



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
ALINE HAAS DE MELLO

**O POTENCIAL NUTRACÊUTICO DO ÔMEGA-3 NA OBESIDADE INDUZIDA POR
DIETA HIPERLIPÍDICA: DO TECIDO ADIPOSEO AO CÉREBRO**

ALINE HAAS DE MELLO

**O POTENCIAL NUTRACÊUTICO DO ÔMEGA-3 NA OBESIDADE INDUZIDA POR
DIETA HIPERLIPÍDICA: DO TECIDO ADIPOSEO AO CÉREBRO**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde para obtenção do título de
Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Gislaine Tezza Rezin, Dra.

Tubarão

2017

Mello, Aline Haas de, 1986-

M47 O potencial nutracêutico do ômega-3 na obesidade induzida por dieta hiperlipídica : do tecido adiposo ao cérebro / Aline Haas de Mello ; -- 2017.
104 f. il. color. ; 30 cm

Orientadora : Gislaine Tezza Rezin.

Tese (doutorado)–Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2017.
Inclui bibliografias.

1. Obesidade. 2. Ácidos graxos Ômega-3. 3. Óleos de peixe. 4. Cérebro - Doenças. I. Rezin, Gislaine Tezza. II. Universidade do Sul de Santa Catarina - Doutorado em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.398

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária da Unisul



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - DOUTORADO

Título da Tese

O potencial nutracêutico do Ômega-3 na obesidade induzida por dieta hiperlipídica: do tecido adiposo ao cérebro

ALINE HAAS DE MELLO

AUTORA

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Tese em 07 de agosto de 2017.

Doutora Gislaine Tezza Rezin (orientador) _____

Doutora Leandra Celso Constantino (avaliador externo - UFSC) _____

Doutor Alexandre Pastoris Müller (avaliador externo - UNESC) _____

Doutora Fabiana Schuelter Trevisol (avaliador interno) _____

Doutor Luiz Alberto Kanis (avaliador interno) _____


Professor Doutor Jefferson Traebert

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

AGRADECIMENTOS

É fato que muitos contribuíram para a realização desta tese, então tenho muito a agradecer.

Primeiramente agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), pela bolsa de estudos que permitiu que eu fizesse um doutorado.

Agradeço também à minha orientadora Gislaine Tezza Rezin, por toda confiança, orientação e tempo concedidos.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), pelo tanto que me ensinaram.

À secretaria do PPGCS da UNISUL, por todo apoio.

À Isabela Casagrande Jeremias, professora da UNISUL, por todo auxílio e por me indicar para a melhor oportunidade que tive até hoje: um pós-doutorado no exterior.

Aos professores da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), que aceitaram parcerias para a realização de análises bioquímicas e aos alunos que as realizaram ou que me auxiliaram a realizá-las.

A todos alunos de iniciação científica, de mestrado e colegas de doutorado da UNISUL, que auxiliaram nos experimentos com os animais e nas análises bioquímicas.

Aos animais que foram utilizados para a realização deste estudo.

Por fim, agradeço a meus pais e ao meu namorado, por me apoiarem, me ouvirem, e por que, como diz um provérbio popular, “na maioria das vezes o que precisamos ouvir não é vai dar tudo certo, mas sim eu vou estar aqui, mesmo que tudo dê errado”.

Eu não teria conseguido sem a contribuição de cada um. Meu muito obrigada a todos, por tudo!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Introdução: A obesidade está associada à inflamação, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. Além disso, sabe-se que a obesidade não afeta apenas tecidos periféricos, mas também leva a alterações cerebrais. O aumento da prevalência e as dificuldades no tratamento mostram a necessidade da exploração de outras abordagens terapêuticas. Devido a suas propriedades anti-inflamatórias, o uso de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 pode ser uma estratégia.

Objetivo: Avaliar o potencial nutracêutico do ômega-3 em camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

Métodos: Camundongos Swiss machos receberam dieta normolipídica (controle) ou dieta hiperlipídica (obeso). Após seis semanas, os grupos foram divididos em Controle + Salina, Controle + Ômega-3, Obeso + Salina e Obeso + Ômega-3 e 400 mg/kg/dia de óleo de peixe (ou salina) foi administrado via oral, por quatro semanas. O consumo alimentar e o peso corporal foram acompanhados durante todo experimento. Quando o experimento completou dez semanas, os animais foram eutanasiados e o tecido adiposo visceral (gordura mesentérica) e o cérebro foram removidos. As estruturas cerebrais hipotálamo, hipocampo, córtex pré-frontal e estriado foram isoladas.

Resultados: O ômega-3 não influenciou no consumo alimentar nem no peso corporal, mas reduziu a gordura visceral. Na gordura visceral, o ômega-3 reduziu o dano oxidativo, bem como amenizou as alterações na defesa antioxidante e no ciclo de Krebs, causadas pela ingestão de dieta hiperlipídica. A cadeia respiratória mitocondrial não foi alterada pela obesidade nem pelo ômega-3 na gordura visceral. Em estruturas cerebrais, o ômega-3 reduziu a inflamação, o dano oxidativo, assim como amenizou as alterações na defesa antioxidante e no metabolismo energético (ciclo de Krebs e cadeia respiratória mitocondrial).

Conclusão: Conclui-se que o ômega-3 apresentou efeito benéfico na gordura visceral e no cérebro de animais obesos, visto que reverteu parcialmente as alterações causadas pelo consumo de dieta hiperlipídica, sem causar piora dos parâmetros analisados.

Descritores: Obesidade. Tecido adiposo. Cérebro. Ácidos graxos insaturados. Óleos de peixe.

ABSTRACT

Introduction: Obesity is associated with inflammation, oxidative stress and mitochondrial dysfunction. In addition, it is known that obesity does not only affect peripheral tissues, but also leads to brain alterations. The increased prevalence and difficulties in treatment show the necessity to explore different therapeutic approaches. Due to its anti-inflammatory properties, the use of omega-3 polyunsaturated fatty acids may be a strategy.

Objective: Evaluate the nutraceutical potential of omega-3 in mice submitted to obesity induced by high-fat diet.

Methods: Male Swiss mice received either a normolipid diet (control) or a high-fat diet (obese). After 6 weeks, the groups were divided in Control + Saline, Control + Omega-3, Obese + Saline and Obese + Omega-3, and 400 mg/kg/day of fish oil (or saline) was administered orally, for 4 weeks. Food intake and body weight were monitored throughout the experiment. When the experiment completed 10 weeks, the animals were euthanized and the visceral adipose tissue (mesenteric fat) and brain were removed. The cerebral structures hypothalamus, hippocampus, prefrontal cortex and striatum were isolated.

Results: Omega-3 did not influence food intake or body weight, but reduced visceral fat. In visceral fat, omega-3 reduced the oxidative damage, as well as alleviated alterations in antioxidant defense and in the Krebs cycle, caused by the intake of high-fat diet. The mitochondrial respiratory chain was not altered by obesity or omega-3 in visceral fat. In brain structures, omega-3 reduced the inflammation, the oxidative damage, as well as alleviated alterations in antioxidant defense and in energy metabolism (Krebs cycle and mitochondrial respiratory chain).

Conclusion: It was concluded that omega-3 had a beneficial effect on the visceral fat and brain of obese animals, since it partially reversed the alterations caused by the consumption of high-fat diet, without worsening the parameters analyzed.

Keywords: Obesity. Adipose tissue. Brain. Unsaturated fatty acids. Fish oils.

LISTAS

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

ω -3, n-3 ou w-3 – ácidos graxos ômega-3

2,6-DCIP – 2,6-dicloroindofenol (do inglês *2,6-dichloroindophenol*)

AA – ácido araquidônico

Acetil-CoA – acetil coenzima A

ADP – adenosina difosfato

AgRP – proteína relacionada ao gene agouti (do inglês *agouti-related protein*)

ALA – ácido alfa-linolênico

ANOVA – análise de variância

ATP – adenosina trifosfato

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*)

BHE – barreira hematoencefálica

C – citocromo c

CAT – catalase

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CHF – dieta com alto teor de gordura (óleo de milho)

CO₂ – dióxido de carbono

CoASH – coenzima A

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DHA – ácido docosahexaenóico

DNA – ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)

DTNB – ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)

e⁻ – elétrons

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPA – ácido eicosapentaenoico

EPM – erro padrão da média

EROs – espécies reativas de oxigênio

FAD – flavina adenina dinucleotídeo

FADH₂ – flavina adenina dinucleotídeo reduzida

FO – óleo de peixe (do inglês *fish oil*)

g – grama

GPx – glutathione peroxidase

GSH – glutathione

GSSG – glutathione oxidada

GDP – guanosina difosfato

GTP – guanosina trifosfato

H⁺ – íon hidrogênio

H₂O – água

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HFD – dieta com alto teor de gordura

HFHF – dieta com alto teor de gordura e frutose

HFHS – dieta com alto teor de gordura e sacarose

Icv – intracerebroventricular

IMC – índice de massa corporal

IL-1 β – interleucina-1 β

IL-6 – interleucina-6

IL-10 – interleucina-10

KO – óleo de krill (do inglês *krill oil*)

IMM – membrana mitocondrial interna (do inglês *inner mitochondrial membrane*)

mL – mililitro

MO – óleo de microalgas (do inglês *microalgal oil*)

NAD⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NF κ B – fator nuclear kappa B (do inglês *nuclear factor-kappaB*)

nm - nanômetro

O₂ – oxigênio

O₂[•] – ânion superóxido

OH[•] – radical hidroxila

OMS – Organização Mundial da Saúde

P_i – fosfato inorgânico

pg – picogramas

pH – potencial hidrogeniônico

PPAR – receptor ativado por proliferadores de peroxissoma

PUFA – ácidos graxos poli-insaturados (do inglês *polyunsaturated fatty acids*)

SNC – sistema nervoso central

SOD – superóxido dismutase

Succinil-CoA – succinil coenzima A

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*)

TG – triacilglicerol

TLR – receptor Toll-like (do inglês *Toll-like receptor*)

TLR2 – receptor Toll-like 2 (do inglês *Toll-like receptor 2*)

TLR4 – receptor Toll-like 4 (do inglês *Toll-like receptor 4*)

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa (do inglês *Tumor necrosis factor alpha*)

Ub – ubiquinona

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina

Versus – vs.

Vigitel – Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico

Lista de quadros

Quadro 1 – Composição e valor calórico das dietas utilizadas.....	54
Quadro 2 – Percentual de macronutrientes das dietas utilizadas.....	54
Quadro 3 – Efeitos do ômega-3 no tecido adiposo visceral e no cérebro de camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica.....	82

Lista de figuras

Figura 1 – Alterações do tecido adiposo na obesidade.....	22
Figura 2 – Efeitos da obesidade na função cognitiva.....	25
Figura 3 – Estruturas cerebrais envolvidas no controle do consumo alimentar.....	27
Figura 4 – Vias inflamatórias que induzem estresse oxidativo na obesidade.....	28
Figura 5 – Sistemas enzimáticos de defesa antioxidante.....	29
Figura 6 – Metabolismo energético.....	31
Figura 7 – Ciclo de Krebs.....	32
Figura 8 – Cadeia respiratória mitocondrial.....	33

Figura 9 – Disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, inflamação e apoptose na obesidade.....	36
Figura 10 – Estrutura química dos principais ácidos graxos ômega-3.....	38
Figura 11 – Metabolismo dos ácidos graxos ômega-3.....	39
Figura 12 – Efeitos anti-inflamatórios do EPA e do DHA.....	41
Figura 13 – Relação entre alterações inflamatórias e bioquímicas na obesidade: alvos para a ação do ômega-3.....	49
Figura 14 – Delineamento do estudo.....	52
Figura 15 – Efeito do ômega-3 no consumo alimentar de camundongos submetidos à obesidade.....	61
Figura 16 – Acompanhamento semanal do efeito do ômega-3 no consumo alimentar de camundongos submetidos à obesidade.....	62
Figura 17 – Efeito do ômega-3 no peso corporal de camundongos submetidos à obesidade.....	63
Figura 18 – Acompanhamento semanal do efeito do ômega-3 no peso corporal de camundongos submetidos à obesidade.....	63
Figura 19 – Efeito do ômega-3 no peso da gordura visceral de camundongos submetidos à obesidade.....	64
Figura 20 – Efeito do ômega-3 sobre o dano oxidativo na gordura visceral de camundongos submetidos à obesidade.....	66
Figura 21 – Efeito do ômega-3 sobre a atividade e níveis de antioxidantes na gordura visceral de camundongos submetidos à obesidade.....	67
Figura 22 – Efeito do ômega-3 sobre a atividade de enzimas do ciclo de Krebs na gordura visceral de camundongos submetidos à obesidade.....	69
Figura 23 – Efeito do ômega-3 sobre a atividade de complexos da cadeia respiratória mitocondrial na gordura visceral de camundongos submetidos à obesidade.....	70
Figura 24 – Efeito do ômega-3 sobre parâmetros inflamatórios em cérebro de camundongos submetidos à obesidade.....	73
Figura 25 – Efeito do ômega-3 sobre o dano oxidativo em cérebro de camundongos submetidos à obesidade.....	75
Figura 26 – Efeito do ômega-3 sobre a atividade e níveis de antioxidantes em cérebro de camundongos submetidos à obesidade.....	76

Figura 27 – Efeito do ômega-3 sobre a atividade de enzimas do ciclo de Krebs em cérebro de camundongos submetidos à obesidade.....	78
Figura 28 – Efeito do ômega-3 sobre a atividade de complexos da cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de camundongos submetidos à obesidade.	79

Lista de tabelas

Tabela 1 – Revisão de estudos em animais sobre ômega-3 para a obesidade (e alterações relacionadas).....	43
Tabela 2 – Revisão de estudos em humanos sobre ômega-3 para a obesidade (e alterações relacionadas).....	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
1.1.1 Obesidade: definição e epidemiologia.....	18
1.1.2 Fisiopatologia da obesidade.....	19
1.1.2.1 Inflamação na obesidade.....	21
1.1.2.2 Obesidade e sistema nervoso central.....	23
1.1.2.3 Estresse oxidativo na obesidade.....	28
1.1.2.4 Metabolismo energético e disfunção mitocondrial na obesidade.....	30
1.1.3 Modelos animais de obesidade.....	36
1.1.4 Tratamento da obesidade.....	37
1.1.4.1 Ômega-3.....	38
1.1.4.2 Obesidade e ômega-3.....	42
2. OBJETIVOS.....	50
2.1 OBJETIVO GERAL.....	50
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
3. MÉTODOS.....	51
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	51
3.2 ANIMAIS.....	51
3.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	51
3.4 CONSUMO ALIMENTAR.....	55
3.5 REMOÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS TECIDOS.....	56
3.6 PESO DA GORDURA VISCERAL.....	56
3.7 PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS.....	56
3.8 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	56
3.8.1 Dano oxidativo a lipídios e a proteínas.....	56
3.8.2 Defesa antioxidante.....	57
3.8.3 Metabolismo energético.....	58
3.8.3.1 Atividade de enzimas do ciclo de Krebs.....	58
3.8.3.2 Atividade de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial.....	59
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
3.10 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	60

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5. CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS.....	85
APÊNDICES.....	101
APÊNDICE A – Artigos relacionados à tese.....	101
APÊNDICE B – Artigos publicados durante o período do Doutorado (não relacionados à tese).....	102
ANEXO.....	103
ANEXO A – Pareceres de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	103

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a obesidade é considerada um sério problema de saúde pública mundial¹. Apesar das políticas de saúde pública e dos esforços individuais de tratamento para combater a epidemia de obesidade, mais de dois bilhões de pessoas no mundo estão acima do peso ou obesas².

Diversas alterações no organismo são observadas na obesidade e, entre essas, já foi demonstrado presença de inflamação³⁻⁷, estresse oxidativo⁸⁻¹⁰ e disfunção mitocondrial¹¹⁻¹³, sendo que a maior parte dos estudos mostrou alterações em sistemas e órgãos periféricos. No entanto, estudos já revelaram que a obesidade também pode causar anormalidades no cérebro¹⁴⁻¹⁶, em especial nas estruturas cerebrais hipotálamo¹⁷⁻¹⁹, hipocampo²⁰⁻²², córtex pré-frontal e estriado²³⁻²⁵. O hipotálamo é o centro regulador do metabolismo energético^{19,26}, o hipocampo está envolvido com cognição, memória, aprendizagem e emoções^{15,20}, e o córtex pré-frontal e o estriado estão envolvidos com o sistema de recompensa^{23,24}. Portanto, alterações nessas estruturas cerebrais podem trazer diversos prejuízos para o indivíduo.

Devido aos riscos estabelecidos para a saúde e ao aumento substancial da prevalência, a obesidade tornou-se um grande desafio para a saúde global²⁷. A visão da obesidade como doença inflamatória tem despertado interesse para a intervenção terapêutica com foco na inflamação^{5,28}. Nesse contexto, determinadas substâncias podem desempenhar um papel importante na mediação da inflamação e das alterações relacionadas²⁹. O termo nutracêutico aparece neste cenário visto que se refere a substâncias com potenciais benefícios terapêuticos. Dentre elas, o uso de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 pode ser uma estratégia, visto que esta substância tem conhecido efeito anti-inflamatório e tem mostrado potencial para auxiliar no tratamento da obesidade e das alterações metabólicas associadas^{30,31}.

O ômega-3 tem mostrado diversos efeitos benéficos sobre alterações relacionadas à obesidade em animais, tais como redução no ganho de gordura corporal, melhora do perfil lipídico, da resistência à insulina, da intolerância à glicose e da esteatose hepática, bem como redução da inflamação em tecidos periféricos³²⁻³⁷. Em humanos com excesso de peso ou obesidade, estudos mostraram que o

tratamento com ômega-3 pode reduzir a adiposidade, a inflamação, os triglicerídeos, assim como reduzir o estresse oxidativo no plasma³⁸⁻⁴¹.

No entanto, o efeito do ômega-3 na neuroinflamação foi menos estudado. Uma revisão conduzida por Trépanier e colaboradores⁴² reuniu estudos que mostraram propriedades anti-inflamatórias do ômega-3 em modelos animais de neuroinflamação, mas observa-se que muitos mecanismos pelos quais ele exerce estes efeitos ainda não estão completamente elucidados. Além disso, nenhum modelo animal de obesidade foi citado nesta revisão.

O efeito do ômega-3 no sistema nervoso central (SNC) sobre alterações relacionadas à obesidade foi pouco estudado. O foco tem sido apenas sobre o hipotálamo, de modo que o efeito do ômega-3 em outras estruturas cerebrais não foi explorado. Além disso, observa-se muita diferença nas etapas metodológicas dos estudos, o que limita e dificulta a comparação e a generalização dos resultados. Dois estudos compararam o consumo de dieta rica em gordura (óleo de soja ou banha de porco) com dieta rica em ômega-3 (óleo de peixe), sem indução prévia de obesidade, e mostraram efeitos benéficos do ômega-3 em parâmetros relacionados com inflamação no hipotálamo de roedores^{43,44}. Em modelo animal de obesidade, a substituição de banha de porco por óleo de linhaça (ômega-3) ou azeite de oliva (ômega-9) na dieta, assim como a administração intracerebroventricular de ômega-3 e ômega-9, se mostraram capazes de reverter o processo inflamatório no hipotálamo, restabelecer a sinalização de insulina e leptina, e levar a perda de peso em roedores⁴⁵.

Considerando as alterações já identificadas na obesidade e as propriedades do ômega-3, o estudo desta substância e o esclarecimento de seus efeitos pode trazer novos horizontes para o tratamento da obesidade⁴⁶. Nesse contexto, observa-se que muitos efeitos do ômega-3 na obesidade ainda permanecem desconhecidos, principalmente no SNC.

O conjunto de circuitos do SNC, bem como a homeostase do tecido adiposo são importantes alvos para estudo da obesidade². O foco maior dos estudos tem sido a inflamação, mas o efeito do tratamento com ômega-3 (óleo de peixe via gavagem) sobre parâmetros inflamatórios no cérebro de camundongos, após indução de obesidade, não foi relatado. O efeito do ômega-3 sobre parâmetros de estresse oxidativo e de metabolismo energético na gordura visceral e no cérebro de camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica também não foi estudado.

Portanto, considerando que ainda são necessários esclarecimentos quanto ao papel do ômega-3 na obesidade, visto que muitos efeitos e mecanismos ainda são desconhecidos, o presente trabalho teve como objetivo verificar se o óleo de peixe, rico em ômega-3 na forma de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexanóico (DHA), reverte algumas alterações em parâmetros inflamatórios e bioquímicos na gordura visceral e no cérebro de camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Os efeitos do ômega-3 sobre o consumo alimentar, peso corporal e peso da gordura visceral também foram avaliados. Destaca-se que este estudo, diferente da metodologia utilizada na maior parte dos estudos prévios, verificou o efeito da suplementação com ômega-3 após a indução de obesidade e sem qualquer mudança na dieta, ou seja, verificou se o ômega-3 teria um efeito benéfico mesmo se mantida uma dieta rica em gordura saturada.

Assim, este trabalho se justifica pela contribuição que trará na elucidação de efeitos e mecanismos do ômega-3 em parâmetros inflamatórios, de estresse oxidativo e de metabolismo energético em modelo animal de obesidade. Os resultados poderão contribuir para o aprimoramento na utilização dessa substância para o tratamento da obesidade, bem como poderão servir de evidência para o estímulo ao maior consumo de fontes naturais de ômega-3 por indivíduos obesos. Além disso, hoje já se sabe que o hipotálamo não é a única região cerebral envolvida com o comportamento alimentar, e este estudo expande o foco do estudo da obesidade para outras estruturas cerebrais (hipocampo, córtex pré-frontal e estriado) que até então receberam menor atenção.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Obesidade: definição e epidemiologia

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a obesidade como um acúmulo de gordura anormal ou excessivo que pode prejudicar a saúde do indivíduo⁴⁷. Além do excesso de gordura corpórea, deve-se considerar sua distribuição regional, uma vez que o excesso de gordura localizada na região abdominal está mais associado com disfunção metabólica e, conseqüentemente, com a presença de comorbidades⁴⁸⁻⁵⁰. O acúmulo de gordura na região visceral é fator de risco independente para alterações metabólicas e doenças cardiovasculares, em especial resistência à insulina e dislipidemias⁴⁹.

A prevalência de obesidade está aumentando em todo o mundo⁵¹. Segundo a OMS, ela dobrou desde 1980⁴⁷. Atualmente, a obesidade é considerada uma epidemia e é reconhecida como um dos mais importantes problemas de saúde pública que o mundo enfrenta^{1,51}.

O estudo Carga Global de Doenças (do inglês *Global Burden of Disease*) relatou aumento da prevalência de obesidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento entre 1980 e 2013²⁷. Em 2014, segundo a OMS, em torno de 1,9 bilhões de adultos estavam acima do peso e, entre estes, mais de 600 milhões eram obesos. Em percentual, no mesmo ano, 39% dos adultos com 18 anos ou mais estavam acima do peso e 13% eram obesos. Além disso, 41 milhões de crianças com menos de cinco anos de idade estavam acima do peso ou obesas em 2014⁴⁷. No Brasil, a pesquisa Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (Vigitel), realizada em 2016 e divulgada em 2017, mostrou que a prevalência de sobrepeso passou de 42,6% em 2006 para 53,8% em 2016, e de obesidade passou de 11,8% em 2006 para 18,9%, em 2016⁵².

Esses dados se mostram muito preocupantes pelo fato de a obesidade ser, simultaneamente, uma doença e um fator de risco importante para várias outras doenças, tais como doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, doenças respiratórias, alterações músculo-esqueléticas e alguns tipos de câncer, impactando a qualidade de vida e a longevidade da população^{1,47,51,53,54}. Além disso, ainda há o impacto econômico da obesidade, haja vista que os custos totais decorrentes da obesidade e doenças relacionadas são significativos e crescentes para os sistemas de saúde e para a sociedade⁵⁵.

