

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

Gabriela Fernandes Hahn

**Efeitos da suplementação com ômega-3 sobre
parâmetros metabólicos e marcadores de dano
oxidativo e inflamação no intestino de ratos
com obesidade induzida por dieta hiperlipídica**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre

2018

Gabriela Fernandes Hahn

Efeitos da suplementação com ômega-3 sobre parâmetros metabólicos e marcadores de dano oxidativo e inflamação no intestino de ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Marilene Porawski

Porto Alegre

2018

Catálogo na Publicação

Hahn, Gabriela Fernandes

Efeitos da suplementação com ômega-3 sobre parâmetros metabólicos e marcadores de dano oxidativo e inflamação no intestino de ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica / Gabriela Fernandes Hahn. -- 2018.

72 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2018.

Orientador(a): Profa. Dra. Marilene Porawski.

1. Obesidade. 2. Ácidos Graxos Ômega-3. 3. Intestino.
4. Estresse oxidativo. 5. Inflamação. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

INSTITUIÇÕES E FONTES DE FINANCIAMENTO

Esse trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, nos laboratórios de Fisiologia comportamental e metabólica (Prédio 3, laboratório 502) e de Genética toxicológica (prédio 3, laboratório 714). Esse trabalho contou com recursos financeiros do CAPES e do PROAP/ UFCSPA.

Dedico esse trabalho aos meus pais Luzia e Florentino e ao meu companheiro Diego. Sem vocês eu não teria conseguido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de modo especial a minha mãe **Luzia**, meu pai **Florentino** e ao meu companheiro **Diego** pelo apoio (emocional e financeiro), amor, carinho e compreensão que sempre tiveram comigo ao longo de toda a minha trajetória acadêmica. Obrigada por serem o meu porto seguro e por não deixarem de acreditar em mim, nem mesmo quando eu achava que não iria conseguir. A vocês todo o meu amor e gratidão!

Gostaria de agradecer a **UFCSPA** pela oportunidade e pelo privilégio de ter estudado nesta instituição de excelência. E de forma especial, gostaria de agradecer ao **PPG Biociências**. Obrigada pelo acolhimento e pelo conhecimento que esse período do mestrado me proporcionou. A UFCSPA e o PPGBio são exemplos que eu quero levar para a minha vida profissional. O ambiente da Universidade é agradável e a equipe de professores, além de serem referências em suas áreas, são muito acessíveis, interessados e amigáveis. Enfim, só tenho a agradecer pela oportunidade de ter feito parte da UFCSPA e do PPGBio, muito obrigada pelo aprendizado!

Agradeço a Professora **Marilene Porawski** por ter me recebido como sua orientanda e pela troca de conhecimentos. Tu me deste a oportunidade de realizar o meu sonho de ser mestra. Agradeço também aos colaboradores deste projeto **Luiza Steffens**, Professora **Dinara Moura** e Professora **Renata Guedes**. Obrigada por ajudarem a tornar possível a execução deste trabalho. Sem a ajuda de vocês tudo seria mais difícil. Dentre os colaboradores deste projeto, agradeço com carinho a minha colega de laboratório **Michely Nunes**. Obrigada por sempre dar um jeito de me ajudar, seja nos experimentos ou simplesmente esparecendo tomando um café e falando bobagens. Agradeço também aos demais colegas do Laboratório de Fisiologia Comportamental e Metabólica pelo acolhimento, discussões, troca de ideias e pelo coleguismo. Foi um prazer conhecer e trabalhar com vocês.

Por fim, ressalto que ao longo desta caminhada, nada foi fácil, e sem vocês certamente eu não teria conseguido. Por isso, **com vocês eu compartilho a alegria desta conquista!**

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por se omitir”.

Augusto Cury

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 OBESIDADE	14
2.2 FISIOPATOLOGIA DA OBESIDADE	16
2.2.1 Disfunção do tecido adiposo	17
2.2.2 Obesidade e estresse oxidativo	20
2.2.3 O papel do intestino e da sua microbiota	22
2.3 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS	24
2.3.1 Metabolismo dos ácidos graxos poli-insaturados.....	25
2.3.2 Ômega-3	27
2.3.3 Ômega-3: efeitos na obesidade	29
2.3.4 Mediadores lipídicos pró-resolução.....	30
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 ARTIGO CIENTÍFICO	34
5 CONCLUSÕES	61
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
7 ANEXOS	70

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

AA	Ácido araquidônico
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
ALT/TGP	Alanina aminotransferase
AST/TGO	Aspartato aminotransferase
CAT	Catalase
COX	Ciclooxigenase
DCF	Dicloro-fluoresceína-diacetato
DHA	Ácido decosahexaenóico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GGT	Gama glutamiltransferase
HDL	Colesterol ligado a lipoproteína de alta densidade
HFD	Dieta de alto teor de gordura (do inglês <i>high fat diet</i>)
IgA	Imunoglobulina A
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
LDL	Colesterol ligado a lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos do tipo 1
NFκB	Fator de Transcrição Nuclear <i>Kappa B</i>
SOD	Superóxido dismutase
TAB	Tecido adiposo branco
TBARS	Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico
TLR	Receptores do tipo <i>Toll</i>
TNFα	Fator de necrose tumoral <i>alfa</i>
VLDL	Colesterol ligado a lipoproteína de densidade muito baixa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O dogma central da fisiopatologia da obesidade.....	21
Figura 2. Metabolismo dos ácidos graxos ômega-6 e ômega-3.....	26
Figura 3. Estrutura química do ácido α -linolênico, EPA e DHA.....	27
Figura 4. Produção dos mediadores lipídicos pró-resolução.....	31

RESUMO

A obesidade é uma doença metabólica complexa que não possui um tratamento efetivo. Neste sentido, diversos estudos já evidenciaram os efeitos benéficos do ômega-3 para a saúde. Contudo, pouco é sabido sobre os efeitos do ômega-3 no intestino. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação com ômega-3 nas alterações metabólicas e intestinais observadas na obesidade. **Materiais e métodos:** A obesidade foi induzida por 5 meses em 40 ratos Wistar por *high fat diet* (HFD) com 45% das calorias em lipídios. A partir do 4º mês os animais foram divididos em 4 grupos (n=10 cada): I- *Standard diet* (SD); II- SD + ômega-3; III- HFD e IV- HFD + ômega-3. Os animais nos grupos SD e HFD receberam 1 mL de solução salina diariamente e os animais nos grupos SD + ômega-3 e HFD + ômega-3 foram suplementados com ômega-3 (1g/Kg) diariamente via gavagem. Foi mensurado a evolução de peso e o consumo de ração, além de parâmetros bioquímicos no sangue e análises de estresse oxidativo e inflamação no intestino. Os dados foram avaliados com ANOVA de duas vias e pós teste de Bonferroni, um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Aprovação CEUA/UFCSPA nº 232/13. **Resultados:** Os animais do grupo HFD+O ganharam menos peso quando comparados aos animais do grupo HFD sem suplementação, além de acumularem menos gordura abdominal e epididimal. No grupo HFD+O também houve diminuição do índice de adiposidade, índice de Lee e índice HOMA-IR, além de redução no colesterol total, triglicerídeos, LDL, VLDL e insulina plasmática. No intestino, o grupo HFD+O apresentou redução nas espécies reativas de oxigênio, lipoperoxidação, atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase bem como menor ativação do NFκB e produção de TNFα. **Conclusões:** Esses resultados indicam que a suplementação com ômega-3 possui um papel benéfico na atenuação das alterações metabólicas da obesidade assim como na redução do estresse oxidativo e inflamação intestinal. Portanto, a suplementação com ômega-3 poderia ser utilizada como um adjuvante no tratamento da obesidade.

Palavras-chave: Obesidade; Ácidos Graxos Ômega-3; Intestino; Estresse oxidativo; Inflamação.

ABSTRACT

Obesity is a complex metabolic disease that doesn't have an effective treatment. In this sense, many studies shown the benefic effects of omega-3 on health. However, little known about the omega-3 effects in gut. Thus, the objective this study was to evaluate the effects of omega-3 supplementation in metabolic and intestinal changes observed in obesity. Materials and methods: Experimental obesity was induced for 5 months in 40 male Wistar rats by high fat diet (HFD - 45% fat). From 4th month the animals were divided into 4 groups (n = 10 each): I- Standard diet (SD); II- SD + omega-3; III- HFD and IV- HFD + omega-3. Animals in SD and HFD groups received 1 mL of saline solution daily and animals in SD+omega-3 and HFD+omega-3 groups were supplemented with omega-3 (1 g/Kg) via gavage daily for 4 weeks. We evaluated: weight gain and feed intake, biochemical parameters in plasm and markers of oxidative stress and inflammation in gut. Data were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc. A p-value < 0.05 was considered statistically significant. The study was approved by CEUA/UFCSPA, n°232/13. Results: The animals in HFD+O group had a decreased weight gain compared to the HFD animals without supplementation and less accumulation of abdominal and epididymal fat. In supplemented group there was reduction of adiposity index, Lee index, HOMA-IR index, total cholesterol, triglycerides, LDL, VLDL and plasma insulin. In gut, supplementation with omega 3 reduced the reactive oxygen species, lipoperoxidation, the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase and the NFkB activation and TNF α production. Conclusions: These results indicate that omega-3 supplementation plays a beneficial role in attenuating metabolic changes in obesity and reducing oxidative stress and intestinal inflammation. Therefore, of omega-3 supplementation could be used as adjuvant in obesity treatment.

Key-words: Obesity; Omega-3 Fatty Acids; Oxidative Stress; Gut; Inflammation.

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença metabólica complexa. Sua etiologia é atribuída a uma combinação entre fatores genéticos, epigenéticos, ambientais, psicossociais e de estilo de vida (González-Muniesa et al., 2017). Sua principal característica clínica é a inflamação crônica sistêmica e de baixo grau causada pela expansão do tecido adiposo branco bem como pelo depósito ectópico de gordura em tecidos não adiposos (Choe et al., 2016). Este estado inflamatório desempenha um papel crítico no desenvolvimento de complicações associadas à obesidade, como resistência à insulina, aterosclerose, diabetes *mellitus* tipo 2, esteatose hepática e síndrome metabólica (O'Rourke, 2009; Lumeng & Saltiel, 2011)

Nas últimas décadas, o estilo de vida moderno e sedentário e a alimentação rica em calorias, gorduras e açúcares, associados ao envelhecimento populacional tem aumentado consideravelmente a prevalência mundial de obesidade. Assim sendo, a pandemia de obesidade é considerada um dos maiores problemas de saúde pública deste século. (Swinburn et al., 2011). A obesidade e suas comorbidades associadas diminuem a qualidade de vida da população e promovem um impacto negativo sobre os sistemas públicos de saúde (Tremmel et al., 2017). Contudo, não existe um tratamento efetivo para a obesidade, os procedimentos que trazem melhores resultados são a cirurgia bariátrica ou a redução de peso associada a medicamentos inibidores do apetite. Porém ambos com sérios efeitos colaterais e complicações de longo prazo. Assim, o tratamento da obesidade continua a ser um grande desafio. (Kang & Park, 2012).

Há uma necessidade urgente de encontrar alternativas de prevenção e/ou tratamento da obesidade que possam substituir ou atuar como um coadjuvante dessas terapêuticas, uma vez que muitas delas são associadas a efeitos adversos (Torres-Fuentes et al., 2013). Neste panorama, o ácido graxo poli-insaturado do tipo ômega-3 é amplamente conhecido por seus diversos efeitos benéficos para a saúde humana (Siriwardhana et al., 2012). Há décadas a sua utilização tem sido estudada em diversos contextos, inclusive na obesidade e na síndrome metabólica a ela associada. (Flachs et al., 2009; González-Pérez et al.,

2009; Martínez-Fernandez et al., 2015). Esses estudos apresentaram diversos resultados animadores, o que emerge como uma possibilidade de melhoria das condições clínicas da obesidade.

Contudo, sabendo-se que o intestino desempenha um papel importante durante o desenvolvimento da obesidade induzida por dieta, visto que é nesse órgão que os nutrientes ingeridos são absorvidos (Ding & Li, 2003; Araújo et al., 2017). E considerando ainda, que durante o desenvolvimento da obesidade ocorre alteração na composição da microbiota intestinal (disbiose) e o aumento da permeabilidade do epitélio intestinal, o que permite que as bactérias intestinais e seus produtos, como o lipopolissacarídeos (LPS) e toxinas, se transloquem e ativem receptores do tipo *Toll-like* (TLRs). Tal fato promove uma cascata de sinalização celular pró-inflamatória, gerando a superprodução de mediadores inflamatórios e de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que causa dano e morte celular. Assim sendo, pouca atenção tem sido dada sobre os possíveis efeitos do ômega-3 especificamente neste órgão. Alguns estudos já avaliaram os efeitos do ômega-3 no intestino, porém visando a melhor compreensão da fisiopatologia das doenças inflamatórias intestinais, e não dentro do contexto da obesidade (Gobbetti et al., 2017; Ungaro et al., 2017). Portanto, é relevante que se estude os efeitos do ômega-3 especificamente neste órgão. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar não somente os efeitos metabólicos do ômega-3 no contexto da obesidade, mas também de forma específica no intestino.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 OBESIDADE

A obesidade é caracterizada pela inflamação crônica sistêmica e de baixo grau gerada pela contínua produção de mediadores inflamatórios em consequência da expansão do tecido adiposo branco (TAB) e do depósito ectópico de ácidos graxos em tecidos não adiposos, como músculo, fígado e pâncreas, prejudicando assim a função destes órgãos (Choe et al., 2016; González-Muniesa et al., 2017). A obesidade está intimamente associada à síndrome metabólica, que é caracterizada pela presença de três das seguintes condições: hiperglicemia, obesidade abdominal, hipertensão arterial, elevação dos triglicerídeos plasmáticos e redução do colesterol HDL (Alberti et al., 2009). Tal fato, gera um grande impacto negativo na qualidade de vida das pessoas, pois acarreta em distúrbios do sono, problemas respiratórios, osteoartrite, diabetes *mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares, problemas psicossociais, alguns tipos de câncer e até mesmo a infertilidade (O'Rourke, 2009; Lumeng & Saltiel, 2011).

A estimativa do grau de adiposidade é feita pelo índice de massa corporal (IMC). O IMC calcula grosseiramente a adiposidade e identifica sobrepeso e obesidade com base no peso do indivíduo expresso em quilogramas (kg) dividido pela altura quadrada em metros (m²). A Organização Mundial de Saúde classifica indivíduos com IMC acima de 25 Kg/m² com sobrepeso, IMC \geq 30 Kg/m² como obesos, e pessoas com IMC \geq 40 Kg/m² são classificadas como obesos mórbidos. Contudo, o IMC não relata nem a composição corporal, nem a localização do excesso de gordura, nem as variações individuais em função do sexo, etnia e idade em termos de quantidade de massa magra (músculo). No entanto, mesmo que o IMC seja uma ferramenta imprecisa, é a mais comumente utilizada, pois é simples, prática e sem custo (WHO, 2018).

A obesidade pode ser classificada em monogênica ou poligênica. A obesidade monogênica é resultante de mutações em um único gene e são raras, afetando cerca de 5% da população. Ela é caracterizada por obesidade extrema e de início precoce. Em contraste, na obesidade poligênica cada polimorfismo leva a uma variante que confere suscetibilidade, exigindo, porém, a presença de

fatores como estilo de vida e um ambiente obesogênico para determinar o fenótipo obeso. Neste sentido, acredita-se que os hábitos de vida sedentários associados às mudanças de comportamento alimentar, com a oferta ilimitada de alimentos baratos, processados, palatáveis, práticos e de alta concentração energética, atuando sobre genes de suscetibilidade sejam o determinante principal do crescimento da obesidade no mundo. (Swinburn et al., 2011; Albuquerque et al., 2015; González-Muniesa et al., 2017)

A obesidade é atualmente um dos mais graves problemas de saúde pública. Sua prevalência vem crescendo acentuadamente nas últimas décadas, inclusive nos países em desenvolvimento, o que levou a doença à condição de epidemia do século 21. A obesidade é uma doença metabólica complexa que atinge todas as idades, gêneros e classes sociais, sobrecarregando o sistema de saúde com uma demanda crescente de atendimento às doenças crônicas relacionadas a obesidade (Finkelstein et al., 2009; NCD, 2016; González-Muniesa et al., 2017; Tremmel et al., 2017).

