênese pela redução da atividade de SREBP1c e aumento da β-oxidação (YOSHIKAWA *et al.*, 2002). Entretanto, a maioria dos resultados mostrando efeitos benéficos do óleo de peixe resulta de experimentos preventivos, enquanto pouco se sabe sobre os efeitos de tratamento do óleo de peixe. Ainda, será que os efeitos do óleo de peixe se mantêm frente a dietas hiperlipídicas?

HOLNESS *et al.* (2004) encontraram que enriquecimento agudo (24 horas) de dieta hiperlipídica com ácidos graxos ômega 3 resultou em redução da hiperinsulinemia

sem melhora no quadro de resistência à insulina, efeito considerado diabetogênico pelos autores. OOSTERVEER *et al.* (2009) apresentaram dados indicando potencialização da resistência à insulina por óleo de peixe adicionado na dieta hiperlipídica (60kcal% de gordura) em camundongos durante 6 semanas. Este estudo encontrou que óleo de peixe promoveu ganho de peso adicional, maior oxidação de gordura em detrimento aos carboidratos (maior razão gordura-carboidrato) associados com redução do clearance de glicose estimulado por infusão contínua de insulina, embora tenham encontrado aumento na concentração plasmática de adiponectina. É possível que em dietas com grandes quantidades de lipídios, obtidos de gordura de origem animal, óleo de peixe não consiga executar seus efeitos e, muitas vezes possa ter efeitos indesejáveis. O plano de fundo da dieta dos animais afeta de diversos modos o efeito das intervenções, sendo importante considerá-las.

Assim, o presente estudo demonstra que óleo de peixe isoladamente não traz benefícios no metabolismo da glicose, como observado pela manutenção de quadro de resistência à insulina, em animais submetidos à ração hiperlipídica. Inclusive, a associação do óleo de peixe com o fármaco metformina acarretou piora do quadro de resistência à insulina, principalmente pela reversão dos efeitos benéficos da metformina isoladamente (melhora da insulinemia).

Por outro lado, nos animais recebendo ração rica em carboidratos (COP), óleo de peixe teve efeitos diferentes. De modo geral, os animais recebendo esta ração não desenvolveram intolerância à glicose, embora tenha havido ganho de massa corporal.

A inflamação possui importante papel no desencadeamento da resistência à insulina, tanto sistêmica quanto àquela que ocorre no tecido adiposo. Considera-se que a ligação entre obesidade e resistência à insulina seja o processo inflamatório. Esta inflamação crônica afeta diversos tecidos envolvidos no metabolismo energético, principalmente o tecido adiposo. Sabe-se que o tecido adiposo de animais obesos expressa maiores concentrações de moléculas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-6 (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2003). Este processo inflamatório é visto como mecanismo de defesa contra a resistência à insulina induzida pela obesidade e se caracteriza por processo crônico, de baixa intensidade, considerado como meta-inflamação por não envolver os sinais cardinais clássicos do processo inflamatório. Os

processos exatos que iniciam este mecanismo inflamatório não são bem estabelecidos, mas podem envolver o estresse do retículo endoplasmático e a hipóxia do tecido adiposo em expansão, entre outros (SALTIEL, 2012).

Embora os adipócitos possam atuar como fonte de citocinas pró-inflamatórias, é provável que a principal fonte localize-se no estroma vascular do tecido adiposo (FAIN *et al.*, 2003). Além de adipócitos, o tecido adiposo é formado por fibroblastos e células imunitárias. O papel metabólico deste tecido é bem conhecido, porém pouco se sabe sobre seu papel no processo inflamatório. Estudos anteriores confirmaram a participação de macrófagos do tecido adiposo na geração de moléculas pró-inflamatórias em animais obesos (XU *et al.*, 2003). Porém, tem-se demonstrado que as células responsáveis pelo recrutamento destes macrófagos são os linfócitos T (NISHIMURA *et al.*, 2009). Ainda existe controvérsia com relação ao tipo de linfócito T que recruta estes macrófagos. Nosso estudo mostrou que há variações com relação ao papel desempenhado por cada tipo celular, dependendo do tipo de tecido adiposo e da composição da ração utilizada.

No presente estudo, não foram observadas diferenças nas concentrações plasmáticas das citocinas avaliadas, TNF- α (figura 12) e adiponectina (figura 13), com relação às diferentes rações. Correlações positivas são feitas com respeito às elevadas concentrações de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL6) e características da síndrome metabólica, como disfunção endotelial e resistência à insulina (WAJCHENBERG *et al.*, 2009). Nossos dados não apresentaram modificações nestes parâmetros. PETERSEN *et al.* (2004) não encontraram diferenças nas concentrações plasmáticas de TNF- α , IL6 e adiponectina em filhos de diabéticos tipo 2 resistentes à insulina. Talvez, a inflamação não seja a primeira etapa que leva à resistência à insulina na obesidade. Ela pode atuar como consequência, mais do que causa. Como observado por SALTIEL (2012), inflamação pode atuar como mecanismo de defesa contra obesidade e resistência à insulina. Embora citocinas próinflamatórias tenham papéis bem estabelecidos como indutores de resistência à insulina, principalmente por afetarem, negativamente, a via de sinalização da insulina em tecidos-alvo, pouco é comentado sobre seu papel benéfico. O próprio TNF- α poderia atuar no controle energético, sendo que esta citocina pode promover resistência à insulina no tecido adiposo, porém pode ser insuficiente

para causar resistência à insulina sistêmica (YE; McGUINNESS, 2013). Isso fica evidente no estudo de XU *et al.* (2002) que ao utilizarem camundongos transgênicos com expressão de TNF- α transmembrana exclusiva no adipócito observaram redução da massa de gordura, porém não levou à resistência à insulina, sendo que as concentrações de insulina plasmática nestes animais foram menores do que à dos animais controle. Pode-se explicar este resultado através da percepção de que a atividade catabólica estimulada por esta citocina, observada pelo reduzido tamanho da massa de gordura, talvez como resultado de maior lipólise em adipócitos resistentes à insulina limita o efeito armazenador de lipídios e a expansão do adipócito, o que poderia acarretar em maiores respostas inflamatórias. Portanto, inflamação possui papéis ainda controversos na obesidade e resistência à insulina.

Óleo de peixe foi capaz de reduzir a concentração plasmática de TNF- α em animais recebendo ração hiperlipídica (HOP). Interessantemente, isto não foi acompanhado de melhoras na homeostasia glicêmica. MUURLING *et al.* (2003) encontraram redução das concentrações da proteína TNF- α no tecido adiposo branco de camundongos após dieta hiperlipídica enriquecida com óleo de peixe, porém isto não foi acompanhado de melhora na sensibilidade à insulina destes animais, como já citado acima. Quando se associa metformina e óleo de peixe (HOPMET) é observado aumento na concentração de TNF- α quando comparado ao grupo HOP, portanto efeito do fármaco e, por outro lado aumento de adiponectina quando comparado ao grupo HFDMET, efeito do óleo de peixe. O aumento na concentração de adiponectina é desejável, em vista de seus efeitos na melhora da sensibilidade à insulina, através de redução da gliconeogênese, aumento na captação de glicose e aumento da oxidação de ácidos graxos livres (TILG; MOSCHEN, 2006). NESCHEN *et al.* (2006) mostraram que camundongos recebendo ração enriquecida com óleo de peixe (27%) apresentaram 2,7 vezes aumento na concentração plasmática de adiponectina dentro de 15 dias, quando comparados à de animais recebendo dieta contendo 27% de óleo de girassol. Interessantemente, estes autores também demonstraram que esta elevação foi independente de PPAR α , pois ao utilizarem camundongos deficientes em PPAR α , dieta com 14,5% de óleo de peixe por 15 dias resultou em similar concentração de adiponectina nestes animais. Entretanto, se um antagonista de PPAR γ é adicionado,

este efeito do óleo de peixe é anulado, mostrando um mecanismo dependente de PPAR γ . De fato, PPAR γ possui reconhecido efeito de promover aumento de adiponectina. Como ácidos graxos ômega-3 são ligantes de PPAR γ , pode-se supor que seja por este mecanismo que óleo de peixe aumente adiponectina.