1.1.2 Fisiopatologia da obesidade

Após a revolução industrial, o estilo de vida de grande parte da população mundial sofreu profundas mudanças. O avanço das ciências, a melhoria da higiene e da saúde pública, além da maior oferta de empregos e alimentos, possibilitaram um aumento expressivo da expectativa de vida⁵⁶. Por outro lado, a facilidade de acesso e o baixo custo de alimentos altamente palatáveis e com grande densidade calórica, aliados ao menor requerimento de atividade física na vida diária, fizeram com que a prevalência de obesidade aumentasse significativamente em todo o mundo^{47,57}.

Apesar de outros fatores, tais como genéticos, psicológicos⁵⁰, e inclusive infecciosos⁵⁸, estarem envolvidos na etiologia da obesidade, as mudanças nos padrões de alimentação e atividade física das últimas décadas, como o consumo excessivo de alimentos, ou de alimentos altamente energéticos, e o sedentarismo são considerados os principais fatores relacionados com a gênese da obesidade⁴⁷. Portanto, a obesidade é resultado de um desequilíbrio entre consumo e o gasto energético^{2,59}. O excesso de substrato é armazenado na forma de triglicerídeos em células denominadas adipócitos, que formam o tecido adiposo⁵⁹. O tecido adiposo responde ao consumo em excesso de nutrientes pela hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos⁶⁰. Desta forma, a obesidade é caracterizada pelo aumento no armazenamento de ácidos graxos em uma massa expandida de tecido adiposo⁴.

A ingestão alimentar e o gasto energético são controlados por sistemas neurais, que recebem sinais aferentes desde o sistema digestório passando pelo tecido adiposo e chegando às estruturas centrais^{61,62}. Hormônios circulantes e estímulos vagais informam ao SNC sobre o estado nutricional e a energia de todo o corpo. Acredita-se que a leptina e a insulina estão envolvidas na regulação a longo prazo do balanço energético, enquanto que hormônios gastrointestinais e aferentes vagais representam um mecanismo de regulação de curto prazo. Estes hormônios atuam em conjunto em circuitos neurais específicos em diferentes regiões do cérebro, em especial no hipotálamo, estabelecendo interações que regulam o equilíbrio energético⁶².

A leptina é produzida pelo tecido adiposo branco e a insulina pelas células beta pancreáticas¹⁹. A produção e concentração sérica de leptina são proporcionais à massa de tecido adiposo, sendo que ela informa ao cérebro sobre os estoques energéticos^{61,63}. A insulina, em adição aos tecidos-alvo clássicos para a ação deste hormônio, tais como o fígado, músculo e tecido adiposo branco, atua no hipotálamo desempenhando um papel na manutenção do equilíbrio energético, na regulação lipídica periférica e no metabolismo da glicose⁶⁴. No entanto, enquanto os níveis circulantes de leptina e insulina aumentam na obesidade, uma resistência para ambos os hormônios se desenvolve^{19,63}.

1.1.2.1 Inflamação na obesidade

Na obesidade, o tecido adiposo branco se modifica devido ao aumento dos níveis de triglicerídeos. Os pré-adipócitos se diferenciam e os adipócitos aumentam de tamanho, levando a capacidades de armazenamento aprimoradas⁶⁵. Ao lado de seu papel importante no armazenamento de energia, o tecido adiposo é um importante órgão endócrino^{4,66}. Este tecido produz moléculas bioativas, como por exemplo as citocinas, que quando são secretadas pelo tecido adiposo são denominadas adipocinas (ou adipocitocinas), e não só servem como reguladores do metabolismo sistêmico, mas também possuem propriedades imunomoduladoras⁶⁶⁻⁶⁸.

A obesidade leva a alterações na produção de adipocinas⁴. Com o aumento progressivo dos adipócitos e expansão do tecido adiposo, o fornecimento de sangue pode ser reduzido, com consequente hipóxia. A hipóxia está relacionada com necrose e com infiltração de macrófagos no tecido adiposo⁶⁹. O aumento do armazenamento de triglicerídeos no tecido adiposo, com sua consequente expansão, também leva à ativação de vias pró-inflamatórias, especialmente pelo fator nuclear kappa B (NFkB). Além de aumentar o número de macrófagos, a obesidade induz um estado pró-inflamatório nestas células, e por sua vez, estes macrófagos ativados secretam abundantemente adipocinas pró-inflamatórias³.

Os macrófagos residentes, que no tecido adiposo magro exibem polarização semelhante ao fenótipo tipo M2 (ativação alternativa) e secretam citocinas anti-inflamatórias como a interleucina-10 (IL-10), mudarão para a polarização semelhante ao fenótipo tipo M1 (ativação clássica), resultando na expressão de mediadores pró-inflamatórios e no recrutamento de monócitos circulantes^{65,67}. Os macrófagos infiltrados formam estruturas semelhantes a coroas que cercam os adipócitos, o que leva a uma produção excessiva de adipocinas, que incluem mediadores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-1 β (IL-1 β)^{4,5,70}.

O TNF- α também induz a lipólise, que acarreta na liberação de ácidos graxos livres. Os ácidos graxos saturados, por sua vez, se ligam ao receptor Toll-like 4 (TLR4) na superfície de ambos os adipócitos e macrófagos e ativam ainda mais a sinalização de NFkB, o aumento da produção de TNF- α e de outras adipocinas pró-inflamatórias, como por exemplo a IL-1 β ^{3,65,66}. Semelhante ao TNF- α , estudos mostraram aumento

nos níveis de IL-1 β na obesidade^{6,70-72}. A Figura 1 ilustra as alterações que ocorrem no tecido adiposo na obesidade.

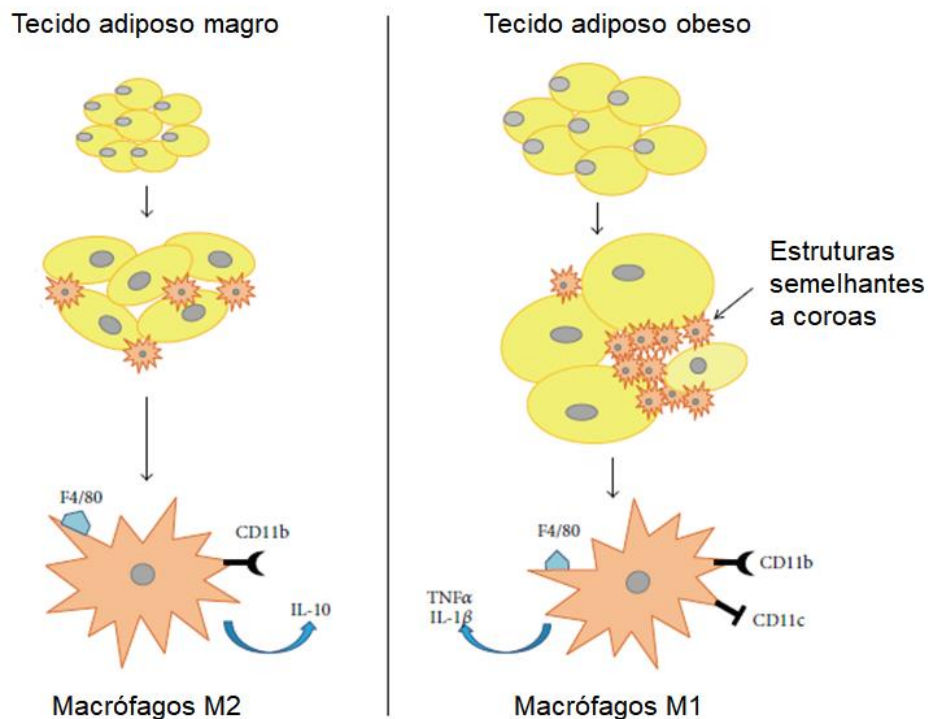


Figura 1 – Alterações do tecido adiposo na obesidade.

Fonte: Adaptado de Patel, Buras e Balasubramanyam⁷⁰.

Desta forma, a obesidade é caracterizada por uma inflamação crônica de baixo grau, detectada pela elevação de marcadores e citocinas inflamatórias e pela presença de macrófagos infiltrados no tecido adiposo branco^{5,66,73}. A inflamação é normalmente uma resposta fisiológica a uma infecção ou lesão e é rapidamente resolvida para evitar danos nos tecidos⁹. No entanto, na obesidade, embora a inflamação seja de baixo grau, ela persiste¹⁹. Esta inflamação crônica de baixo grau no tecido adiposo se propaga a uma inflamação sistêmica e contribui para o início e progressão das doenças/alterações metabólicas associadas, tais como resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2, hiperlipidemias e aterosclerose⁶⁷.

Além disso, a '*overnutrition*', ou seja, o excesso de consumo de alimentos, foi reconhecido como não apenas um fator que contribui para a obesidade, mas também como um estímulo ao sistema imune inato que causa uma inflamação atípica. A alimentação pode ter um efeito imediato sobre os marcadores de inflamação circulantes, visto que poucas horas depois da ingestão de uma refeição com alto teor de gordura, um aumento transitório nos marcadores inflamatórios é visto na

circulação¹⁹. Neste sentido, os componentes alimentares mais amplamente estudados na indução de inflamação são os ácidos graxos saturados⁷⁴. Além do aumento de citocinas pró-inflamatórias na circulação, como consequência do recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo branco, os ácidos graxos saturados consumidos em excesso na dieta ativam as vias imunitárias inatas por meio da ligação e ativação do receptor Toll-like (TLR)²⁸. A ativação dessa resposta inflamatória não ocorre apenas nos tecidos periféricos, mas também no SNC^{28,75}.

1.1.2.2 Obesidade e sistema nervoso central

Atualmente, sabe-se que a obesidade não leva apenas a alterações em tecidos periféricos, mas também no SNC^{14,15,76}. Uma dieta rica em gordura pode levar à obesidade e consequente inflamação crônica periférica, onde há liberação de citocinas. Isto por sua vez tem efeitos deletérios sobre a funcionalidade cerebral, como por exemplo, alteração da barreira hematoencefálica (BHE) e neuroinflamação. A inflamação periférica e aumento de permeabilidade da BHE leva a migração de leucócitos para o cérebro, o que agrava a neuroinflamação⁷⁷.

Células imunitárias periféricas podem ser recrutadas para o SNC de um modo semelhante aos macrófagos recrutados para o tecido adiposo branco na obesidade⁷⁸. Este recrutamento/migração de células imunológicas periféricas para o SNC, pode propiciar a ativação de células gliais, como micróglia e astrócitos, que tem um papel fundamental na resposta inflamatória no SNC^{75,79}. De fato, foi demonstrado que uma alimentação rica em gordura e a obesidade estão associadas com a ativação de micróglia e de astrócitos^{18,75,80,81}.

O primeiro local do SNC onde uma resposta altamente reativa pode ser detectada quando animais são expostos a uma dieta hipercalórica é uma região cerebral denominada hipotálamo^{18,75}. A resposta reativa é caracterizada por reatividade glial, secreção de citocinas e aumento de níveis de sinais inflamatórios intracelulares⁷⁵.

O hipotálamo contém uma variedade de células gliais, incluindo micróglia e astrócitos, além de grupos de neurônios que fazem o controle homeostático do balanço energético⁷⁵. Esta complexa rede recebe informações de fatores transmitidos pelo sangue, posicionando o hipotálamo como um sensor metabólico⁷⁵.

Assim, considerando que o hipotálamo integra múltiplos sinais metabólicos de órgãos periféricos, modulando o comportamento alimentar e metabolismo energético, falhas neste sistema podem estar relacionadas à obesidade^{19,26,82}. Neste contexto, foi identificado que o consumo em excesso de gorduras saturadas (presentes nas carnes bovina e suína, leite, queijos e manteiga) causa um processo inflamatório no hipotálamo, o que acaba influenciando o funcionamento desta estrutura cerebral, podendo alterar a regulação da fome e saciedade e levar a um desequilíbrio entre a ingestão de alimentos e o dispêndio energético^{17-19,26,83}.

O hipotálamo responde rapidamente a desafios metabólicos, como por exemplo uma dieta hipercalórica⁷⁵. O excesso de consumo calórico provoca inflamação hipotalâmica, o que por sua vez desregula a homeostase entre a ingestão e o gasto energético, além de alterar a secreção e sensibilidade à insulina^{15,18}. Ao contrário da inflamação nos tecidos periféricos, um processo que se desenvolve ao longo de semanas de alimentação rica em gordura em modelos de estudo em roedores, os marcadores de inflamação hipotalâmica são elevados dentro de 1 a 3 dias de exposição à dieta rica em gordura, antes do ganho de peso^{18,75}. Portanto, além das citocinas inflamatórias circulantes observadas na obesidade (como TNF- α e IL-1 β), o excesso de nutrientes por si só também ativa vias inflamatórias intracelulares em uma variedade de células alvo^{70,71}. Desta forma, a dieta, ao invés do aumento da adiposidade, pode ser a causa primária da inflamação hipotalâmica⁷⁵.

Milanski e colaboradores⁸³ verificaram que os ácidos graxos saturados ativam os receptores do tipo Toll-like – receptor Toll-like 2 (TLR2) e TLR4 – no hipotálamo, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e interleucina-6 (IL-6) e, conseqüentemente, podendo sinalizar vias que levam à destruição de neurônios responsáveis pelo controle do apetite. Outros estudos também identificaram e descreveram a inflamação hipotalâmica na obesidade em roedores^{17,84}. Em seres humanos, Thaler e colaboradores¹⁸, utilizando ressonância magnética, encontraram evidências de aumento de gliose no hipotálamo mediobasal de obesos, sugerindo que, de forma semelhante ao que ocorre em roedores com obesidade induzida por dieta com alto teor de gordura, a obesidade em humanos está associada à lesão neuronal no hipotálamo.

Mais recentemente, a neuroinflamação derivada da obesidade demonstrou afetar outras estruturas cerebrais⁶⁵. O hipotálamo se comunica com outras áreas cerebrais, como por exemplo as que compõe os sistemas de memória e emoção e de

recompensa^{25,59}. Portanto, embora o hipotálamo seja crítico para o controle homeostático da alimentação, outras áreas cerebrais também desempenhem papel importante na obesidade^{25,59}.

O processo inflamatório resultante do consumo em excesso de calorias na dieta (em especial dietas ricas em gordura) e consequente obesidade também está associado ao comprometimento do hipocampo, estrutura cerebral relacionada com cognição, memória, aprendizagem e emoções^{15,79,85,86}. Neste contexto, Jeon e colaboradores⁸⁷ mostraram que dieta com alto teor de gordura promove um aumento na expressão do TNF- α no hipocampo de camundongos, assim como ativa a micróglia. Boitard e colaboradores²⁰ relataram que a ingestão de dieta com alto teor de gordura promoveu aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo de roedores, o que contribui para danificar os processos envolvidos com a memória. Estudo conduzido por Dutheil e colaboradores⁸⁸ mostrou aumento dos níveis de TLR4 e da expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) no hipocampo de ratos alimentados com dieta rica em gordura.

Assim, observa-se que a função cognitiva também pode ser prejudicada pela alta ingestão de gordura e pela obesidade^{65,79,89}. A Figura 2 ilustra os efeitos da obesidade na função cognitiva.

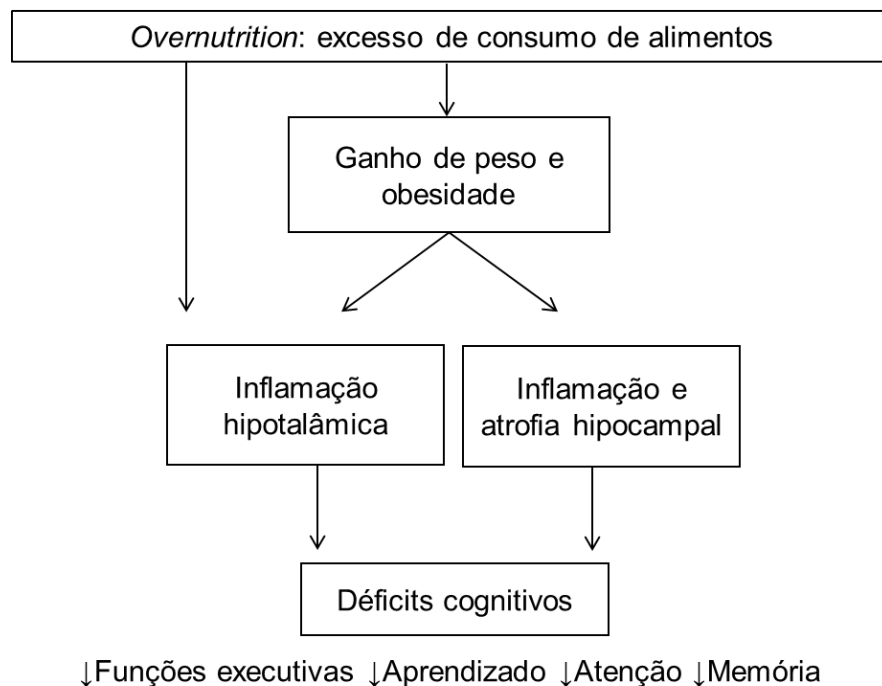


Figura 2 – Efeitos da obesidade na função cognitiva.

Fonte: Adaptado de Shefer, Marcus e Stern¹⁵.

Estudos também mostraram relação entre a obesidade e o sistema de recompensa, destacando anormalidades em regiões como córtex pré-frontal e estriado^{23-25,90-92}. O sistema de recompensa cerebral desempenha um papel importante na ingestão alimentar^{61,93}. Alimentos com muita energia e saborosos provocam respostas semelhantes em regiões cerebrais relacionadas a recompensas, semelhante a substâncias viciantes⁹⁴. O córtex pré-frontal está implicado no sistema neural necessário para tomar decisões, avaliando-se as consequências futuras. Pacientes obesos podem ser mais sensíveis às propriedades de recompensa do alimento do que às consequências negativas futuras de determinadas escolhas alimentares, tornando-se propensos a comer mais por impulso que pela tomada de decisão⁹⁵.

No geral, os alimentos pouco saborosos não são consumidos em excesso, enquanto alimentos palatáveis (ricos em gordura e açúcar) são consumidos mesmo após as necessidades energéticas terem sido atingidas⁹³. O prazer obtido por meio da ingestão de alimentos palatáveis é uma motivação que em certos indivíduos pode se sobrepor aos sinais homeostáticos (regulação hormonal e controle hipotalâmico), levando o indivíduo a comer além de suas necessidades e, assim, promovendo o aumento de peso^{61,96}. Denis e colaboradores⁹⁷ mostraram que os neurônios hipotalâmicos proteína relacionada ao gene agouti (AgRP) conduzem o comportamento alimentar apenas em uma dieta equilibrada, pois quando uma dieta altamente palatável é introduzida a camundongos, estes neurônios se tornam dispensáveis e o circuito hedônico opera sozinho, reforçando que os aspectos gratificantes e recompensadores dos alimentos podem se sobrepor ao controle hipotalâmico.

Existem duas teorias sobre como o sistema de recompensa pode estar alterado na obesidade: hiporresponsividade e hiper-responsividade²⁵. A teoria da hiporresponsividade defende que alguns indivíduos possuem uma menor sensibilidade para recompensas (por exemplo menos receptores de dopamina) e por isso consomem quantidades de alimentos em excesso para superar este déficit de recompensa, ou seja, alcançar o mesmo nível de recompensa^{25,94}. Neste contexto, estudo de Geiger e colaboradores⁹⁸ mostrou redução dos níveis de dopamina no córtex pré-frontal medial e no estriado de ratos propensos à obesidade. Em humanos, Stice e colaboradores⁹⁹ mostraram que o ganho de peso é associado a uma resposta

reduzida no estriado a alimentos palatáveis, o que sugere baixa sensibilidade nos circuitos de recompensa.

Na outra teoria, a exposição a alimentos altamente gratificantes resulta em hiper-responsividade, o que leva os indivíduos a procurar alimentos com mais frequência e em maior quantidade. Esta teoria sugere que indivíduos obesos têm uma resposta de recompensa aumentada aos alimentos altamente gratificantes, mas após o aumento do consumo de alimentos, isso leva a uma resposta diminuída, e isso leva a uma maior ingestão alimentar ao longo do tempo para alcançar a recompensa esperada²⁵. Essas duas hipóteses são difíceis de testar em seres humanos, mas ambas as teorias mostram o envolvimento dos sistemas de recompensa no apetite desregulado na obesidade²⁵.

A partir do exposto observa-se que os circuitos/estruturas cerebrais que controlam a alimentação/consumo alimentar em seres humanos não são regulados somente pelos mecanismos homeostáticos (hipotálamo), mas também pela recompensa, emoção, memória, atenção e sistemas de controle cognitivo^{25,95}. Estes circuitos interagem para controlar o consumo e o gasto energético²⁵ (Figura 3).

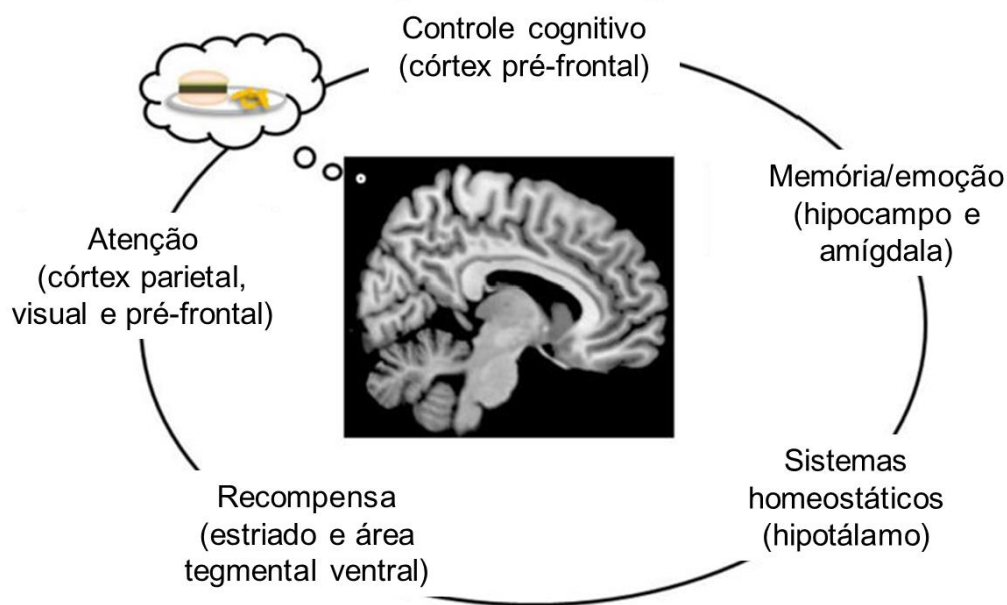


Figura 3 – Estruturas cerebrais envolvidas no controle do consumo alimentar.

Fonte: Adaptado de Farr et al.²⁵.

1.1.2.3 Estresse oxidativo na obesidade

Diversos mecanismos relacionados ao processo inflamatório que ocorre na obesidade, como o aumento de citocinas pró-inflamatórias e a infiltração de leucócitos, podem aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e levar a danos oxidativos^{9,100-102}. A Figura 4 esquematiza este processo.