Contudo, apesar de políticas de saúde pública para combater a epidemia de obesidade, estudos epidemiológicos têm relatado números alarmantes desta doença (Ng et al., 2014; NCD, 2016). Dados da organização mundial da saúde evidenciam que no ano de 2016 mais de 1,9 bilhão de adultos maiores de 18 anos tinham excesso de peso. Destes, mais de 650 milhões de adultos eram obesos. Projeta-se que cerca de metade da população adulta do mundo estará com excesso de peso ou obesidade até 2030 (WHO, 2016).

No Brasil, é crescente o número de crianças, adolescentes e adultos com sobrepeso e obesidade. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde 56,5% da população adulta brasileira está com sobrepeso e 22,1% obesa. Entre crianças e adolescentes de 5 a 19 anos 28% está com sobrepeso e 10,8% são obesos. Estes números mais que dobraram desde 1980 (WHO, 2016). Neste cenário, destaca-se a cidade de Porto Alegre (RS) com mais de 50% da população adulta com sobrepeso e 19,9% obesos (VIGITEL, 2016)

Em um estudo publicado em 2016 que avaliou o IMC de 19,2 milhões de participantes adultos (9,9 milhões de homens e 9,3 milhões de mulheres) em 200 países concluiu que se as tendências pós ano 2000 continuarem, não apenas o

mundo não atingirá o objetivo global de travar o aumento da obesidade, assim como até o ano de 2025, a prevalência global de obesidade atingirá 18% nos homens e superará os 21% nas mulheres (NCD, 2016). Neste panorama nada favorável, salienta-se ainda que o tratamento da obesidade é complexo e multidisciplinar. Envolve intervenções nos hábitos de vida, como mudanças na alimentação e a prática regular de exercício físico, podendo necessitar de medicação ou cirurgia bariátrica em alguns casos mais graves (ABESO, 2016). Numerosas drogas terapêuticas, como a Fentermina, Dietilpropiona, Liraglutida, Sibutramina e Lorcaserina, foram desenvolvidas para o tratamento da obesidade. Estas exercem seus efeitos restringindo o apetite, controlando o metabolismo lipídico e restringindo a ingestão de energia. Contudo, nenhuma destas drogas foi aprovada para uso em gestantes, pacientes com outras doenças ou em populações pediátricas. Além disso, esses medicamentos mostraram resultados insatisfatórios em termos de eficácia, segurança e manutenção a longo prazo da perda de peso. Além de apresentarem efeitos colaterais importantes como fezes oleosas, pressão arterial elevada, variação na frequência do pulso, dor de cabeça, tonturas, náuseas e depressão. Assim, as atuais opções de tratamento farmacológico anti-obesidade permanecem limitadas devido à fraca eficácia e a presença de grandes efeitos colaterais (Kang & Park, 2012). De tal modo, existe uma necessidade urgente de encontrar alternativas para o tratamento da obesidade.

2.2 FISIOPATOLOGIA DA OBESIDADE

A obesidade é uma doença crônica e multifatorial que pode ser definida basicamente como o resultado entre o aumento da ingestão calórica e a diminuição do gasto energético. No entanto, o desenvolvimento da obesidade é um processo muito mais complexo que envolve fatores socioeconômicos, ambientais, psicológicos, comportamentais, além de genéticos e epigenéticos que atuam por meio de vias que conectam o metabolismo com o sistema imune, influenciando diretamente na ingestão de alimentos, gasto energético e no

depósito de gordura (Gregor & Hotamisligil, 2011; Swinburn et al., 2011; Williams et al., 2015).

O mecanismo chave da fisiopatologia da obesidade é a inflamação crônica sistêmica e de baixo grau gerada pela hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo branco (TAB) e pelo depósito ectópico de ácidos graxos em tecidos não adiposos (Gregor & Hotamisligil, 2011). Embora o gatilho exato desse processo inflamatório seja desconhecido, a infiltração de células imunológicas (Huh et al., 2014), a hipóxia do tecido adiposo (Reilly & Saltiel, 2017), a desregulação do metabolismo de lipídios, glicose, nucleotídeos e aminoácidos (Cummins et al., 2014), o estresse do retículo endoplasmático (Kawasaki et al., 2012), o estresse oxidativo (Marseglia et al., 2015) a disfunção mitocondrial (Bournat & Brown, 2010), a alteração da composição da microbiota intestinal (Tilg & Kaser, 2011) e a ativação de TLRs (Kim et al., 2012) foram identificados como fatores importantes neste processo.

2.2.1 Disfunção do tecido adiposo

Até o momento, foram caracterizados três tipos de tecidos adiposos com funções, localização anatômica e fenótipos diferentes: o tecido adiposo branco (TAB), o tecido adiposo marrom e o tecido adiposo bege. O TAB é o principal órgão de estoque do organismo, é encontrado principalmente na região subcutânea e na região visceral. Já o tecido adiposo marrom está localizado principalmente na região interescapular. Ele é caracterizado por múltiplas gotículas de lipídios, sendo bem vascularizado e rico em mitocôndrias. A sua principal função é a regulação térmica por meio da geração de calor mediada pela oxidação lipídica. O mais recente tecido adiposo identificado é o tecido adiposo bege. Os adipócitos beges foram encontrados em alguns depósitos de TAB, mas exercendo características funcionais e moleculares semelhantes aos adipócitos marrons. É sabido que a exposição ao frio induz ao remodelamento dos adipócitos brancos para adipócitos bege, a fim de gerar calor por meio da termogênese. Esse remodelamento fenotípico vem sendo estudado como uma alternativa de amenizar/tratar a obesidade (Hildebrand et al., 2018).

Contudo, o TAB é o que realmente desempenha um papel fundamental na patogênese da obesidade e nas suas complicações associadas. O TAB é o principal órgão de armazenamento do organismo, acumulando o excesso de energia sob a forma de triglicerídeos, que podem ser mobilizados sob condições de privação de energia (Choe et al., 2016). Além disso, o TAB atua como um importante órgão endócrino liberando uma ampla gama de moléculas chamadas adipocinas, que exercem ação endócrina no organismo. As adipocinas estão envolvidas na regulação de muitas funções fisiológicas, incluindo o peso corporal (leptina), metabolismo vascular (PAI-1), metabolismo da glicose e sensibilidade à insulina (adiponectina) e no padrão de secreção de adipocinas pró-inflamatórias, como a proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1), interleucinas (IL) 8, IL-6, IL-1 e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucinas anti-inflamatórias como a IL-10 (Wozniak et al., 2009).

Em indivíduos magros e saudáveis, o TAB apresenta adipócitos pequenos e sensíveis à insulina, sendo habitado por linfócitos T *helper* do tipo 2 (Th2), linfócitos T regulatório (Treg), linfócitos *natural killer* (NK) e eosinófilos que contribuem para a ativação de macrófagos do tipo M2 (anti-inflamatório) por meio da secreção de IL-4 ou IL-10, mantendo assim a homeostase local. Em contraste, durante o balanço energético positivo presente na obesidade, os adipócitos sofrem hipertrofia e hiperplasia para armazenar o excesso de nutrientes ingeridos. Esse processo é acompanhado por hipóxia, necrose, infiltrado de células imunológicas tais como neutrófilos, linfócitos T *helper* do tipo 1, linfócitos B e mastócitos que induzem a ativação de macrófagos com fenótipo M1 (pró-inflamatório) por meio da alteração no padrão de secreção de adipocinas. Conseqüentemente, as células imunológicas recrutadas secretam mais citocinas inflamatórias, o que perpetua um ciclo vicioso que leva o TAB a um estado pró-inflamatório constante (Tateya et al., 2013; Huh et al., 2014; Reilly & Saltiel, 2017).

Durante o processo de hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos o TAB passa por uma reprogramação metabólica que inclui uma maior produção de leptina. Essa superprodução é responsável por iniciar uma resistência em seus receptores centrais, ao mesmo tempo em que aumenta a atividade pró-

inflamatória, estimulando a angiogênese, vasoconstrição, agregação plaquetária e ativação das células do sistema imunológico. Assim sendo, a obesidade é frequentemente associada à resistência à leptina e hiperleptinemia, enquanto a concentração de adiponectina é diminuída, estando intimamente relacionada com a resistência à insulina (Tateya et al., 2013; Huh et al., 2014; Reilly & Saltiel, 2017). Além dessas respostas inflamatórias, e também por consequência delas, existe uma produção aumentada de proteínas desdobradas no TAB que leva ao estresse do retículo endoplasmático. Tal fato amplifica ainda mais o sinal quimiotático e pró-inflamatório. Ou seja, o estresse do retículo também desempenha um papel importante na disfunção do TAB observado na obesidade (Kawasaki et al., 2012).

A disfunção mitocondrial causada pela secreção desregulada de adipocinas, defeitos na oxidação de ácidos graxos, aumento da produção de espécies reativas e alteração no metabolismo da glicose também está associada à disfunção do TAB. Assim, a disfunção mitocondrial tem sido implicada na patogênese de uma variedade de doenças, incluindo obesidade e suas doenças associadas (Bournat & Brown, 2010; Cummins et al., 2014)

A ativação dos TLR pelos ácidos graxos livres, pelo LPS e também pelo inflamassoma induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e o recrutamento de células imunes. (Fresno et al., 2011; Kim et al., 2012) A ativação dos TLR e do fator nuclear *kappa* B (NFκB) são considerados os mecanismos chave da inflamação crônica do tecido adiposo. A via de sinalização do NFκB desempenha um papel crucial na iniciação e amplificação da inflamação através da modulação de múltiplos mediadores inflamatórios. (Vitseva et al., 2008)

Contudo, embora inicialmente, esse processo inflamatório pertença ao TAB, as células imunes pró-inflamatórias recrutadas amplificam a resposta inflamatória através de interações célula a célula e de adipócitos com outras células imunes, o que induz a inflamação crônica e sistêmica. Afetando diferentes órgãos, como fígado e músculo esquelético e causando distúrbios metabólicos, incluindo resistência à insulina, doença hepática gordurosa não alcoólica e síndrome metabólica. (Xu et al., 2003; O'Rourke, 2009; Lumeng & Saltiel, 2011; Zand et al., 2017). Esta inflamação sistêmica é descrita como "Meta inflamação" e

é caracterizada por uma doença inflamatória de baixo grau e de longo prazo desencadeada por superávit metabólico (Li et al., 2017).

2.2.2 Obesidade e estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) são moléculas altamente reativas e transientes que exercem um importante papel no organismo. Embora a elevação transitória destes estímulos seja essencial para a regulação de diversos processos fisiológicos celulares, tais como sinalização celular e fagocitose, se os estímulos estressores forem persistentes e/ou excederem a capacidade de defesa do organismo, instala-se o processo de estresse oxidativo. A cronicidade do processo de estresse oxidativo é prejudicial para as células, pois provoca danos em proteínas, lipídios e ao ácido desoxirribonucleico (DNA), além de estar relacionado como o desenvolvimento de diversas doenças. (Valko et al., 2007).

Atualmente é sabido que o estresse oxidativo associado a inflamação crônica desempenha papel crucial no desenvolvimento da obesidade e de suas comorbidades associadas. Muito embora seja difícil estabelecer a sequência temporal da sua relação. Em outras palavras, o quadro clássico presente na obesidade: com a presença de inflamação crônica, hiperleptinemia, resistência à insulina, hiperglicemia, injúria tecidual, presença de ácidos graxos livres, deficiência de vitaminas e minerais e disfunção mitocondrial e endotelial levam a produção exacerbada de espécies reativas (Manna & Jain, 2015). Essas espécies reativas ativam o NFκB, que é redox sensível, desencadeando a liberação de citocinas inflamatórias, que por sua vez aumentam a produção de espécies reativas, estabelecendo assim um círculo vicioso prejudicial ao organismo que acarreta em injúria tecidual, resistência à insulina, distúrbios do sono, diabetes dentre outras comorbidades (Figura 1) (Fernández-Sánchez et al., 2011; Bryan et al., 2013).

Neste sentido, os indivíduos obesos apresentam maior susceptibilidade ao dano oxidativo. Isso porque, a obesidade além de aumentar a produção de espécies reativas, também cursa com a diminuição das defesas antioxidantes,

incluindo superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), vitamina A, vitamina E, vitamina C e β -caroteno. (Amirkhizi et al., 2007)

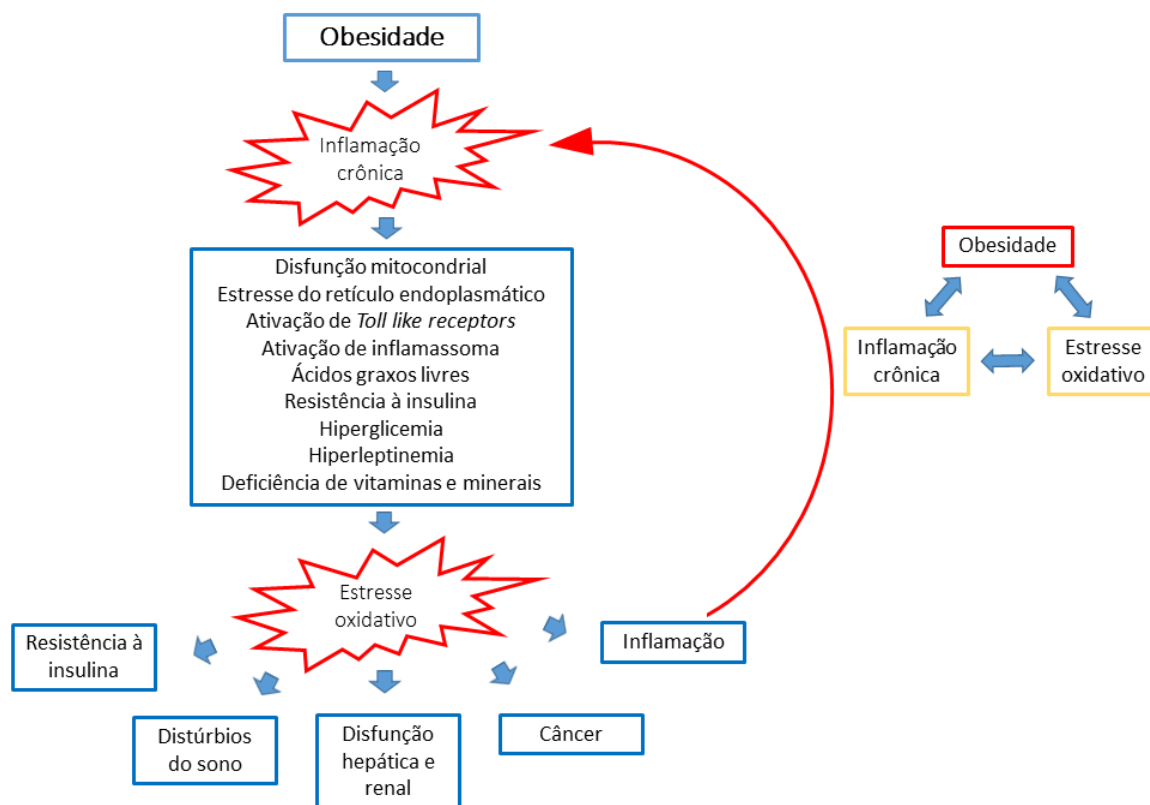


Figura 1. O dogma central da fisiopatologia da obesidade. À medida que o tecido adiposo branco se expande para armazenar o excesso de nutrientes vindos da alimentação, os adipócitos geram níveis crescentes de mediadores pró-inflamatórios. Este processo acarreta em inflamação crônica e sistêmica, com recrutamento de células imunológicas, estresse do retículo endoplasmático, ativação de *toll like receptors*, ativação de inflamassomas, presença de ácidos graxos livres, hiperleptinemia, hiperglicemia, resistência à insulina, disfunção mitocondrial e deficiência de vitaminas e minerais. Estes estão intimamente relacionados com a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e conseqüentemente, o estresse oxidativo. O estresse oxidativo *per se* conduz à resistência à insulina, doenças cardiovasculares, disfunção hepática e renal, distúrbios do sono, alguns tipos de câncer e inflamação. Desta forma, forma-se um ciclo vicioso entre a geração de mediadores pró-inflamatórios e a produção de espécies reativas que acarretam em diversos danos ao organismo. Adaptado de: Manna & Jain, 2015.