Dentre as várias tentativas de relacionar inflamação e resistência à insulina periférica, postulou-se que a infiltração de células imunitárias no tecido adiposo ocorre através do excesso de nutrientes dietéticos e é responsável pelo processo inflamatório crônico associado com a obesidade (FLOCK *et al.*, 2013). Rações hiperlipídicas estão relacionadas com deposição de macrófagos CD11c positivos (M1) no tecido adiposo e, conseqüente redução de macrófagos CD206 positivos (M2) (FUJISAKA *et al.*, 2011; LUMENG *et al.*, 2007; TODORIC *et al.*, 2006). Isto é associado com aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL6 e MCP-1 (NICKELSON *et al.*, 2012) e das concentrações protéicas de mediadores das vias inflamatórias, como da quinase N-terminal de c-jun (JNK) e NF κ B (HERAS *et al.*, 2013; HIROSUMI *et al.*, 2002) os quais reduzem o metabolismo da glicose por afetar a via de sinalização da insulina e acarretam resistência à insulina.

Assim, o próximo passo foi avaliar a infiltração de células imunitárias (linfócitos T e macrófagos) em dois tipos de tecido adiposo, o epididimal e o retroperitoneal. Pouco se sabe sobre as influências de dietas com diferentes composições e do papel de tecidos adiposos diferentes sobre os efeitos finais do óleo de peixe na inflamação do tecido adiposo. Além disso, menos ainda é conhecido com relação ao papel da metformina isoladamente ou em associação com óleo de peixe neste processo.

Com relação ao tecido adiposo epididimal, a suplementação com óleo de peixe em animais alimentados com dieta regular (ROP) resultou em aumento dos linfócitos T CD4 (figura 16), que foi acompanhado de aumento na razão CD4/CD8 (Figura 14). Além disso, houve redução da razão CD11c/CD206 (Figura 15), indicando redução no número de células positivas para CD11c (M1). Este resultado não ocorreu no tecido adiposo retroperitoneal, com relação ao grupo ROP. Estudos têm apontado a importância de linfócitos T no recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo (NISHIMURA *et al.*, 2009; KINTSCHER *et al.*, 2008). Porém, pouco se sabe sobre o papel de cada subtipo de linfócito T neste processo. O resultado descrito acima para o

grupo ROP no tecido adiposo epididimal demonstra a habilidade antiinflamatória do óleo de peixe em dieta normocalórica, pois através do aumento de linfócitos T CD4 ocorreu redução de macrófagos M1 pró-inflamatórios (CD11c).

Linfócitos T CD4 podem se diferenciar em Th1 (produzindo citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ) ou Th2 (produzindo citocinas anti-inflamatórias, como IL10) (STRISSEL *et al.*, 2010; LOLMÈDE *et al.*, 2011). STRISSEL *et al.* (2010) demonstraram polarização Th1 de linfócitos no tecido adiposo de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, coincidindo com o recrutamento de macrófagos M1. No presente estudo, como o aumento de células positivas para linfócitos T CD4 foi associado à redução de macrófagos M1 (pró-inflamatórios), pode-se supor que o óleo de peixe, neste tecido e nesta ração, foi capaz de aumentar linfócitos T CD4 Th2. Estudos mais específicos sobre os subtipos de linfócitos T envolvidos são necessários.

De maneira interessante, suplementação com óleo de peixe em animais alimentados com ração hiperlipídica (HOP) acarretou em efeito oposto ao observado para o grupo ROP, no tecido adiposo epididimal. Neste caso, houve aumento no número de células positivas para CD11c (Figura 15), porém sem alteração na razão CD11c/CD206. Metformina, isoladamente, não alterou a infiltração das células imunitárias, embora tenha havido tendência em reduzir a razão CD11c/CD206 (figura 17). Óleo de peixe, em associação com metformina acarretou aumento no número de células positivas para CD11c (Figura 15) acompanhado de aumento na razão CD11c/CD206, quando comparado ao grupo HFDMET, indicando efeito do óleo de peixe. Não foi observada alteração nos linfócitos (Figura 14).

Este efeito, à princípio, representa efeito pró-inflamatório, sendo que o óleo de peixe se sobressai e abole o efeito da metformina, pelo menos nesta ração (hiperlipídica) e neste tecido, epididimal. Como dito anteriormente, dietas hiperlipídicas são associadas com a deposição de macrófagos do tipo M1 (com características pró-inflamatórias) no tecido adiposo, principalmente devido à polarização de M2 para M1. Entretanto, fatores como a presença de linfócitos T estão relacionados com esta polarização de macrófagos. Porém, o subtipo de célula T envolvida não está claro e nem como estes linfócitos são recrutados para o tecido adiposo. Interessante estudo mostrou que a ativação do chamado “inflamassoma” NLRP3 (família contendo domínio

pirina, rico em leucina e ligadora de nucleotídeo), que funciona como sensor das células imunitárias, pode ser o passo inicial para o recrutamento de linfócitos e macrófagos para o tecido adiposo, iniciando uma cascata de eventos pró-inflamatórios através da liberação de citocinas IL1 β e IL18. É postulado que a ativação deste inflamassoma pode induzir um perfil pró-inflamatório Th1 no tecido adiposo (VANDANMAGSAR *et al.*, 2011). Nosso resultado mostra que o óleo de peixe não conseguiu promover resposta antiinflamatória no tecido adiposo epididimal de animais submetidos à dieta hiperlipídica, na verdade potencializando o perfil pró-inflamatório.

Por outro lado, no tecido adiposo retroperitoneal, ração hiperlipídica isoladamente (HFD) resultou em redução da razão CD4/CD8 (Figura 16) quando comparado ao grupo R. Óleo de peixe (HOP) reduziu a razão CD4/CD8 comparado ao grupo HFD, embora não tenha sido estatisticamente significante. O mesmo vale para a razão CD11c/CD206 (Figura 17). Claramente, observa-se que os efeitos do óleo de peixe variam, de acordo com a ração utilizada e tipo de tecido adiposo analisado, não sendo prudente afirmar que os efeitos do óleo de peixe são sempre antiinflamatórios.

Algo que se pode notar pelas figuras 13, 15, 16 e 17 é que a redução de células positivas para CD11c é acompanhada pelo aumento de células positivas para CD4 e, ainda que no tecido adiposo retroperitoneal dos animais sob dieta hiperlipídica houve redução de células positivas para CD4.

A inflamação do tecido adiposo obeso foi primeiro observada pela detecção de maior expressão de TNF- α no tecido adiposo de animais obesos, por HOTAMISLIGIL *et al.* (1993). Após isto, foi mostrado que células imunitárias infiltram o tecido adiposo obeso. Entretanto, ainda permanece obscuro o entendimento de como é a interligação entre células imunitárias na inflamação deste tecido. Como elas são recrutadas? Quais células são as primeiras a infiltrarem o tecido? Quais fatores liberados pelo tecido adiposo atraem estas células? De que modo a infiltração de células imunitárias no tecido adiposo acarreta resistência à insulina em outros tecidos, tais como músculo esquelético e fígado? E por fim, tipos diferentes de tecido adiposo apresentam perfis diferentes de células imunitárias? Muitas questões ainda não estão respondidas.