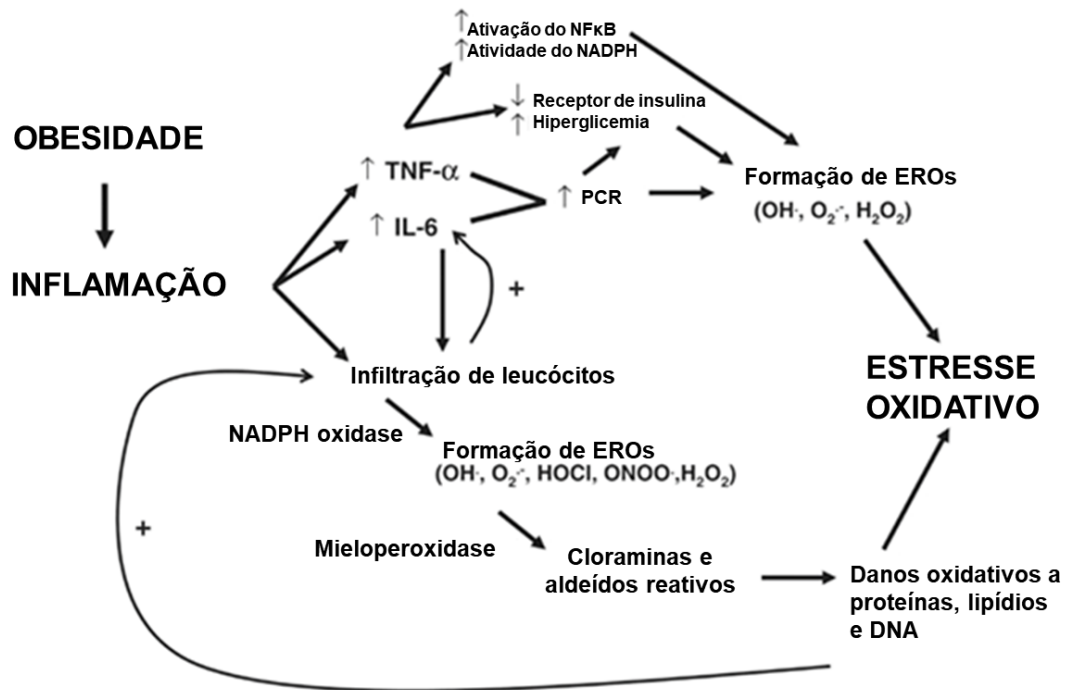


Figura 4 – Vias inflamatórias que induzem estresse oxidativo na obesidade. Na obesidade, os níveis de adipocinas aumentam e levam à formação de EROs, por meio de diversas vias intracelulares. A infiltração de leucócitos também leva à formação enzimática de EROs. A produção em excesso de EROs pode levar a danos oxidativos.

Fonte: Adaptado de Vincent e Taylor¹⁰⁰.

As EROs podem ser divididas em dois grupos: os radicais livres e as espécies não radicalares. As EROs com maior significância fisiológica são o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) – radicais livres – e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) – espécie não radicalar. As EROs podem reagir com outras moléculas importantes e causar danos a lipídios, a proteínas e ao ácido desoxirribonucleico (DNA)¹⁰³.

Por conseguinte, tendo em vista a produção contínua de EROs durante os processos metabólicos, o organismo dispõe de um sistema antioxidante que tem o

objetivo de limitar os níveis de tais espécies e controlar os danos decorrentes. Esse sistema é dividido em não-enzimático e enzimático. O sistema de defesa não-enzimático inclui compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais se destacam: vitamina E, vitamina C, carotenóides, ácido úrico e polifenóis. Os principais antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx)^{103,104}. A glutathiona (GSH) é também um importante antioxidante, visto que é utilizada como substrato pela GPx, e também tem, portanto, um papel chave no sistema de defesa antioxidante¹⁰⁵.

A enzima SOD, por meio da reação de dismutação, catalisa a geração de H_2O_2 a partir do radical $O_2^\bullet$. As enzimas CAT e GPx agem com o propósito de impedir o acúmulo de H_2O_2 , pois o convertem em água. Tal ação é de grande importância, pois este acúmulo possibilita, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, a geração do $OH^\bullet$, contra o qual não há sistema enzimático de defesa^{103,104}. A GPx reduz o H_2O_2 à água, no entanto o faz à custa da conversão da GSH em glutathiona oxidada (GSSG)¹⁰⁶ (Figura 5).

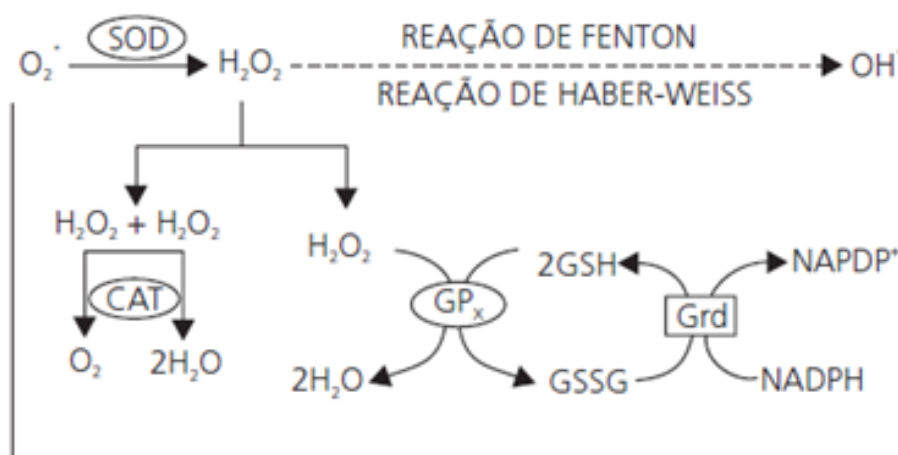


Figura 5 – Sistemas enzimáticos de defesa antioxidante.

Fonte: Barbosa et al.¹⁰⁶.

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre do desequilíbrio entre a produção de EROs e defesas antioxidantes, em favor da produção excessiva das EROs ou em detrimento da velocidade de remoção destas pelos antioxidantes¹⁰³. O estresse oxidativo pode levar à oxidação de biomoléculas, tais como lipídios, proteínas e DNA, com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático¹⁰³. Além disso, ao danificar estruturas celulares, o estresse oxidativo pode desencadear ou potencializar uma resposta inflamatória¹⁰¹. Portanto, um

equilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes é essencial para a adequada função dos órgãos e tecidos¹⁰³.

Um aumento na produção de EROs é considerado uma das várias respostas celulares ao excesso de nutrientes na obesidade^{9,10,16,102,107}. O estresse oxidativo pode preceder inclusive o aparecimento da insensibilidade à insulina na obesidade induzida por dieta rica em gordura¹⁰⁸. Além disso, a susceptibilidade ao dano oxidativo em indivíduos obesos pode ser ainda maior devido à redução da atividade de enzimas antioxidantes^{109,110}.

O excesso de EROs pode levar à disfunção mitocondrial^{107,111}. Por outro lado, o consumo excessivo de nutrientes e a obesidade levam a alterações nas mitocôndrias, o que favorece a geração de EROs e o desenvolvimento de estresse oxidativo^{13,102}. Neste contexto, Ma e colaboradores¹¹² identificaram dano oxidativo e disfunção mitocondrial no plasma e no cérebro (tecido cerebral total, sem divisão de estruturas cerebrais) de ratos com obesidade induzida por dieta rica em gordura.

1.1.2.4 Metabolismo energético e disfunção mitocondrial na obesidade

As mitocôndrias desempenham um papel central no metabolismo energético. A função primária das mitocôndrias é a de produzir energia para as células na forma de adenosina trifosfato (ATP) a partir de substratos provenientes da alimentação (carboidratos, lipídios e proteínas)^{113,114}.

Em 1937 Hans Krebs descreveu três estágios na produção de energia a partir da oxidação de alimentos (atualmente o ciclo proposto por Krebs leva o seu nome). No primeiro estágio, as grandes moléculas presentes em alimentos são quebradas em unidades menores (digestão). Os carboidratos são hidrolisados em açúcares simples, como a glicose, os lipídios são hidrolisados em glicerol e ácidos graxos, e as proteínas são hidrolisadas em aminoácidos. Os produtos são então absorvidos pelas células intestinais e distribuídos por todo organismo. No segundo estágio, estas moléculas são degradadas em algumas unidades simples essenciais ao metabolismo, como a acetil coenzima A (acetil-CoA). No terceiro estágio, o ATP é produzido pela oxidação completa da acetil-CoA. O terceiro estágio compreende o ciclo de Krebs (também chamado de ciclo do ácido cítrico e de ciclo do ácido tricarboxílico) e a fosforilação oxidativa, vias finais comuns na oxidação de moléculas energéticas¹¹⁵ (Figura 6).

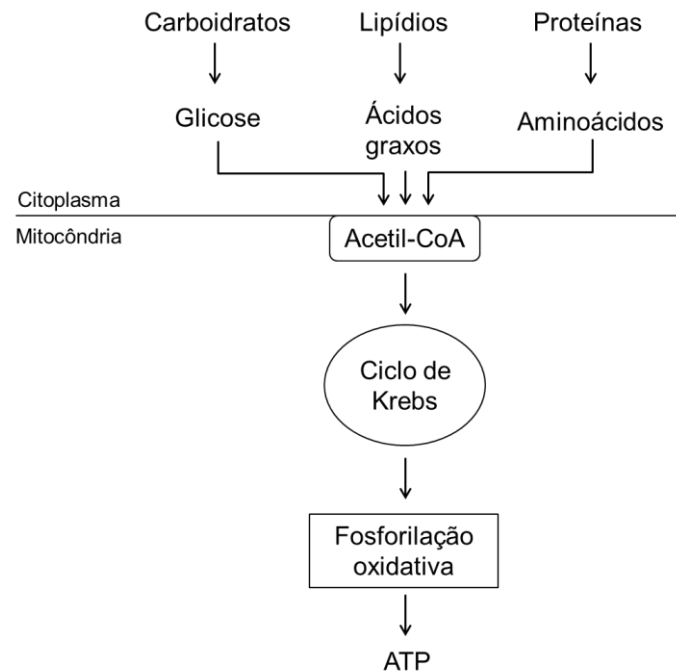


Figura 6 – Metabolismo energético.

Fonte: Adaptado de Berg et al.¹¹⁵.

Os elétrons provenientes dos nutrientes, no processo de inúmeras reações enzimáticas que envolvem a degradação da glicose, ácidos graxos e aminoácidos, são transformados em acetil-CoA. A acetil-CoA, formada pela piruvato desidrogenase a partir do piruvato, é completamente oxidada a dióxido de carbono (CO_2) pelo ciclo de Krebs, por meio de uma série de reações composta por oito passos, sendo que cada uma é catalisada por enzima específica. A enzima citrato sintase forma citrato a partir de oxaloacetato e acetil-CoA, o citrato é isomerizado a isocitrato pela enzima aconitase, o isocitrato é oxidado e descarboxilado a α -cetoglutarato pela isocitrato desidrogenase, o α -cetoglutarato sofre descarboxilação oxidativa (com envolvimento do complexo α -cetoglutarato desidrogenase) e forma succinil coenzima A (succinil-CoA), que pela ação da succinil-CoA sintetase forma succinato, que é oxidado a fumarato pela succinato desidrogenase, que é transformado a malato pela fumarase, que, por fim, é oxidado para formar oxaloacetato a partir da ação da malato desidrogenase^{115,116} (Figura 7).

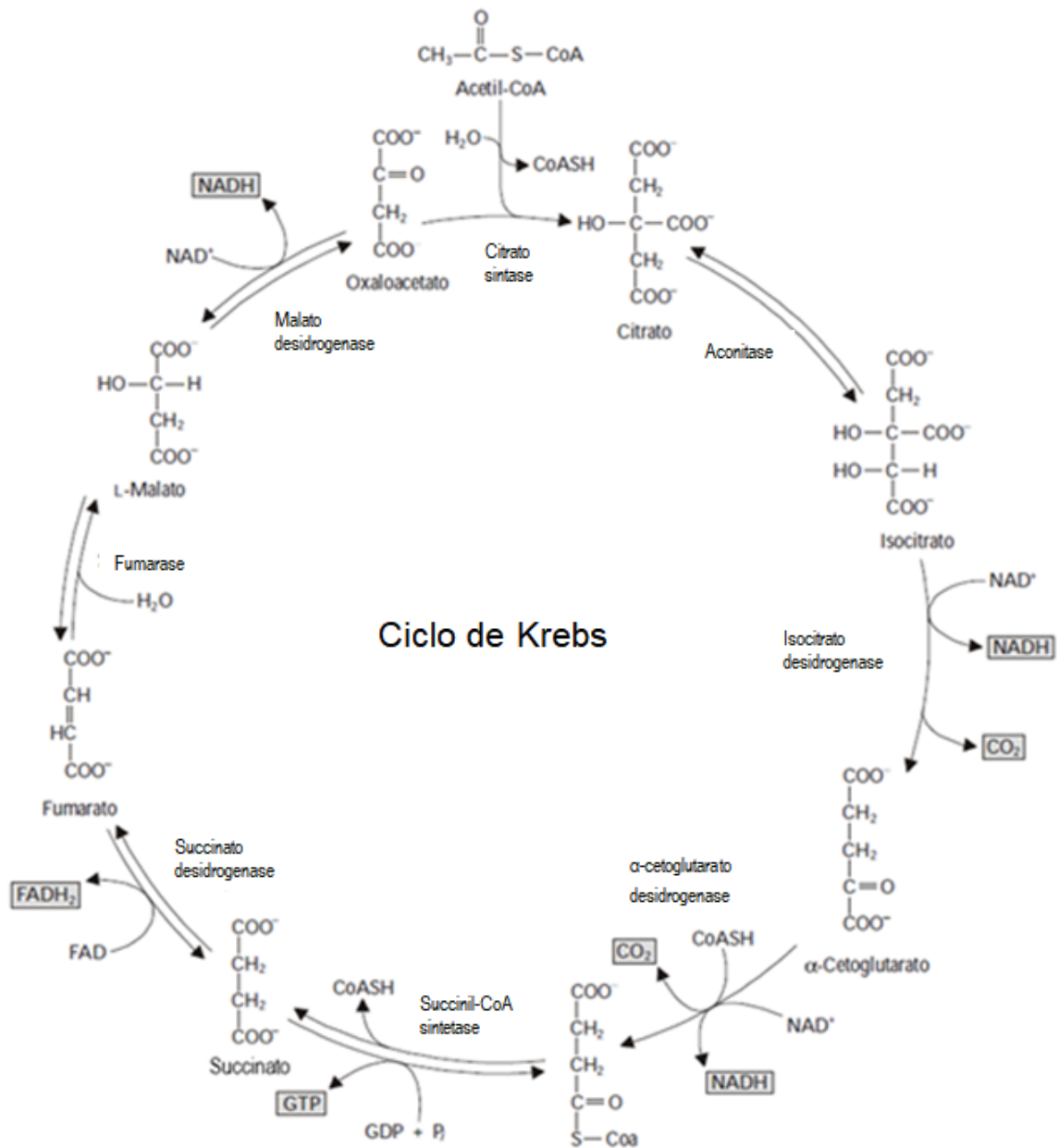


Figura 7 – Ciclo de Krebs. Acetil-CoA: acetil coenzima A; CoASH: coenzima A; CO₂: dióxido de carbono; FAD: flavina adenina dinucleotídeo; FADH₂: flavina adenina dinucleotídeo reduzida; GDP: guanosina difosfato; GTP: guanosina trifosfato; H₂O: água; NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida; P_i: fosfato inorgânico

Fonte: Adaptado de Berg et al.¹¹⁵.

O ciclo de Krebs começa e termina com o oxaloacetato. Uma volta completa no ciclo produz duas moléculas de CO₂, três de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), uma de flavina adenina dinucleotídeo reduzida (FADH₂) e um composto de alta energia – ATP ou guanosina trifosfato (GTP)^{115,116}.

A fosforilação oxidativa é um processo que requer a ação de vários complexos enzimáticos (complexos I, II, III e IV) localizados em uma estrutura da membrana mitocondrial interna denominada cadeia respiratória mitocondrial (ou cadeia de transporte de elétrons)¹¹⁷. O NADH produzido pelo ciclo de Krebs doa elétrons para o complexo I e o FADH₂ doa elétrons ao complexo II. Os elétrons são então transportados do complexo I e do complexo II pela ubiquinona (Ub) ao complexo III e pelo citocromo c ao complexo IV. O último aceptor de elétrons é o oxigênio, que se reduz a água. Esse processo de transporte de elétrons pelos complexos leva a um bombeamento de prótons através da membrana interna da mitocôndria. Esse bombeamento gera um gradiente de prótons, que impulsiona a ATP sintase (ou complexo V) a produzir ATP^{115,117} (Figura 8). Durante a produção de ATP, a cadeia respiratória mitocondrial gera EROs¹¹⁸ (Figura 8), e, portanto, representa a principal fonte de produção destas espécies¹¹⁹.

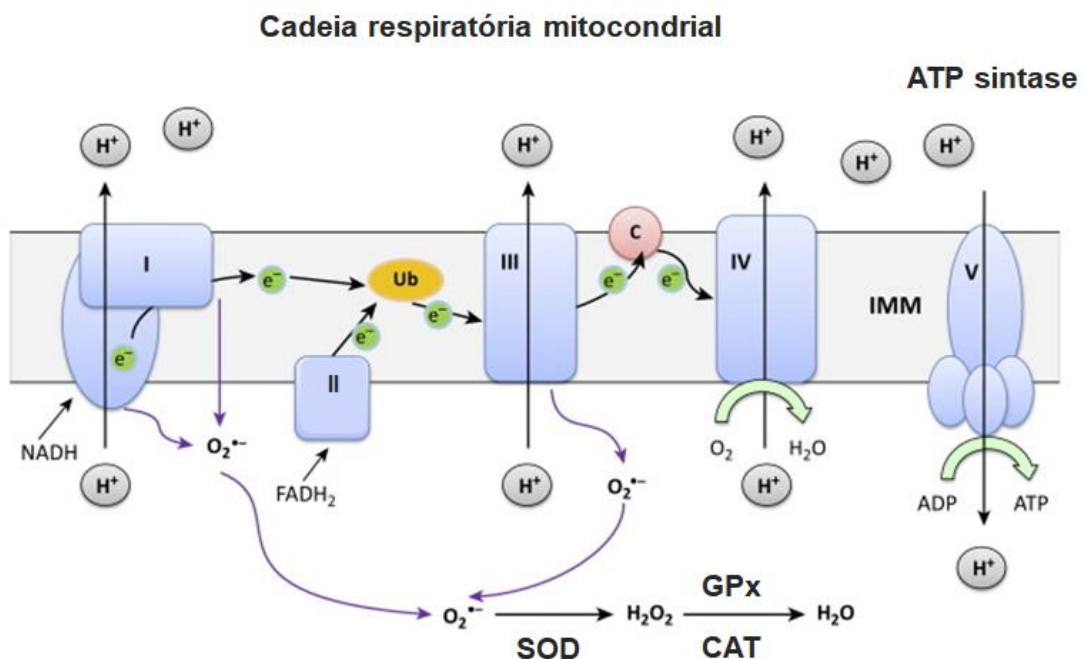


Figura 8 – Cadeia respiratória mitocondrial. ADP: adenosina difosfato; ATP: adenosina trifosfato; C: citocromo c; CAT: catalase; e⁻: elétrons; FADH₂: flavina adenina dinucleotídeo reduzida; GPx: glutatona peroxidase; H⁺: íon hidrogênio; H₂O: água; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; IMM: membrana mitocondrial interna; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida; O₂: oxigênio; O₂^{•-}: ânion superóxido; SOD: superóxido dismutase; Ub: ubiquinona

Fonte: Adaptado de Yu e Bennet¹²⁰.

A ação combinada do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa é responsável pela maior parte da produção de ATP gerada pelos seres humanos (mais de 90%)¹¹⁵. Sem um fornecimento contínuo de ATP, as células são incapazes de realizar suas funções¹²¹.

Alterações em processos relacionados a produção de ATP podem levar à disfunção mitocondrial¹¹⁴. Há evidências de que o consumo em excesso de nutrientes afeta a função das mitocôndrias¹²². Neste contexto, estudos mostraram que a obesidade está relacionada com disfunção mitocondrial^{11-13,123,124}.

Qualquer célula pode ser afetada pela disfunção mitocondrial¹¹⁴. No entanto, em se tratando de obesidade, alguns tecidos foram mais estudados: tecido adiposo, músculo e fígado. O excesso de ingestão de nutrientes leva a altas concentrações de ácidos graxos livres, hiperglicemia, aumento da produção de EROs mitocondrial e causa disfunção mitocondrial em adipócitos¹¹⁴. No tecido adiposo, estudos mostraram que na obesidade há diminuição da biogênese mitocondrial em roedores¹²⁵. Estudos em humanos também identificaram redução da biogênese e da atividade oxidativa mitocondrial no tecido adiposo na obesidade^{12,124}. Em músculo esquelético, foi reportada relação entre obesidade e alterações mitocondriais, tais como redução da função e da massa mitocondrial^{11,13,123,126}. No fígado também foi descrito que a função mitocondrial é prejudicada pela obesidade induzida por dieta¹¹.

Normalmente, menos de 5% do oxigênio recolhido pela mitocôndria é liberado como EROs. No entanto, o comprometimento da função mitocondrial, como visto na obesidade, pode aumentar a produção destas moléculas instáveis e, portanto, resultar em dano a ácidos nucleicos mitocondriais e nucleares, membranas lipídicas e proteínas, e, em especial, às enzimas da cadeia respiratória mitocondrial¹²¹.

Em comparação com os indivíduos magros, as mitocôndrias em indivíduos obesos têm capacidades de geração de energia mais baixas, membranas internas menos definidas e redução da oxidação de ácidos graxos¹¹¹. Além destas, outras anormalidades metabólicas que foram identificadas na obesidade incluem a diminuição da oxidação de gordura e maior dependência de glicose para a síntese de ATP, bem como baixas concentrações basais de ATP. A disfunção mitocondrial também está envolvida em alguns sinais e sintomas da obesidade, incluindo baixo gasto energético, ingestão crônica de alimentos em excesso, bem como a presença de marcadores inflamatórios. Estas alterações não só favorecem o desenvolvimento e a progressão da obesidade, mas também tem implicações no tratamento¹²¹.

Além disso, o consumo excessivo de nutrientes, geralmente visto na obesidade, que leva à disfunção mitocondrial e metabolismo anormal de lipídios e glicose¹¹⁸, também pode levar à indução da cascata inflamatória²⁹. Este processo inicia-se com a sobrecarga mitocondrial de ácidos graxos e glicose, que resulta em um aumento na produção de acetil-CoA. Níveis mais elevados de acetil-CoA resultam em um aumento de NADH gerado a partir do ciclo de Krebs, que aumenta a disponibilidade de elétrons para os complexos da cadeia respiratória mitocondrial, o que estimula uma maior produção de EROs dentro da célula. O estresse oxidativo pode ativar inúmeros fatores de transcrição, incluindo NFκB, que é o principal mediador da resposta inflamatória²⁹.

As mitocôndrias são as principais fontes de energia celular, mas também desempenham um papel central na apoptose^{113,127}. A apoptose é um mecanismo de morte celular programada mediada por um programa de sinalização intracelular que envolve uma variedade de moléculas de sinalização e organelas celulares, incluindo caspases (proteases que executam a morte celular), proteínas ativadoras e inibidoras de caspases e da apoptose¹²⁸. São duas as principais vias apoptóticas: a via extrínseca (morte mediada por receptor ou citoplasmática) e a via intrínseca (mitocondrial)^{113,128}.

O desequilíbrio nutricional (com a alta ingestão calórica) leva à disfunção mitocondrial e maior susceptibilidade à apoptose^{111,127}. O aumento da gordura corporal está associado com um estado pró-apoptótico em tecido adiposo de obesos^{127,129}.