De tal modo, esta integração redox-inflamatória presente na obesidade representa um grande desafio para o seu tratamento, mas também uma grande oportunidade. Visto que os estudos avançam em busca de alternativas para tratar,

amenizar e/ou prevenir a obesidade visando alvos presentes na cascata de sinalização redox-inflamatória (Bryan et al., 2013; Savini et al., 2013).

2.2.3 O papel do intestino e da sua microbiota

O intestino é basicamente um tubo oco com cerca de 7 a 8 metros de comprimento. Estruturalmente, o trato gastrointestinal humano (intestino delgado e intestino grosso) é composto por uma monocamada de células epiteliais unidas por junções apertadas, formando uma barreira de proteção que separa o ambiente externo do conteúdo do lúmen intestinal (Madara, 1990; Turner, 2009)

O intestino possui funções importantes, tais como a digestão, absorção de nutrientes, absorção de água e íons, produção de muco, secreção do hormônio secretina e excreção de resíduos não digeríveis. No entanto, para que a função intestinal ocorra de maneira adequada, o perfeito funcionamento da barreira intestinal é de vital importância. Isto depende não somente da barreira formada pelas células epiteliais intestinais, mas também do conjunto: células epiteliais, presença de uma microbiota intestinal saudável, produção de muco e pelas células imunes. Em suma, a presença de uma microbiota intestinal saudável, impede que microrganismos patogênicos se instalem. A presença de muco forma uma barreira mecânica, e a presença de células imunológicas e da secreção de Imunoglobulina A (IgA) formam uma barreira imunológica. Desta forma, o intestino funciona como um filtro, ou seja, com permeabilidade seletiva, permitindo a absorção de nutrientes e impedindo a penetração de microrganismos patogênicos e de suas toxinas, como por exemplo, o LPS das bactérias Gram-negativas (Baumgart & Dignass, 2002; Turner, 2009).

Já faz alguns anos que a microbiota intestinal tem estado em evidência no mundo científico. Conseqüentemente, evidenciou-se a sua participação em diversos contextos fisiológicos e patológicos. A microbiota intestinal compreende principalmente bactérias. No entanto, vírus, fungos e protozoários também estão presentes. A microbiota intestinal contém trilhões de células bacterianas, 10 vezes mais células que o número de células que constituem o corpo humano. A maioria das bactérias presentes no intestino são pertencentes aos filos *Firmicutes* e

Bacteroidetes que possuem uma relação simbiótica com o hospedeiro humano. O hospedeiro contribui com os nutrientes necessários para a sobrevivência das bactérias, que, por sua vez, auxiliam o hospedeiro na absorção de nutrientes dos alimentos, por exemplo, convertendo fibras dietéticas indigeríveis em ácidos graxos de cadeia curta, como butirato, propionato e acetato; fornecendo proteção contra agentes patogênicos por meio de competição pelos nutrientes; além de fornecer sinais de vigilância imunológica constante. (Ding et al., 2003; Owyang & Wu, 2014; Frosali et al., 2015).

Atualmente, é sabido que alterações na composição da microbiota intestinal (disbiose), bem como alterações na permeabilidade do epitélio intestinal, estão envolvidos em inúmeras doenças intestinais e extra-intestinais, como diabetes, doenças cardiovasculares e obesidade (Owyang & Wu, 2014; Gérard, 2016). Neste sentido, a alguns anos foi evidenciado que o desenvolvimento da obesidade está associado com alterações na composição da microbiota intestinal. Camundongos livres de germes (*germ free*) são resistentes a obesidade induzida pela dieta. No entanto, o transplante da microbiota intestinal de camundongos obesos para o camundongo *germ free* também transfere o fenótipo metabólico da obesidade (Garcia-Lafuente et al., 2001). Além disso, a obesidade aumenta a permeabilidade da barreira intestinal, o que resulta em níveis mais elevados de LPS na circulação. O LPS derivado do intestino pode iniciar uma cascata inflamatória através da ativação de TLRs. Assim, o LPS derivado das bactérias intestinais é um importante gatilho inflamatório na fisiopatologia da obesidade (Frosali, et al., 2015). Soma-se a isso o fato de que a microbiota intestinal se comunica de maneira bidirecional com o sistema nervoso central. Participando ativamente da regulação da fome e do peso corporal. A disbiose aumenta a eficiência da absorção de energia dos alimentos, modifica a permeabilidade intestinal, interfere na liberação de hormônios intestinais e induz o estresse oxidativo e a inflamação (Solas et al., 2017).

Assim sendo, o intestino tem papel fundamental no modelo experimental de obesidade induzida por dieta, pois é nele que ocorre a absorção destes nutrientes (Araújo et al., 2017). No entanto, a maioria dos estudos são focados no TAB, o que não é surpreendente, dado o fato de que o TAB é o principal órgão

envolvido na patogênese da obesidade. Contudo, uma vez que o intestino contribui para uma extensão significativa do gasto diário de energia do metabolismo, além de possuir funções vitais para o organismo, é relevante que se estude os efeitos da obesidade também sobre este órgão.

2.3 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS

Os ácidos graxos são classificados em ácidos graxos de cadeia curta (menos que 6 carbonos), média (entre 6 e 12 carbonos) ou longa (mais de 12 carbonos) dependendo do número de átomos de carbonos presentes em sua estrutura química. São classificados também de acordo com o número de duplas ligações presentes na sua cadeia de hidrocarbonetos em ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados. Os saturados não possuem duplas ligações em sua estrutura química, os monoinsaturados contêm uma dupla ligação, já os poli-insaturados possuem mais de uma dupla ligação. Dentre os principais representantes dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) temos o ômega-3 e o ômega-6, nomenclatura essa baseada na posição da primeira dupla ligação a partir do carbono metil final da molécula (Pompéia, 2002).

Os AGPI ômega-3 e ômega-6 são considerados ácidos graxos essenciais pois são imprescindíveis para o funcionamento do organismo e porque não podem ser sintetizados pelo mesmo, sendo necessária sua ingestão por meio da dieta. De tal modo, a deficiência de ômega-6 está associada principalmente a problemas dérmicos. Enquanto o ômega-3 é essencial para o desenvolvimento do sistema nervoso central e para a visão. Além disso, os AGPI possuem papel crucial na biologia das membranas, conferindo fluidez, flexibilidade e permeabilidade seletiva e também nos processos de sinalização celular da maioria dos organismos vivos (Pompéia, 2002).

Os AGPI essenciais fazem parte da nossa dieta desde o início da vida humana. Antes da revolução agrícola, os seres humanos evoluíram consumindo uma dieta que continha quantidades pequenas e aproximadamente iguais de AGPI do tipo ômega-6 e ômega-3 (proporção de ômega-6/ômega-3: 1-4:1). No entanto, ao longo dos últimos 150 anos houve grandes mudanças no padrão

alimentar humano. O consumo de ácidos graxos ômega-6 aumentou consideravelmente. Este aumento é oriundo da produção industrial de alimentos e também da alimentação dos animais para consumo humano com uma dieta rica em grãos fontes de ômega-6. Tal fato aliado ao menor consumo de peixes, maior fonte de ômega-3, são a origem das mudanças no padrão metabólico humano nas sociedades ocidentais. Hoje, a dieta ocidental é muito rica em ômega-6 e a proporção de ômega-6/ômega-3 aumentou até 20-30:1. (Simopoulos, 1999).

Após a ingestão, os lipídios da dieta, incluindo o ômega-3 e ômega-6, são hidrolisados no lúmen intestinal. Os produtos de sua hidrólise, os monoglicerídeos e os ácidos graxos livres são então incorporados em micelas e absorvidos pelos enterócitos. Dentro das células intestinais, os ácidos graxos livres são incorporados aos quilomícrons e entram na circulação sanguínea. Uma vez na circulação as lipoproteínas circulam pelo corpo, fornecendo lipídios a diversos órgãos (Jones et al., 2014).

2.3.1 Metabolismo dos ácidos graxos poli-insaturados

Os precursores para a síntese de AGPI das séries ômega-6 e ômega-3 em mamíferos são ácido linoleico e ácido α -linolênico, respectivamente. Embora o ácido linoleico e o ácido linolênico deem origem a diferentes metabólitos, as enzimas envolvidas no seu metabolismo são as mesmas (Figura 2). O ácido linoleico e ácido α -linolênico competem pela enzima $\Delta 6$ -dessaturase, que é a enzima chave do metabolismo destes ácidos graxos. Contudo, o substrato preferido para $\Delta 6$ -dessaturase é o ácido α -linolênico, mas, como o ácido linoleico é muito mais prevalente na maioria das dietas humanas o metabolismo dos ácidos graxos ômega-6 acaba por ser o mais favorecido (Flachs et al., 2009; Calder, 2017).

Em termos gerais, o ácido araquidônico (AA), as prostaglandinas da série 2 e os tromboxanos e leucotrienos da série 4 produzidos durante o metabolismo do ômega-6, tipicamente exercem efeitos inflamatórios, aterogênicos e pró-trombóticos, além de estarem envolvidos em reações alérgicas e na proliferação e crescimento tumoral. Enquanto que o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido

decosahexaenoico (DHA), ambos produzidos durante o metabolismo do ômega-3, possuem atividade anti-inflamatória. EPA dá origem a prostaglandinas da série 3 e tromboxanos e leucotrienos da série 5, estes com atividade inflamatória menor que os produzidos a partir do AA, e também às resolvinas da série E. Do DHA são produzidos resolvinas da série D, protectinas e maresinas (Siriwardhana et al., 2012; Calder, 2014). Esses metabólitos derivados de EPA e DHA, coletivamente chamados de mediadores lipídicos pró-resolução, possuem importante papel na resolução da inflamação (Schwab et al., 2007; Serhan, 2014).

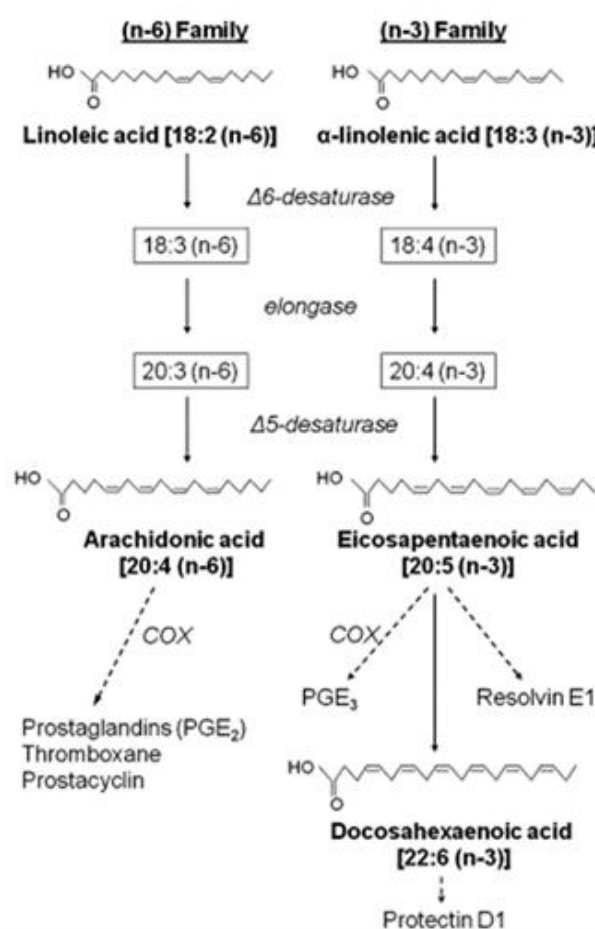


Figura 2. Metabolismo dos ácidos graxos ômega-6 e ômega-3. Ácido linoleico e ácido α-linolênico são os precursores dos ácidos graxos poli-insaturados ômega-6 e ômega-3, respectivamente. Estes competem pela enzima $\Delta 6$ -desaturase. O ácido linoleico é convertido em ácido araquidônico e o ácido α-linolênico é convertido em EPA e DHA. Os eicosanóides derivados do ácido araquidônico são pró-inflamatórios, enquanto que os derivados de EPA apresentam menor atividade inflamatória. Os metabólitos de EPA e DHA, como resolvinas e protectinas possuem papéis importantes na resolução da inflamação. Fonte: Kalupahana et al., 2010.

De fato, a prevalência de doenças metabólicas em que a inflamação exerce um componente central na sua patogênese, incluindo diabetes *mellitus* tipo 2, dislipidemia, hipertensão e doenças cardiovasculares, estão intimamente relacionadas ao aumento da ingestão de ômega-6 com diminuição do omega-3 encontrado na atual dieta humana (Mori et al., 1999; Calder, 2014). Evidenciou-se que a alta ingestão de ácidos graxos ômega-6 muda o organismo de um estado fisiológico para um que é pró-trombótico e pró-agregatório, caracterizado pelo aumento da viscosidade sanguínea, vasoespasmo e vasoconstrição (Simopoulos, 1999). Assim sendo, o aumento da ingestão de ômega-3 a partir de suplementos é uma alternativa viável, considerando o atual estilo de vida da população, para suprir as necessidades diárias de ômega-3 e conseqüentemente amenizar/reverter o quadro inflamatório associado a diversas doenças metabólicas (Torres-Fuentes et al., 2013; Polus et al., 2016).

2.3.2 Ômega-3

Os AGPI do tipo ômega-3 são caracterizados por ter a primeira dupla ligação entre os carbonos números 3 e 4 contando o carbono metil terminal como o número um. O ômega-3 é representado pelo ácido α -linolênico, ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenoico (DHA). (Figura 3) (Pompéia, 2002).

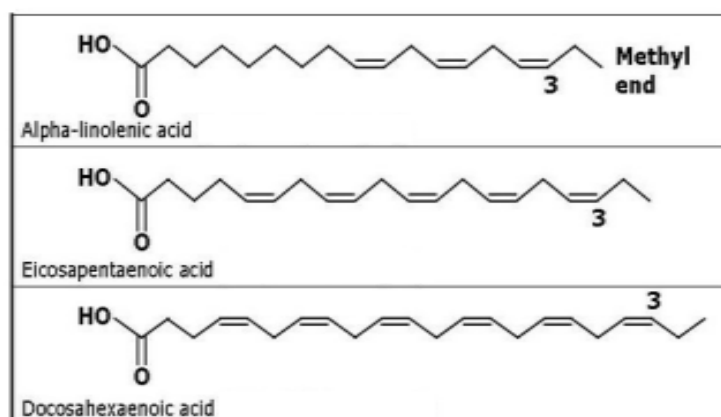


Figura 3. Estrutura química do ácido α -linolênico, EPA e DHA. Fonte: TutorVista.com.

A primeira evidência do importante papel do AGPI do tipo ômega-3 foi derivada de observações epidemiológicas da baixa incidência de doenças autoimunes e inflamatórias como asma, psoríase e diabetes *mellitus* tipo 1, bem como a completa ausência de esclerose múltipla em uma população de esquimós da Groenlândia. Descobriu-se, que o fator de proteção era promovido pelo ômega-3 presente em grande quantidade em alguns peixes de regiões frias, principalmente salmão, atum e truta, muito consumidos pelos esquimós. (Kromann & Green, 1980)

Há décadas, o metabolismo do AGPI ômega-3, têm sido alvo de muitos estudos. Hoje sabemos que o ômega-3 exerce uma grande variedade de efeitos biológicos, sendo essencial para o crescimento e desenvolvimento normais, além de desempenhar um papel importante na prevenção e tratamento da doença arterial coronariana, hipertensão, diabetes, resistência à insulina, depressão, artrite, diversas doenças inflamatórias e autoimunes e câncer (Simopoulos, 1999; Siriwardhana et al., 2012). Atualmente o ômega-3 é amplamente conhecido pelos pesquisadores e pela comunidade em geral, por seus efeitos benéficos na redução dos triglicerídeos, na proteção cardiovascular e por suas ações anti-inflamatórias (Mori et al., 1999; Flachs, et al., 2009; Calder, 2014).