Entretanto, muitas pesquisas estão sendo conduzidas para responder estas questões, inclusive o presente estudo. Aqui, foi apresentado que o tecido adiposo

retroperitoneal obeso teve menos células T CD4 positivas (Figura 16). De fato, foi mostrado por NISHIMURA *et al.* (2009) que a infiltração de linfócitos T CD8 positivos no tecido adiposo epididimal é o evento primário durante o desenvolvimento de obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos, por meio de análises temporais, seguida da infiltração de macrófagos. Estes autores não encontraram modificação no número de células positivas para CD4 e CD8 no tecido adiposo subcutâneo. Ainda, para melhorar a correlação clínica os autores avaliaram o tecido adiposo subcutâneo humano e encontraram maior expressão do marcador CD8 nos indivíduos obesos. KINTSCHER *et al.* (2008) demonstraram que linfócitos T foram primeiramente recrutados no tecido adiposo gonadal em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica após 5 semanas nesta dieta, por meio de imunohistoquímica. Por outro lado, macrófagos somente foram detectados após 10 semanas. Estes autores afirmaram que macrófagos não devem participar da redução na resposta à insulina no camundongo obeso, pois na semana 5 estes animais já apresentavam intolerância à glicose, mesmo sem infiltração de macrófagos. Eles não definiram subtipos de linfócitos T nos camundongos.

Nosso resultado demonstrou redução na razão CD4/CD8 nos animais obesos (Figura 16), que poderia indicar maior número de linfócitos T CD8 positivos em relação aos linfócitos T CD4. Porém, STRISSEL *et al.* (2010) mostraram que linfócitos T CD4 polarizados para Th1 contribuem para inflamação e resistência à insulina associada à obesidade. Por meio dos estudos citados, espera-se que na obesidade ocorra aumento precoce de linfócitos positivos para CD8 ou CD4 polarizados para Th1, os quais apresentam maior perfil pró-inflamatório, sendo responsáveis pelo recrutamento de macrófagos.

Em indivíduos magros e sensíveis à insulina, a porcentagem de macrófagos no tecido adiposo é pequena, sendo em sua maioria do tipo M2. Após dieta rica em lipídios ocorre mudança da polarização destas células, as quais se tornam predominantemente do tipo M1. Não está claro o mecanismo exato desta mudança de polarização, mas os linfócitos apresentam papel importante. Linfócitos e macrófagos comunicam-se por meio de citocinas e promovem resposta orquestrada contra patógenos. O mesmo raciocínio pode ser colocado para a interrelação destas células no tecido adiposo.

Macrófagos próinflamatórios são ativados por citocinas liberadas por linfócitos T CD4 Th1, como o IFN- γ , enquanto os macrófagos M2 são ativados por citocinas liberadas por linfócitos T CD4 Th2, como IL4. Já foi demonstrado acima que tanto linfócitos T CD8 como linfócitos T CD4 Th1 promovem recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo (DALMAS *et al.*, 2011; FUJISAKA *et al.*, 2009; LOLMÈDE *et al.*, 2011).

De fato, tem-se postulado também que o próprio tecido adiposo possui papel importante no recrutamento de células imunitárias. No tecido adiposo obeso, a hipertrofia dos adipócitos resulta em reduzido fluxo sanguíneo para determinadas regiões, isto promove a morte de adipócitos por hipóxia. Este processo acarreta a liberação de fatores, como leptina, as quais levam ao recrutamento de macrófagos. Assim, foi detectado que estes macrófagos formam estruturas ao redor de adipócitos mortos. Ainda, aumento de ácidos graxos saturados, seja por dieta hiperlipídica ou pela aumentada lipólise, resulta em interação destes ácidos graxos com receptores de reconhecimento padrão (TLR4), que também estão envolvidos no recrutamento de macrófagos, principalmente por liberar citocinas pró-inflamatórias. Esta última interação resulta na polarização de macrófagos em M1. O mecanismo exato que explica a troca fenotípica dos macrófagos (polarização M1/M2) é complexa. O principal determinante é o microambiente que envolve estas células. Assim, dietas hiperlipídicas resultam em polarização M1, principalmente pelo mecanismo descrito acima envolvendo o receptor TLR4. Entretanto, a família de receptores ativados pelo proliferador de peroxissomos (PPAR) desempenha funções importantes. Quando PPAR γ é ativado ocorre polarização M2, talvez em virtude da redistribuição de lipídios dentro dos adipócitos ou por meio do aumento dependente de PPAR γ na produção e secreção de adiponectina, a qual também é considerada fator importante na polarização de macrófagos em M2. Além da presença de subtipos de linfócitos e das citocinas que eles liberam, como explicado acima (LOLMÈDE *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2006; TRAYHURN *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008; RAUSCH *et al.*, 2008; OHASHI *et al.*, 2010; ODEGAARD *et al.*, 2007; COENEN *et al.*, 2009). Muitas são as maneiras de intervenção neste processo, na tentativa de favorecer polarização M2.

Óleo de peixe foi capaz de aumentar células positivas para CD4 (Figura 14), ao mesmo tempo que reduziu a razão CD11c/CD206 (Figura 15) no tecido adiposo

epididimal, nos animais com ração regular. Aqui, pode-se supor que óleo de peixe exerceu efeito benéfico, por reduzir a infiltração de macrófagos M1. Diversos são os mecanismos propostos para a melhora do processo inflamatório desencadeada pelos ácidos graxos ômega 3. Dentre estes, a ativação de receptor acoplado à proteína G (GPR), mais especificamente GPR120, ocasionando inibição da via do NFκB e JNK, o que é suportado pela ausência destes efeitos em animais deficientes em GPR120 (OH *et al.*, 2010). De outro modo, a ativação de PPARγ é responsável pela maior produção de adiponectina, reconhecidamente antiinflamatória e sensibilizadora da insulina (NESCHEN *et al.*, 2006; SIRIWARDHANA *et al.*, 2013). FORYST-LUDWIG *et al.* (2010) demonstraram que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por 10 semanas apresentaram redução da infiltração de linfócitos após tratamento com agonista de PPARγ, rosiglitazona. É difícil avaliar a importância de cada subtipo de linfócito (Th1 ou Th2) na inflamação associada à obesidade, sendo possível que a ativação de PPARγ possa atuar de modo antiinflamatório, através da produção de adiponectina, promovendo polarização de linfócitos em Th2.

Pode-se supor, pelas figuras 14 e 15 que ao promover aumento de linfócitos positivos para CD4, óleo de peixe (ROP) pode ter aumentado linfócitos T CD4 Th2, os quais por meio de citocinas com menor perfil pró-inflamatório resultou na redução de macrófagos M1, como evidenciado pela redução da razão CD11c/CD206. Por outro lado, na dieta hiperlipídica o efeito foi oposto, com aumento no número de macrófagos M1, inclusive após associação de óleo de peixe e metformina. No último caso, óleo de peixe não foi capaz de reduzir a infiltração de células com características pró-inflamatórias no tecido adiposo epididimal. Assim, observa-se que óleo de peixe possui efeitos diferenciados quando adicionado à dieta de animais submetidos à rações com diferentes composições.

Em resumo, animais submetidos à ração hiperlipídica tornaram-se resistentes à insulina, como pôde ser observado pelo acúmulo de glicogênio hepático e maior taxa lipolítica no tecido adiposo epididimal. Suplementação com óleo de peixe isoladamente não promoveu melhoras na resistência à insulina. Metformina, isoladamente acarretou melhoras importantes, tais como redução da insulinemia e aumento da resposta

lipolítica do tecido adiposo à adrenalina. Associação de óleo de peixe e metformina reverteu os efeitos benéficos obtidos com metformina apenas.

Obtenção do perfil de ácidos graxos dos dois tecidos adiposos é uma maneira de tentar entender a ausência de efeitos do óleo de peixe nos animais sob dieta hiperlipídica. Será que óleo de peixe apresenta efeitos limitados em animais com excesso de ácidos graxos saturados na dieta?