No entanto, o tecido adiposo não é o único local afetado. No SNC, estudo conduzido por Moraes e colaboradores¹⁷ mostrou que a exposição aos ácidos graxos saturados pode levar à apoptose em neurônios hipotalâmicos de roedores. Rivera e colaboradores¹³⁰ mostraram relação entre dieta rica em gordura saturada e presença de apoptose no hipocampo de ratos.

Considerando o exposto, pode-se inferir que todos os mecanismos fisiopatológicos presentes na obesidade abordados neste referencial teórico, como inflamação, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial estão relacionados e podem de alguma forma levar à apoptose celular. Isso pode ocorrer tanto em tecidos periféricos quanto no cérebro. Esta integração está ilustrada na Figura 9.

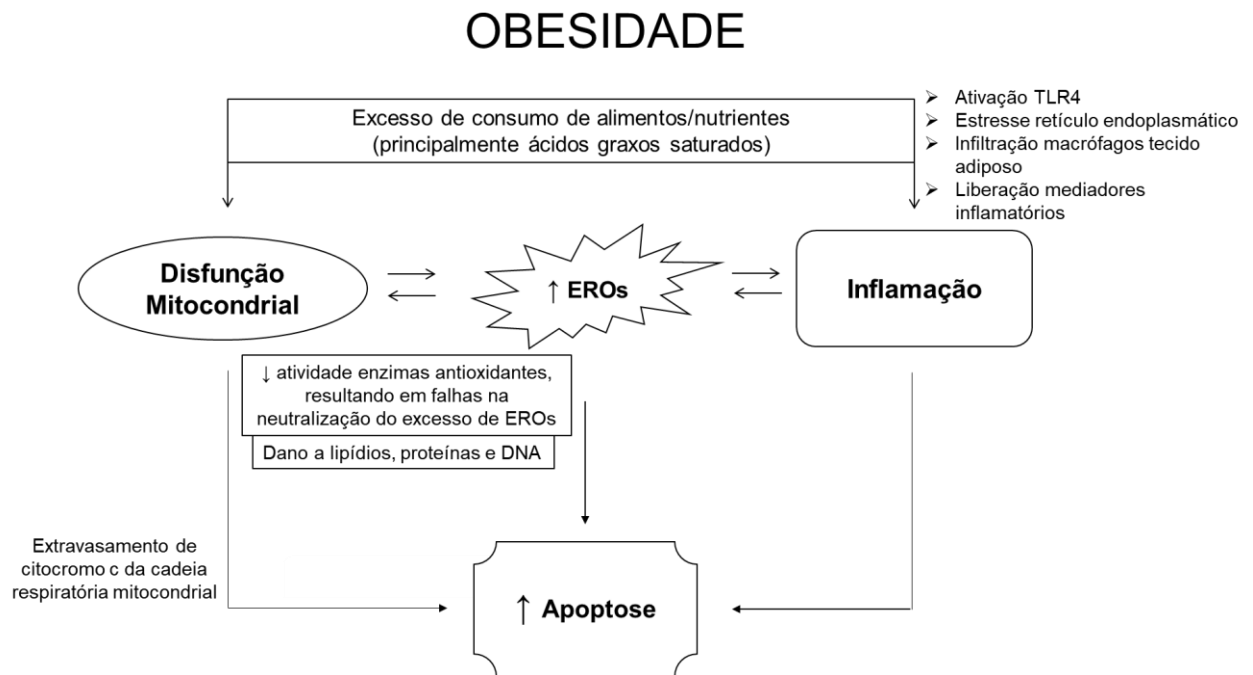


Figura 9 – Disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, inflamação e apoptose na obesidade. Alterações como disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e inflamação, presentes na obesidade, estão relacionadas entre si e podem levar à apoptose celular.

1.1.3 Modelos animais de obesidade

O estudo dos mecanismos relacionados a alterações provocadas pela obesidade pode ser facilitado com a utilização de modelos animais¹³¹. Modelos animais permitem a compreensão de mecanismos intracelulares que não são possíveis em pesquisas com seres humanos e podem levar a alvos importantes para intervenções comportamentais, alimentares e farmacológicas¹⁴.

Existem diferentes modelos animais de obesidade, geralmente pequenos roedores (ratos e camundongos)^{132,133}, que se tornam obesos a partir de mutações genéticas¹³⁴, de induções químicas e também a partir do consumo de dietas hipercalóricas¹³³. No entanto, se o objetivo é que o modelo animal seja o mais próximo possível da gênese da obesidade em humanos, a indução via consumo de dieta com alto valor energético parece ser a mais apropriada, visto que simula o comportamento nutricional humano, ou seja, a obesidade como consequência de um balanço energético positivo gerado pelo consumo de alimentos altamente calóricos^{131,132,135}.

O modelo animal de obesidade induzido por dieta simula a maior disponibilidade de alimentos com alto teor de gordura e elevada densidade energética, principal contribuinte para a obesidade em humanos¹³⁴. Assim, dietas ricas em gordura permitem a caracterização do desenvolvimento da obesidade e a avaliação de intervenções para tratar a obesidade em um ambiente experimental *in vivo* que é fisiopatologicamente muito semelhante à doença em humanos¹³⁶.

Entre as gorduras, foi demonstrado que os ácidos graxos saturados, encontrados principalmente em carnes bovina e suína, são os lipídios mais nocivos quando se trata de acúmulo de massa adiposa⁸³. A ingestão em excesso de ácidos graxos saturados está relacionada com a ativação de diversas vias inflamatórias e, portanto, favorecem o estado pró-inflamatório⁸³.

Para se confirmar a obesidade em modelos animais geralmente se utiliza o peso corporal (aumento com relação ao grupo controle)¹³¹, mas o peso da gordura visceral também pode ser utilizado¹³⁵. Em roedores, a gordura da região mesentérica é amplamente citada como a mais análoga ao tecido adiposo intra-abdominal humano, tanto na sua localização como na biologia¹³⁷. A gordura mesentérica pode contribuir de forma importante para a disfunção metabólica¹³⁸. Além disso, o mesentério contém fibras nervosas autônomas que conectam os gânglios espinhais ao intestino, potencialmente ligando o sistema nervoso e a gordura mesentérica¹³⁹.

Quanto à validade do modelo animal, roedores com obesidade induzida por dieta são considerados um modelo animal válido, pois refletem efeitos da obesidade observados em seres humanos, tais como: aumento de peso corporal (validade de face/aparente), resistência à insulina, alteração de perfil lipídico (validade de construto), assim como redução do peso corporal quando submetidos a tratamento farmacológico que afeta o apetite (como a sibutramina, por exemplo) (validade preditiva)¹³².

1.1.4 Tratamento da obesidade

O tratamento da obesidade é extremamente importante e deve buscar não somente a perda de peso, mas também a saúde metabólica do indivíduo. A implementação de um plano dietoterápico hipoenergético aliado à educação nutricional e ao aumento da atividade física constituem o tratamento convencional e de primeira escolha para a obesidade. O insucesso dessas medidas, principalmente

quanto à manutenção dos resultados, tem enfatizado a necessidade de recursos terapêuticos coadjuvantes^{140,141}. No entanto, a terapia farmacológica tem se mostrado repleta de efeitos adversos graves e muitos medicamentos foram retirados do mercado por exibirem relações risco-benefício desfavoráveis^{51,140,141}.

Assim, tendo em vista o aumento das taxas mundiais de obesidade, bem como as dificuldades de tratamento recorrentes atualmente observadas, estudos se fazem necessários para ampliar as opções de tratamento. Neste contexto, estudos vêm investigando a capacidade dos ácidos graxos ômega-3 neutralizarem alterações metabólicas decorrentes da obesidade^{30,31,37-41}.

1.1.4.1 Ômega-3

Os ácidos graxos ômega-3 (ω -3, n-3 ou w-3) compreendem uma família de ácidos graxos poli-insaturados (com mais de uma ligação dupla) fundamentais para o funcionamento do organismo, denominados ácidos graxos essenciais^{142,143}. A designação ômega está relacionada com a posição da primeira ligação dupla, sendo que os ácidos graxos ômega-3 têm a primeira ligação dupla entre o terceiro e o quarto átomo de carbono¹⁴⁴. Os principais ácidos graxos ômega-3 são o ácido alfa-linolênico (ALA) (18 carbonos, 3 ligações duplas), o EPA (20 carbonos, 5 ligações duplas) e o DHA (22 carbonos, 6 ligações duplas)¹⁴³⁻¹⁴⁵ (Figura 10).

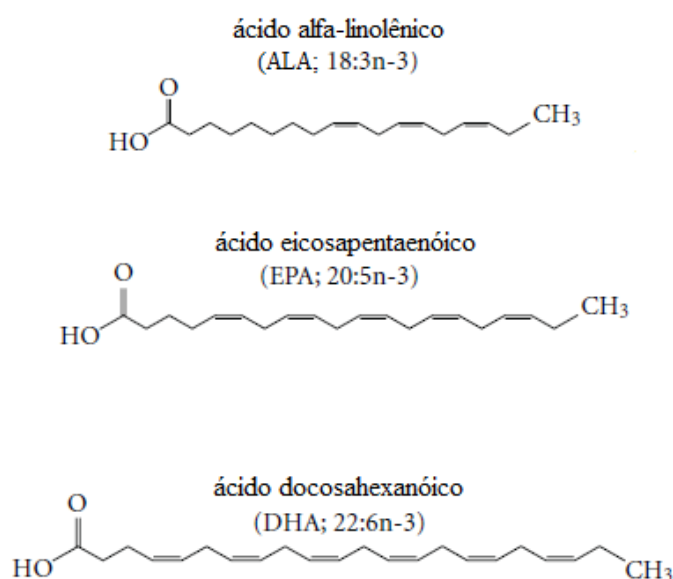


Figura 10 – Estrutura química dos principais ácidos graxos ômega-3.

Fonte: Adaptado de Yates et al.¹⁴⁶.

Os componentes lipídicos, especialmente os ácidos graxos, exercem um papel importante na estrutura das membranas celulares e em processos metabólicos¹⁴⁴. Como os ácidos graxos ômega-3 não podem ser sintetizados pelo organismo, eles precisam ser obtidos a partir de fontes dietéticas^{142,144}. Estas fontes podem ser de origem vegetal, na forma de ALA, ou a partir de algumas espécies de peixes, na forma de EPA e DHA^{142,145,147}.

O ALA, encontrado em linhaça, soja, chia, canola e nozes, pode ser metabolizado em EPA e DHA, pela ação das enzimas *elongase* e *dessaturase*^{144,148} (Figura 11). No entanto, os seres humanos são ineficientes em realizar esta síntese a partir do ALA^{145,149}, dado que estas enzimas são influenciadas por inúmeros aspectos como tabagismo, consumo de álcool, diabetes mellitus, estresse e envelhecimento^{145,148,150}. Os peixes de origem marinha, como sardinha, salmão, atum, cavala e arenque, representam as principais fontes de EPA e DHA^{144,150}.

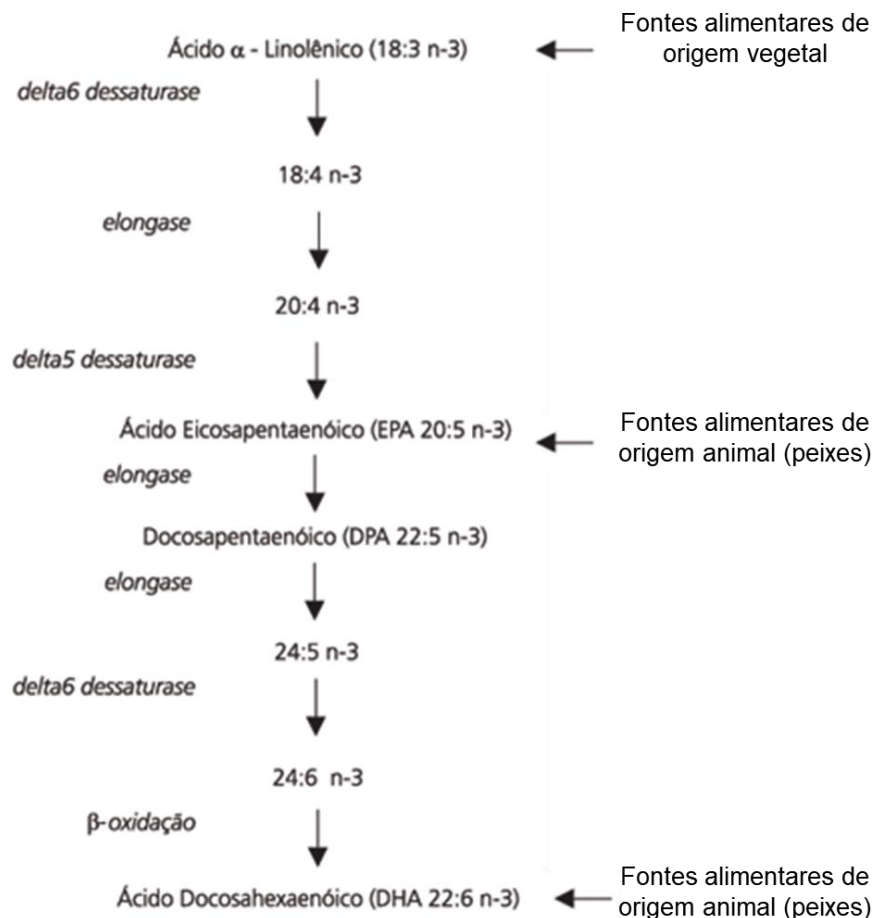


Figura 11 – Metabolismo dos ácidos graxos ômega-3. O ALA pode ser metabolizado em EPA e DHA pela ação das enzimas *elongase* e *dessaturase*.

Fonte: Adaptado de Gómez Candela et al.¹⁴³ e Barceló-Coblijn e Murphy¹⁴⁹.

Os ácidos graxos ômega-3 estão presentes nas membranas celulares, particularmente na bicamada lipídica da membrana plasmática e, dependendo da proporção destes nas membranas, estas podem sofrer alterações de fluidez e, por conseguinte, em suas funções¹⁴³. O DHA, em especial, é um dos componentes mais abundantes nos lípidios estruturais do cérebro^{148,151} e componente-chave das membranas neuronais em locais de transdução de sinal, o que sugere que sua ação é vital para a função cerebral¹⁵¹. A incorporação de EPA e DHA na dieta pode influenciar não só a composição e estrutura lipídica das membranas celulares, mas também as respostas fisiológicas que dependem destas membranas, como é o caso dos mecanismos de sinalização celular^{46,152}.

Estudos demonstraram que os ácidos graxos ômega-3 são capazes de influenciar o cérebro de várias maneiras ao longo da vida. Eles são importantes no início da vida para apoiar o desenvolvimento neural e prevenir alterações do desenvolvimento neurológico e continuam a ser importantes ao longo da vida para a fluidez das membranas celulares, como mediadores inflamatórios e para a saúde cardiovascular¹⁵³.

O ômega-3 derivado do óleo de peixe (EPA e DHA) exerce efeitos importantes nas vias inflamatórias, atuando como anti-inflamatório^{146,147,154,155}. Isso se deve a sua capacidade de interagir com as principais vias de sinalização inflamatórias, assim como ao seu efeito supressor sobre a produção de citocinas^{146,156}. Os mecanismos de ação anti-inflamatórios exercidos pelo EPA e pelo DHA incluem supressão do NFκB (pelo aumento da expressão do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma – PPAR, que previne a translocação do NFκB para o núcleo), redução da produção de eicosanóides, bem como alteração da organização de membranas, particularmente às relacionadas com as funções dos TLRs e na sinalização dos linfócitos T^{150,154,157}. Além disso, as propriedades anti-inflamatórias do EPA e do DHA também são mediadas por meio da inibição das vias de sinalização dos TLRs¹⁵⁷.

O EPA e o DHA exercem os seus efeitos anti-inflamatórios diminuindo também a produção de eicosanóides pró-inflamatórios derivados do ácido araquidônico, bem como servindo como substratos para a produção de mediadores lipídicos com propriedades de pró-resolução, tais como resolvinas, protectinas e maresinas^{157,158}. Esses mediadores lipídicos pró-resolutivos possuem potentes ações imunorreguladoras, visto que ativam mecanismos específicos para promover a resolução da inflamação^{157,158}. Os mediadores derivados do EPA são conhecidos

como resolvinas da série E, e aqueles derivados do DHA são nomeados como resolvinas da série D, enquanto que protectinas e maresinas são derivadas apenas do DHA^{46,157,158}. Os efeitos anti-inflamatórios do EPA e do DHA estão ilustrados na Figura 12.

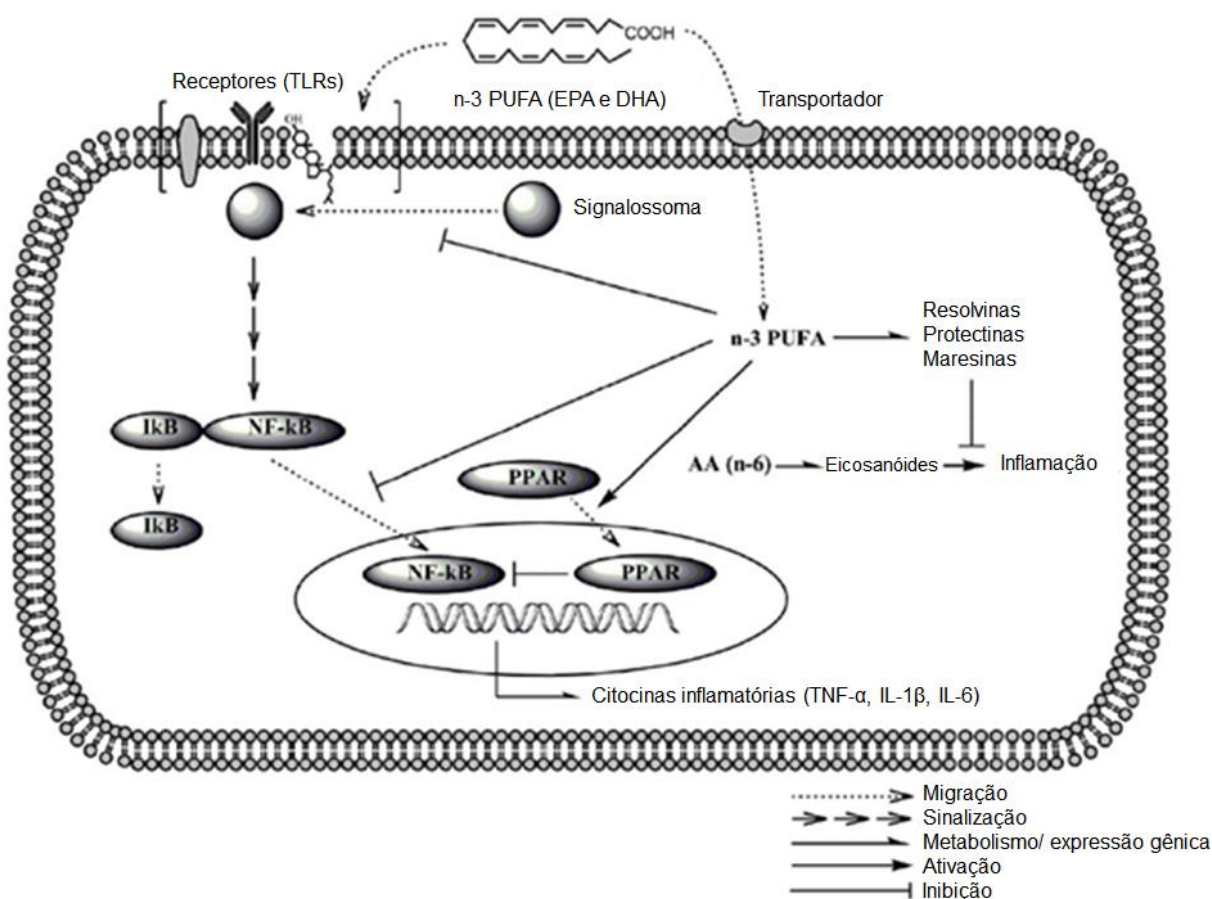


Figura 12 – Efeitos anti-inflamatórios do EPA e do DHA. AA: ácido araquidônico; PUFA: ácidos graxos poli-insaturados

Fonte: Chapkin et al¹⁵⁴.

Além disso, outros efeitos documentados de ômega-3 incluem benefícios cardiovasculares, como redução de triglicerídeos, arritmias cardíacas, pressão arterial e agregação plaquetária^{159,160}. Estudos mostraram ainda que uma dieta enriquecida com ômega-3 pode ser capaz de inibir a neuroinflamação, retardar o estresse oxidativo e a apoptose celular^{42,46,152}. Porém, muitos mecanismos pelos quais o ômega-3 poderia exercer estes efeitos e a relação com muitas doenças, como a obesidade por exemplo, ainda não estão esclarecidos. Dessa forma, considerando que a inflamação e alterações relacionadas estão fortemente ligadas a muitas

doenças crônicas, a ingestão de ômega-3 (principalmente na forma de EPA e DHA) pode desempenhar um papel fundamental na prevenção e/ou no tratamento destas doenças^{31,46,148}.

1.1.4.2 Obesidade e ômega-3

O ômega-3 tem potencial para induzir uma série de efeitos que podem ser úteis para o tratamento da obesidade¹⁶¹. A maior parte dos estudos com ômega-3 e obesidade tem focado em tecidos periféricos, plasma e soro. O ômega-3 tem mostrado diversos efeitos benéficos sobre alterações relacionadas à obesidade em animais, tais como redução no ganho de gordura corporal, melhora do perfil lipídico, da resistência à insulina, da intolerância à glicose e da esteatose hepática, bem como redução da inflamação em tecidos periféricos³²⁻³⁷. O efeito do ômega-3 sobre alterações cerebrais relacionadas à obesidade foi menos estudado, sendo o maior foco dos estudos no hipotálamo. O ômega-3 mostrou efeitos benéficos na modulação da inflamação e função hipotalâmica em roedores⁴³⁻⁴⁵, e inclusive foi capaz de reverter o efeito negativo na expressão gênica do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) causado pela obesidade no hipotálamo de ratos¹⁶². Uma revisão de estudos em animais sobre ômega-3 para a obesidade (e alterações relacionadas) está apresentada na Tabela 1.

Em humanos com excesso de peso ou obesidade, estudos mostraram que o tratamento com ômega-3 pode reduzir a adiposidade, a inflamação (tecido adiposo e soro), os triglicerídeos e o estresse oxidativo no plasma, sugerindo que o ômega-3 pode ser benéfico para auxiliar no tratamento da obesidade^{38,39,163}. Uma revisão de estudos em humanos sobre ômega-3 para a obesidade (e alterações relacionadas) está apresentada na Tabela 2.

Tabela 1 – Revisão de estudos em animais sobre ômega-3 para a obesidade (e alterações relacionadas).