Um dos principais mecanismos anti-inflamatórios exercido pelo ômega-3 é por meio da inibição competitiva exercida pelo seu metabólito EPA com o AA pela enzima ciclooxigenase (COX), que produz eicosanóides pró-inflamatórios. Quando EPA é submetido a oxidação pela COX, prostaglandinas da série 3, com baixa atividade inflamatória são geradas enquanto que o AA gera prostaglandina da série 2 altamente pró-inflamatória. Além disso, como EPA é estruturalmente semelhante ao AA, o EPA também pode competir com AA pela incorporação aos fosfolípidios das membranas celulares, garantindo fluidez à membrana (Gillies et al., 2012; Calder, 2017).

Outro importante mecanismo pelo qual o ômega-3 exerce seus efeitos anti-inflamatórios é por meio da redução da ativação do NFκB. Este fator de transcrição é um potente indutor da produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-6 e o TNFα, ambos diminuídos por EPA e DHA e seus mediadores lipídicos pró-resolução (Siriwardhana et al., 2012; Calder, 2014; Serhan, 2014).

Além dessas importantes ações anti-inflamatórias, o ômega-3 também demonstrou ser capaz de realizar imunomodulação. O ômega-3 e seus metabólitos ativos são incorporados na membrana das células imunes, dessa forma afetando a fagocitose, a sinalização das células T e a capacidade de apresentação do antígeno (Calder, 2007).

Soma-se a isso, que o ômega-3 também possui atividade antioxidante. No estudo de Richard e colaboradores (2008) foi caracterizada a ação antioxidante do ômega-3. Neste estudo, a suplementação de células endoteliais aórticas humanas com ômega-3 resultou em menor formação de ERO em comparação com células suplementadas com ácidos graxos saturados, monoinsaturados ou poli-insaturados da série ômega-6 (Richard, et al., 2008).

2.3.3 Ômega-3: efeitos na obesidade

O ômega-3 também chamou a atenção por sua capacidade de regular o peso e a composição corporal, prevenindo a obesidade e a síndrome metabólica a ela associada. O ômega-3 é capaz de melhorar a inflamação de baixo grau proveniente do tecido adiposo e induzir mudanças no padrão de secreção de adipocinas, resultando em uma melhora do metabolismo geral (Flachs et al., 2009; Kalupahana et al., 2010; Moreno-Aliaga et al., 2010).

Neste sentido, em um estudo com humanos com sobrepeso e hipertensão foi evidenciado que a ingestão de peixe (rico em ômega-3) aliado a uma dieta com restrição de energia e gordura tem benefícios significativos sobre o peso corporal, metabolismo da glicose, insulina e metabolismo lipídico, aumentando o colesterol HDL e diminuindo os triglicerídeos (Mori et al., 1999). O ômega-3 também mostrou modular a adipogênese (Kim et al., 2006), suprimir a lipogênese (Perez-Echarri et al., 2009) e induzir a beta-oxidação de ácidos graxos (Flachs et al., 2005; Guo et al., 2005) em órgãos chave para o metabolismo, como o intestino delgado (van Schothorst, et al., 2009), músculo esquelético, fígado e o TAB (Flachs et al., 2005). Essas ações são mediadas pela ligação do ômega-3 com o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR- γ) que controla a sinalização celular inflamatória e os padrões de expressão gênica

envolvidos no metabolismo oxidativo (Flachs et al., 2005; Gillies et al., 2012); pela modulação da atividade de AMPK, regulando assim a via de sinalização da insulina (Lorente-Cebrián et al., 2009); por meio da ligação do ômega-3 com o receptor acoplado a proteína G-120 (GPR120), o que promove ação anti-inflamatória e aumento da sensibilidade à insulina (Oh et al., 2010); e também pela inibição da ativação do inflamassoma NLRP3 (Yan et al., 2013).

Além disso, conforme revisado por Costantini e colaboradores, o ômega-3 exerce efeitos significativos sobre a composição da microbiota intestinal. Dessa forma, influenciando no retorno da homeostase intestinal em situações como ganho de peso e obesidade, resistência à insulina, aumento da permeabilidade intestinal, dieta rica em gordura, doenças inflamatórias intestinais e depressão. Por todas essas ações, o ômega-3 pode ser considerado como um prebiótico, capaz de restaurar a eubiose intestinal em diversas condições patológicas. (Costantini et al., 2017). EPA e DHA também atuam na preservação da integridade da barreira intestinal através da atenuação do aumento da permeabilidade do epitélio intestinal induzida por citocinas inflamatórias (Li et al., 2008).

2.3.4 Mediadores lipídicos pró-resolução

Nos últimos anos, um enorme avanço na compreensão das abrangentes ações anti-inflamatórias do ômega-3 foi a descoberta e elucidação das estruturas, ações e mecanismos de ação dos chamados mediadores lipídicos pró-resolução produzidos a partir de EPA e DHA. Estes mediadores incluem as resolvinas da série E produzidas a partir de EPA e as resolvinas da série D, protectinas e maresinas produzidas a partir de DHA (Figura 4). Esses mediadores lipídicos, de forma contrária aos seus substratos metabólicos EPA e DHA, exercem as suas ações biológicas benéficas em concentração nanomolar (Serhan, 2014).

Os mediadores lipídicos pró-resolução atuam não apenas como "sinais de parada" da resposta inflamatória, contra regulando os mediadores químicos pró-inflamatórios, reduzindo a magnitude e a duração da inflamação; mas também como facilitadores da capacidade dos macrófagos para eliminar as células

apoptóticas e migrar para os gânglios linfáticos periféricos, acelerando assim a “limpeza” dos sítios de inflamação e estimulando a reepitelização, cicatrização de feridas e a regeneração de tecidos, ou seja, o retorno à homeostase (Schwab et al., 2007; Buckley et al., 2014).

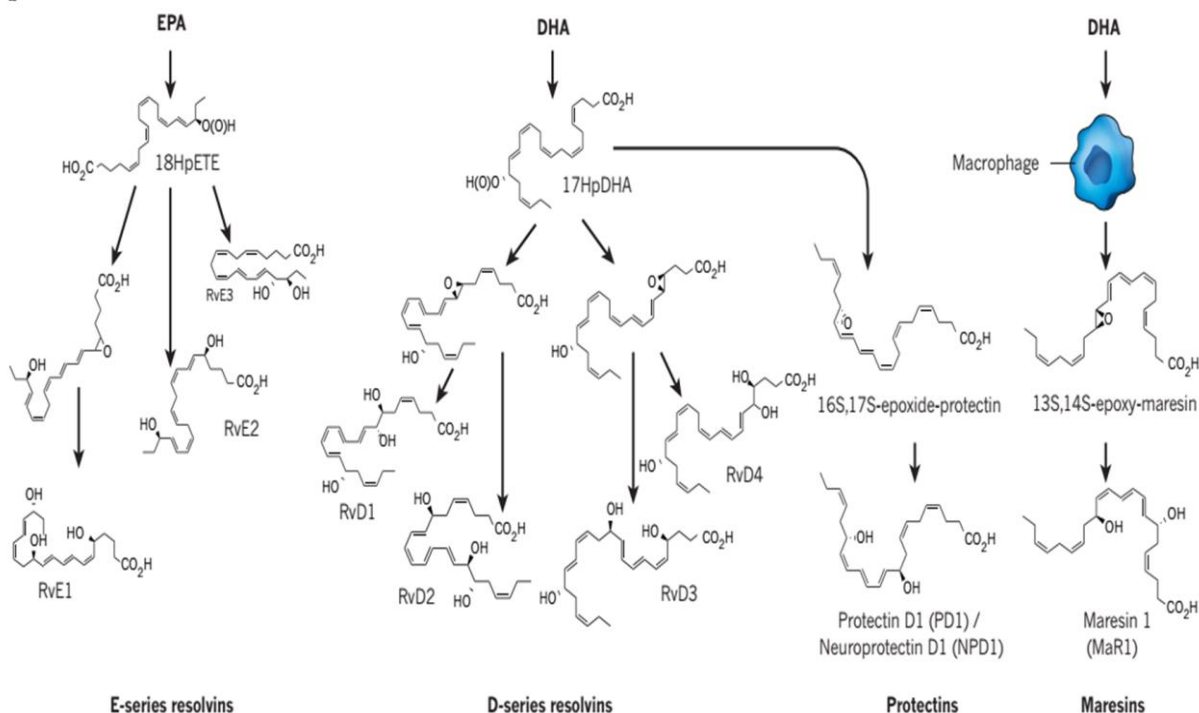


Figura 4. Geração dos mediadores lipídicos pró-resolução. Durante o metabolismo do ômega-3 são gerados mediadores químicos com atividade anti-inflamatória. Estes potentes mediadores são denominados de mediadores lipídicos pró-resolução. Do EPA são gerados as resolvinas da série E, do DHA são geradas as resolvinas da série D, protectinas e maresinas. Fonte: Serhan, 2014.

Nesse sentido, foi evidenciado que a resolvina D1 desvia a polarização de macrófagos do TAB de um perfil pró-inflamatório (fenótipo M1) em direção a um estado semelhante ao macrófago M2, anti-inflamatório. Essa mudança de fenótipo foi acompanhada por uma redução das citocinas pró-inflamatórias e redução das ERO (Titos et al., 2011). Além disso, no estudo de Gobbetti e colaboradores, foi evidenciado que os mediadores lipídicos pró-resolução derivados do ômega-3, especificamente a protectina D1 e a resolvina D5, realizaram a proteção do tecido intestinal no modelo animal de colite, diminuindo a inflamação intestinal por meio

da diminuição da reatividade dos neutrófilos e da produção de citocinas pró-inflamatórias. (Gobbetti et al., 2017).

Esses achados são consistentes com a noção de que a inflamação crônica de baixa intensidade presente no organismo do indivíduo obeso é o resultado de uma capacidade inadequada de produção de resolvinas, protectinas e maresinas que permitem que a resposta inflamatória prossiga sem pontos de controle. Assim, nos últimos anos os mediadores lipídicos derivados do ômega-3 atraíram a atenção como uma nova estratégia para agilizar o processo de resolução da inflamação crônica presente na obesidade. De tal modo, salienta-se que os conhecidos efeitos metabólicos e anti-inflamatórios do ômega-3 no organismo dependem em grande parte da formação de seus metabolitos ativos pró-resolução (López-Vicario et al., 2015; Martínez-Fernandez et al., 2015).

Consequentemente, devido ao surgimento de numerosas evidências de benefícios à saúde associados ao ômega-3 e seus metabolitos, diversas agências e organizações ao redor do mundo estabeleceram recomendações diárias para EPA e DHA, a fim de que haja a manutenção da saúde e a redução do risco de doenças crônicas. A ingestão adequada determinada pelo *Institute of Medicine of the National Academies* é de 1,6 g/dia para homens a partir dos 14 anos, e 1,1 g/dia para mulheres a partir dos 14 anos (*Institute of Medicine, Food and Nutrition Board*, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da suplementação com ômega-3 nas alterações metabólicas e intestinais de ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as alterações metabólicas do modelo por meio da medida de glicose, triglicerídeos, colesterol total, HDL, LDL, VLDL e insulina plasmáticas;
- Acompanhar a evolução de peso dos animais e o consumo de ração;
- Mensurar o peso das gorduras epididimal e abdominal, bem como o percentual de gordura por meio do índice de adiposidade;
- Estimar a resistência à insulina por meio do índice HOMA-IR e o grau de sobrepeso e obesidade por meio do Índice de Lee;
- Analisar as alterações metabólicas do modelo por meio da medida dos parâmetros bioquímicos AST, ALT, GGT, fosfatase alcalina, uréia e creatinina;
- Avaliar o *status* pró ou anti-inflamatório do intestino dos animais por meio da medida do NFκB e TNFα;
- Avaliar o dano oxidativo no intestino através da medida das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Mensurar a produção de espécies reativas de oxigênio no intestino por meio da técnica DCF;
- Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase no tecido intestinal.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados desse trabalho serão apresentados na forma de artigo científico. Assim, o artigo a seguir foi redigido conforme as normas de publicação da revista *Journal of Physiology and Biochemistry* na qual o trabalho será submetido para publicação. As normas para publicação e o fator de impacto da revista podem ser obtidos no endereço eletrônico: <https://link.springer.com/journal/13105>

Omega-3 supplementation improves insulin resistance, oxidative stress and inflammation in gut of rats with obesity induced by high fat diet

Gabriela Fernandes Hahn^{1,*}, Michely Lopes Nunes², Luiza Steffens¹, Renata Padilha Guedes¹, Dinara Jaqueline Moura¹ and Marilene Porawski^{1,2}

1 Programa de Pós-Graduação em Biociências. Universidade Federal Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

2 Programa de Pós-Graduação em Medicina: Hepatologia. Universidade Federal Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

* Corresponding author: Gabriela Fernandes Hahn: gfhahn1989@gmail.com
Laboratório de Fisiologia Comportamental e Metabólica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), R. Sarmiento Leite, 245. 90050-170 Porto Alegre, RS, Brasil.

ABSTRACT

Background: Obesity is a complex metabolic disease that doesn't have an effective treatment. In this sense, the benefic effects of omega-3 on health are known. However, little is known about the omega-3 effects in gut. **Objective:** Evaluate the effects of omega-3 in metabolic and intestinal changes observed in obesity. **Methods:** Obesity was induced for 5 months in 40 rats by a high fat diet (HFD). In the 4th month the animals were divided into 4 groups: I- Standard diet (SD); II- SD+omega-3; III- HFD; and IV- HFD+omega-3. SD and HFD groups received 1mL of saline solution daily; and SD+omega-3 and HFD+omega-3 groups were supplemented with omega-3 (1g/Kg) daily, for 4 weeks. We evaluated: weight gain, food intake, biochemical parameters in the plasm, and markers of oxidative stress and inflammation in gut. Data was analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc. A $p < 0.05$ was considered significant. The study was approved by CEUA/UFCSPA, nº232/13. **Results:** The HFD+omega-3 group showed a decreased weight gain, less accumulation of abdominal and epididymal fat, reduction of adiposity index, Lee index, HOMA-IR, total cholesterol, triglycerides, LDL, VLDL, and plasma insulin, compared to the HFD group. In gut, omega-3 supplementation reduced the reactive oxygen species, lipoperoxidation, the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase, the NF κ B activation, and the TNF α production. **Conclusion:** Omega-3 supplementation plays a beneficial role in metabolic parameters and reducing oxidative stress and intestinal inflammation. Thus, omega-3 supplementation could be used as an adjuvant in the obesity treatment.

Keywords: Obesity; Omega-3 Fatty Acids; Oxidative Stress; Gut; Inflammation.

INTRODUCTION

Obesity is characterized by meta inflammation. Originated by chronic and low-grade systemic inflammation because excessive accumulation of fat in the adipose tissue, and ectopic deposit of fat in non-adipose tissues caused by chronic excess of nutrients intake [1]. Data from WHO (2016) showed that 1.9 billion adults over 18 years old are overweight, and more than 650 million adults are obese. It is estimated that half of the world's adult population will be overweight or obese by 2030. Thus, obesity is considered one of the greatest public health problems this century [2, 3]. Obesity is a multifactorial and polygenic disease [4], usually accompanied of insulin resistance and metabolic dysfunction [1], elevation in LDL (low-density lipoprotein) and VLDL (very low-density lipoprotein) cholesterol and in plasma triglycerides, decrease in HDL (high-density lipoprotein) cholesterol, hyperglycemia, hyperleptinemia [5], mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress, and oxidative stress [6, 7].