Por meio das tabelas 7 e 6 pode-se observar que a incorporação de EPA e DHA não foi igual para os dois tecidos. No tecido adiposo epididimal de animais suplementados com óleo de peixe e sob ração regular (ROP) houve melhor incorporação de EPA e DHA do que no tecido adiposo retroperitoneal. Isto resultou em maior índice de insaturação para o primeiro tecido, sendo que houve redução concomitante na porcentagem de ácidos graxos saturados (láurico e esteárico). Pode-se extrapolar este resultado para o maior efeito do óleo de peixe na infiltração de células imunitárias no tecido adiposo epididimal, efeito este considerado benéfico. Não houve, por outro lado, efeito no tecido adiposo retroperitoneal. Com relação aos animais alimentados com ração rica em carboidrato, a incorporação de EPA e DHA também foi melhor no tecido adiposo epididimal quando comparado ao retroperitoneal. No primeiro tecido, houve aumento do índice de insaturação quando comparado ao grupo C, enquanto no retroperitoneal houve redução deste índice talvez porque houve redução também da porcentagem de ácido araquidônico. Animais alimentados com ração hiperlipídica apresentaram tecidos adiposos com menor índice de insaturação, embora não possuindo grandes quantidades de ácidos graxos saturados, houve redução de ácido linoléico e linolênico. O tecido adiposo epididimal destes animais apresentou maior taxa lipolítica do que a dos animais do grupo R e pior resposta frente ao estímulo com adrenalina, além do estado geral de resistência à insulina destes animais. Pode-se supor que a maior lipólise deste tecido no estado basal contribua para o efeito gerador de inflamação e resistência à insulina destes animais por meio da interação com receptores TLR4, embora não se tenha observado grandes alterações no perfil inflamatório geral dos animais, somente resistência à insulina. Como dito anteriormente, inflamação não é necessariamente o evento primário na resistência à insulina.

Novamente, EPA e DHA obtiveram melhor incorporação no tecido adiposo epididimal do grupo HOP que apresentou maior aumento do índice de insaturação. Entretanto, esta incorporação foi muito menor do que nos grupos ROP e COP. De fato, com respeito à infiltração de células imunitárias, a resposta do tecido adiposo epididimal do grupo HOP não foi benéfica como no grupo ROP, sendo observado aumento de macrófagos M1. Metformina, isoladamente, promoveu melhora na incorporação de EPA e DHA nos dois tecidos, aumentando o índice de insaturação, sendo melhor no tecido adiposo retroperitoneal. Já a associação de óleo de peixe e metformina não promoveu incorporação suficiente para sobrepujar a metformina apenas. Assim, a baixa taxa de incorporação de EPA e DHA nos tecidos adiposos dos animais sob ração hiperlipídica pode explicar a baixa eficácia do óleo de peixe nos grupos.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo demonstrou-se que óleo de peixe, isoladamente ou em associação com metformina, não foi capaz de reverter quadro pré-estabelecido de resistência à insulina. Ração rica em carboidratos foi capaz de promover lipogênese hepática, porém não acarretou acúmulo de glicogênio hepático. A ração hiperlipídica promoveu acúmulo de triacilglicerol hepático em associação com acúmulo de glicogênio hepático, indicando possível resistência à insulina hepática. Ração hiperlipídica, embora tenha acarretado resistência à insulina sistêmica, não causou inflamação sistêmica. Óleo de peixe foi capaz de reduzir a concentração de TNF- α em animais alimentados com ração hiperlipídica. Entretanto, associação de óleo de peixe e metformina reverteu os efeitos do óleo de peixe na concentração de TNF- α . A associação de óleo de peixe e metformina promoveu aumento na concentração de adiponectina, quando comparado ao grupo que recebeu somente metformina, assim indicando efeito do óleo de peixe em aumentar a concentração desta adipocina.

Os animais resistentes à insulina, alimentados com ração hiperlipídica, além de não desenvolver inflamação sistêmica, também não apresentaram acúmulo de macrófagos CD11c e de linfócitos nos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal. Óleo de peixe foi capaz de aumentar a porcentagem de linfócitos T CD4 no tecido adiposo epididimal, bem como a razão CD4/CD8, acompanhado de redução da razão CD11c/CD206 neste mesmo tecido, em animais alimentados com ração regular. Entretanto, em animais alimentados com ração hiperlipídica, óleo de peixe causou aumento na porcentagem de macrófagos CD11c neste mesmo tecido, sendo o mesmo efeito encontrado após associação do óleo de peixe e metformina, quando comparado ao grupo que recebeu somente metformina. Com relação ao tecido adiposo retroperitoneal, ração hiperlipídica acarretou redução na porcentagem de linfócitos T CD4, sem efeitos nas porcentagens de macrófagos.

Estes efeitos foram associados com melhor incorporação de EPA e DHA no tecido adiposo epididimal de animais alimentados com ração regular, após suplementação com óleo de peixe, quando comparados aos demais grupos

suplementados. No tecido adiposo retroperitoneal, a melhor incorporação de EPA e DHA foi observada no grupo alimentado com ração hiperlipídica suplementados com óleo de peixe e recebendo metformina, em associação.

REFERÊNCIAS

ABUSHUFA, R.; REED, P.; WEINKOVE, C.; Fatty acids erythrocytes measured by isocratic HPLC. **Clinical chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1707-1712, 1994.

ADAMS, J.M.; PRATIPANAWATR, T.; BERRIA, R.; WANG, E.; DEFRONZO, R.A.; SULLARDS, M.C.; MANDARINO, L.J. Ceramide Content Is Increased in Skeletal Muscle From Obese Insulin-Resistant Humans. **Diabetes**, v.53, p.25-31, 2004.

ARAÚJO, E. P.; SOUZA, C. T.; UENO, M.; CINTRA, D. E.; BERTOLO, M. B.; CARVALHEIRA, J. B.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A. Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. **Endocrinology**, v.148, n.12, p. 5991-5997, 2007.

ATTIE, A.D.; SCHERER, P.E. Adipocyte metabolism and obesity. **Journal of Lipid Research**, v.50, p.395-399, 2009.

BASTARD J.; MAACHI, M.; LAGATHU, C.; KIM, M. J.; CARON, M.; VIDAL, H.; CAPEAU, J.; FEVE, B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation and insulin resistance. **European Cytokine Network**, v. 17, p. 4-12, 2006.

BEYER, R.S.; JENSEN, L.S. Overestimation of the cholesterol content of eggs. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.39, p.917-920, 1989.

BIKMAN, B.T.; ZHENG, D.; KANE, D.A.; ANDERSON, E.J.; WOODLIEF, T.L.; PRICE, J.W.; DOHM, G.L.; NEUFER, P.D.; CORTRIGHT, R.N. Metformin Improves Insulin Signaling in Obese Rats via Reduced IKK β Action in a Fiber-Type Specific Manner. **Journal of Obesity**, v.2010, p.1-9, 2010.

BJORK, S. The cost of diabetes and diabetes care. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 54, p. 13-18, 2001.

BJØRNDAL, B.; BURRI, L.; STAALESEN, V.; SKORVE, J.; BERGE, R. K. Different Adipose Depots: Their Role in the Development of Metabolic Syndrome and Mitochondrial Response to Hypolipidemic Agents. **Journal of Obesity**, v.2011, p.1-16, 2011.

BLACKBURN, G. L. From bench to bedside: novel mechanisms andvtherapeutic advances through the development of selective peroxissomevproliferator-activated receptor γ modulators. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.91, p. 251-253, 2010.

BLÜHER, M. Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.27, p.163-177, 2013.

BONNARD, C.; DURAND, A.; VIDAL, H.; RIEUSSET, J. Changes in adiponectin, its receptors and AMPK activity in tissues of diet-induced diabetic mice. **Diabetes & Metabolism**, v.34, p.52-61, 2008.