(continua)

Autores	Animais	Grupos / Intervenção	Duração	Tecidos avaliados	Principais resultados (principais efeitos do ômega-3)
Mori et al. ¹⁶⁴	Camundongos C57BL/6J	Expt. 1 (5 grupos): 5%TG, 30%TG, 28%TG + 2%FO, 26%TG + 4%FO, ou 22%TG + 8%FO Expt. 2 (3 grupos): 5%TG, 30%TG or 22%TG + 8%FO	Expt. 1: 5 meses Expt. 2: 2 semanas	Sangue, tecido adiposo, fígado, e mucosa intestinal	↓ gordura hepática e ganho de peso corporal ↑ catabolismo de ácidos graxos no intestino delgado
Rokling-Andersen et al. ³²	Ratos Wistar	Grupo 1: Banha de porco (19.5%) Grupo 2: Ômega-3 (9.1% banha de porco e 10.4% TriomarTM - EPA e DHA)	7 semanas	Plasma, tecido adiposo, músculo e fígado	↓ depósitos adiposos viscerais (sem afetar o peso corporal e a composição corporal) ↓ concentração plasmáticas de lipídios
Samane et al. ³³	Ratos Wistar	Grupo 1: Dieta padrão (controles) Grupo 2: HFHS Grupo 3: HFHS com 6% da gordura substituída por FO Grupo 4: HFHS com 6% da gordura substituída por óleo de argan	4 semanas	Plasma, tecido adiposo, músculo e fígado	FO preveniu o acúmulo de gordura, reduziu a glicemia de jejum e normalizou as respostas glicêmicas ou insulínicas ao teste de tolerância à glicose intraperitoneal. A ingestão de FO também preveniu a resistência à insulina.
Kalupahana et al. ³⁴ e LeMieux et al. ¹⁶⁵	Camundongos C57BL/6J	1) Dieta com 10% de gordura; 2) HFD (45% gordura); 3) HFD-EPA (15% gordura substituído por EPA; prevenção) por 11 semanas; 4) HFD por 6 semanas e HFD-EPA por 5 semanas (reversão)	11 e 5 semanas	Plasma, tecido adiposo e fígado	↓ peso corporal e adiposidade (prevenção) ↓ resistência à insulina, tamanho de adipócitos e infiltração de macrófagos (prevenção e reversão)
Cintra et al. ⁴⁵	Camundongos Swiss e ratos Wistar	Camundongos: 8 semanas de ração padrão ou HFD, e mais 8 com HFD + óleo de linhaça ou azeite de oliva (10, 20 ou 30% da gordura substituída). Ratos: HFD por 8 semanas e injeção icv de albumina, ômega-3, ômega-9 ou ácido esteárico por 1 semana	8 semanas e 1 semana	Sangue, tecido adiposo e hipotálamo	↓ inflamação hipotalâmica ↓ resistência à insulina hipotalâmica e corporal ↓ adiposidade corporal ↓ expressão de proteínas apoptóticas no hipotálamo
Liu et al. ³⁵	Camundongos C57BL/6J	1) 5% óleo de milho (dieta controle) 2) Dieta HFHF 3) Dieta HFHF com 1% fosfolipídios de soja 4) Dieta HFHF com 1% fosfolipídios de EPA	4 semanas	Soro e fígado	↓ acúmulo de gordura corporal ↓ resistência à insulina e glicemia ↓ níveis séricos de TNF-α e IL-6 ↓ esteatose hepática

(continuação)

Autores	Animais	Grupos / Intervenção	Duração	Tecidos avaliados	Principais resultados (principais efeitos do ômega-3)
Ávila et al. ¹⁶⁶	Ratos Wistar	Ração padrão (grupo magro) ou HFD (grupo obeso) por 2 meses. Mais 2 meses, ratos obesos divididos: não suplementados; resveratrol; FO; ou resveratrol + FO	8 semanas	Miocárdio e aorta	↑ atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase e glutathione peroxidase) ↓ produção de superóxido ↓ dano oxidativo a lipídios e proteínas
Pimentel et al. ⁴³	Ratos Wistar	1) Ração balanceada 2) HFD com óleo de soja 3) HFD com FO	8 semanas	Sangue, fígado, músculo gastrocnêmio e hipotálamo	↓ níveis hipotalâmicos de TNF- α e IL-6 ↑ níveis do receptor de IL-10 ↓ TNF- α e IL-6 em músculo e fígado
Rossmesl et al. ³⁶	Camundongos C57BL/6J	1) cHF 2) cHF com 10% lipídios substituídos por ômega-3 (DHA/EPA) 3) cHF com rosiglitazona 4) cHF com ômega-3 e rosiglitazona 5) Ração padrão (controles magros)	7 semanas	Plasma, tecido adiposo e fígado	Prevenção de ganho de peso Prevenção de resistência à insulina ↓ colesterol hepático e plasmático ↓ gordura abdominal ↓ triacilgliceróis plasmáticos ↓ esteatose hepática
Bargut et al. ³⁷	Camundongos C57BL/6J	1) Ração padrão (10% gordura) 2) Ração padrão+FO (10% gordura) 3) HFD (50% gordura/banha de porco) 4) HFD+FO (50% gordura/FO)	8 semanas	Sangue e gordura epididimal	↓ ganho de massa corporal e adiposidade Melhorou tolerância à glicose e sinalização de insulina ↓ resistência à insulina na gordura ↓ inflamação na gordura
Philp et al. ¹⁶⁷	Camundongos C57BL/6J	1) Ração padrão 2) Dieta rica em gordura saturada 3) Dieta rica em gordura saturada com 7,5% substituído por FO	14 semanas	Músculo esquelético e plasma	FO preveniu a disfunção induzida por gordura saturada em vias de metabolismo lipídico em músculo esquelético.
Yook et al. ¹⁶⁸	Camundongos C57BL/6J	Dieta normal ou HFD por 8 semanas, mais 8 semanas de suplementação oral: 1) dieta normal+água; 2) HFD+água; 3) HFD+sebo de carne; 4) HFD+óleo de milho; 5) HFD+FO; ou 6) HFD+MO	8 semanas	Sangue, fígado e gordura epididimal	↓ ganho de peso corporal ↓ peso da gordura epididimal ↓ triglicerídeos e colesterol total ↓ concentrações séricas de insulina e leptina (menores no grupo MO)

(conclusão)

Autores	Animais	Grupos / Intervenção	Duração	Tecidos avaliados	Principais resultados (principais efeitos do ômega-3)
Ferramosca et al. ¹⁶⁹	Ratos Sprague-Dawley	1) Controles (dieta padrão) 2) Grupo HFD (35% gordura saturada e monoinsaturada) 3) Grupo HFD + KO (dieta HFD + 2,5% KO)	4 semanas	Plasma e fígado	↓ triglicerídeos e colesterol ↑ oxidação de ácidos graxos (fígado) ↑ atividade da citrato sintase e dos complexos da cadeia respiratória (fígado)
Abdel-Maksoud et al. ¹⁶²	Ratos Sprague-Dawley	1) Controles (ração normal) 2) Obesos (HFD; 60% gordura saturada) 3) Ômega-3 (HFD; 60% gordura saturada; administração oral de ômega-3 DHA/EPA da 12 ^a à 14 ^a semana)	2 semanas	Sangue e hipotálamo	↓ colesterol total sérico, TG, nível sérico de glicose e índice HOMA Ômega-3 também reverteu o efeito negativo na expressão do gene de BDNF no hipotálamo causado pela obesidade.
Cavaliere et al. ¹⁷⁰ e Viggiano et al. ⁴⁴	Ratos Wistar	1) Dieta controle 2) HFD rica em banha de porco 3) HFD rica em FO	6 semanas	Sangue, músculo esquelético e hipotálamo	↓ massa gorda e ganho de peso corporal ↓ perfil lipídico e resistência à insulina ↑ oxidação lipídica ↓ geração de EROs na mitocôndria ↓ parâmetros pró-inflamatórios
Sá et al. ¹⁷¹	Camundongos C57BL/6J	4 semanas com dieta controle e mais 8 semanas: dieta controle, dieta controle+FO, HFD ou HFD+FO (FO via gavagem; 3 x semana)	12 semanas	Sangue e tecido adiposo (inguinal e retroperitoneal)	FO exerceu efeitos benéficos sobre a dislipidemia e a resistência à insulina FO preveniu alterações induzidas pela HFD no tecido adiposo
Go et al. ¹⁷²	Camundongos C57BL/6J	HFD por 4 semanas para induzir obesidade e 9 semanas adicionais com administração oral de: PBS (controles), MO, FO ou óleo de milho (consumindo dieta normal)	9 semanas	Sangue e fígado	↓ peso (a perda induzida por MO foi a mais significativa). O MO mostrou um aparente efeito inibitório no acúmulo de lipídios no fígado.

↓, redução. ↑, aumento. cHF, Dieta com alto teor de gordura (óleo de milho). Expt., experimento. TG, triacilglicerol. FO, óleo de peixe. HFD, dieta com alto teor de gordura. HFHF, dieta com alto teor de gordura e frutose. HFHS, dieta com alto teor de gordura e sacarose. Icv, intracerebroventricular. KO, óleo de krill. MO, óleo de microalgas. A coluna 'Duração' refere-se ao tempo que o ômega-3 foi testado, não ao experimento completo.

Tabela 2 – Revisão de estudos em humanos sobre ômega-3 para a obesidade (e alterações relacionadas).

Autores	Amostra	Grupos / Intervenção	Duração	Principais resultados (principais efeitos do ômega-3)
Itariu et al. ³⁸	55 pacientes obesos não diabéticos	1) 3,36g ômega-3/dia (EPA e DHA; n=27) 2) manteiga (controle; n=28)	2 meses	↓ expressão gênica de marcadores inflamatórios em tecido adiposo ↑ produção de eicosanóides anti-inflamatórios em tecido adiposo ↓ IL-6 e triglicerídeos
Kiecolt-Glaser et al. ¹⁶³	138 indivíduos de meia-idade e idosos saudáveis, sedentários e com sobrepeso	1) cápsulas de placebo (n=46) 2) 1.25 g/dia ômega-3 (EPA/DHA; n=46) 3) 2.5 g/dia ômega-3 (EPA/DHA; n=46)	4 meses	↓ IL-6 no soro (nas 2 doses) ↓ TNF-α no soro (nas 2 doses)
Kiecolt-Glaser et al. ³⁹	106 healthy sedentary overweight middle-aged and older adults	1) cápsulas de placebo (n=31) 2) 1.25 g/dia ômega-3 (EPA/DHA; n=40) 3) 2.5 g/dia ômega-3 (EPA/DHA; n=35)	4 meses	↓ estresse oxidativo no plasma (avaliado por F2-isoprostanos)
González-Acevedo et al. ⁴⁰	60 mulheres adultas obesas	1) placebo, vitamina E (n=20) 2) 1g ômega-3 (EPA/DHA; n=20) 3) 2g ômega-3 (EPA/DHA; n=20) 3 grupos → dieta e exercício moderado	3 meses	↓ peso corporal, IMC e massa gorda total Essas diferenças foram significativamente maiores no grupo que recebeu 2g de ômega-3.
Juárez-López et al. ⁴¹	201 crianças e adolescentes obesos e resistentes à insulina	1) 500mg de metformina (n=98) 2) 1.8g de ômega-3 (EPA/DHA; n=103)	3 meses	↓ concentrações de glicose e insulina ↓ triglicerídeos ↓ IMC
Haghravan et al. ¹⁷³	50 mulheres com excesso de peso	1) ômega-3 (n=25) ou 2) placebo (n=25). 2 grupos → programa de exercícios aeróbicos e educação dietética	2 meses	↓ peso corporal, porcentagem de gordura corporal, circunferência da cintura e dobra cutânea abdominal. Ômega-3 também melhorou o resultado VO ₂ max.
Ellulu et al. ¹⁷⁴	64 obesos hipertensos e/ou diabéticos	1) ômega-3 (EPA e DHA; n=31) 2) grupo controle (n=33)	2 meses	↓ nível de proteína C reativa de alta sensibilidade ↓ glicemia em jejum ↓ triglicerídeos
Wang et al. ¹⁷⁵	99 diabéticos tipo 2 com obesidade abdominal	1) 4g/dia FO (2,4g ômega-3; n=49) 2) placebo (óleo de milho; n=50)	6 meses	↓ triglicerídeos ↑ HDL-C

↓, redução. ↑, aumento. FO, óleo de peixe. IMC, índice de massa corporal.

Os ácidos graxos ômega-3, especialmente na forma de EPA e DHA, demonstraram poder desempenhar um papel importante no tratamento da obesidade^{157,176,177}. Uma revisão sistemática com meta-análise conduzida por Bender e colaboradores¹⁷⁸ mostrou evidências de que o consumo de peixe ou óleo de peixe encapsulado (ricos em ômega-3) estão relacionados com leves reduções no peso corporal e na circunferência da cintura. No entanto, estes autores concluíram que mais pesquisas são necessárias para esclarecer os possíveis mecanismos pelos quais o ômega-3 pode levar a reduções no peso¹⁷⁸.

Já uma meta-análise conduzida por Du e colaboradores¹⁷⁹ identificou que o óleo de peixe não teve efeito sobre a redução do peso corporal e do IMC em indivíduos com sobrepeso ou obesidade. No entanto, a circunferência da cintura e a relação cintura quadril foram significativamente reduzidas em indivíduos suplementados com óleo de peixe, especialmente quando combinado com modificação no estilo de vida. Os autores concluem que as evidências não provaram que a ingestão de óleo de peixe pode diminuir o peso corporal em adultos com sobrepeso ou obesidade, mas que estes indivíduos podem se beneficiar de redução da gordura abdominal. O estudo também ressalta que os resultados devem ser tratados com cautela e sugerem uma investigação em grande escala durante um longo período para determinar conclusões definitivas¹⁷⁹.

Uma meta-análise mais recente conduzida por Zhang e colaboradores¹⁸⁰ também mostrou que não existe diferença estatisticamente significativa na perda de peso ao se comparar o uso de ômega-3 com placebo, enquanto que o ômega-3 mostrou que pode efetivamente reduzir a circunferência da cintura e os níveis de triglicerídeos em adultos com sobrepeso e obesidade. Os autores também sugeriram mais estudos para explorar e esclarecer esta questão¹⁸⁰.

O ômega-3 (EPA e DHA) pode modular o número de adipócitos, regulando a proliferação, diferenciação e apoptose de adipócitos. O ômega-3 também regula vias relacionadas ao armazenamento e à mobilização de gordura, diminuindo o acúmulo de lipídios e favorecendo o metabolismo oxidativo dos adipócitos ao estimular a biogênese mitocondrial e a oxidação de ácidos graxos. Além disso, o ômega-3 pode modular a sensibilidade à insulina e a utilização de glicose nos adipócitos¹⁵⁸.

Outros mecanismos pelos quais o EPA e o DHA podem ajudar a tratar a obesidade estão relacionados à capacidade destas substâncias inibirem a atividade do NFκB e a sinalização inflamatória mediada pelo TLR¹⁵⁷. O ômega-3 também pode

reduzir a inflamação no tecido adiposo por meio da regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, diminuindo a infiltração de macrófagos M1 e reduzindo a formação de mediadores lipídicos pró-inflamatórios derivados do ômega-6¹⁵⁸. O ômega-3 pode inclusive polarizar macrófagos e micróglias em direção ao fenótipo anti-inflamatório^{181,182}. Além disso, o tratamento com ômega-3 pode aumentar a produção de mediadores lipídicos com propriedades de pró-resolução (resolvinas, protectinas e maresinas) no tecido adiposo^{183,184} e promover a redução da inflamação tanto no tecido adiposo como sistêmica³⁸.

Considerando o exposto, ainda se observa muitas lacunas quanto aos efeitos e possíveis mecanismos pelos quais o ômega-3 poderia auxiliar no tratamento da obesidade. A maior parte dos estudos tem focado em tecidos periféricos, sendo que o SNC tem sido pouco explorado. No SNC, o foco tem sido apenas no hipotálamo, sendo que o efeito do ômega-3 em outras estruturas cerebrais não foi explorado em modelos animais de obesidade. Além disso, o foco da maior parte dos estudos vem sendo o efeito do ômega-3 na inflamação, de forma que alterações relacionadas ao processo inflamatório como estresse oxidativo e disfunção mitocondrial foram pouco explorados. Observa-se também muita diferença nas etapas metodológicas dos estudos, tanto com animais quanto com seres humanos, o que limita e dificulta a comparação e a generalização dos resultados. Alguns estudos ao enriquecer a ração com ômega-3 (óleo de linhaça) reduziram a quantidade de banha de porco ofertada aos animais, simulando uma reeducação alimentar⁴⁵, outros estudos apenas comparam o consumo de dieta rica em ômega-3 com consumo de dieta rica em banha de porco ou óleo de soja, sem indução prévia de obesidade^{43,44}. As revisões sistemáticas com meta-análise têm focado principalmente no peso, e, em geral, após a revisão de literatura, parece-nos que o efeito benéfico do ômega-3 não seria no peso, mas sim na redução das alterações metabólicas relacionadas à obesidade. Portanto, este estudo buscou verificar os efeitos do tratamento com ômega-3 (na forma de óleo de peixe) em parâmetros inflamatórios e bioquímicos (estresse oxidativo e metabolismo energético) em um modelo animal de obesidade sem alteração na dieta, ou seja, verificar se o ômega-3 teria um efeito benéfico mesmo se mantido o consumo em excesso de gordura saturada (Figura 13).

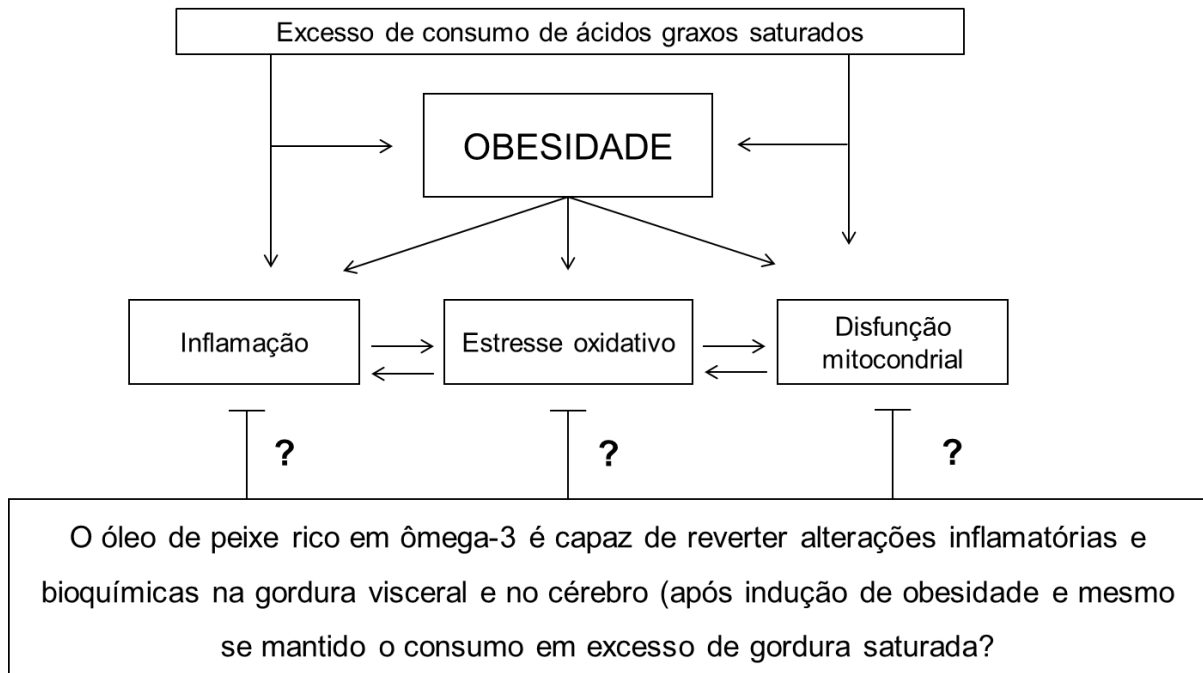


Figura 13 – Relação entre alterações inflamatórias e bioquímicas na obesidade: alvos para a ação do ômega-3.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial nutracêutico do ômega-3 em camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do ômega-3 sobre o consumo alimentar de camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica;
- Avaliar o efeito do ômega-3 sobre o peso corporal e o peso da gordura visceral de camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica;
- Avaliar o efeito do ômega-3 sobre parâmetros inflamatórios (níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-10) no cérebro de camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica;
- Avaliar o efeito do ômega-3 sobre o dano oxidativo a lipídios e a proteínas na gordura visceral e no cérebro de camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica;
- Avaliar o efeito do ômega-3 sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, e sobre os níveis de GSH na gordura visceral e no cérebro de camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica;
- Avaliar o efeito do ômega-3 sobre a atividade de enzimas do ciclo de Krebs (citrato sintase, isocitrato desidrogenase, α -cetoglutarato desidrogenase, succinato desidrogenase e malato desidrogenase) na gordura visceral e no cérebro de camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica;
- Avaliar o efeito do ômega-3 sobre a atividade dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória mitocondrial na gordura visceral e no cérebro de camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

O presente trabalho trata-se de um estudo experimental com modelo animal de obesidade induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 300 camundongos Swiss machos (*Mus musculus*) com 40 dias de idade, pesando inicialmente entre 30-40g, procedentes do Biotério da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram acomodados em gaiolas para camundongos no biotério da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), onde a indução de obesidade foi realizada. Os camundongos tiveram livre acesso à água e ração e foram mantidos em ciclos de claro/escuro de 12 horas cada e temperatura de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Os camundongos foram alojados em gaiolas individuais, a fim de impedir brigas entre eles, bem como para permitir a avaliação do consumo alimentar individual, procedimento recomendado durante a indução de obesidade em animais¹³⁴. Este procedimento de manter camundongos machos isolados é comum em experimentos longos, como a indução de obesidade por exemplo^{45,167}, visto que estes animais podem apresentar agressividade e acabam causando lesões graves que comprometem e invalidam o estudo.

3.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Neste estudo foi induzido um quadro de obesidade em camundongos (a partir do consumo de dieta hiperlipídica por dez semanas) e avaliado o efeito da administração de ômega-3 nas últimas quatro semanas. A Figura 14 resume o delineamento deste estudo.

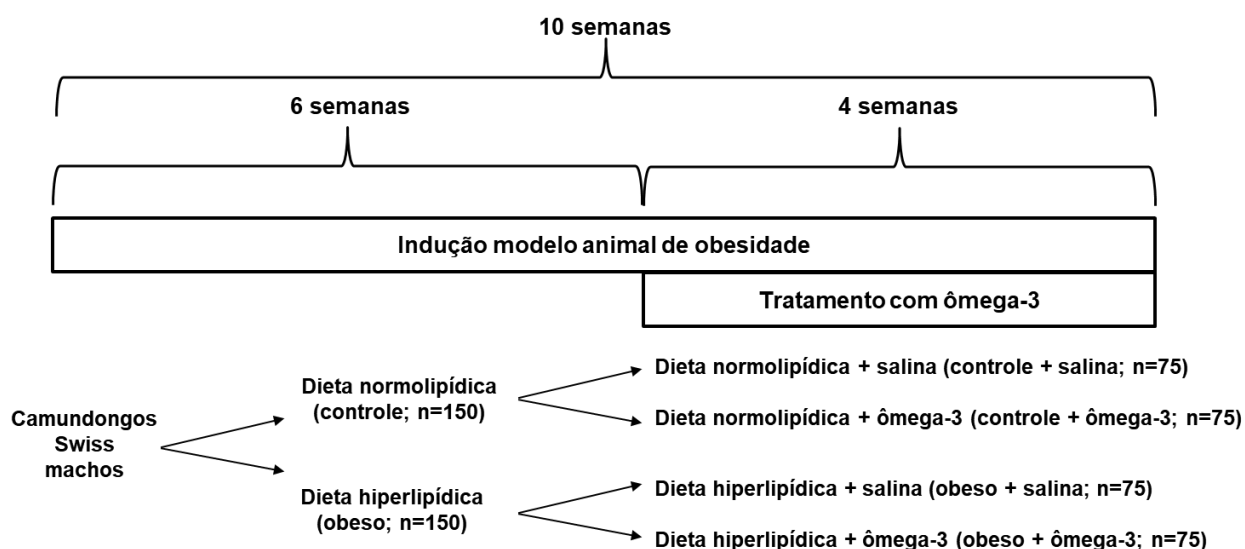


Figura 14 – Delineamento do estudo.