Particularly, the modern food behavior, with unlimited supply of cheap, processed, palatable, practical and high-energy foods are contributing to the obesity development (diet-induced obesity) [3, 8]. The profile of fatty acids present in the diet may also is relevant to obesity. Epidemiological studies show that humans evolved ingesting a balanced amount of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs). However, after the industrial revolution, there was a large increase in omega-6 PUFA intake. This fact combined with the lower consumption of fish, a rich source of omega-3, is the origin of changes in the human metabolic pattern in the Western societies. Omega-3 is an essential fatty acid, however body does not synthesize it, so its ingestion through diet is necessary [9]. In this sense, omega-3 supplementation has been studied in various contexts, including obesity. These studies presented encouraging results, such as: regulation of dyslipidemia, reduction of inflammation, reduction in the risk of cardiovascular disease, regulation of body weight, and prevention and reversal of insulin resistance [10, 11, 12, 13]. This arises as a possibility for improving the clinical conditions of obesity. However, little is known about the effects of omega-3 in gut.

Gut plays an important role during the development of diet-induced obesity. In this organ the nutrients ingested in the diet are absorbed [14]. During the obesity development occurs a change in the composition of intestinal microbiota (dysbiosis), and the permeability of the intestinal epithelium increases. This allows the intestinal bacteria and their products, such as lipopolysaccharide (LPS) and toxins, to translocate and activate toll-like receptors (TLRs), promoting a cascade of proinflammatory cell signaling with the overproduction of inflammatory mediators and reactive oxygen species (ROS). In addition, dysbiosis increases the energy absorption efficiency of food and interferes in the release of intestinal hormones [15]. Therefore, some alternatives have been studied to prevent, ameliorate or reverse the intestinal damage. Cranberry polyphenols were able to reduce inflammation and intestinal oxidative stress [16]. Similarly, a Li study it was verified that eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) prevent the disruption of the intestinal epithelial barrier, induced by proinflammatory cytokines, *in vitro* [17]. Therefore, the objective of this study was to evaluate the metabolic effects of omega-3 supplementation in experimental model of obesity induced by high fat diet (HFD), and its effect in inflammatory and oxidative stress parameters in gut.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Forty adult Wistar male rats, weighing 150-200 grams, from the animal facility of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA) were used in this study. The animals were kept in plastic boxes, with 2 animals per box, in an average temperature of 22 - 24°C, and light and dark cycle of 12 hours, having free access to food and water. All procedures were conducted in accordance with the provisions the Arouca Law (Federal Law 11794/2008). The procedures in this study were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of UFCSPA, under protocol number 232/13.

Experimental design

Rats were randomly allocated into two groups (n = 20 each): standard diet group (SD) or high fat diet group (HFD, 45% fat), receiving the specific diet during 16 weeks. After 16 weeks from the beginning of the experiment, these groups were divided, according to supplementation and diet, in other 2 groups, with 10 animals each: I- Standard diet (SD); II- SD + omega-3; III- High fat diet (HFD); and IV- HFD + omega-3. Animals in SD and HFD groups received 1 mL of saline solution daily, and animals in SD+omega-3 and HFD+omega-3 groups were supplemented with omega-3 (1 g/Kg) via gavage for 4 weeks. The animals always received the gavage between 5 and 6 in the afternoon. The total duration of the experiment was 20 weeks. The standard diet was provided by the institution's laboratory, its energetic content had 14,22 kJ/g (NUVITAL®, Curitiba, PR, Brazil) with 63% carbohydrates, 11% lipids, and 26% proteins. HFD had an energetic content of 18,83 kJ/g (Pragsoluções Biociências®, Jaú, SP, Brazil) with 35.7% carbohydrates, 19.2% proteins, and 45.1% lipids. Body weight was recorded weekly and feed intake was monitored daily.

Material collection

Animals were euthanized by overdose of the anesthetics xilasin hydrochloride (Rompum®) and ketamine hydrochloride (Ketalar®). Blood was

collected through the retro-orbital plexus and placed in heparin tubes (Liquemine®). The blood was centrifuged at 2000g for 15 minutes at 4°C, and the plasma stored in a freezer at -20°C. After ventral laparotomy, epididymal and abdominal adipose tissue, and gut were immediately removed, washed in PBS, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C.

Analysis of biochemical indices in plasma

Glucose, triglycerides, total cholesterol, HDL, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyl transferase (GGT), alkaline phosphatase, urea, and creatinine concentrations in the plasma were measured using an automatic biochemical analyzer (Vitalab Flexor E, Elitech Group). Analyses were performed using the commercial kits from Elitech Group according to the manufacturer's instructions. LDL cholesterol was estimated by Friedewald [18] formula: $[\text{LDL} = (\text{total cholesterol} - \text{HDL}) - \text{triglycerides}/5]$, where triglycerides/5 represents the VLDL cholesterol. Fasting Insulin was tested by an enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) kit from Millipore (United States).

Adiposity index, Lee index and HOMA IR

To calculate the adiposity index, total body fat was divided by body weight: $[(\text{epididymal} + \text{abdominal fat}) / \text{final body weight}] \times 100$. The result was expressed in percentage. The Lee Index [19] was calculated dividing the cube root of body weight, in grams, by nasoanal length, in centimeters, and multiplying by 10: $[\text{cube root of body weight (g)} / \text{nasoanal length (cm)} \times 10]$. The result was expressed in g/cm³. The HOMA-IR index (Homeostatic Model Insulin Resistance) was calculated based on fasting insulin and glucose levels [20]. Its purpose was to determine insulin resistance. The HOMA-IR formula is: $[\text{fasting insulin (mcU/ml)} \times \text{fasting glucose (mmol/L)}] / 22.5$.

Tissue preparation and protein determination

Tissue homogenization was performed using a Potter type homogenizer. The fresh tissue was weighed and homogenized with 1.5% KCl, containing a protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma). Homogenates were

centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4°C, the pellet was discarded, and supernatants were kept at -80°C until analysis. Protein concentration was determined by the method of Lowry [21] using a standard curve of bovine serum albumin.

Analysis of oxidative stress in gut

Lipoperoxidation induced by oxidative stress was measured by the technique of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) [22]. One of the substances generated is malondialdehyde (MDA), when it is heated to 100°C, in the presence of thiobarbituric acid, a pink product is formed and measured by the spectrophotometer at 532 nm. Results are expressed in nanomoles per milligram of protein. The activity of the antioxidant enzyme Superoxide dismutase (SOD) [23] was evaluated by quantifying the ability of SOD to inhibit superoxide radical reaction with adrenaline. Absorbance reading was performed at 480 nm and data were expressed in units of SOD per milligram of protein. The activity of the antioxidant enzyme Catalase (CAT) [24] was evaluated by determining the decomposition rate of H₂O₂ added to the sample. The H₂O₂ degradation is directly proportional to the CAT activity. Reading was performed in a spectrophotometer at 240 nm, and data were expressed in picomoles per milligram of protein. The reactive oxygen species (ROS) production was measured using the dichloro-fluorescein-diacetate (DCF-DA) probe [25]. With the ROS presence, this probe is oxidized and produces the fluorescent compound dichlorofluorescein (DCF). DCF fluorescence is measured in a spectrophotometer with excitation wavelength of 480 nm and emission of 520 nm. Result was expressed in fluorescence per milligram of total protein.

Measurement of NFκB and TNFα in gut

Tumor necrosis factor (TNF)-α and factor nuclear kappa B (NFκB) in gut were determined with a ELISA kit for rats (from Abcam and Invitrogen respectively). For the TNFα dosage the intestinal tissue was lysed and test was performed according to the manufacturer's instructions. For the NFκB dosing, in

addition to the tissue lysis, a nuclear extraction protocol (performed according to the manufacturer's instructions) was performed prior to analysis.

Statistical analyses

All values were expressed in means \pm S.E.M. Data were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc, using the Prism 5.01 (GraphPad Software). A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Effects of omega-3 supplementation on body composition and physiological parameters

After 16 weeks of being fed with a standard diet (SD) or a high fat diet (HFD), and another 4 weeks with the respective diets plus vehicle or omega-3 supplementation, it was verified that the animals of the HFD group acquire more weight than the animals in the SD groups, evidencing the effect of the diet composition on weight gain. However, animals fed with the HFD and supplemented with omega-3 had a decreased weight gain when compared to HFD group, evidencing the positive effect of omega-3 supplementation on lowering the weight gain of these animals (Figure 1A and 1B). Feed intake in grams/rat was lower in HFD fed groups compared to SD groups. Conversely, feed intake (energy) in kJ/rat was higher in HFD groups than in SD groups (Figure 1C, 1D, 1E and 1F). It means that animals fed with HFD despite of consuming less feed (g), consumed more energy (kJ), and consequently acquired more weight than animals fed with a standard diet. Similarly, when evaluating the abdominal and epididymal fat weight, it was verified that the animals of the HFD group accumulated higher amount of fat (g), compared to the animals of the SD group. Omega-3 supplementation was able to reduce the accumulation of abdominal and epididymal fat in the HFD+O animals, compared to the HFD group without supplementation (Figure 2A and 2B). The Lee index (g/cm^3) also shows a significant statistical difference in the HFD group supplemented with omega-3, compared to the HFD animals without supplementation (Figure 2C). The fat percentage or adiposity index (%) was higher in the HFD group, compared to the SD group. Omega-3 supplementation was able to reduce the adiposity index of animals fed with the HFD (Figure 2D).

Effects of omega-3 supplementation on biochemical parameters

Fasting glucose, plasma insulin, and HOMA-IR index were significantly higher in the HFD group, compared to the SD group. However, omega-3 supplementation decreased fasting glucose, plasma insulin, and HOMA-IR index

in the HFD+O group (Figure 3). This results show that omega-3 improves the insulin sensitivity caused by the HFD feeding.

The evaluation of serum lipid profile (total cholesterol, HDL, LDL, VLDL, and triglycerides), with the exception of the HDL cholesterol, shows that all parameters were decreased by the omega-3 supplementation (HFD group compared to the HFD+O group) (table 1). Similarly, omega-3 supplementation decreased the levels of urea and creatinine in the HFD+O group, and the markers of hepatic function (AST, ALT, GGT, and alkaline phosphatase) were also decreased in the HFD+O group (table 1). These results together show that omega-3 plays a beneficial role, improving the overall metabolism by reducing the serum lipid profile values, and the markers of renal and hepatic function.

Effects of omega-3 supplementation in gut

The activity of the antioxidant enzyme SOD was significantly higher in the groups fed with HFD, when compared to their respective controls (SD and SD+O groups). Omega-3 supplementation reduced SOD activity in gut of the HFD fed animals (HFD group compared to HFD+O group) (Figure 4A). Similarly, the activity of the antioxidant enzyme CAT was higher in HFD group, and the omega-3 supplementation decreased CAT activity in gut of HFD+O group (Figure 4B). On the other hand, there is an increased production of reactive oxygen species (ROS) in gut between the groups that received the standard diet, the SD+O group produced significantly less ROS than the SD group. The HFD fed group produced higher ROS quantity than the SD group, evidencing the effect of the diet. Omega-3 supplementation (HFD+O group) decreased the amount of ROS production (Figure 4C). Omega-3 also decreased lipoperoxidation in HFD+O group, compared to the HFD group (Figure 4D). The activation of NF κ B in gut was significantly higher in the HFD group, compared to SD group. Omega-3 (HFD+O group) supplementation reduced the NF κ B activation (Figure 5A). Similarly, TNF α production was higher in the HFD group, compared to SD group. Omega-3 supplementation decreased TNF α production in HFD+O group (Figure 5B). These data together show that omega-3 reduces oxidative stress and inflammation in gut.

Correlation analysis

Analyzing the correlation among the adiposity index of all experimental groups and fasting glucose (Figure 6A), insulin (Figure 6B), HOMA-IR (Figure 6C); activation of NF κ B (Figure 6D), TNF α production (Figure 6E), and ROS production in gut (Figure 6F), it was verified that all related data showed a positive correlation with the increase in the adiposity index of the animals, indicating these factors play an important role during the development of obesity.

DISCUSSION

Gut is also affected by persistent and systemic oxidative stress and inflammation in obesity [1]. The capacity of omega-3 PUFAs against obesity-associated inflammation has been investigated in many studies [13] but without focusing in the intestinal tissue. Some researchers have already evaluated the effects of omega-3 in gut, however they tried to understand the pathophysiology of inflammatory bowel diseases, not within the context of obesity [26]. Therefore, it is relevant to study the effects of omega-3 specifically on this tissue. In this sense, we examined the effects of omega-3 supplementation on metabolic parameters such as body weight, adiposity index, insulin sensitivity, lipid profile, renal and hepatic function, markers of inflammation, and oxidative stress in gut of rats with obesity induced by HFD.

In the present study, omega-3 supplementation reduced NF κ B activation and TNF α secretion in gut of HFD feed rats. NF κ B, a transcription factor, is a potent inducer of the production of pro-inflammatory cytokines, including TNF α . These results are consistent with previous studies. Bashir and colleagues showed that fish oil supplementation decreases the levels of NF κ B/p65 in the epididymal fat of HFD fed mice, and decreases inflammatory cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , and IL-2) in macrophages isolated from epididymal fat [27]. In gut, Constanzo and colleagues evidenced that a mixture of Krill Oil (source of omega-3), the probiotic *Lactobacillus reuteri*, and vitamin D reduces gut inflammation in mice [28]. The anti-inflammatory mechanism of omega-3 is well known. EPA competes with arachidonic acid for the enzyme cyclooxygenase (COX), thus reducing the synthesis of a series of eicosanoids with a high pro-inflammatory activity [11]. In addition, EPA and DHA present other mechanisms to modulate the inflammatory response: by binding to G-protein coupled receptor 120 (GPR120) reducing the activity of NF κ B. [29]; inhibiting the NLRP3 inflammasome [30]; by activation to the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ), this transcription factor acts in an anti-inflammatory manner [31]; and through the "stop signs" of the inflammatory response generated by the pro-resolved lipid mediators (SPMs),

derived from EPA and DHA, they negatively regulate pro-inflammatory mediators, reducing the magnitude and duration of inflammation, inclusive in gut [26].

Gut has vital functions, not only to digest and absorb nutrients, but also to modulate systemic immunity and to prevent bacterial and endotoxin invasion [14]. During the development of obesity induced by HFD in mice, the alteration of gut microbiota (dysbiosis) is associated with an increased intestinal permeability, rising the systemic levels of bacterial and LPS, which after the TLR4 activation, triggers many inflammatory pathways and the secretion of proinflammatory cytokines, such as TNF α . Over-production of these cytokines results in intestinal mucosal dysfunction and disruption of tight junction proteins in gut. This precedes the development of metabolic endotoxemia, systemic inflammation, and other associated disorders [15, 32]. Defects in the tight junction barrier have been considered an important etiologic factor of Crohn's disease. However, n-3 PUFA supplementation prevents the ultrastructure alteration of tight junction in a model of ulcerative colitis [33]. Furthermore, omega-3 has significant effects on the composition of the intestinal microbiota. Influencing the return of intestinal homeostasis in situations such as weight gain and obesity, insulin resistance, increased intestinal permeability, HFD, and inflammatory bowel diseases [34]. In our study, we speculate that the anti-inflammatory effects of omega-3 in gut have occurred by binding of omega-3 in GPR120 on the membrane surface of enterocytes, thus decreasing NF κ B activation and production proinflammatory cytokines, such as TNF α , in the intestinal tissue.

The protective role of omega-3 in gut is closely related to their inhibitory effects on the over-release of intestinal inflammatory mediators. However, inflammation in gut is also accompanied by increased levels of ROS. Hassan and colleagues demonstrated that omega-3 reduces the expression of proinflammatory molecules such as TNF α in rats with colitis. Also, it was evidenced that systemic markers of oxidative stress were inhibited by omega-3 action, and the colon glutathione concentration was restored [35]. Our study shows that the activity of antioxidant enzymes SOD and CAT were increased in HFD fed animals, and decreased in HFD animals supplemented with omega-3. In contrast, Ozgen and colleagues observed that the activity of antioxidant enzymes, such as catalase, is

decreased in obese children [36]. But in agreement, it was demonstrated that the consumption of a high fat and high fructose diet caused increased activity of the antioxidant enzymes SOD, CAT, and GPx in liver of mice [37]. Our results can be explained by the increased production of ROS and lipoperoxidation in the HFD group. Higher levels of ROS leads to increased expression of Nfr2, which consequently raises the transcription of antioxidant enzymes to counteract reactive species [38]. Therefore, we demonstrated that omega-3 had antioxidant action reducing ROS and lipoperoxidation in gut.