BUETTNER, R.; SCHOLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity**, v.15, n.4, 2007.

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

CAMPBELL, S.C.; BELLO, N.T. Omega-3 Fatty Acids and Obesity. **Journal of food and nutritional disorders**, v.1, n.2, p.1-2, 2012.

CARVALHEIRA J. B. C.; HENRIQUE G. Z.; M. J. A. SAAD. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiros de Metabologia e Endocrinologia**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

CATON, P.W.; NAYUNI, N.K.; KIESWICH, J.; KHAN, N.Q.; YAQOOB, M.M.; CORDER, R. Metformin suppresses hepatic gluconeogenesis through induction of SIRT1 and GCN5. **Journal of Endocrinology**, v.205, p.97-106, 2010.

CATON, P.W.; KIESWICH, J.; YAQOOB, M.M.; HOLNESS, M.J.; SUGDEN, M.C. Metformin opposes impaired AMPK and SIRT1 function and deleterious changes in core clock protein expression in white adipose tissue of genetically-obese db/db mice. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.13, p.1097-1104, 2011.

CEFALU, W. T. Insulin Resistance: Clinical Concepts. **Experimental Biology and Medicine**. v.226, p.13-26, 2001.

CHUN, M.; LEE, Y.J.; KIM, K. *et al.* Differential Effects of High-carbohydrate and High-fat Diet Composition on Muscle Insulin Resistance in Rats. **Endocrinology, Nutrition & Metabolism**, v.25, p.1053-1059, 2010.

COELHO, M.; OLIVEIRA, T.; FERNANDES, R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. **Archives of Medical Science**, v.9, n.2, p.191-200, 2013.

COENEN, K.R.; GRUEN, M.L.; LEE-YOUNG, R.S.; PUGLISI, M.J.; WASSERMAN, D.H.; HASTY, A.H. Impact of Macrophage Toll-Like Receptor 4 Deficiency on Macrophage Infiltration into Adipose Tissue and the Artery Wall in Mice. **Diabetologia**, v.52, n.2, p.318-328, 2009.

CORCORAN M. P.; LAMON-FAVA S.; FIELDING R. A. Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance: effect of dietary fatty acids and exercise. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, p. 662-77, 2007.

CUNNANE, S.C.; McADOO, A.R.; HORROBIN, D.F. n-3 Essential fatty acids decrease weight gain in genetically obese mice. **British Journal of Nutrition**, v.56, p.87-96, 1986.

DALMAS, E.; CLEMENT, K.; GUERRE-MILLO, M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. **Trends in Immunology**, v.32, n.7, p.307-314, 2011.

DEFRONZO, R.A. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. **Diabetologia**, v.53, p.1270-1287, 2010.

DENTIN, R.; GIRARD, J.; POSTIC, C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. **Biochimie**, v.87, p.81-86, 2005.

FAIN J.N.; CHEEMA P.S.; BAHOUTH S.W.; LLOYD H.M. Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. V.17, n.300, p.674-678, 2003.

FERRANTI, S.; MOZAFFARIAN, D. The Perfect Storm: Obesity, Adipocyte Dysfunction, and Metabolic Consequences. **Clinical Chemistry**, v.54, n.6, p.945-955, 2008.

FERREIRA, A. V. M.; MARIO, E. G.; PORTO, L. C. J.; ANDRADE, S. P.; BOTION, L. M. High-Carbohydrate Diet Selectively Induces Tumor Necrosis Factor- α Production in Mice Liver. **Inflammation**, v.34, n.2, p.139-145, 2011.

FLACHS, P.; ROSSMEISL, M.; BRYHN, M.; KOPECKY, J. Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. **Clinical Science**, v.116, p.1-16, 2009.

FLOCK M.R.; ROGERS, C.J.; PRABHU, K.S.; KRIS-ETHERTON, P.M. Accepted Article Immunometabolic role of long-chain omega-3 fatty acids in obesity-induced inflammation. **Diabetes Metab Research and Reviews**, 2013.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation and purification of total lipid from animal tissue. **Journal of biological chemistry**, v.226, p. 497-509, 1956.

FORYST-LUDWIG, A.; HARTGE M., CLEMENZ, M., SPRANG, C., HEß, K., MARX, N., UNGER, T., KINTSCHER, U. PPAR γ activation attenuates T-lymphocyte-dependent inflammation of adipose tissue and development of insulin resistance in obese mice. **Cardiovascular Diabetology**, v.9, n.64, p.1-9, 2010.

FUJISAKA, S.; USUI, I.; BUKHARI, A. *et al.* Regulatory Mechanisms for Adipose Tissue M1 and M2 Macrophages in Diet-Induced Obese Mice. **Diabetes**, v.58, p.2574-2582, 2009.

FUJISAKA, S.; USUI, I.; KANATANI, Y.; IKUTANI, M. *et al.* Telmisartan Improves Insulin Resistance and Modulates Adipose Tissue Macrophage Polarization in High-Fat-Fed Mice. **Endocrinology**, v.152, p.1789-1799, 2011.

GALIC, S.; OAKHILL, J.S.; STEINBERG, G.R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.316, p.129-139, 2010.

GUTIERREZ, D. A .; PUGLISI, M. J.; HASTY, A . H. Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. **Current Diabetes Reports**, v. 9, p. 26-32, 2009.

HABER E. P.; CURI R.; CARVALHO C. R. O.; CARPINELLI A. R. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Metabologia e Endocrinologia**, v. 45, n. 3, p. 219-227, 2001.

HAO, Q. *et al.* High-glycemic index carbohydrates abrogate the antiobesity effect of fish oil in mice. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, n.302, p. 1097-1112, 2012.

HARRIS, R.B.S.; APOLZAN, J.W. Changes in glucose tolerance and leptin responsiveness of rats offered a choice of lard, sucrose, and chow. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.302, p.1327-1339, 2012.

HERAS, N.; VALERO-MUÑOZ, M.; BALLESTEROS, S. *et al.* Factors involved in rosuvastatin induction of insulin sensitization in rats fed a high fat diet. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.xx, p.1-8, 2013.

HIRAKO, S.; KIM, H.; SHIMIZU, S.; CHIBA, H.; MATSUMOTO, A. Low-Dose Fish Oil Consumption Prevents Hepatic Lipid Accumulation in High Cholesterol Diet Fed Mice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.59, p.13353-13359, 2011.

HIROSUMI, J.; TUNCMAN, G.; CHANG, L. *et al.* A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v.420, p.333-336, 2002.

HOEHN, K. L.; TURNER, N.; SWARBRICK, M. M.; WILKS, D.; PRESTON, E.; YUWEI, P.; JOSHI, H.; FURLER, S. M.; LARANCE, M.; HEGARTY, B. D.; LESLIE, S. J.; PICKFORD, L.; HOY, A. J.; KRAEGER, E. W.; JAMES, D. E.; COONEY, G. J. Acute or chronic upregulation of mitochondrial fatty acid oxidation has no net effect on whole body energy expenditure or adiposity. **Cell Metabolism**, v.11, n.1, p.70-76, 2010.

HOLNESS, M.J.; SMITH, N.D.; GREENWOOD, G.K. SUGDEN, M.C. Acute α -3 Fatty Acid Enrichment Selectively Reverses High-Saturated Fat Feeding-Induced Insulin

Hypersecretion But Does Not Improve Peripheral Insulin Resistance. **Diabetes**, v.53, suplemento 1, p.166-171, 2004.

HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **Journal of Clinical Investigation**, v.109, p.1125-1131, 2002.

HOTAMISLIGIL, G.S.; SHARGILL, N.S.; SPIEGELMAN, B.M. Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- α : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. **Science**, v.259, p.87-91, 1993.

IOZZO, P.; PRATIPANAWATR, T.; PIJL, H. *et al.* Physiological hyperinsulinemia impairs insulin-stimulated glycogen synthase activity and glycogen synthesis. **American Journal of Endocrinology and Metabolism**, v.280, p.712-719, 2001.