No que diz respeito ao tempo para a indução da obesidade em camundongos por dieta hiperlipídica, existe muita variabilidade nos trabalhos publicados, sendo que, na maior parte deles, o tempo varia de seis a doze semanas^{34,45,131}. No Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos da UNISUL, onde foi realizado este estudo, a indução do modelo animal de obesidade por dieta hiperlipídica foi padronizada em dez semanas. No entanto, estudos prévios realizados no supracitado laboratório (dados não publicados) permitiram observar que com seis semanas de consumo de dieta hiperlipídica os camundongos já apresentaram diferença estatisticamente significativa no peso corporal, o que já permite a introdução de um tratamento. Este procedimento de introduzir o tratamento após seis semanas para estudar se determinadas propostas terapêuticas são capazes de reverter as alterações causadas por dietas hiperlipídicas já foi relatado em estudo prévio conduzido por Kalupahana e colaboradores³⁴. A escolha de quatro semanas de tratamento foi baseada e adaptada a partir de estudos prévios^{35,185}. Apesar do experimento ter uma duração total de dez semanas, não foi possível trabalhar simultaneamente com 300 animais (os animais ficaram alojados individualmente), sendo que foi necessário realizar quatro experimentos de dez semanas cada para completar o tamanho amostral.

O protocolo para indução da obesidade e a composição das dietas também foram baseados e adaptados de estudos prévios^{45,186}. Todos os animais tiveram livre

acesso à água e ração (normolipídica ou hiperlipídica) durante o experimento. No 1º dia de experimento os animais foram pesados e divididos em dois grupos de igual número. Os grupos foram divididos de forma que tivessem média de peso semelhante.

- Dieta normolipídica (grupo controle)
- Dieta hiperlipídica (grupo obeso)

Os camundongos foram mantidos nas respectivas dietas por dez semanas e foram pesados semanalmente. A ração dos animais foi adquirida de empresa especializada em desenvolvimento e produção de dietas padronizadas para experimentação animal (PragSoluções Biociências – PragSoluções Comércio e Serviços Ltda – ME). Os dois tipos de ração (normolipídica e hiperlipídica) foram adquiridos da mesma empresa, visto que os ingredientes e a quantidade de micronutrientes da ração podem variar de uma marca para outra e isso poderia interferir nos resultados do estudo.

Além disso, a ração do grupo controle teve os mesmos ingredientes da ração hiperlipídica, com exceção da banha de porco, fonte de gordura saturada utilizada para induzir obesidade. É recomendado na literatura científica que não se utilize ração padrão para roedores comumente utilizada em biotério (feita com farelo de trigo, milho, soja, entre outros cereais) para os animais do grupo controle em experimentos para induzir obesidade com dieta rica em gordura, visto que ela não é comparável com os ingredientes das dietas hiperlipídicas que são geralmente utilizadas¹⁸⁷.

A dieta hiperlipídica forneceu mais calorias e maior percentual de gordura saturada que a dieta normolipídica. O percentual de gordura saturada em torno de 60%kcal na dieta hiperlipídica é preconizado para a indução da obesidade em camundongos¹³⁴. A composição, o valor calórico e o percentual de macronutrientes das dietas que foram utilizadas estão descritas nos Quadros 1 e 2 na sequência. As informações foram baseadas em laudo fornecido pelo fabricante da ração e em estudos prévios^{45,186}.

Quadro 1 – Composição e valor calórico das dietas utilizadas.

COMPOSIÇÃO E VALOR CALÓRICO A CADA 1000G (1KG) DE RAÇÃO				
	Ração controle		Ração hiperlipídica	
Ingredientes	g/kg	kcal/kg	g/kg	kcal/kg
Amido de milho	427,5	1710	115,5	462
Caseína	200	800	200	800
Sacarose	132	528	132	528
Amido dextrinizado	100	400	100	400
Óleo de soja	40	360	40	360
Banha de porco	-	-	312	2808
Celulose	50	-	50	-
Mix de minerais	35	-	35	-
Mix de vitaminas	10	-	10	-
L-Cistina	3	-	3	-
Bitartarato de colina	2,5	-	2,5	-
Butil hidroxitolueno (BHT)	0,028	-	0,028	-
Total	1000,028	3798	1000,028	5358

Fonte: Adaptado de PragSoluções Biociências, Cintra et al.⁴⁵ e Razolli et al.¹⁸⁶.

Quadro 2 – Percentual dos macronutrientes das dietas utilizadas.

PERCENTUAL DE MACRONUTRIENTES (%kcal)		
	Ração controle	Ração hiperlipídica
Carboidratos	69 %	26 %
Proteínas	21 %	15 %
Lipídios	10 %	59 %

O consumo alimentar foi mensurado a cada 48 horas. A avaliação do consumo alimentar é indicada durante a indução de obesidade em animais¹³⁴, pois pode-se acompanhar a aceitação da dieta, detectar alterações e influências ambientais, bem como acompanhar a relação com a evolução do peso.

Após seis semanas de protocolo de dieta, o peso corporal foi aferido e utilizado para verificar se havia diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Após confirmada a diferença, os camundongos foram randomizados em quatro grupos (com

igual número de animais cada) para o tratamento com ômega-3, nos seguintes regimes, nos quais foram mantidos por quatro semanas:

- Dieta normolipídica + salina (grupo controle + salina; n=75)
- Dieta normolipídica + ômega-3 (grupo controle + ômega-3; n=75)
- Dieta hiperlipídica + salina (grupo obeso + salina; n=75)
- Dieta hiperlipídica + ômega-3 (grupo obeso + ômega-3; n=75)

O número final de animais por grupo foi estabelecido em 75 por conta do tamanho das estruturas cerebrais, sendo que para a maior parte das análises do tecido cerebral foi necessário utilizar cinco animais distintos de cada um dos grupos experimentais (n=15 parâmetros inflamatórios, n=10 dano oxidativo, n=15 defesa antioxidante, n=20 ciclo de Krebs e n=15 cadeia respiratória). O tratamento foi realizado utilizando-se óleo de peixe rico em ômega-3 (contendo 120 mg de DHA e 180 mg de EPA por g de óleo de peixe, marca Performance Science Nutrition, fabricado e distribuído por Performance Trading Imp. Exp. e Com. Ltda.). O óleo de peixe foi administrado diariamente por via oral, com agulha de gavagem para camundongos, na dose de 400 mg/kg. A dose foi baseada em estudo prévio conduzido por Abdel-Maksoud e colaboradores¹⁶², que mostrou que esta dose e estas quantidades de DHA e EPA tiveram efeitos benéficos a nível cerebral. Relativo ao valor calórico do óleo de peixe, o mesmo fornece 9kcal/g, o que considerando a dose administrada aos animais, não adiciona valor calórico relevante à dieta dos animais. Os animais dos grupos 'Controle + Salina' e 'Obeso + Salina' receberam a mesma dose (400 mg/kg) de solução salina (solução isotônica de Cloreto de Sódio a 0,9%).

Durante este período de quatro semanas, os animais continuaram sendo pesados semanalmente. Após a última pesagem, os animais foram mortos por decapitação. O método físico para a morte (decapitação) se justifica pelo fato de que os métodos químicos (fármacos) interferem nas análises bioquímicas que foram realizadas e poderiam, portanto, invalidar o estudo¹⁸⁸.

3.4 CONSUMO ALIMENTAR

O consumo alimentar foi mensurado a cada 48 horas e foi calculado por meio da diferença entre a ração ofertada e as sobras. A média da quantidade consumida

em gramas (média semanal e média total das 10 semanas de experimento) foi transformada em Kcal.

3.5 REMOÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS TECIDOS

Após a morte dos animais, a cavidade abdominal foi aberta e o tecido adiposo da região mesentérica, localizado ao longo do trato intestinal¹³⁷, foi retirado. O cérebro dos animais também foi rapidamente removido e, na sequência, as estruturas cerebrais hipotálamo, hipocampo, córtex pré-frontal e estriado foram isoladas. A gordura visceral e o tecido cerebral foram armazenados a -80°C até serem utilizados nas análises de parâmetros inflamatórios e bioquímicos.

3.6 PESO DA GORDURA VISCERAL

Para mensurar a gordura visceral, o tecido adiposo da região mesentérica foi pesado em balança de alta precisão. Após este procedimento, foi determinada a relação entre o peso do tecido adiposo visceral e o peso do animal. Os resultados foram expressos em g/100g peso corporal.

3.7 PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS

Os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-10 nas estruturas cerebrais foram determinados pela técnica de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) em leitor de microplacas com a utilização de kits comerciais, seguindo as recomendações do fabricante. Os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-10 foram normalizadas pelo conteúdo de proteínas, que foram determinadas conforme método de Lowry e colaboradores¹⁸⁹. Os resultados foram expressos em picogramas por mililitro (pg/mL).

3.8 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

3.8.1 Dano oxidativo a lipídios e a proteínas

O dano oxidativo em lípidos na gordura visceral foi avaliado pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês *thiobarbituric acid*

reactive substances), conforme descrito por Draper e Hadley¹⁹⁰. A formação de TBARS durante uma reação ácido-aquecimento é amplamente adotada como um método sensível para a medição da peroxidação lipídica. Nesta técnica, as amostras foram misturadas com 1 ml de ácido tricloroacético 10% e 1 ml de ácido tiobarbitúrico 0,67%. Posteriormente, foram aquecidas em banho de água fervente (100°C) durante 30 min. Os equivalentes de malondialdeído foram determinados pela absorbância em 532 nm, utilizando-se 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo.

Como índice de peroxidação de lipídios nas estruturas cerebrais foi verificado a formação de malondialdeído, mensurado por cromatografia líquida de alta eficiência (Prominence Shimadzu em coluna Ascentis® C18, 250 x 2.1 mm, 5 µm, Supelco Sigma-Aldrich), conforme descrito por Grotto e colaboradores¹⁹¹.

O dano oxidativo em proteínas, tanto na gordura como no cérebro, foi avaliado pela quantificação de proteínas carboniladas por meio da reação de grupamentos carbonilas em proteínas oxidadas, com base na reação com dinitrofenilhidrazina, conforme método descrito por Levine et al.¹⁹². Nesta técnica as proteínas foram precipitadas por adição de ácido tricloroacético a 20% e dissolvidas em dinitrofenilhidrazina. A absorbância foi avaliada em 340 nm.

As análises foram normalizadas pelo conteúdo de proteínas, determinados pelo método de Lowry e colaboradores¹⁸⁹. Os resultados foram expressos em nmol/mg proteína.

3.8.2 Defesa antioxidante

A atividade da enzima antioxidante SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente, conforme descrito por Bannister e Calabrese¹⁹³. A técnica baseia-se na inibição da reação do radical O₂• com adrenalina, composto que se auto-oxida com variação de pH. A oxidação da adrenalina leva à formação de adrenocromo e a atividade da SOD foi determinada medindo-se a velocidade de formação do adrenocromo, determinada espectrofotometricamente a 480 nm, em um meio de reação contendo glicina-NaOH (50 mM em pH 10,2) e adrenalina 60 mM.

A atividade da enzima antioxidante CAT foi determinada medindo-se a taxa de decaimento da absorbância do H₂O₂ em 240nm, conforme técnica descrita por Aebi¹⁹⁴. Nesta técnica, os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato (pH 7,4) e

centrifugados durante 10 min. Na sequência, a um meio de reação foi adicionado uma alíquota de amostra e 1mL de substrato contendo H_2O_2 e tampão fosfato. As absorbâncias iniciais e finais foram registradas após 1 e 6 min, respectivamente.

Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin e Hilf¹⁹⁵, com algumas adaptações. A GSH foi mensurada após precipitação de proteína com 1 mL proteína de ácido tricloroacético 10%. Na sequência foi adicionado tampão fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500 μM de ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB). O desenvolvimento de cor resultante a partir da reação entre o DTNB e tióis atingiu um máximo em 5 min e manteve-se estável durante mais de 30 min. A absorbância foi lida a 412nm depois de 10 min. Uma curva padrão de glutatona reduzida foi usado para calcular os níveis de GSH nas amostras.

Todas as análises de antioxidantes foram normalizadas pelo conteúdo de proteínas, que foram determinadas pelo método de Lowry e colaboradores¹⁸⁹. Os resultados das atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT foram expressos em U/mg de proteína e os níveis de GSH em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína.

3.8.3 Metabolismo energético

3.8.3.1 Atividade de enzimas do ciclo de Krebs

A atividade da enzima citrato sintase foi avaliada de acordo com o método de Faloona e Srere¹⁹⁶. Foi utilizado 1 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2,5 mM de acetil-CoA (concentração no meio de 0,1 mM), 1 mM de 5,5'-di-tio-bis-(ácido 2-nitrobenzóico) (concentração no meio de 0,1 mM), 0,1% de Triton X-100 (concentração no meio de 0,1%), oxaloacetato 4 mM (concentração no meio 0,2 mM) e 2-4 μg de proteína do sobrenadante. A reação foi iniciada pela adição de oxaloacetato e acompanhada em 412 nm em espectrofotômetro.

A atividade da enzima isocitrato desidrogenase foi determinada conforme método descrito por Plaut¹⁹⁷. Foi utilizado tampão Tris 33mM, pH 7,4, rotenona 10 μM , MnCl_2 1,2 mM, ADP 0,67 mM, Triton X-100 0,1%, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) 0,3 mM e isocitrato 5 mM. A redução do NAD^+ a NADH foi acompanhada em espectrofotômetro a 37°C em comprimento de onda de 340 nm.

A atividade da enzima α -cetoglutarato desidrogenase foi determinada conforme técnica descrita por Tretter e Adam-Vizi¹⁹⁸, pela formação de NADH em um meio de

incubação contendo K_2HPO_4 50 mM, Triton X-100 0,1%, $MgCl_2$ 1 mM, tiamina pirofosfato 0,2 mM, EGTA 100 μ M, coenzima A-SH 50 mM, α -cetoglutarato 1 mM e NAD^+ 2 mM, pH 7,35. A redução do NAD^+ a NADH foi acompanhada em espectrofotômetro a 37°C em comprimento de onda de 340 nm.

A atividade da enzima succinato desidrogenase foi determinada de acordo com o método descrito por Fischer e colaboradores¹⁹⁹. A um meio de incubação foi adicionado tampão fosfato de potássio 62,4 mM pH 7,4, succinato de sódio 250 mM e 2,6-dicloroindofenol (2,6-DCIP) e amostra. Os sistemas foram pré-incubados por 20 minutos a 30°C em banho-maria e, após, foi adicionado azida sódica 100 mM, rotenona 1 mM, 2,6-DCIP e metassulfato de fenazina. A redução do 2,6-DCIP foi determinada em 600 nm durante 5 minutos em espectrofotômetro.

A atividade da enzima malato desidrogenase foi avaliada de acordo com o método descrito por Kitto²⁰⁰. Foi utilizado 10 μ M de rotenona, 0,2% de Triton X-100, 0,14 mM de NADH e 50 mM tampão de fosfato de potássio, pH 7,4, a 37°C. A reação foi iniciada após a adição de oxaloacetato 0,30 mM e o consumo de NADH foi acompanhado pela redução da absorbância em 340 nm durante 3 a 5 minutos a 37°C em espectrofotômetro.

Todas as análises de atividade das enzimas do ciclo de Krebs foram normalizadas pelo conteúdo de proteínas, determinadas pelo método de Lowry e colaboradores¹⁸⁹. Os resultados da atividade das enzimas do ciclo de Krebs foram expressos em nmol/min x mg proteína.

3.8.3.2 Atividade de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial

A atividade do complexo I foi avaliada pelo método descrito por Cassina e Radi²⁰¹ pela taxa de NADH-dependente da redução do ferricianeto. Em meio de reação foi adicionado tampão fosfato de potássio 100 mM, ferricianeto 10 mM, NADH 14 mM, rotenona 2 mM e amostra. Após a adição de todos os reagentes e da amostra, a leitura foi realizada em espectrofotômetro de 1 em 1 min, durante 3 min, em 420 nm.

A atividade do complexo II foi mensurada pelo método descrito por Fischer e colaboradores¹⁹⁹ pela diminuição da absorbância do 2,6-DCIP. A amostra foi adicionada a um meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 62,5 mM, succinato de sódio 250 mM e 2,6-DCIP 0,5 mM. Foi realizada incubação por 20 minutos a 30°C em banho-maria. Após a incubação foi adicionada azida sódica 100

mM, rotenona 2 mM e novamente 2,6-DCIP 0,5 mM, para então ser realizada leitura em espectrofotômetro de 1 em 1 min, por 5 min, em 600 nm.

A atividade do complexo IV foi determinada de acordo com a técnica descrita por Rustin e colaboradores²⁰² e calculada pela diminuição da absorbância causada pela oxidação do citocromo c reduzido. A um meio de incubação foi adicionado tampão fosfato de potássio 62,5 mM, lauril maltosídeo 125 mM, amostra diluída com tampão SETH (Sacarose, EDTA, Trizma base e Heparina) e Citocromo c 1%, para então ser realizada leitura em espectrofotômetro de 1 em 1 min, por 10 min, em 550 nm.

Todas as análises de atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial foram normalizadas pelo conteúdo de proteínas, determinadas conforme descrito por Lowry e colaboradores¹⁸⁹. Os resultados da atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial foram expressos em nmol/min x mg proteína.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico *GraphPad Prism* (versão 6). As análises entre dois grupos foram determinadas pelo teste t de Student e as diferenças entre mais grupos experimentais foram determinadas por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo post hoc de Tukey. Os resultados foram apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e a significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

3.10 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina (registros nº 15.021.4.01.IV e 16.023.4.01.IV, anexo A). A utilização dos animais seguiu a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliado o efeito do óleo de peixe, rico em ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, sobre o consumo alimentar, peso corporal, peso da gordura visceral, parâmetros inflamatórios (cérebro), dano oxidativo, defesa antioxidante, enzimas do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória mitocondrial (gordura visceral e cérebro) em camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

Relativo ao consumo alimentar, os resultados mostraram que os animais que receberam dieta hiperlipídica (grupo obeso) consumiram mais calorias que o grupo que recebeu dieta normolipídica (grupo controle) ($p < 0,0001$). O tratamento com ômega-3 não influenciou no consumo alimentar (Figura 15). A Figura 15 apresenta a média de consumo alimentar total do experimento.

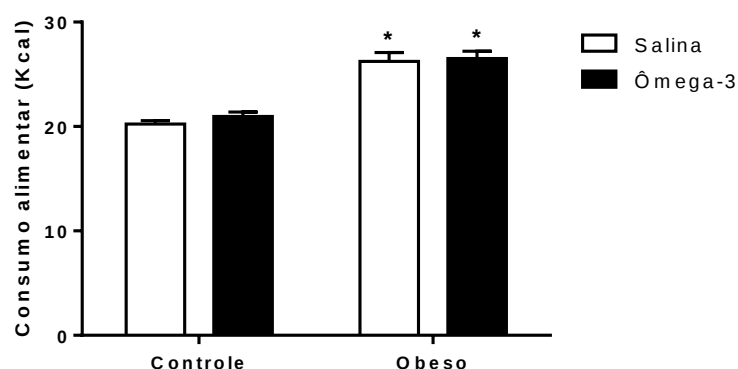


Figura 15 – Efeito do ômega-3 no consumo alimentar de camundongos submetidos à obesidade. Valores expressos em média $\pm$ EPM ($n=15$); * vs. Controle + Salina; $p < 0,05$ (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

A Figura 16 apresenta a média semanal do consumo alimentar dos animais. Observa-se que durante todo o experimento os resultados foram semelhantes à média de consumo alimentar total do estudo, ou seja, o grupo obeso (dieta hiperlipídica) consumindo mais calorias que o grupo controle (dieta normolipídica) e o tratamento com ômega-3 não causando influência significativa no consumo alimentar.

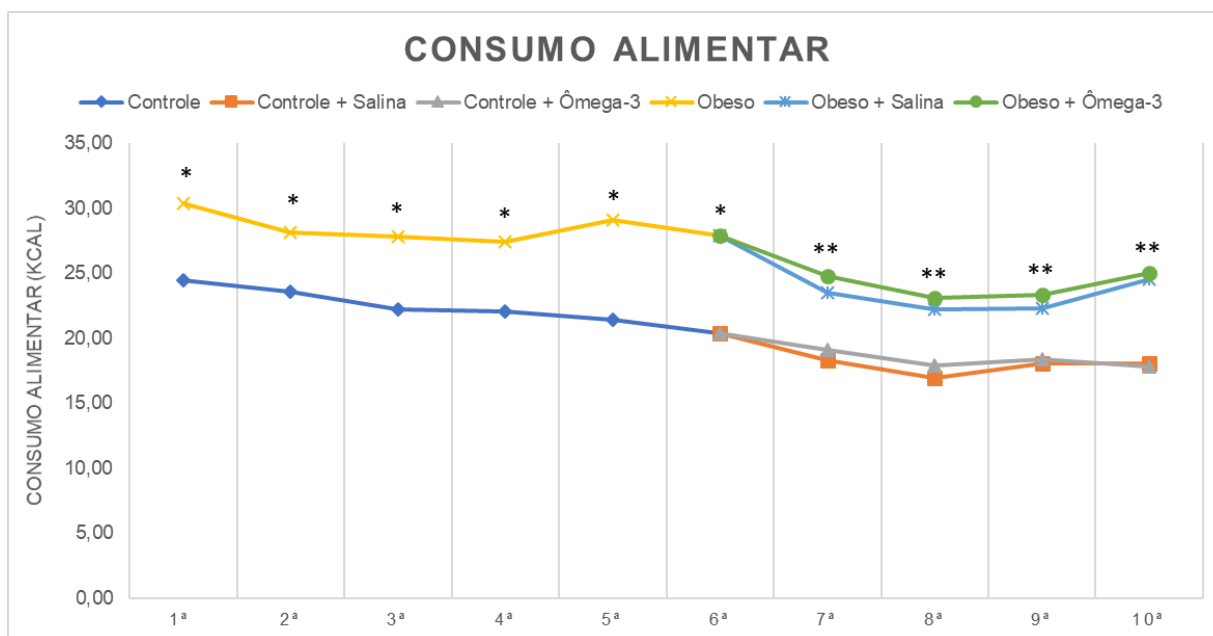


Figura 16 – Acompanhamento semanal do efeito do ômega-3 no consumo alimentar de camundongos submetidos à obesidade. Valores expressos em média (n=15); * vs. Controle (até 6ª semana); $p < 0,05$ (teste t de Student); **vs. Controle + Salina (após 6ª semana); $p < 0,05$ (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey). ** indica que tanto o grupo Obeso + Salina quanto o Obeso + Ômega-3 foram diferentes do grupo Controle + Salina.

O efeito do ômega-3 no consumo alimentar (ou a falta de efeito) é de difícil explicação e comparação com outros estudos, por conta das diferenças metodológicas. Muitos estudos publicados enriqueceram a ração com fonte de ômega-3 (com redução de gordura saturada ou até mesmo substituindo totalmente)^{33,44,45}, enquanto neste estudo foi administrado o óleo de peixe via gavagem sem alterar a ração. O único estudo relacionado identificado que tenha avaliado consumo alimentar de animais obesos após administração de óleo de peixe via gavagem foi publicado por Yook e colaboradores¹⁶⁸, e assim como em nosso estudo, mostraram que o óleo de peixe não influencia o consumo energético. De forma geral, apesar das diferenças metodológicas, observa-se que não há evidências na literatura de que o ômega-3 influencie de alguma forma a saciedade e possa alterar o consumo alimentar.