In addition, in the present study we evaluated the omega-3 effects in glucose homeostasis, insulin resistance (HOMA-IR) and weight gain. It has been known that obesity is associated with dyslipidemia, increased fasting glucose, and insulin resistance [1, 5]. In this study, that is corroborated by Pearson's correlation analysis, showing that these factors have a positive correlation with the increase in adiposity. The effect of omega-3 in the reduction of the lipid profile is well described, promoting benefits mainly for patients with cardiovascular diseases [39]. On the other hand, there is no consensus on the effects of omega-3 under glucose homeostasis and insulin resistance. Some studies find positive results [10, 27, 29, 40], and others have shown that there is no change [revised in 13, 40]. However, there is a difficulty in comparing the results for many studies published on the topic. Animal studies, investigating the effects of omega-3, have used a variety of models, diet compositions, sources and doses of omega-3. Such differences across experimental designs hamper the correlation of the results. The studies with humans are much more heterogeneous. The omega-3 effects vary on age, ethnicity, sex, and presence of prior diseases in the assessed population, besides the adherence to the treatment proposed by researchers [13,40]. Nevertheless, our study demonstrated the beneficial role of omega-3 supplementation in decreased fasting glucose, insulin resistance and weight gain, reversing the effects of HFD feed in rats.

In summary, our data support the importance of the supplementation with omega-3 PUFAs, which was able to improve insulin sensitivity, to decrease abdominal and epydidimal adiposity, and to reduce intestinal oxidative stress and inflammation. Therefore, in this study, we characterized, not only the already

known beneficial effects of omega-3 for metabolism, but also its anti-inflammatory and antioxidant action in gut. In this context, we suggest omega-3 supplementation could be used as an adjuvant in the treatment of obesity.

Acknowledgment: This study was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and PROAP/UFSCPA (Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre). Gabriela Fernandes Hahn thanks Ana Carolina de Moura for reviewing English.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Gregor MF, Hotamisligil GS. (2011) Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 29: 415-445 doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101322
- [2] WHO. Obesity and overweight. Available in: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> Access in: Feb.2018.
- [3] Williams EP, Mesidor M, Winters K, Dubbert PM, Wyatt SB (2015) Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. *Curr. Obes. Rep.* 4: 363-370 doi: 10.1007/s13679-015-0169-4.
- [4] Albuquerque D, Stice E, Rodríguez-López R, Manco L, Nóbrega C (2015) Current review of genetics of human obesity: from molecular mechanisms to an evolutionary perspective. *Mol Genet Genomics* 290: 1191-1221 doi: 10.1007/s00438-015-1015-9
- [5] Avramoglu RK, Basciano H, Adeli K (2006) Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clin Chim Acta* 368: 1-19 doi: 10.1016/j.cca.2005.12.026
- [6] Kawasaki N, Asada R, Saito A, Kanemoto S, Imaizumi K (2012) Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Sci. Rep* 2: 1-7 doi: 10.1038/srep00799
- [7] Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, et al (2015) Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 378-400 doi: 10.3390/ijms16010378
- [8] Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, et al (2011) The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet* 378: 804-814 doi: 10.1016/S0140-6736(11)60813-1.

- [9] Simopoulos AP, DiNicolantonio JJ (2016) The importance of a balanced ω -6 to ω -3 ratio in the prevention and management of obesity. *Open Heart*: 3(2): e000385 doi: 10.1136/openhrt-2015-000385
- [10] Kalupahana NS, Claycombe K, Newman SJ, Stewart T, et al (2010) Eicosapentaenoic acid prevents and reverses insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice via modulation of adipose tissue inflammation. *J Nutr* 140:1915-22 doi: 10.3945/jn.110.125732
- [11] Calder PC (2014) Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim. Biophys Acta* 1851:469-484 doi: 10.1016/j.bbali.2014.08.010
- [12] Lorente-Cebrián S, Costa AGV, Navas-Carretero S, Zabala M, et al (2013) Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence. *J Physiol Biochem* 69: 633-51. doi: 10.1007/s13105-013-0265-4
- [13] Albracht-Schulte K, Kalupahana NS, Ramalingam L, Wang S et al (2017) Omega-3 fatty acids in obesity and metabolic syndrome: A mechanistic update. *J Nutr Biochem* 58:1-16 doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.02.012
- [14] Ding LA, Li JS (2003) Gut in diseases: physiological elements and their clinical significance. *World J. Gastroenterol* 9: 2385-2389 doi: 10.3748/wjg.v9.i11.2385
- [15] Araújo JR, Tomas J, Brenner C, Sansonetti P (2017) Impact of high-fat diet on the intestinal microbiota and small intestinal physiology before and after the onset of obesity. *Biochimie* 141: 97-106 doi: 10.1016/j.biochi.2017.05.019.
- [16] Denis MC, Desjardins Y, Furtos A, Marcil V, et al (2015) Prevention of oxidative stress, inflammation and mitochondrial dysfunction in the intestine by different cranberry phenolic fractions. *Clin. Sci* 128: 197-212 doi: 10.1042/CS20140210
- [17] Li Q, Zhang Q, Wang M et al (2008) n-3 polyunsaturated fatty acids prevent disruption of epithelial barrier function induced by proinflammatory cytokines. *Mol Immunol* 45(5): 1356-1365 doi: 10.1016/j.molimm.2007.09.003
- [18] Friedewald WT, Levi RI, Fredrickson DS (1972) Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. *Clin. Chem* 18:499-502
- [19] Bernardis LL, Patterson BD (1968) Correlation between "Lee Index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol* 40(4):527-528 doi: 10.1677/joe.0.0400527

- [20] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, et al (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-419
- [21] Lowry OH, Rosebrouh NJ, Lewis-Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- [22] Draper HH, Hadley M (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186:421-431 doi: 10.1016/0076-6879(90)86135-I
- [23] Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247(10):3170-3175
- [24] Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126 doi: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- [25] Wang H, Joseph JA (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biol. Med* 27: 612-616 doi: 10.1016/S0891-5849(99)00107-0
- [26] Gobbetti T, Dallia J, Colas RA, Canova DF, et al. (2017) Protectin D1n-3 DPA and resolvin D5n-3 DPA are effectors of intestinal protection. *PNAS*. 114(15): 3963-3968 doi: 10.1073/pnas.1617290114
- [27] Bashir S, Sharma Y, Elahi A, Khan F (2016) Amelioration of obesity-associated inflammation and insulin resistance in c57bl/6 mice via macrophage polarization by fish oil supplementation. *J Nutr Biochem* 33: 82-90 doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.02.011
- [28] Costanzo M, Cesi V, Palone F, Pierdomenico M, et al (2018) Krill oil, vitamin D and *Lactobacillus reuteri* cooperate to reduce gut inflammation. *Beneficial Microbes* 9: 389-399 doi: 10.3920/BM2017.0078
- [29] Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, et al (2010) GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Antiinflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell* 142: 687-698. doi: 10.1016/j.cell.2010.07.041.
- [30] Yan Y, Jiang W, Spinetti T, Tardivel A, et al (2013) Omega-3 Fatty Acids Prevent Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome Activation. *Immunity* 38: 1154-1163 doi: 10.1016/j.immuni.2013.05.015
- [31] Gillies PJ, Bhatia SK, Belcher LA, Hannon DB, et al (2012) Regulation of inflammatory and lipid metabolism genes by eicosapentaenoic acid-rich oil. *J Lipid Res* 53:1679-1689 doi: 10.1194/jlr.M022657

- [32] Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, et al (2008) Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* 57:1470-1481 doi: 10.2337/db07-1403.
- [33] Qiurong Li Q, Zhang Q, Zhang M, Wang C, et al (2008) Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on membrane microdomain localization of tight junction proteins in experimental colitis. *FEBS J* 275:411-420 doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06210.x
- [34] Costantini L, Molinari R, Farinon B, Merendino N (2017) Impact of Omega-3 Fatty Acids on the Gut Microbiota. *Int. J. Mol. Sci* 18 (2645): 1-18 doi: 10.3390/ijms18122645.
- [35] Hassan A, Ibrahim A, Mbodji K, Coeffier M, et al (2010) An α -Linolenic Acid-Rich Formula Reduces Oxidative Stress and Inflammation by Regulating NF- κ B in Rats with TNBS-Induced Colitis. *J Nutr* 140: 1714-1721 doi:10.3945/jn.109.119768
- [36] Ozgen IT, Tascilar ME, Bilir P, Boyraz M, et al (2012) Oxidative stress in obese children and its relation with insulin resistance. *J Pediatr Endocr Met* 25: 261-266 doi: 10.1515/jpem-2011-0397
- [37] Jarukamjorn K, Jearapong N, Pimson C, Chatuphonprasert W (2016) A High-Fat, High-Fructose Diet Induces Antioxidant Imbalance and Increases the Risk and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *Scientifica* doi: 10.1155/2016/5029414
- [38] Vomhof-DeKreya EE, Picklo MJ (2012) The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism. *J Nutr Biochem* 23:1201-1206 doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.03.005
- [39] Weintraub H (2013) Update on marine omega-3 fatty acids: management of dyslipidemia and current omega-3 treatment options. *Atherosclerosis* 230:381-389 doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.07.041
- [40] Flachs P, Rossmeisl M, Kopecky J (2014) The Effect of n-3 Fatty Acids on Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity. *Physiol. Res* 63: S93-S118 PMID: 24564669

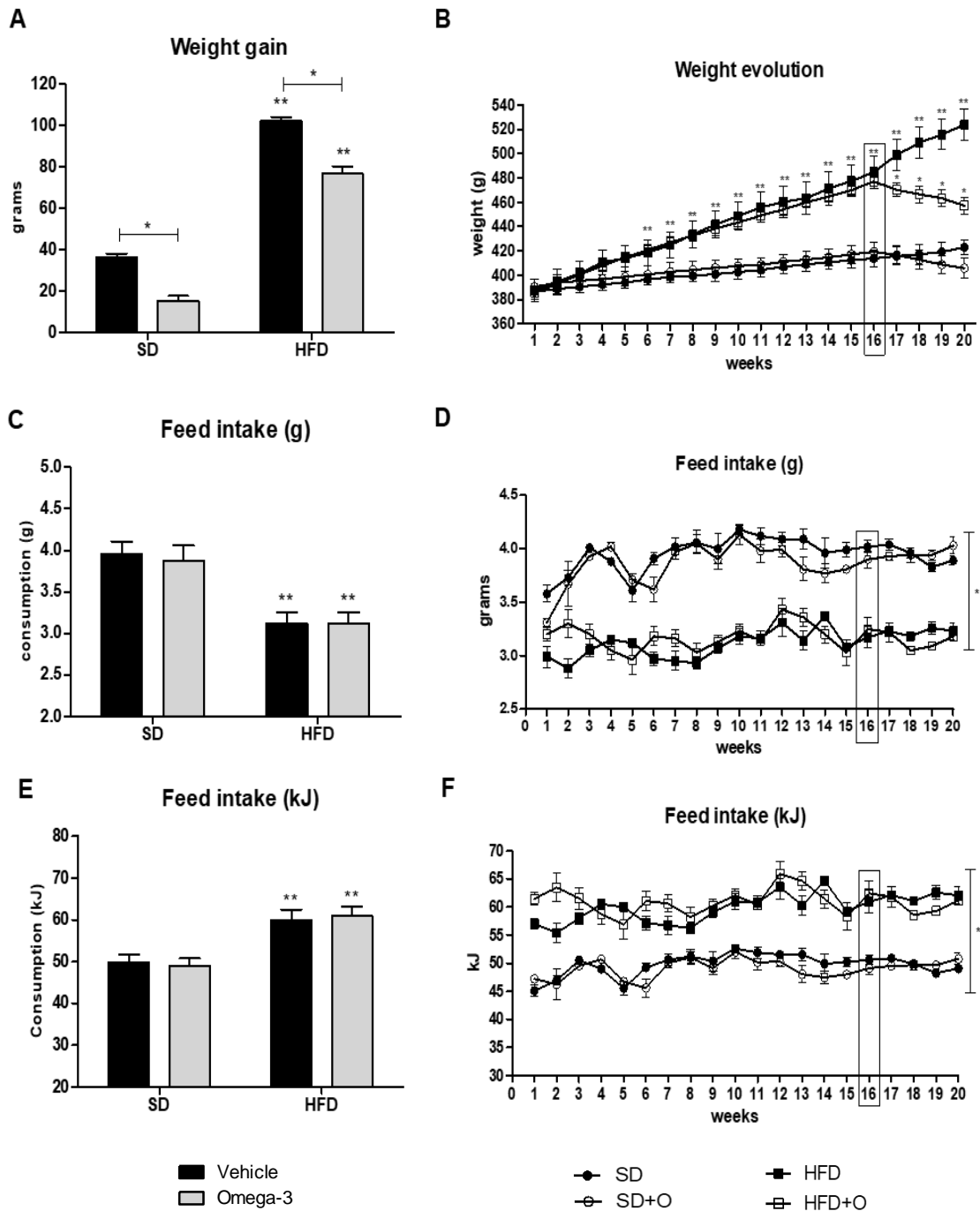


Figure 1 Body weight and feed intake. Parameters are presented in mean and S.E.M (n= 10). **A.** Weight gain (g); **B.** Evolution of weight the animals during the 20 weeks of the experiment; **C.** Feed consumption in grams/rat. **D.** Feed intake (in grams) during the 20 weeks of the experiment; **E.** Energy intake in kJ/rat. **F.** Feed intake (in kJ) during the 20 weeks of the experiment. * Difference between HFD and HFD+O or SD and SD+O groups. ** Difference of respective control. Data

from bar graphs were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc. For data from lines graphs repeated measures ANOVA were used. $p < 0,05$

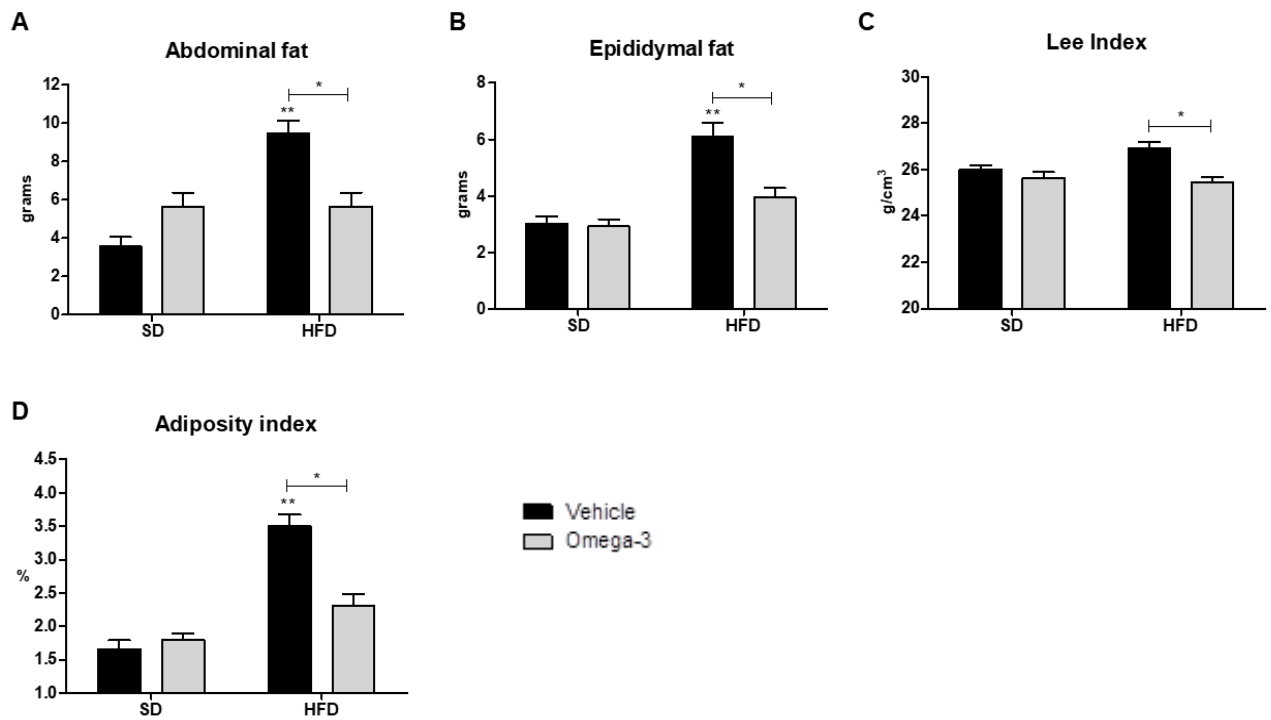


Figure 2. Body parameters. Parameters are presented in mean and S.E.M (n= 10). **A.** Abdominal fat (g); **B.** Epididymal fat (g); **C.** Lee index (g/cm³); **D.** Adiposity index (%). * Difference between HFD and HFD+O or SD and SD+O groups. ** Difference of respective control. Data were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc. $p < 0,05$