JANOVSKÁ, P.; FLACHS, P.; KAZDOVÁ, L.; KOPECKÝ, J. Anti-obesity effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in mice fed high-fat diet is independent of cold-induced thermogenesis. **Physiology Research**, v.62, p.153-161, 2013.

JENKINS D.J.; WOLEVER T.M.; TAYLOR R.H.; BARKER H.M.; FIELDEN H.; BALDWIN J.M.; *et al.* Glycaemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.34, p.362-6, 1981.

JOCKEN, J.W.E.; BLAAK, E.E. Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. **Physiology & Behavior**, v.94, p.219-230, 2008.

KAHN, S.E.; HULL, R.L.; UTZSCHNEIDER, K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v.444, p.840-846, 2006.

KALUPAHANA, N.S.; CLAYCOMBE, K.J.; MOUSTAID-MOUSSA, N. (n-3) Fatty Acids Alleviate Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance: Mechanistic Insights. **Advanced Nutrition**, v.2, p.304-316, 2011.

KALUPAHANA, N. S.; CLAYCOMBE, K.; NEWMAN, S. J.; STEWART, T.; SIRIWARDHANA, N.; MATTHAN, N.; LICHTENSTEIN, A. H.; MOUSTAID-MOUSSA, N. Eicosapentaenoic Acid Prevents and Reverses Insulin Resistance in High-Fat Diet-Induced Obese Mice via Modulation of Adipose Tissue Inflammation. **The Journal of Nutrition**, v.140, p.1915-1922, 2010.

KASHYAP, S.R.; DEFRONZO, R.A. The insulin resistance syndrome: physiological considerations. **Diabetes and Cardiovascular Disease Research**, v.4, p.13-19, 2007.

KENNEDY *et al.* Saturated Fatty Acid-Mediated Inflammation and Insulin Resistance in Adipose Tissue: Mechanisms of Action and Implications. **The Journal of Nutrition**, n.139, p.1-4, 2009.

KINTSCHER, U.; HARTGE, M.; HESS, K. *et al.* T-lymphocyte Infiltration in Visceral Adipose Tissue A Primary Event in Adipose Tissue Inflammation and the Development of Obesity-Mediated Insulin Resistance. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.28, p.1304-1310, 2008.

KIM, F.; PHAM, M.; LUTTRELL, I. *Et al.* Toll-Like Receptor-4 Mediates Vascular Inflammation and Insulin Resistance in Diet-Induced Obesity. **Circulation Research**, v.100, p. 1589-1596, 2007.

KOPÁL, M.; MUCHOVÁ, J.; DURACKOVÁ, Z. Modulation of insulin resistance by PUFA in metabolic tissues. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.115, p.475-482, 2013.

KOTTKE, T. E.; WU, L. A .; HOFFMAN, R. S. Economic and Psychological Implications of the Obesity Epidemic. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 78, p. 92-94, 2003.

KROMHOUT, D.; YASUDA, S.; GELEIJNSE, J.M.; SHIMOKAWA, H. Fish oil and omega-3 fatty acids in cardiovascular disease: do they really work? **European Heart Journal**, v.33, p.436-443, 2012.

LANGIN, D.; DICKER, A.; TAVERNIER, G. *et al.*. Adipocyte Lipases and Defect of Lipolysis in Human Obesity. **Diabetes**, v.54, p.3190-3197, 2005.

LEE, J.S.; PINNAMANENI, S.K.; EO, S.J.; Cho, I.H. *et al.*. Saturated, but not n-6 polyunsaturated, fatty acids induce insulin resistance: role of intramuscular accumulation of lipid metabolites. **Journal of Applied Physiology**, v.100, p.1467-1474, 2006.

LEE, S.K.; LEE, J.O.; KIM, J.K. *et al.* Metformin Sensitizes Insulin Signaling Through AMPK-Mediated PTEN Down-Regulation in Preadipocyte 3T3-L1 Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.112, p.1259-1267, 2011.

LEIGHTON, B.; COOPER, G.L.S. **Nature**, v. 335, p. 632-635, 1989.

LI, X. Adiponectin and peroxisome proliferator-activated receptor γ expression in subcutaneous and omental adipose tissue in children. **Pediatrics**, v.121, p.125, 2008.

LIMA, T. M.; GORJÃO, R.; HATANAKA, E.; CURY-BOAVENTURA, M. F.; SILVA, E. P. P.; PROCÓPIO, J.; CURI, R. Mechanisms by which fatty acids regulate leucocyte function. **Clinical Science**, v.113, p.65-77, 2007.

LIU, Z.; LI, J.; ZENG, Z.; LIU, M.; WANG, M. The antidiabetic effects of cysteinyl metformin, a newly synthesized agent, in alloxan- and streptozocin-induced diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 173, p. 68-75, 2008.

LOLMÈDE, K.; DUFFAUT C., ZAKAROFF-GIRARD A., BOULOUMIÉ A. Immune cells in adipose tissue: Key players in metabolic disorders. **Diabetes & Metabolism**, v.37, p.283-290, 2011.

LOMBARDO, Y. B.; CHICCO, A. G. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, p. 1-13, 2006.

LUDWIG, T.; WORSCH, S.; HEIKENWALDER, M.; DANIEL, H.; HAUNER, H.; BADER, B. L. Metabolic and immunomodulatory effects of n-3 fatty acids are different in mesenteric and epididymal adipose tissue of diet-induced obese mice. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.304, p.1140-1156, 2013.

LUMENG, C.N.; BODZIN, J.L.; SALTIEL, A.R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **The Journal of Clinical Investigation**, v.117, p.175-184, 2007.

MA, T., LIASET, B., HAO, Q., PETERSEN, R.Q., FJÆRE, E., NGO, H.T., LILLEFOSSE, H.H., RINGHOLM, S., SONNE, S.B., TREEBAK, J.T., PILEGAARD, H., FRØYLAND, L., KRISTIANSEN, K., MADSEN, L. Sucrose Counteracts the Anti-Inflammatory Effect of Fish Oil in Adipose Tissue and Increases Obesity Development in Mice. **PLoS ONE**, v.6, n.6, 2011.

MATFIN, G. Challenges in developing therapies for the metabolic syndrome. **The British Journal of Diabetes and Vascular Disease**, v.7, p. 152-156, 2007.

MENG, R.; ZHU, D.; BI, Y.; YANG, D.; WANG, Y. Erythropoietin Inhibits Gluconeogenesis and Inflammation in the Liver and Improves Glucose Intolerance in High-Fat Diet-Fed Mice. **PLoS ONE**, v.8, n.1, p.1-9, 2013.

MILLER, R.A.; BIRNBAUM, M.J. An energetic tale of AMPK-independent effects of metformin. **Journal of Clinical Investigation**, v.120, n.7, p.2267-2270, 2010.

MONTORI, V. M.; FARMER, A. ; WOLLAN, P. C.; DINNEEN, S. F. Fish oil supplementation in type 2 diabetes. A quantitative systematic review. **Diabetes Care**, v.23, p.1407-1415, 2000.

MUOIO, D. M.; NEWGARD, C. B. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, p.193-205, 2008.

MUURLING, M.; MENSINK, R.P.; PIJL, H.; ROMIJN, J.A.; HAVEKES, L.M.; VOSHOL, P.J. A Fish Oil Diet Does Not Reverse Insulin Resistance despite Decreased Adipose Tissue TNF- α Protein Concentration in ApoE-3*Leiden Mice. **Journal of Nutrition**, v.133, p. 3350 –3355, 2003.

NASCIMENTO, T. B. *Et al.* Alterações Vasculares em Ratos Obesos por Dieta Rica em Gordura: Papel da Via L-arginina/NO Endotelial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2011. [online].