Os resultados também mostraram que os animais alimentados com dieta hiperlipídica (grupo obeso) tiveram o peso corporal significativamente maior que o grupo que recebeu dieta normolipídica (grupo controle) ($p=0,0004$), confirmando-se

assim a indução da obesidade. O tratamento com ômega-3 não reverteu o aumento no peso corporal dos animais obesos (Figuras 17 e 18). A Figura 17 apresenta a média de peso final, aferida no dia da eutanásia. A Figura 18 apresenta a evolução semanal do peso dos animais.

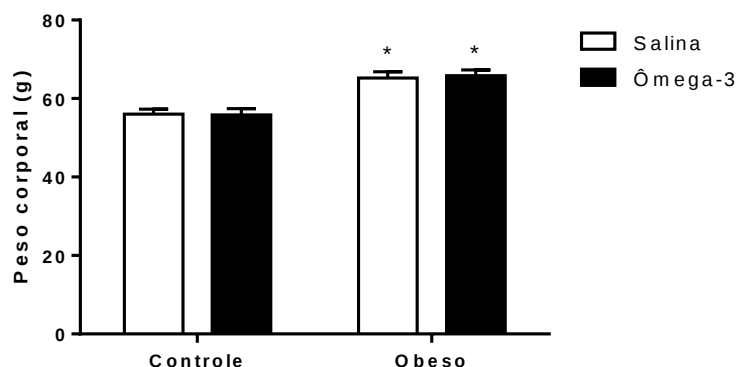


Figura 17 – Efeito do ômega-3 no peso corporal de camundongos submetidos à obesidade. Valores expressos em média $\pm$ EPM (n=15); * vs. Controle + Salina; $p < 0.05$ (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

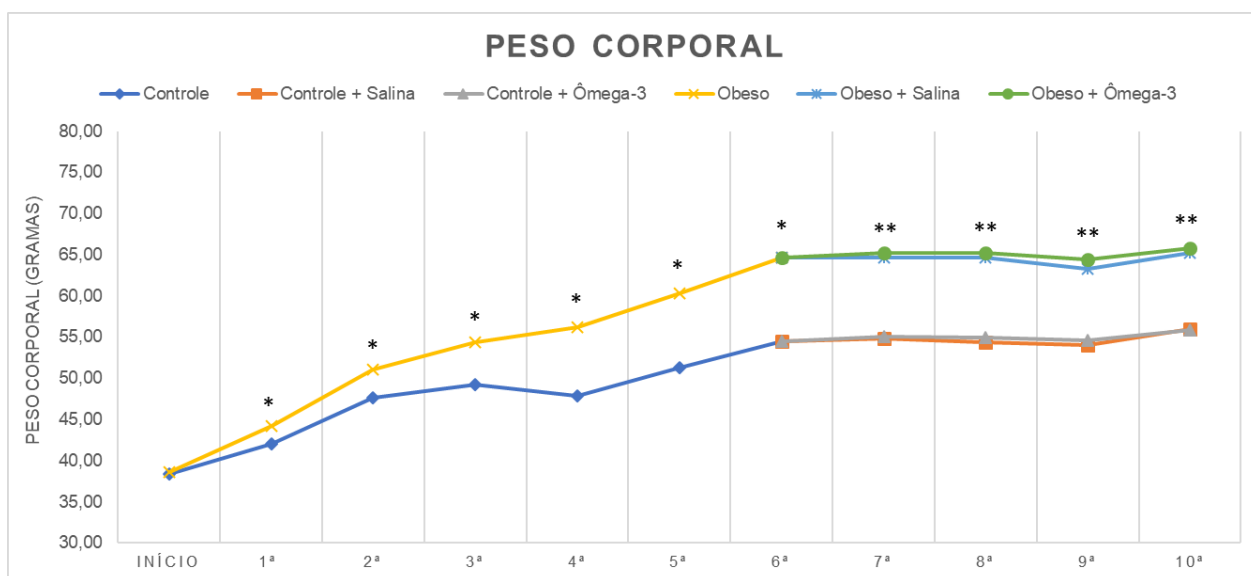


Figura 18 – Acompanhamento semanal do efeito do ômega-3 no peso corporal de camundongos submetidos à obesidade. Valores expressos em média (n=15); * vs. Controle (até 6ª semana); $p < 0,05$ (teste t de Student); **vs. Controle + Salina (após 6ª semana); $p < 0.05$ (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey). ** indica que tanto o grupo Obeso + Salina quanto o Obeso + Ômega-3 foram diferentes do grupo Controle + Salina.

Rokling-Andersen e colaboradores³² também identificaram que uma dieta rica em ômega-3 não influenciou o ganho de peso corporal de ratos. Já Cintra e colaboradores⁴⁵ mostraram que a substituição de ácidos graxos saturados (banha de porco rica em gordura saturada) por insaturados (óleo de linhaça rico em ômega-3 e azeite de oliva rico em ômega-9), bem como a administração intracerebroventricular de ômega-3 e ômega-9, foram capazes de levar a perda de peso em camundongos e ratos. Resultado positivo no peso também foi identificado em revisão sistemática com meta-análise conduzida por Bender e colaboradores¹⁷⁸, que mostrou evidências de que o consumo de peixe ou óleo de peixe encapsulado (ricos em ômega-3) estão relacionados com leves reduções no peso corporal e na circunferência da cintura de seres humanos. No entanto, destacaram que os mecanismos pelos quais o ômega-3 poderia levar a reduções no peso ainda não estão esclarecidos¹⁷⁸.

Além do peso corporal, o aumento da gordura visceral também pode ser utilizado como indicador de obesidade¹³⁵. Neste estudo, os animais alimentados com dieta hiperlipídica (grupo obeso) tiveram a gordura visceral (gordura da região mesentérica) significativamente mais pesada que o grupo que recebeu dieta normolipídica (grupo controle) ($p=0,0005$). O tratamento com ômega-3 reverteu o aumento na gordura visceral dos animais obesos ($p=0,04$ Obeso + Salina vs. Obeso + Ômega-3) (Figura 19).

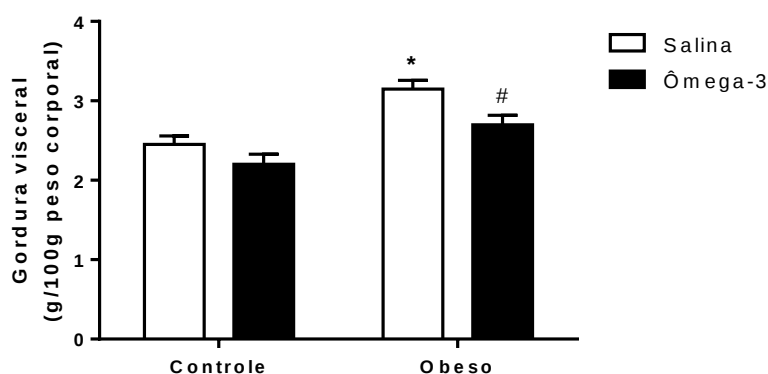


Figura 19 – Efeito do ômega-3 no peso da gordura visceral de camundongos submetidos à obesidade. Valores expressos em média $\pm$ EPM ($n=15$); * vs. Controle + Salina; # vs. Obeso + Salina; $p<0.05$ (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

Rokling-Andersen e colaboradores³² mostraram que uma dieta enriquecida com ômega-3 (EPA e DHA) promoveu menor acúmulo de gordura visceral em ratos, quando comparado a ratos alimentados com uma dieta rica em gordura saturada (banha de porco). Isso ocorreu sem a alteração no peso, mostrando que o ômega-3 pode ter promovido uma redistribuição de tecido adiposo dos depósitos viscerais para o depósito subcutâneo nos animais. Liu e colaboradores³⁵ também mostraram que a suplementação com EPA foi eficaz na supressão do acúmulo de gordura corporal em camundongos com obesidade induzida por dieta rica em gordura saturada e frutose. Os resultados estão de acordo com o publicado em meta-análises^{179,180}, porque mesmo que a ingestão de ômega-3 não reduza o peso corporal, os indivíduos podem se beneficiar da redução da gordura abdominal. Destaca-se que, neste estudo, a redução de gordura visceral ocorreu mesmo sem qualquer mudança na dieta, ou seja, mesmo se mantido o consumo em excesso de gordura saturada o tratamento com ômega-3 ainda assim reduziu a gordura visceral.

O acúmulo de gordura ativa vias inflamatórias³, que levam ao aumento de citocinas pró-inflamatórias e da infiltração de macrófagos no tecido adiposo, caracterizando a obesidade como uma inflamação crônica de baixo grau^{5,66,73}. O efeito do ômega-3 sobre a inflamação na gordura, em outros tecidos periféricos e no soro já foi explorado em outros estudos. Foi demonstrado que o ômega-3 é capaz de reduzir citocinas pró-inflamatórias neste tecido^{37,171}, assim como em outros tecidos periféricos e soro^{35,43,163}.

Especificamente na gordura, LeMieux e colaboradores¹⁶⁵ mostraram que dieta rica em EPA (15% da gordura da ração substituída por EPA) reduziu a infiltração de macrófagos no tecido adiposo (gonadal). Bargut e colaboradores³⁷ mostraram que dieta rica em ômega-3 promove redução dos níveis de TNF- α e IL-6 em tecido adiposo (epididimal), quando comparada a dieta rica em banha de porco. Sá e colaboradores¹⁷¹ mostraram que a suplementação de ômega-3 via gavagem em animais alimentados com dieta rica em gordura saturada também reduziu níveis de TNF- α e IL-6 em tecido adiposo (retroperitoneal). Os mecanismos pelos quais o ômega-3 reduz a inflamação parecem envolver a capacidade destas substâncias inibirem a sinalização inflamatória mediada pelos TLR (ativado por ácidos graxos saturados), inibirem a translocação do NF κ B para o núcleo, consequentemente reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Está bem documentado que o processo inflamatório pode levar ao aumento de EROs e causar estresse oxidativo. Para limitar os níveis de EROs e controlar os danos decorrentes o organismo conta com um sistema antioxidante. As enzimas SOD, CAT e GPx, assim como a GSH (utilizada como substrato pela GPx) são considerados importantes antioxidantes^{103,105}.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre EROs e defesas antioxidantes, o que pode causar danos a lipídios, proteínas e DNA, e assim prejudicar a função de qualquer célula do organismo¹⁰³. Diversos estudos mostraram presença de estresse oxidativo na obesidade^{9,10,29}.

Dessa forma, neste estudo foi avaliado o efeito do ômega-3 sobre parâmetros de estresse oxidativo (dano oxidativo e defesa antioxidante) na gordura visceral de camundongos submetidos à obesidade induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica. Os animais do grupo obeso apresentaram aumento de dano oxidativo a lipídios ($p=0,01$) (expresso pelo aumento de TBARS, tais como malondialdeído e equivalentes) e aumento de dano oxidativo a proteínas ($p=0,006$) (expresso pelo aumento de proteínas carboniladas). O tratamento com ômega-3 reverteu o aumento de proteínas carboniladas ($p=0,01$ Obeso + Salina vs. Obeso + Ômega-3), assim como observou-se uma tendência do tratamento com ômega-3 reverter o aumento de TBARS, mas os resultados não alcançaram significância estatística ($p=0,13$ Obeso + Salina vs. Obeso + Ômega-3) (Figura 20).

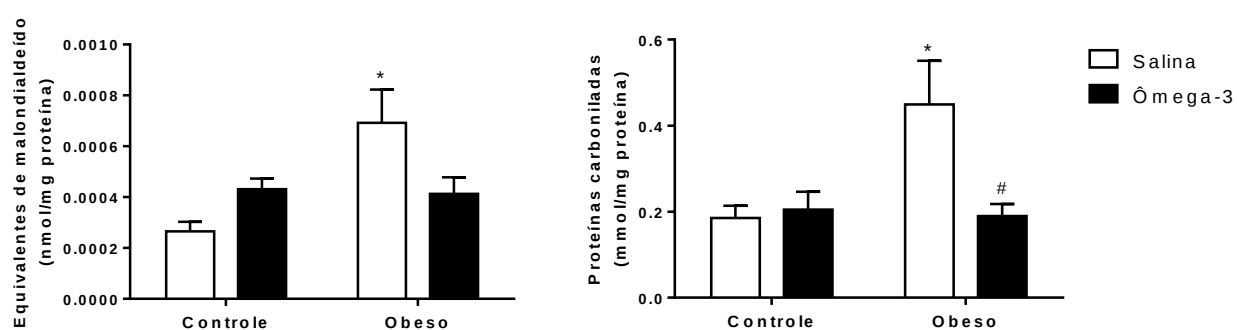


Figura 20 – Efeito do ômega-3 sobre o dano oxidativo na gordura visceral de camundongos submetidos à obesidade. Valores expressos em média $\pm$ EPM ($n=5$); * vs. Controle + Salina; # vs. Obeso + Salina; $p<0.05$ (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

Relativo à defesa antioxidante na gordura visceral de animais obesos, a atividade da SOD e da CAT não foram significativamente alteradas e houve redução significativa nos níveis de GSH ($p=0,03$). Observou-se uma tendência de redução da atividade da SOD, mas não houve significância estatística ($p=0,18$). O tratamento com ômega-3 promoveu aumento dos níveis de GSH, mas não a ponto de reverter a alteração causada pela dieta hiperlipídica e obesidade. Foi observada uma tendência do ômega-3 aumentar a atividade da SOD em animais obesos, mas os resultados não foram estatisticamente significativos ($p=0,06$ Obeso + Salina vs. Obeso + Ômega-3) (Figura 21).

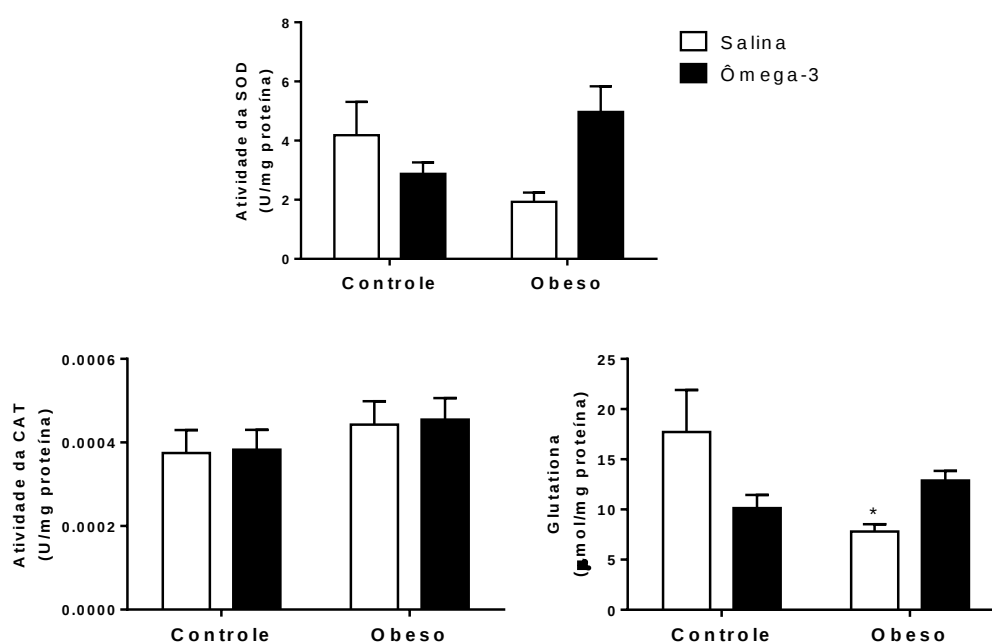


Figura 21 – Efeito do ômega-3 sobre a atividade e níveis de antioxidantes na gordura visceral de camundongos submetidos à obesidade. Valores expressos em média $\pm$ EPM ($n=5$); * vs. Controle + Salina; $p < 0.05$ (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

O efeito do ômega-3 sobre o estresse oxidativo na gordura visceral após indução de obesidade ainda não havia sido relatado. Outros tecidos periféricos já foram estudados: fígado, miocárdio, aorta e músculo esquelético, além do soro e do plasma. De Assis e colaboradores²⁰³ mostraram que a suplementação de ômega-3 em dieta rica em gordura reduz os níveis de lipoperoxidação (TBARS), não influencia no dano proteico (proteínas carboniladas), e reduz a atividade da SOD e da CAT que estavam aumentadas em fígado de ratos alimentados com dieta rica em gordura. Ávila

e colaboradores¹⁶⁶ mostraram que o tratamento com ômega-3 (óleo de peixe) promoveu redução do dano oxidativo a lipídios e proteínas no miocárdio e na aorta de ratos obesos, assim como promoveu aumento na atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx. Cavaliere e colaboradores¹⁷⁰ mostraram que enquanto uma dieta rica em banha de porco aumenta os níveis de proteínas carboniladas e reduz os níveis de GSH no soro e em músculo esquelético de ratos, uma dieta rica em óleo de peixe não altera estes níveis. Em humanos, Kiecolt-Glaser et al.³⁹ mostraram que a suplementação com ômega-3 reduziu significativamente o estresse oxidativo (F2-isoprostanos) no plasma de indivíduos sedentários com sobrepeso.

Esta pesquisa corrobora os achados prévios e expande o estudo para o tecido adiposo, tão relevante quando se trata de obesidade e que ainda não havia sido estudado, mostrando que o ômega-3 teve efeito benéfico em parâmetros de estresse oxidativo na gordura visceral, provavelmente exercendo um efeito antioxidante. Destaca-se que este efeito ocorreu mesmo sem qualquer alteração na dieta, rica em gordura saturada. O mecanismo pelo qual o ômega-3 reduziu o dano oxidativo pode estar relacionado ao fato do ômega-3 poder ter sido incorporado nos fosfolípidios das membranas celulares e ter reparado componentes das membranas que foram atacadas por EROs. Além disso, a redução da inflamação no tecido adiposo causada pelo ômega-3 (já demonstrada em outros estudos^{37,165,171}), também pode propiciar a redução do estresse oxidativo.

Sabe-se que o estresse oxidativo pode levar à disfunção mitocondrial^{107,111}. Por isso, neste estudo também foi avaliado o efeito do ômega-3 sobre o metabolismo energético na gordura visceral (ciclo de Krebs e cadeia respiratória mitocondrial) de camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

Quanto ao ciclo de Krebs na gordura visceral, este estudo mostrou que os animais obesos apresentaram aumento na atividade das enzimas citrato sintase, isocitrato desidrogenase e malato desidrogenase ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$, e $p = 0,02$, respectivamente). O tratamento com ômega-3 diminuiu o aumento da atividade da citrato sintase e da isocitrato desidrogenase, mas não houve reversão das alterações causadas pela obesidade, já que os valores ainda permaneceram estatisticamente diferentes do grupo controle. Já na malato desidrogenase, o tratamento com ômega-3 aumentou ainda mais a atividade que já tinha sido aumentada pela obesidade. A atividade da succinato desidrogenase não foi alterada em nenhum dos grupos (Figura 22).

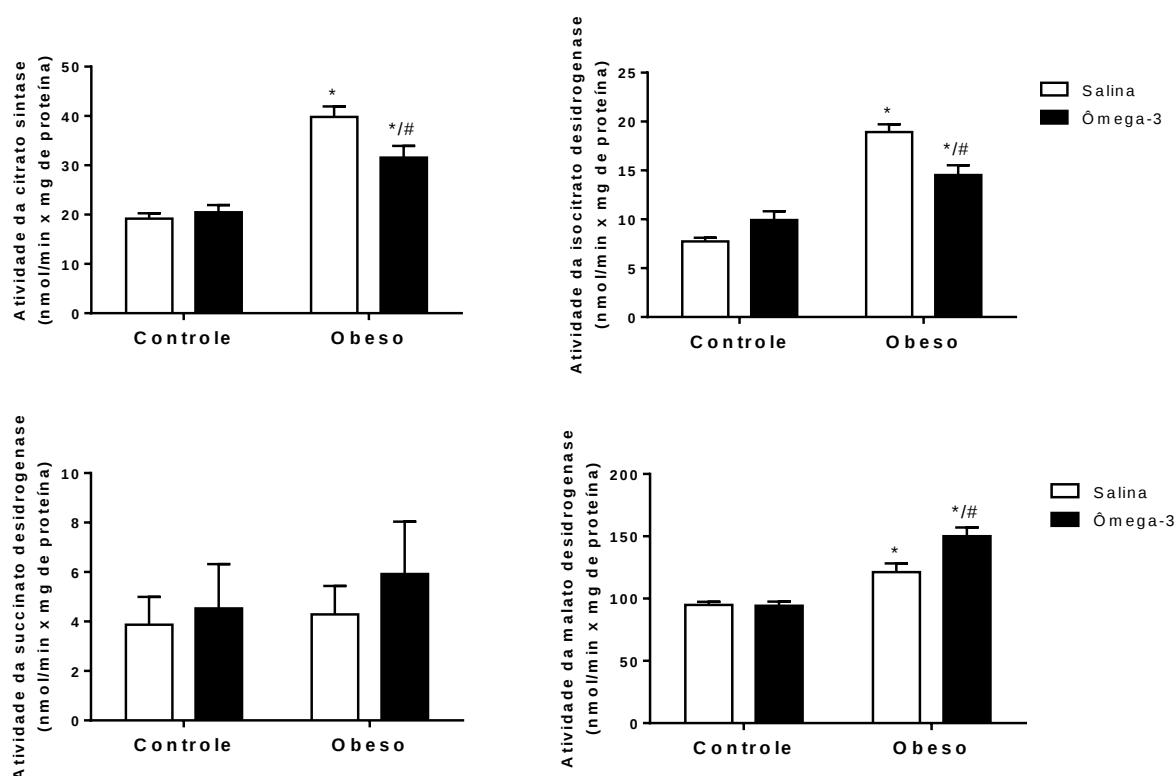


Figura 22 – Efeito do ômega-3 sobre a atividade de enzimas do ciclo de Krebs na gordura visceral de camundongos submetidos à obesidade. Valores expressos em média $\pm$ EPM (n=5); * vs. Controle + Salina; # vs. Obeso + Salina; $p < 0.05$ (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

O excesso de gordura saturada na dieta pode disponibilizar mais ácidos graxos para as mitocôndrias, aumentando os níveis de acetil-CoA e podendo levar à ativação de algumas enzimas do ciclo de Krebs. Isso por sua vez pode gerar uma maior disponibilidade de elétrons para os complexos I e II da cadeia respiratória mitocondrial e estimular uma maior produção de EROs dentro da célula. Este aumento de EROs pode levar ao estresse oxidativo, que pode ativar inúmeros fatores de transcrição, estimular a liberação de citocinas inflamatórias, e aumentar o processo inflamatório.

Não foram localizados estudos sobre o efeito do ômega-3 no ciclo de Krebs após indução de obesidade. Além disso, o foco dos estudos relacionados localizados foi apenas o tecido hepático. Ahmed e colaboradores²⁰⁴ compararam dietas com alto e baixo teor de ômega-3 (sem indução de obesidade) e mostraram que o ômega-3 promoveu maior expressão proteica da malato desidrogenase no fígado de camundongos. Ferramosca e colaboradores¹⁶⁹ investigaram os efeitos de dieta

suplementada com óleo de krill (rico em ômega-3) no metabolismo energético mitocondrial em fígado de ratos alimentados com dieta rica em gordura (sem indução inicial de obesidade) e mostraram diminuição significativa na atividade da citrato sintase, enquanto apenas uma diminuição moderada foi observada em animais que receberam dieta suplementada com ômega-3. Este estudo mostrou resultados diferentes na citrato sintase na gordura visceral (ativação pela obesidade sendo reduzida pelo ômega-3), o que pode ser explicado pela diferença na metodologia, já que foi induzida a obesidade e depois realizado tratamento com ômega-3. Estudos mostraram ainda que o óleo de krill, rico em ômega-3, pode estimular o catabolismo do excesso de gordura introduzido por dietas hipercalóricas^{205,206}. Este estímulo pode estar relacionado à redução da gordura visceral observada neste estudo.