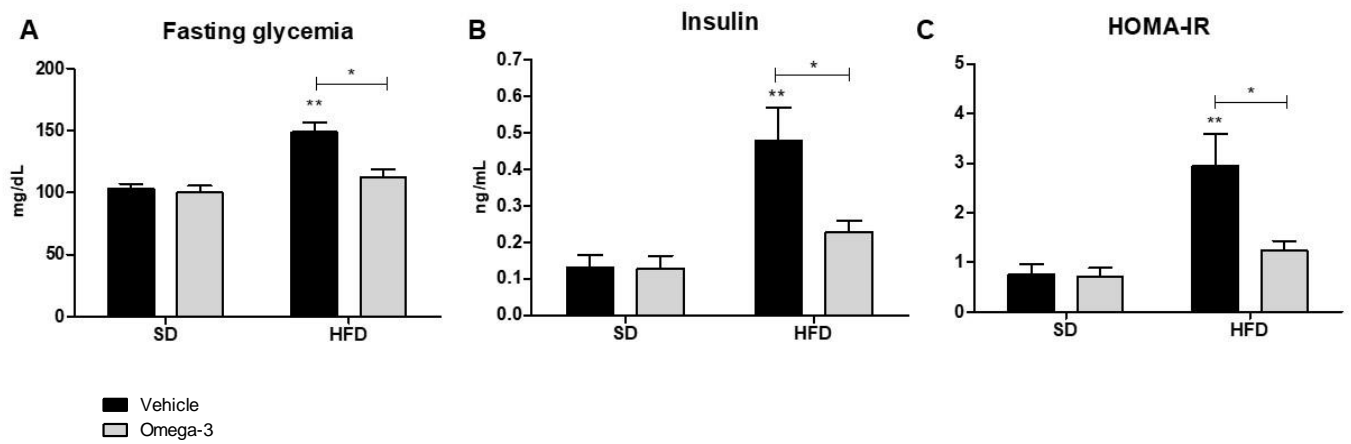


Figure 3 Effect of omega-3 supplementation in glycemia, plasma insulin and HOMA-IR. Parameters represented in mean and S.E.M (n= 10). **A.** Fasting glycemia (mg/dL); **B.** Plasma insulin (ng/mL); **C.** Estimates of insulin resistance (HOMA-IR). * Difference between HFD and HFD+O or SD and SD+O groups. ** Difference of respective control. Data were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc. $p < 0,05$

Table 1: Effect of omega-3 in biochemical parameters.

Groups	SD	SD + O	HFD	HFD + O
Total cholesterol (mg/dL)	59.84 ± 2.58	50.41 ± 2.79	67.02 ± 5.56	47.92 ± 3.78 ^a
HDL (mg/dL)	23.18 ± 1.31	20.45 ± 1.27	22.35 ± 1.00	22.93 ± 1.02
LDL (mg/dL)	24.4 ± 2,02	11.5 ± 3,70 ^b	21.80 ± 2,79	12.0 ± 3,10 ^a
VLDL (mg/dL)	14.1 ± 0,46	15.6 ± 1,05	19.9 ± 1,77 ^b	14.2 ± 0,85 ^a
Triglycerides (mg/dL)	70.35 ± 2.33	78.02 ± 5.23	91.38 ± 3,14 ^b	70.87 ± 4.26 ^a
Urea (mg/dL)	38 ± 3,4	35 ± 2,6	48 ± 2,0 ^b	38 ± 1,4 ^a
Creatinine (mg/dL)	0,45 ± 0,03	0,40 ± 0,04	0,59 ± 0,06 ^b	0,36 ± 0,03 ^a
AST (U/L)	197 ± 18,0	172 ± 18,0	257 ± 11,0 ^b	197 ± 12,0 ^a
ALT (U/L)	28 ± 3,6	30 ± 1,7	59 ± 4,1 ^b	46 ± 2,6 ^{a, c}
GGT (U/L)	2,0 ± 0,22	2,2 ± 0,20	5,4 ± 0,19 ^b	4,3 ± 0,21 ^{a, c}
Alkaline phosphatase (U/L)	136 ± 12,0	165 ± 12,0	346 ± 38,0 ^b	228 ± 27,0 ^a

All parameters represented in mean and S.E.M (n= 10). a = Different from HFD group; b = Different from SD group; c = Different from SD+O group. Data were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc. p < 0,05

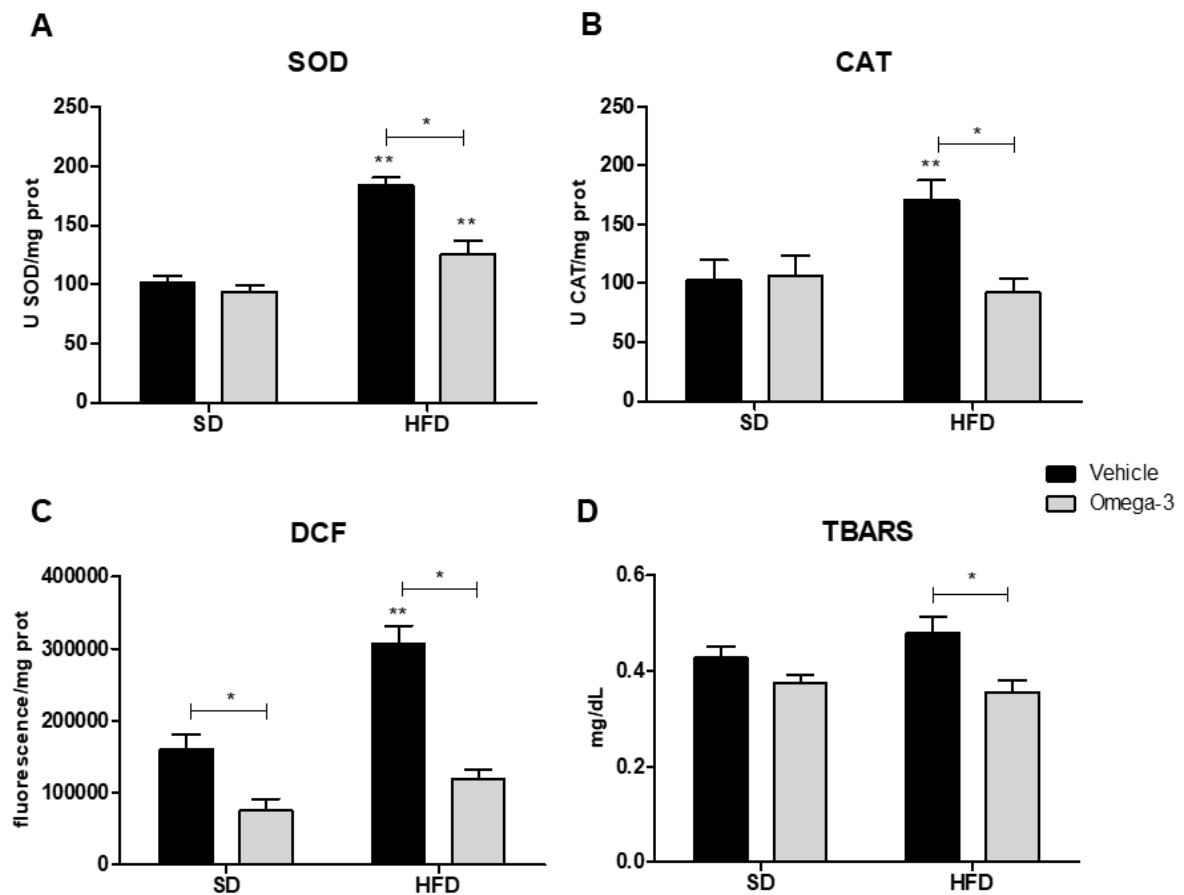


Figure 4. Omega-3 supplementation reduces oxidative stress in gut. Parameters represented in mean and S.E.M (n= 10). **A.** Activity of antioxidant enzyme Superoxide Dismutase (SOD) in gut; **B.** Activity of antioxidant enzyme Catalase (CAT) in gut; **C.** Production of reactive oxygen species in gut; **D.** Measurement of lipoperoxidation in gut; * Difference between HFD and HFD+O or SD and SD+O groups. ** Difference of respective control. Data were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc. $p < 0,05$

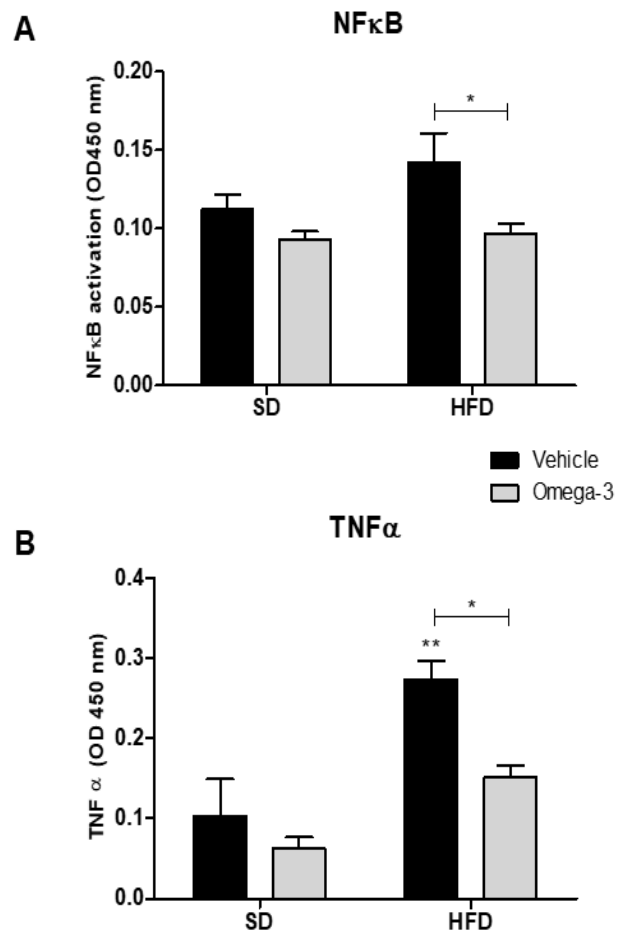


Figure 5. Omega-3 supplementation reduces markers inflammation in gut. Parameters represented in mean and S.E.M (n= 10). **E.** Measurement of NFκB activation in gut; **F.** Evaluation of TNFα production in gut. * Difference between HFD and HFD+O or SD and SD+O groups. ** Difference of respective control. Data were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc. $p < 0,05$

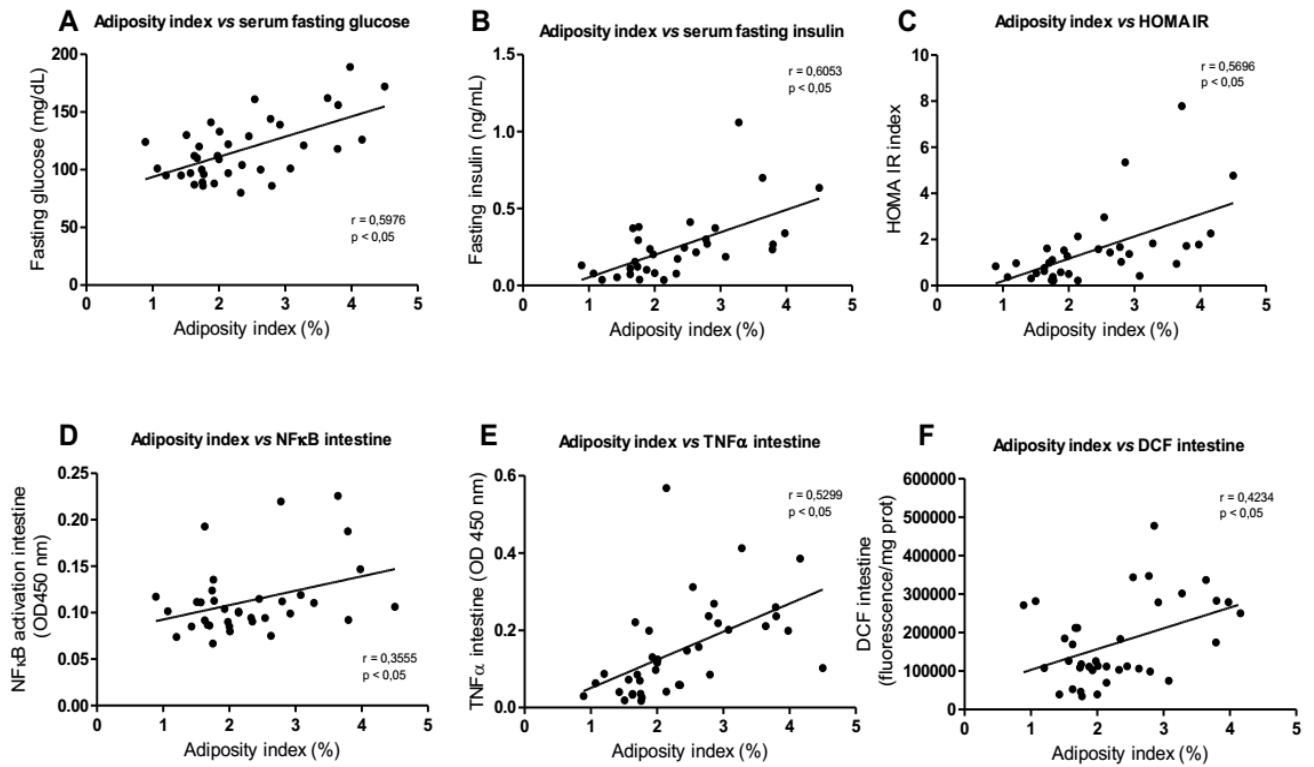


Figure 6. Linear regression and Pearson's correlation analysis. Correlation between the adiposity index of all animals and other parameters evaluated in order to verify which parameters are related to obesity. **A.** Adiposity index vs fasting glucose; **B.** Adiposity index vs fasting insulin; **C.** Adiposity index vs HOMA IR; **D.** Adiposity index vs NFκB activation in gut; **E.** Adiposity index vs TNFα in gut; **F.** Adiposity index vs DCF production in gut. Pearson's correlation coefficient (r) was considered significant when $p < 0.05$

5 CONCLUSÕES

Diversos estudos, tanto em modelos animais quanto em humanos, já forneceram evidências para classificar o ômega-3 como possuidor de vários benefícios preventivos e terapêuticos para a saúde. No contexto da obesidade, a maioria dos estudos são focados no tecido adiposo, o que não é surpreendente, dado o fato que este órgão exerce papel fundamental na fisiopatologia da doença. No entanto, é relevante que se estude os efeitos do ômega-3 no intestino, pois ele também é afetado pela meta inflamação presente na obesidade. Por isso, o presente estudo foi realizado, a fim de avaliar os efeitos do ômega-3, não somente nas alterações metabólicas da obesidade, mas também com enfoque específico na inflamação e estresse oxidativo que acomete o intestino durante a obesidade.

Neste estudo, nós optamos por executar o modelo experimental de obesidade de longa duração induzido por HFD (45% de gordura). Esse modelo é bem estabelecido na literatura científica e tem a vantagem de assemelhar as mudanças fisiopatológicas observadas durante o desenvolvimento da obesidade em humanos. É um modelo de execução trabalhosa, que envolve demanda de pessoas e tempo, pois os animais são acompanhados diariamente por um período longo de tempo. Entretanto, o nosso modelo teve êxito em seu propósito, pois os animais ganharam peso e ficaram resistentes à ação da insulina.