NESCHEN, S.; MORINO, K.; ROSSBACHER, J.C.; PONGRATZ, R.L.; CLINE, G.W.; SONO, S.; GILLUM, M.; SHULMAN, G.I. Fish Oil Regulates Adiponectin Secretion by a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α -Dependent Mechanism in Mice. **Diabetes**, v.55, p.924-928, 2006.

NICKELSON, K.J.; STROMSDORFER, K.L.; TAYLOR PICKERING, R.; LIU, T.; ORTINAU, L.C.; KEATING, A.F.; PERFIELD II, J.W. A Comparison of Inflammatory and Oxidative Stress Markers in Adipose Tissue from Weight-Matched Obese Male and Female Mice. **Experimental Diabetes Research**, v.2012, p.1-8, 2012.

NISHIMURA, S.; MANABE, I.; NAGASAKI, M. *et al.* CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. **Nature Medicine**, v.15, n.8, p.914-921, 2009.

NISHIYAMA-NARUKE, A.; SOUZA, J. A.; CARNELÓES, M. *et al.* HPLC determination of underivatized fatty acids saponified at 37°C analysis of fatty acids in oils and tissues. **Analytical letters**, v.31, n.14, p.2565-2576, 1998.

OBICI, S.; TAVONI, T. M.; BARRENA, H. C.; CURI, R.; BAZZOTE, R. B. Time sequence of the intensification of the liver glucose production induced by high-fat diet in mice. **Cell Biochemistry and Function**, v.30, p.335-339, 2012.

ODEGAARD, J.I.; RICARDO-GONZALEZ, R.R.; GOFORTH, M.H. *et al.* Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. **Nature**, v.447, n.7148, p.1116-1120, 2007.

OH, D.Y.; TALUKDAR, S.; BAE, E.J.; IMAMURA, T.; MORINAGA, H. *et al.* GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. **Cell**, v.142, p.687-698, 2010.

OOSTERVEER MH, SCHREURS M, VAN DIJK TH, WOLTERS H, HAVINGA R, VAN DEN BERG SAA, WILLEMS van Dijk K, VAN DER ZON GCM, OUWENS DM, GROEN AK, KUIPERS, F, REIJNGOUD D-J. Fish oil potentiates high-fat diet-induced peripheral insulin resistance in mice. Submitted.

OHASHI, K.; PARKER, J.L.; OUCHI, N. *et al.* Adiponectin Promotes Macrophage Polarization toward an Anti-inflammatory Phenotype. **The Journal of Biological Chemistry**, v.285, n.9; p.6153-6160, 2010.

OTA, T. Chemokine Systems Link Obesity to Insulin Resistance. **Diabetes and Metabolism Journal**, v.37, p.165-172, 2013.

PANCHAL, S.K.; BROWN, L. Rodent Models for Metabolic Syndrome Research. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2011, p.1-14, 2011.

PARRISH, C.C.; PATHY, D.A.; ANGEL, A. Dietary Fish Oils Limit Adipose Tissue Hypertrophy in Rats. **Metabolism**, v.39, n.3, p.217-219, 1990.

PATEL, P.; ABATE, N. Body Fat Distribution and Insulin Resistance. **Nutrients**, v.5, p.2019-1027, 2013.

PEREIRA-LANCHA, L. O.; COELHO, D. F.; CAMPOS-FERRAZ, P. L.; LANCHA Jr, A. H. Body Fat Regulation: Is It a Result of a Simple Energy Balance or a High Fat Intake? **Journal of the American College of Nutrition**, v.29, n.4, p.343-351, 2010.

PERSSON, P. B.; PERSSON, A. B. Obesity: The BIG issue. **Acta Physiologica**, v.207, p.1-4, 2013.

PETERSEN, K.F.; DUFOUR, S.; BEFROY, D.; GARCIA, R.; SHULMAN, G.I. Impaired Mitochondrial Activity in the Insulin-Resistant Offspring of Patients with Type 2 Diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v.350, n.7, p.664-671, 2004.

PI-SUNIER, X. A clinical view of the obesity problem. **Science**, v. 299, p. 859-860, 2003.

PUGLISI, M.J.; HASTY, A.H.; SARASWATHI, V. The role of adipose tissue in mediating the beneficial effects of dietary fish oil. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.22, p.101-108, 2011.

RAUSCH, M.E.; WEISBERG, S.; VARDHANA, P.; TORTORIELLO, D.V. Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. **International Journal of Obesity**, v.32, p.451-463, 2008.

REN, T.; HE, J.; JIANG, H.; ZU, L.; PU, S.; GUO, X.; XU, G. Metformin reduces lipolysis in primary rat adipocytes stimulated by tumor necrosis factor- α or isoproterenol. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.37, p.175-183, 2006.

REMESH, A. Obesity, pathophysiology and management – a pharmacological perspective. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v.6, n.1, p.11-13, 2013.

REEVES, P; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **Journal of Nutrition**, v.123, p.1939-1951, 1993.

REEVES, P. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet. **Journal of Nutrition**, v.127, p.838-841, 1997.

RICQUIER, D.; BOUILLAUD, F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. **Journal of Physiology**, v.529, n.1, p.3-10, 2000.

KOTTKE, T. E.; WU, L. A. ; HOFFMAN, R. S. Economic and Psychological Implications of the Obesity Epidemic. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 78, p. 92-94, 2003.

SACKMANN-SALA, L.; BERRYMAN, D. E.; MUNN, R. D.; LUBBERS, E. R.; KOPCHICK, J. J. Heterogeneity Among White Adipose Tissue Depots in Male C57BL/6J Mice. **Obesity**, v.20, p.101-111, 2012.

SALTIEL A. R.; KAHN R. C. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, p. 799-806, 2001.

SALTIEL, A.R. Insulin Resistance in the Defense against Obesity. *Cell Metabolism*, v.15, p.798-804, 2012.

SAMUEL, V.T.; SHULMAN, G. I. Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. **Cell**, v.148, n.5, p.852-871, 2012.

SANTOMAURO JÚNIOR, A. C.; UGOLINI, M. R.; SANTOMAURO, A. T.; SOUTO, R. P. Metformina e AMPK: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.52, p. 120-125, 2008.

SARASWATHI, V.; GAO, L.; MORROW, J. D.; CHAIT, A.; NISWENDER, K. D.; HASTY, A. H. Fish Oil Increases Cholesterol Storage in White Adipose Tissue with Concomitant Decreases in Inflammation, Hepatic Steatosis, and Atherosclerosis in Mice. **The Journal of Nutrition**, v.137, p. 1776–1782, 2007.

SARTORELLI, D. S.; CARDOSO, M. A. Associação entre carboidratos da dieta habitual e diabetes mellitus tipo 2: evidências epidemiológicas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.50, n.3, p.415-426, 2006.

SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J. M. Insulin Sensivity: modulation by nutrients and inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v.118, p. 2992-3002, 2008.

SETHI, J. K.; VIDAL-PUIG, A. J. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. **Journal of Lipid Research**, v.48, p. 1253–1262, 2007.

SHI, H.; KOKOEVA, M.V.; INOUE, K.; TZAMELI, I.; YIN, H.; FLIER, J.S. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v.16, n.11, p.3015-3025, 2006.

STRISSEL, K.J.; DEFURIA, J.; SHAUL, M.E. *et al.* T Cell Recruitment and Th1 Polarization in Adipose Tissue During Diet-Induced Obesity in C57BL/6 mice. **Obesity (Silver Spring)**, v.18, n.10, p.1918-1925, 2010.

SILVA, K. C.; ESTEVES, E. A.; MOREIRA, L. L.; SOUTO, P. A.; CUNHA, C. S.; NOBRE, L. N. Qualidade dos carboidratos de dietas consumidas por diabéticas: efeito de um programa de educação. **Comunicações em Ciências da Saúde**, v.22, n.1, p.7-18, 2011.

SIRIWARDHANA, N.; KALUPAHANA, N.S.; CEKANOVA, M.; LEMIEUX, M.; GREER, B.; MOUSTAID-MOUSSA, N. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.24, p.613-623, 2013.

SIJBEN, J. W. C.; CALDER, P. C. Differential immunomodulation with long-chain n-3 PUFA in health and chronic disease. **Proceedings of the Nutrition Society**, V.66, P.237-259, 2007.

SOUZA-MELLO, V.; GREGORIO, B.M.; CARDOSO-DE-LEMO, F.S.; CARVALHO, L.; AGUILA, M.B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet. **Clinical Science**, v.119, p.239-250, 2010.

SPENCER, M.; FINLIN, B.S.; UNAL, R. *et al.* Omega-3 Fatty Acids Reduce Adipose Tissue Macrophages in Human Subjects With Insulin Resistance. **Diabetes**, v.62, p.1709-1717, 2013.

STRISSEL, K.J.; DEFURIA, J.; SHAUL, M.E.; BENNETT, G.; GREENBERG, A.S.; OBIN, M.S. T Cell Recruitment and Th1 Polarization in Adipose Tissue During Diet-Induced Obesity in C57BL/6 mice. **Obesity**, v.18, n.10, p.1918-1925, 2010.

STRYJECKI C.; MUTCH D.M. Fatty acid-gene interactions, adipokines and obesity. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.65, p.285-297, 2011.

SUCHANKOVA, G.; TEKLE, M.; SAHA, A. K.; RUDERMAN, N. B.; CLARKE, S. D.; GETTYS, T. W. Dietary polyunsaturated fatty acids enhance hepatic AMP-activated protein kinase activity in rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 326, p. 851-858, 2005.

SULTAN, A .; STRODTHOFF, D.; ROBERTSON, A .; PAULSSON-BERNE, G.; FAUCONNIER, J.; PARINI, P.; RYDÉN, M.; THIERRY-MIEG, N.; JOHANSSON, M.; CHIBALIN, A .; ZIERATH, J.; ARNER, P.; HANSSON, G. T-Cell-mediated inflammation in adipose tissue does not cause insulin resistance in hyperlipidemic mice. **Circulation Research**, v. 104, p. 961-968, 2009.

TCHERNOF, A.; DESPRÉS, J. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. **Physiological Reviews**, v.93, p.359-404, 2013.

TILG H.; MOSCHEN A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v.6, n.10, p.772-783, 2006.

TODORIC, J.; LÖFFLER, M.; HUBER, J.; BILBAN, M.; REIMERS, M.; KADL, A.; ZEYDA, M.; WALDHÄUSL, W.; STULNIG, T.M. Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. **Diabetologia**, v.49, p.2109-2119, 2006.

TONTONOZ, P.; MANGELSDORF, D. J. Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. **Molecular Endocrinology**, v.17, p.985-993, 2003.

TRAYHURN, P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 184, p. 285-293, 2005.

TRAYHURN, P.; WANG, B.; WOOD, I.A. Hypoxia and the endocrine and signalling role of white adipose tissue. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v.114, n.4, p.267-276, 2008.

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

TSUKUMO, D.M.L.; CARVALHO-FILHO, M.A.; CARVALHEIRA, J.B.C. *et al.* Loss-of-Function Mutation in Toll-Like Receptor 4 Prevents Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. **Diabetes**, v.56, p.1986-1998, 2007.

VANDANMAGSAR, B.; YOUM, Y.; RAVUSSIN, A. *et al.* The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Nature Medicine**, v.17, n.2, p.179-189, 2011.

VIDAL-PUIG, A.J.; CONSIDINE, R.V.; JIMENEZ-LIÑAN, M.; WERMAN, A.; PORIES, W.J.; CARO, J.F.; FLIER, J.S. Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gene Expression in Human Tissues. **Journal of Clinical Investigation**, v.99, p.2416-2422, 1997.

VIOLLET, B.; GUIGAS, B.; SANZ GARCIA, N. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. **Clinical Science**, v.122, p.253-270, 2012.

WAJCHENBERG, B.L.; NERYN, M.; CUNHA, M.R.; SILVA, M.E.R. Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v.53, n.2, p.145-150, 2009.

WANG, B.; WOOD, I.S.; TRAYHURN, P. Hypoxia induces leptin gene expression and secretion in human preadipocytes: differential effects of hypoxia on adipokine expression by preadipocytes. **Journal of Endocrinology**, v.198, p.127-134, 2008.

WELLEN, K.E.; HOTAMISLIGIL, G.S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. **Journal of clinical investigation**, v.112, p.1785-1788, 2003.

- WHITEMAN, E. L.; CHO, H.; BIRNBAUM, M. J. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. **TRENDS in Endocrinology & Metabolism**, v.13, n.10, p.444-451, 2002.
- WIESER, V.; MOSCHEN, A. R.; TILG, H. Inflammation, Cytokines and Insulin Resistance: A Clinical Perspective. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v.61, p.119-125, 2013.
- XU, H.; HIROSUMI, J.; UYSAL, K.T.; GULER, A.D.; HOTAMISLIGIL, G.S. Exclusive Action of Transmembrane TNF α in Adipose Tissue Leads to Reduced Adipose Mass and Local But Not Systemic Insulin Resistance. **Endocrinology**, v.143, p.1502-1511, 2002.
- XU, H.; BARNES, G.T.; YANG, Q. *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **Journal of clinical investigation**, v.112, p.1821-1830, 2003.
- YAMAUCHI, T.; WAKI, H.; KAMON, J.; MURAKAMI, K. *et al.* Inhibition of RXR and PPAR γ ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v.108, p.1001-1013, 2001.
- YANG, Z.; MIYAHARA, H.; TAKEO, J.; KATAYAMA, M. Diet high in fat and sucroses induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid responses of genes involved in lipogenesis, insulin signaling and inflammation in mice. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v.4, n.32, p.1-10, 2012.
- YE, J.; MCGUINNESS, O.P. Inflammation during obesity is not all bad: evidence from animal and human studies. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 304, p.466-477, 2013.
- YOSHIKAWA, T.; SHIMANO, H.; YAHAGI, N. *et al.* Polyunsaturated Fatty Acids Suppress Sterol Regulatory Elementbinding Protein 1c Promoter Activity by Inhibition of Liver X Receptor (LXR) Binding to LXR Response Elements. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.3, p.1705-1711, 2002.
- YOUNGREN, J. F.; PAIK, J.; BARNARD, J. Impaired insulin-receptor autophosphorylation is an early defect in fat-fed, insulin-resistant rats. **Journal of Applied Physiology**, v.21, p.2240-2247, 2001.
- ZECHNER, R.; ZIMMERMANN, R.; EICHMANN, T.O. *et al.* FAT SIGNALS - Lipases and Lipolysis in Lipid Metabolism and Signaling. **Cell Metabolism**, v.15, p.279-291, 2012.

ANEXOS



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 Setor de Ciências Biológicas
 Comitê de Ética no Uso de Animais
 (CEUA)



Nº 511B

CERTIFICADO

O Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

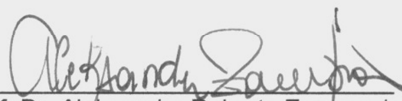
PROCESSO: 23075.062307/2011-97

APROVADO: 01/03/2011 – R.O. 02/2011
 Alteração aprovada em
 13/03/2012 – R.O. 02/2012

TÍTULO: Investigação da suplementação com óleo de peixe e administração de metformina sobre a "diabesidade"

AUTORES: Luiz Cláudio Fernandes, Ricardo Fernandes Perez, Isabela Coelho de Castro, Danielle Cristina Tonello Pequito

DEPARTAMENTO: Fisiologia


 Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
 Coordenador do CEEA