Neste contexto, em nosso estudo foi evidenciado que o ômega-3 teve ação benéfica para o metabolismo em geral. Pois foi capaz de reduzir a resistência à insulina, diminuir a glicose de jejum, reduzir o ganho de peso e o acúmulo de gordura abdominal e epididimal, bem como reduzir o perfil lipídico, e marcadores de função renal e hepática. Os nossos dados também demonstram que o ômega-3 teve ação anti-inflamatória, reduzindo a ativação de NFκB e a produção de TNFα no intestino. Além de ação antioxidante, pois reduziu a produção de ERO e a lipoperoxidação no tecido intestinal. Esses resultados são importantes pois estabelecem aspectos funcionais do ômega-3 no tecido intestinal, conferindo benefícios no tratamento da obesidade. Em resumo, nossos resultados evidenciam que o ômega-3 têm múltiplos benefícios para a saúde,

portanto, seu consumo, especialmente de fontes alimentares, deve ser encorajado. Visto que, a redução da inflamação e estresse oxidativo, juntamente com a perda de peso e a diminuição da resistência à insulina são objetivos importantes a serem alcançados durante o tratamento da obesidade.

Neste estudo, caracterizamos não apenas os já conhecidos efeitos benéficos do ômega-3 para o metabolismo, mas também sua ação anti-inflamatória e antioxidante no intestino. Neste contexto, sugerimos que a suplementação com ômega-3 poderia ser usada como adjuvante no tratamento da obesidade. No entanto, estudos adicionais são necessários para caracterizar os mecanismos de ação do ômega-3 no organismo. Por quais vias ele atua, qual melhor dosagem, qual melhor horário para a administração do ômega, qual são seus alvos moleculares, metabólitos gerados e genes relacionados. O que emerge em grandes possibilidades e também em grandes desafios para estudos futuros.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESO. Diretrizes Brasileiras de Obesidade. 4ªed. São Paulo: ABESO, 2016.

Alberti K.G, Eckel R.H, Grundy S.M, Zimmet P.Z. et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. v.120:1640-1645, 2009.

Albuquerque D, Stice E, Rodríguez-López R, Manco L, Nóbrega C. Current review of genetics of human obesity: from molecular mechanisms to an evolutionary perspective. *Mol Genet Genomics*. 2015.

Amirkhizi F, Siassi F, Minaie S, Djalali M, et al. Is obesity associated with increased plasma lipid peroxidación and oxidative stress in women. *ARYA Atheroscler. J*. v.2: 189-192, 2007.

Araújo J.R, Tomas J, Brenner C, Sansonetti P. Impact of high-fat diet on the intestinal microbiota and small intestinal physiology before and after the onset of obesity. *Biochimie* (2017).

Baumgart D.C, Dignass A.U. Intestinal barrier function. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. v.5: 685-694, 2002.

Bournat J.C, Brown C.W. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. v.17:446-452, 2010.

Bryan S, Baregzay B, Spicer D, Singal P.K, Khaper N. Redox-inflammatory synergy in the metabolic syndrome. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. v 91: 22-30, 2013.

Buckley C.D, Gilroy D.W, Serhan C.N. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity*. v.40:315-327, 2014.

Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim. Biophys Acta* v.1851:469-484, 2014.

Calder P.C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. v.77: 327-335, 2007.

Calder P.C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem. Soc. Trans*. 2017.

Choe S.S, Huh J.Y, Hwang I.J, Kim J.I, Kim J.B. Adipose Tissue Remodeling: its Role in energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol*. v 7: 1-16, 2016.

Costantini L, Molinari R, Farinon B, Merendino N. Impact of Omega-3 Fatty Acids on the Gut Microbiota. *Int. J. Mol. Sci.* v.18, (2645): 1-18, 2017.

Cummins T.D, Holden C.R, Sansbury B.E, Gibb A.A, et al. Metabolic remodeling of white adipose tissue in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v.307: E262–E277, 2014.

Ding L.A, Li J.S. Gut in diseases: physiological elements and their clinical significance. *World J. Gastroenterol.* v.9: 2385-2389, 2003.

Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, et al. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* v.12, 3117-3132, 2011.

Finkelstein E.A, Trogon J.G, Cohen J.W, Dietz W. Annual medical spending attributable to obesity: payerand service-specific estimates. *Health Aff.* v.28, (5): w822-w831, 2009.

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

Fresno M, Alvarez R, Cuesta N. Toll-like receptors, inflammation, metabolism and obesity. *Arch Physiol Biochem.* v.117:151-64, 2011.

Frosali S, Pagliari D, Gambassi G, Landolfi R, et al. How the Intricate Interaction among Toll-Like Receptors, Microbiota, and Intestinal Immunity Can Influence Gastrointestinal Pathology. *J Immunol Res.* p 1-12, 2015.

Garcia-Lafuente A., Antolin M., Guarner F., Crespo E. Malagelada J. R. Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensal flora in the rat. *Gut.* v.48: 503-507, 2001.

Gérard P. Gut microbiota and obesity. *Cell. Mol. Life Sci.* v.73:147–162, 2016.

Gillies P.J, Bhatia S.K, Belcher L.A, Hannon D.B, et al. Regulation of inflammatory and lipid metabolism genes by eicosapentaenoic acid-rich oil. *J Lipid Res.* v. 53:1679-1689, 2012.

Gobbetti, T. Dallia, J. Colas, R.A. Canova, D.F. et al. Protectin D1n-3 DPA and resolvin D5n-3 DPA are effectors of intestinal protection. *PNAS.* v. 114(15): 3963–3968, 2017.

González-Muniesa, P. Martínez-González M-A, Hu F.B, Després J-P, Matsuzawa Y, et al. Obesity. *Nat. Rev. Dis. Primers.* v3:17034, 2017.

González-Pérez, A., Horrillo, R., Ferré, N., Gronert, K., et al. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB J.* 23, 1946–1957, 2009.

Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.* v.29:415-45, 2011.

Guo W, Xie W, Lei T, Hamilton JA. Eicosapentaenoic acid, but not oleic acid, stimulates beta-oxidation in adipocytes. *Lipids.* v.40:815-821, 2005.

Hildebrand S, Stümer J and Pfeifer A. PVAT and Its relation to brown, beige, and white adipose tissue in development and function. *Front. Physiol.* v.9:70, 2018.

Huh JY, Park YJ, Ham M, Kim JB. Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue inflammation and metabolic dysregulation in obesity. *Mol Cells.* v. 37:365-371, 2014.

Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (macronutrients). Washington, DC: National Academy Press; 2005. Disponível em: < <https://www.nap.edu/read/10490/chapter/32#1324> > Acesso em: 10 Mar. 2018.

Jones PJH, Rideout T. Lipids, sterols, and their metabolites. *In:* Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, Tucker KL, Ziegler TR, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease.* 11th ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2014.

Kalupahana NS, Claycombe K, Newman SJ, Stewart, et al. Eicosapentaenoic acid prevents and reverses insulin resistance in high-fat diet induced obese mice via modulation of adipose tissue inflammation. *J Nutr.* v.140:1915-22, 2010.

Kang JG, Park CY. Anti-obesity drugs: a review about their effects and safety. *Diabetes Metab J.* v.36: 13-25, 2012.

Kawasaki N, Asada R, Saito A, Kanemoto S, Imaizumi K. Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Sci. Rep.* v2: 1-7, 2012.

Kim HK, Della-Fera M, Lin J, Baile CA. Docosahexaenoic acid inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr.* v.136:2965-2969, 2006.

Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh EH, Kim DH. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS One.* v 7:e47713, 2012.

Kromann N, Green A. Epidemiological studies in the Upernavik District, Greenland. *Acta Med Scand* v.208:401, 1980.

Li C, Xu M.M, Wang K, Adler A.J, et al. Macrophage polarization and Metainflammation. *Transl. res.* (2017).

Li Q, Zhang Q, Wang M et al. n-3 polyunsaturated fatty acids prevent disruption of epithelial barrier function induced by proinflammatory cytokines. *Mol Immunol* v.45(5): 1356-1365, 2008.

López-Vicario, C., et al. Pro-resolving mediators produced from EPA and DHA: Overview of the pathways involved and their mechanisms in metabolic syndrome and related liver diseases. *Eur J Pharmacol* (2015)

Lorente-Cebrián S, Bustos M, Marti A, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ. Eicosapentaenoic acid stimulates AMP-activated protein kinase and increases visfatin secretion in cultured murine adipocytes. *Clin Sci (Lond)*.v.117:243-249, 2009.

Lumeng C.N, Saltiel A.R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*. v.121(6):2111-2117, 2011.

Madara J.L. Pathobiology of the intestinal epithelial barrier. *Am. J. Pathol*. v137: 1273–1281, 1990.

Manna P, Jain S.K. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab Syndr Relat Disord*. v13 (10): 423-444, 2015.

Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, et al. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *Int. J. Mol. Sci*. v.16, 378-400, 2015.

Martínez-Fernandez L, Laiglesia L.M, Huerta A.E, Martínez J.A, Moreno-Aliaga M.J. Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2015.

McKinsey Global Institute. Overcoming obesity: An initial economic analysis. 106p. 2014.

Moreno-Aliaga MJ, Lorente-Cebrian S, Martinez JA. Regulation of adipokine secretion by n-3 fatty acids. *Proc Nutr Soc*. v.69:324-332, 2010.

Mori T.A, Bao D.Q, Burke V, Puddey I.B, et al. Dietary fish as a major component of a weight-loss diet: effect on serum lipids, glucose, and insulin metabolism in overweight hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr*. v.70: 817-825, 1999.

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet*. v. 387: 1377-1396, 2016.

Ng, M. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* .v.384: 766-781, 2014.

O'Rourke R.W. Inflammation in obesity-related diseases. *Surgery*. v. 145 (3): 255-259, 2009.

Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*. v.142:687-98, 2010.

Owyang C, Wu G.D. The Gut Microbiome in Health and Disease. *Gastroenterology*. v.146:1433-1436, 2014.

Perez-Echarri N, Perez-Matute P, Marcos-Gomez B, Marti A, et al. Downregulation in muscle and liver lipogenic genes: EPA ethyl ester treatment in lean and overweight (high-fat-fed) rats. *J Nutr Biochem*. v. 20:705-714, 2009.

Polus, A. Zapala, B. Razny, U. Gielicz, A, et al. Omega-3 fatty acid supplementation influences the whole blood transcriptome in women with obesity, associated with pro-resolving lipid mediator production. *Biochim. biophys. acta*.1746-1755, 2016.

Pompéia. C. Essencialidade dos ácidos graxos. In Curi R, Pompéia C, Miyasaka C.K, Procopio J. *Entendendo a gordura: os ácidos graxos*. Barueri: Manole 2002. p. 27-32.

Reilly S.M, Saltiel A.R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat. rev. endocrinol*. v 13: 633-643, 2017.

Richard, D. Kefi, K. Barbe, U. Bausero, P. Visioli, F. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharmacol. res*. v.57: 451-455, 2008.

Savini I, Catani M.V, Evangelista D, et al. Obesity associated oxidative stress: Strategies finalized to improve redox state. *Int J Mol Sci*. v14:10497-10538, 2013.

Schwab, J.M., Chiang, N., Arita, M., Serhan, C.N. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* v.447, 869-874, 2007.

Serhan, C.N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*. 210, 92-101, 2014.

Simopoulos A.P. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr*. v.70, 560S–569S, 1999.

Siriwardhana N, Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N. Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Adv Food Nutr Res*. v.65: 211-222, 2012.

Solas M, Milagro FI, Ramírez MJ, Martínez JA. Inflammation and gut-brain axis link obesity to cognitive dysfunction: plausible pharmacological interventions. *Curr. opin. pharmacol*.v37:87-92, 2017.

Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet*. v 378: 804-814, 2011.

- Tateya, S., Kim, F., Tamori Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol.* v.4: 1-14, 2013.
- Tilg, H., Kaser, A. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *J Clin Invest.* v 6:2126-2132, 2011.
- Titos, E., Rius, B., González-Pérez, A., López-Vicario, C., et al. Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype. *J. Immunol.* v. 187: 5408-5418, 2011.
- Torres-Fuentes C, Schellekens H, Dinan T.G, Cryan J.F. A natural solution for obesity: Bioactives for the prevention and treatment of weight gain. A review. *Nutr Neurosci.* 18p. 2013.
- Tremmel M, Gerdtham UG, Nilsson PM, Saha S: Economic burden of obesity: a systematic literature review. *Int J Environ Res Public Health.* v14: E435, 2017.
- Turner J.R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol.* v9:799-809, 2009.
- TutorVista.com. *Omega 3 Fatty Acids*. Disponível em:< <https://chemistry.tutorvista.com/biochemistry/omega-3-fatty-acids.html>>. Acesso em: 07 Mar. 2018.
- Ungaro F, Rubbino F, Danese S, D'Alessio S. Actors and factors in the resolution of intestinal inflammation: lipid mediators as a new approach to therapy in inflammatory bowel diseases. *Front Immunol.* v8: 1-13, 2017.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* v. 39: 44-84, 2007.
- van Schothorst EM, Flachs P, Franssen-van Hal NL, Kuda O, et al. Induction of lipid oxidation by polyunsaturated fatty acids of marine origin in small intestine of mice fed a high-fat diet. *BMC Genomics.*v10:110, 2009.
- Vigitel Brasil 2016. Disponível em:< http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/07/vigitel_2016_jun17.pdf. Acesso em: 14 Mar. 2018.
- Vitseva O.I, Tanriverdi K, Tchkonja T.T, Kirkland J.L, et al. Inducible Toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue. *Obesity (Silver Spring).* v.16:932-937, 2008.
- WHO. BMI classification. Disponível em:< http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html> Acesso em: Fev. 2018
- WHO. Obesity and overweight. Disponível em:< <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>> Acesso em: Fev. 2018.

WHO. Prevalence of obesity among adults. Disponível em:< http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_obesity/obesity_adults/en/> Acesso em: 14 Mar. 2018.

WHO. Prevalence of obesity among children and adolescents. Disponível em:< http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_obesity/obesity_adolescents/en/> Acesso em: 14 Mar. 2018.

WHO. Prevalence of overweight among adolescents and children. Disponível em:< http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_obesity/overweight_adolescents/en/> Acesso em: 14 Mar. 2018.

WHO. Prevalence of overweight among adults. Disponível em:< http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/> Acesso em: 14 Mar. 2018.

Williams, E. P., Mesidor, M., Winters, K., Dubbert, P. M. & Wyatt, S. B. Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. *Curr. Obes. Rep.* v.4: 363-370, 2015.

Wozniak S.E, Gee L.L, Wachtel M.S, Frezza E.E. Adipose Tissue: The New Endocrine Organ? A Review Article. *Dig Dis Sci.* v.54:1847-1856, 2009.

Xu H, Barnes G.T, Yang Q, Tan G, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 112:1821-30, 2003.

Yan Y, Jiang W, Spinetti T, Tardivel A, et al. Omega-3 Fatty Acids Prevent Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome Activation. *Immunity.* v.38, 1154-1163, 2013.

Zand H, Morshedzadeh N, Naghashian F. Signaling pathways linking inflammation to insulin resistance. *Diab Met Syndr: Clin Res Rev*, 2017.

7 ANEXOS

Anexo A – Aprovação CEUA



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UFCSPA

A Comissão de Ética no Uso de Animais, analisou o Projeto:

Projeto: 117/13

Pesquisadores:

Marilene Garrido

Katya Rigatto

Jenifer Saffi

Leisi Goi

Michely Lopes Nunes

Título: ESTUDO DO EFEITO ANTIOXIDANTE E ANTIINFLAMATÓRIO DE COMPOSTO BIOTIVOS EM MODELOS DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA.

Este Projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Todo e qualquer alteração do projeto, assim como eventos adversos graves, deverão ser comunicados a esta CEUA.

Porto Alegre, 16 de outubro de 2013.

Assinatura manuscrita de Katya V. Rigatto.

Katya V. Rigatto
Coordenadora do CEUA
UFCSPA