Relativo à cadeia respiratória mitocondrial na gordura visceral, neste estudo a atividade dos complexos I, II e IV não foi alterada em nenhum dos grupos, ou seja, nem a obesidade nem o tratamento com ômega-3 influenciaram neste parâmetro (Figura 23).

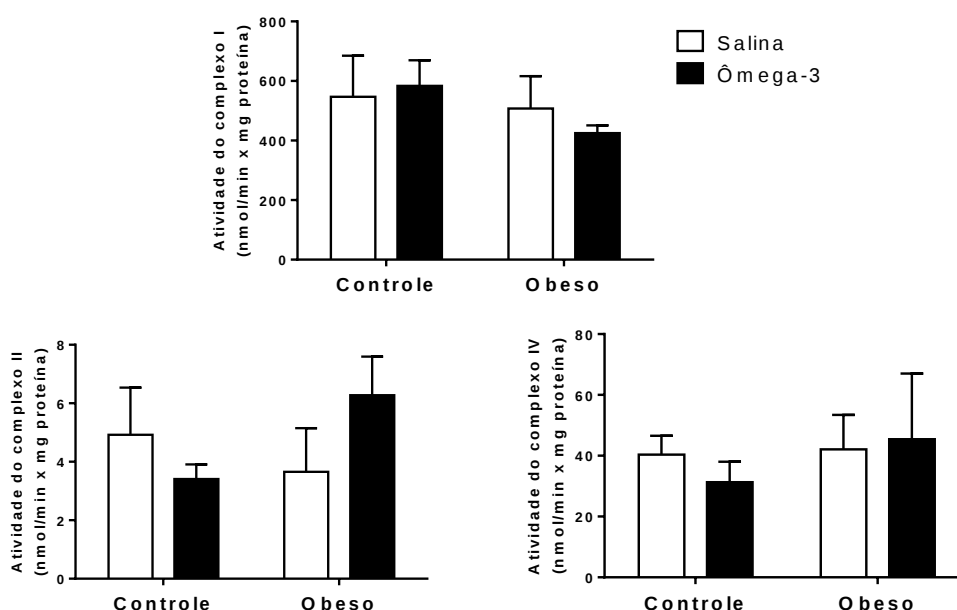


Figura 23 – Efeito do ômega-3 sobre a atividade de complexos da cadeia respiratória mitocondrial na gordura visceral de camundongos submetidos à obesidade. Valores expressos em média $\pm$ EPM (n=5) (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

Este estudo é o primeiro a identificar o efeito do ômega-3 na cadeia respiratória mitocondrial em tecido adiposo após indução de obesidade. O único estudo relacionado localizado, conduzido por Ferramosca e colaboradores¹⁶⁹, comparou

dieta rica em gordura (principalmente saturada e monoinsaturada) com dieta suplementada com ômega-3, e mostraram diminuição significativa na atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial (complexos I, II, III, IV e ATP sintase) em fígado de ratos que receberam dieta rica em gordura. Nos animais que receberam dieta suplementada com ômega-3, não houve esta inibição, sendo os valores sem diferença dos controles, o que mostra que o ômega-3 é capaz de reverter a alteração causada pela dieta rica em gordura no fígado. Apesar de esperada uma alteração na atividade do complexo I na gordura visceral (por conta do envolvimento das enzimas do ciclo de Krebs que carregam o NADH de elétrons e que foram alteradas), isso não foi observado. É possível que tenha ocorrido algum mecanismo de adaptação do organismo, visto que a alteração no ciclo de Krebs na gordura visceral não repercutiu na cadeia respiratória.

Em síntese, as análises bioquímicas da gordura visceral de camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica mostraram que o tratamento com ômega-3 promoveu redução do dano oxidativo, bem como amenizou as alterações na defesa antioxidante e no ciclo de Krebs. A cadeia respiratória mitocondrial não foi alterada pela obesidade nem pelo tratamento com ômega-3 na gordura visceral.

Hoje já se sabe que as alterações na obesidade não se restringem ao tecido adiposo e a outros tecidos periféricos. As células periféricas do sistema imunológico podem ser recrutadas para o SNC assim como os macrófagos para o tecido adiposo⁷⁸. Esta migração de células para o SNC, podem propiciar a ativação de micróglia e astrócitos, que tem um papel fundamental na resposta inflamatória cerebral^{75,79}. Além disso, componentes da dieta, como os ácidos graxos saturados, por si só podem causar dano direto ao SNC. Os ácidos graxos saturados consumidos em excesso ativam vias imunitárias inatas por meio da ligação e ativação do TLR, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias e podendo sinalizar vias que levam à destruição de neurônios^{28,75,83}.

Neste sentido, estudos mostram que a obesidade e o consumo em excesso de gorduras saturadas estão envolvidos com alterações cerebrais^{14-16,76,80}. Foram demonstradas associações entre obesidade e anormalidades no hipotálamo, centro regulador do comportamento alimentar e metabolismo energético^{17-19,26,83}. Alterações neste local podem causar perda deste controle neural e abrir espaço para o surgimento e o agravamento da obesidade¹⁹. Além do hipotálamo, estudos também

mostraram relação entre a obesidade e alterações no hipocampo, estrutura cerebral envolvida com principalmente com memória^{15,20,21,86} e no sistema de recompensa, envolvendo alterações em estruturas como córtex pré-frontal e estriado^{23,24,99}.

Além disso, sabe-se que o hipotálamo se comunica com outras áreas cerebrais, como por exemplo as que compõe os sistemas de memória e emoção (hipocampo) e de recompensa (córtex pré-frontal e estriado) e que estas estruturas de fato interagem para controlar o consumo e o gasto energético^{25,59}. Assim, para se desenvolver terapias eficazes para a obesidade, é necessário compreender os mecanismos do SNC envolvidos no comportamento alimentar e como esses mecanismos se tornam desregulados²⁵. Portanto, neste estudo foi verificado o efeito do ômega-3 sobre parâmetros inflamatórios, de estresse oxidativo e de metabolismo energético em cérebro (hipotálamo, hipocampo, córtex pré-frontal e estriado) de camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

Relativo a parâmetros inflamatórios, os animais que receberam ração hiperlipídica, e que se tornaram obesos, apresentaram aumento de TNF- α no hipocampo ($p=0,0002$), córtex pré-frontal ($p=0,001$) e estriado ($p<0,0001$). Os resultados também mostraram aumento de IL-1 β em todas estruturas cerebrais analisadas (hipotálamo $p=0,03$, hipocampo $p<0,0001$, córtex pré-frontal $p<0,0001$ e estriado $p=0,001$). Quanto à IL-10, ocorreu redução no hipotálamo ($p=0,001$), e aumento no hipocampo ($p=0,006$) e estriado ($p=0,002$). O aumento de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β), assim como as alterações identificadas em citocina anti-inflamatória (IL-10), indicam presença de processo inflamatório nas estruturas cerebrais de animais obesos. O tratamento com ômega-3 reverteu o aumento de TNF- α no hipocampo ($p=0,0003$) e estriado ($p<0,0001$), reverteu o aumento de de IL-1 β no hipotálamo ($p=0,03$), hipocampo ($p=0,0003$) e estriado ($p=0,002$) (Obeso + Salina vs. Obeso + Ômega-3), assim como promoveu redução nos níveis de IL-1 β no córtex pré-frontal. O tratamento com ômega-3 também reverteu o aumento de IL-10 no hipocampo ($p=0,02$) e no estriado ($p=0,002$) (Obeso + Salina vs. Obeso + Ômega-3) (Figura 24).

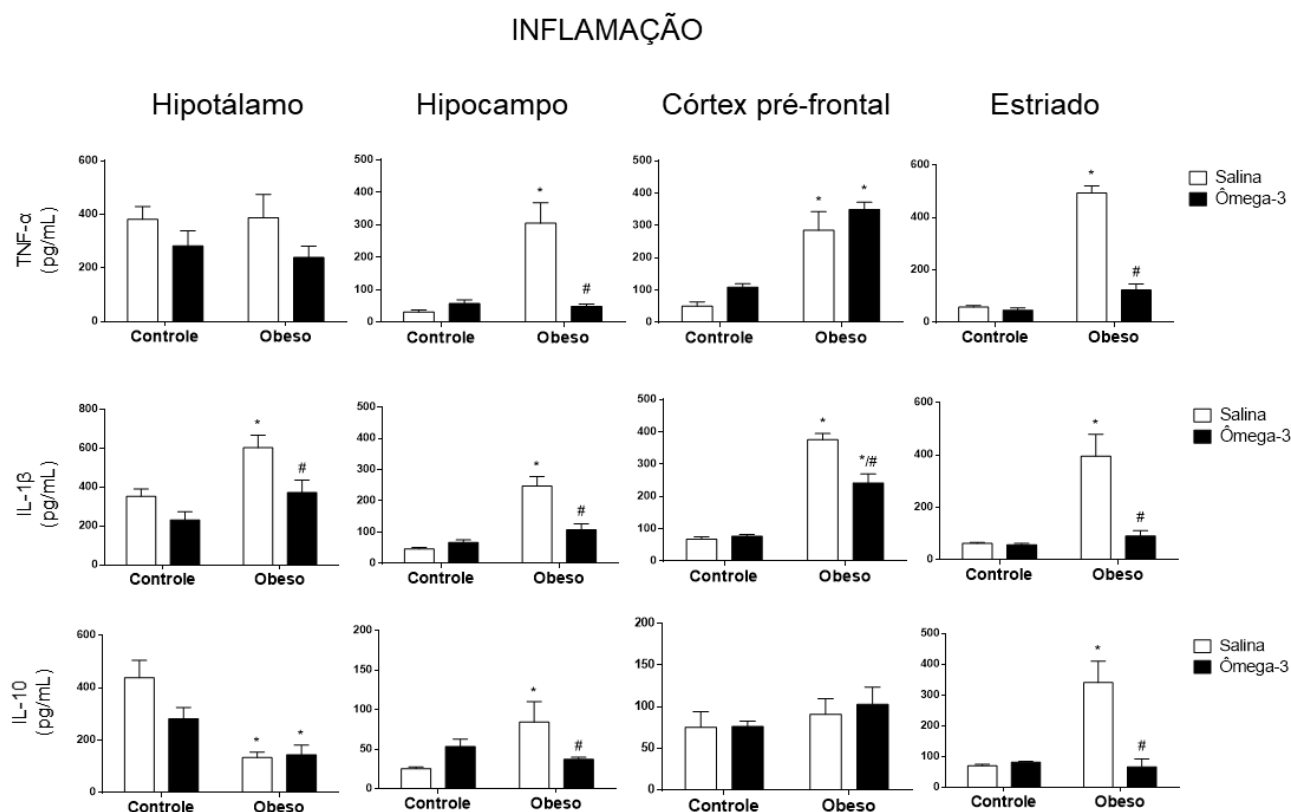


Figura 24 – Efeito do ômega-3 sobre parâmetros inflamatórios em cérebro de camundongos submetidos à obesidade. Valores expressos em média $\pm$ EPM (n=5); * vs. Controle + Salina; # vs. Obeso + Salina; p<0.05 (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

Estudos prévios identificaram e descreveram a inflamação hipotalâmica e hipocampal na obesidade^{18,20,75,83}. Este estudo está de acordo pois mostrou aumento de citocinas pró-inflamatórias em estruturas cerebrais de animais obesos. Além disso, este estudo mostrou que o ômega-3 reverte parcialmente as alterações de parâmetros inflamatórios em estruturas cerebrais. O efeito do ômega-3 no SNC na obesidade foi pouco estudado. Além disso, o foco dos estudos anteriores foi apenas o hipotálamo, por conta de sua relação mais direta com o consumo alimentar e a obesidade. Cintra e colaboradores⁴⁵ mostraram que a substituição de ácidos graxos saturados por insaturados na dieta, bem como a administração intracerebroventricular de ômega-3 e ômega-9, foram capazes de melhorar parâmetros relacionados com inflamação (reduziu TNF- α e IL-6) no hipotálamo de roedores. Pimentel e colaboradores⁴³ compararam o consumo de dieta enriquecida com óleo de soja com dieta enriquecida

com óleo de peixe (rico em ômega-3), sem indução prévia de obesidade, e mostraram que a dieta rica em ômega-3 foi capaz de reduzir níveis de mediadores inflamatórios (TNF- α e IL-6) no hipotálamo de ratos, sugerindo uma proteção contra a obesidade. Viggiano e colaboradores⁴⁴ também mostraram efeitos benéficos de dieta rica em ômega-3 na modulação da inflamação hipotalâmica (redução de níveis de TNF- α) em ratos (sem indução prévia de obesidade).

O efeito anti-inflamatório do ômega-3 pode ser explicado por sua capacidade de interagir com vias de sinalização inflamatórias, tendo um efeito supressor da produção de citocinas pró-inflamatórias^{146,156}. Assim, considerando que a obesidade é uma doença inflamatória, esta ação anti-inflamatória do ômega-3 pode desempenhar papel importante no tratamento. Este efeito, sem qualquer alteração na dieta, como mostrado neste estudo, reforça os efeitos benéficos do ômega-3 mesmo em uma situação de consumo em excesso de gordura saturada, comum em pacientes obesos. Além disso, este é o primeiro estudo a estender a avaliação a outras estruturas cerebrais além do hipotálamo.

Sabe-se que o processo inflamatório que ocorre na obesidade pode levar ao aumento da produção de EROs e levar ao estresse oxidativo^{100,102}. Assim, neste estudo foi verificado o efeito do ômega-3 sobre parâmetros de estresse oxidativo (dano oxidativo e defesa antioxidante) em cérebro (hipotálamo, hipocampo, córtex pré-frontal e estriado) de camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

No que se refere a dano oxidativo, os animais do grupo obeso apresentaram aumento de dano oxidativo a lipídios no hipotálamo ($p=0,0002$) e no hipocampo ($p=0,01$) (expresso pelo aumento nos níveis de malondialdeído) e aumento de dano oxidativo a proteínas no hipotálamo ($p=0,0005$), hipocampo ($p<0,0001$) e estriado ($p<0,0001$) (expresso pelo aumento de proteínas carboniladas). O tratamento com ômega-3 reverteu o aumento nos níveis de malondialdeído no hipotálamo ($p=0,0009$) e no hipocampo ($p=0,0001$) e o aumento de proteínas carboniladas também no hipotálamo ($p=0,02$) e no hipocampo ($p<0,0001$) (Obeso + Salina vs. Obeso + Ômega-3) (Figura 25).

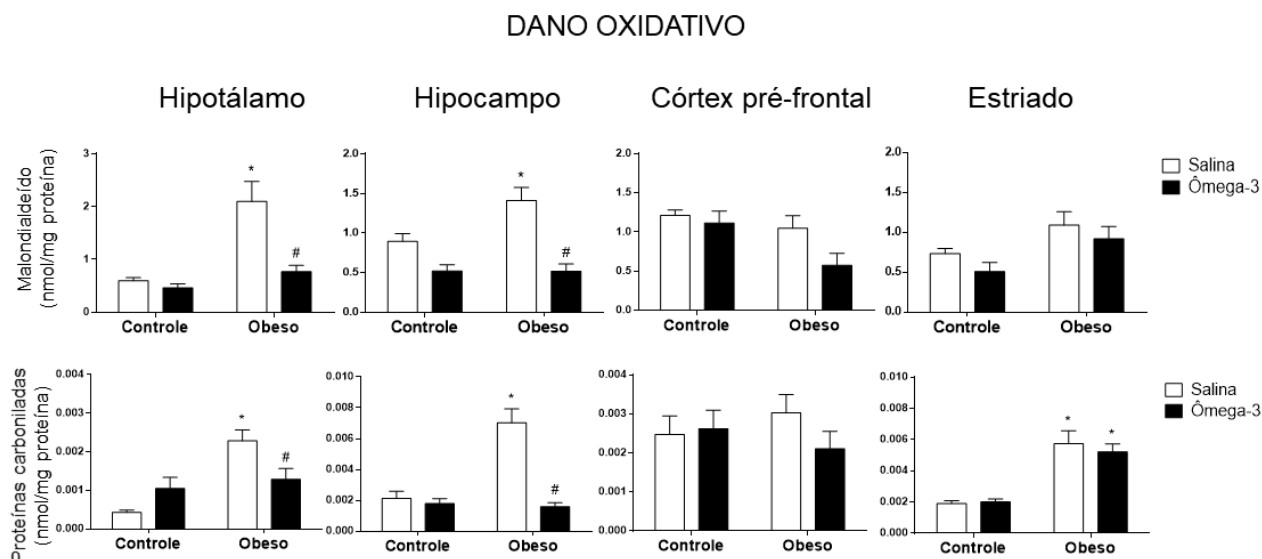


Figura 25 – Efeito do ômega-3 sobre o dano oxidativo em cérebro de camundongos submetidos à obesidade. Valores expressos em média $\pm$ EPM ($n=5$); * vs. Controle + Salina; # vs. Obeso + Salina; $p<0.05$ (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

Relativo a parâmetros de defesa antioxidante, os animais obesos tiveram redução da atividade da enzima antioxidante CAT no hipocampo ($p=0,009$), bem como apresentaram redução nos níveis de GSH no hipotálamo ($p=0,009$), hipocampo ($p=0,0001$) e estriado ($p<0,0001$). O tratamento com ômega-3 não reverteu as alterações na defesa antioxidante. Apesar de ter sido observada uma tendência do tratamento com ômega-3 reverter a alteração da GSH no hipotálamo ($p=0,16$) e no hipocampo ($p=0,06$), os resultados não foram estatisticamente significativos. A atividade da enzima antioxidante SOD não foi alterada em nenhum dos grupos (Figura 26).

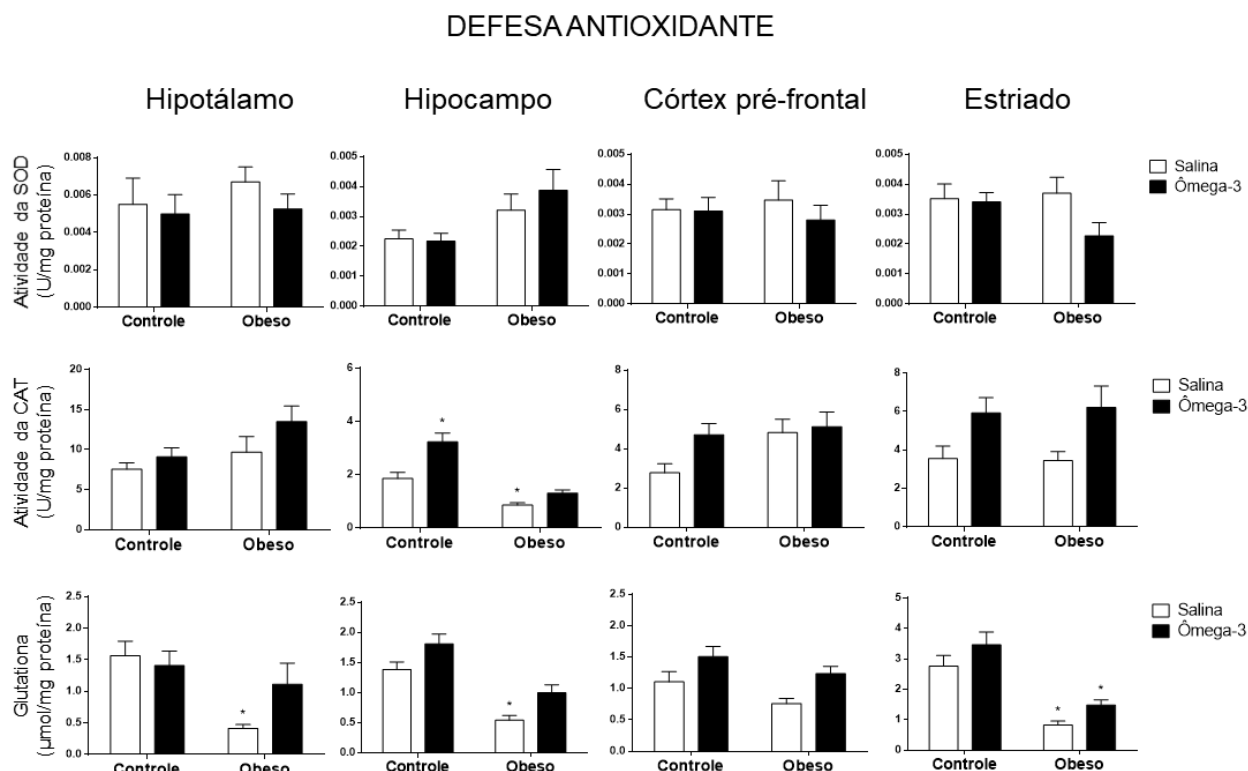


Figura 26 – Efeito do ômega-3 sobre a atividade e níveis de antioxidantes em cérebro de camundongos submetidos à obesidade. Valores expressos em média $\pm$ EPM (n=5); * vs. Controle + Salina; $p < 0.05$ (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

As alterações em parâmetros de dano oxidativo e de defesa antioxidante observadas neste estudo indicam presença de estresse oxidativo no cérebro de camundongos obesos, confirmando achados de estudos prévios^{16,89,112}. O ômega-3 reverteu quase totalmente o dano oxidativo em estruturas cerebrais, mas não reverteu as alterações relacionadas à defesa antioxidante (apesar de ter amenizado algumas alterações). Não foram localizados estudos que relatassem o efeito do ômega-3 sobre o estresse oxidativo cerebral após indução de obesidade. Viggiano et al.⁴⁴ mostraram que uma dieta rica em óleo de peixe, ao contrário de dieta rica em banha de porco (comparação entre dietas, sem indução de obesidade), não alterou os níveis de malondialdeído, de GSH, nem a razão glutathione reduzida/glutathione oxidada (GSH/GSSG) no hipotálamo de ratos.

Sabe-se que o estresse oxidativo pode levar a alterações mitocondriais^{107,111}. Na mitocôndria, o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória são responsáveis pela maior parte da produção de ATP^{113,115}. Alterações em processos relacionados a produção

de ATP podem levar à disfunção mitocondrial¹¹⁴. Estudos prévios mostraram que a obesidade está relacionada com disfunção mitocondrial^{11-13,123,124}.

Nesse contexto, o tecido cerebral é particularmente vulnerável, visto que possui alta demanda de energia e depende fortemente da eficiente função mitocondrial²⁰⁷. Portanto, neste estudo foi avaliado o efeito do ômega-3 sobre parâmetros de metabolismo energético (atividade de enzimas do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória mitocondrial) em cérebro (hipotálamo, hipocampo, córtex pré-frontal e estriado) de camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

No que se refere a enzimas do ciclo de Krebs em estruturas cerebrais, os animais que receberam dieta hiperlipídica e se tornaram obesos tiveram inibição da atividade da citrato sintase no hipocampo ($p=0,0007$), da isocitrato desidrogenase no córtex pré-frontal ($p=0,01$) e da α -cetoglutarato desidrogenase no córtex pré-frontal ($p<0,0001$) e no estriado ($p=0,01$). Além disso, o grupo obeso apresentou aumento da atividade da α -cetoglutarato desidrogenase no hipocampo ($p<0,0001$), da succinato desidrogenase no córtex pré-frontal ($p=0,001$) e da malato desidrogenase no hipotálamo ($p<0,0001$). O tratamento com ômega-3 reverteu a inibição da citrato sintase no hipocampo ($p=0,03$) e a ativação da malato desidrogenase no hipotálamo ($p<0,0001$) (Obeso + Salina vs. Obeso + Ômega-3). Observou-se ainda tendência de o ômega-3 reverter a alteração da succinato desidrogenase no córtex pré-frontal ($p=0,07$) (Obeso + Salina vs. Obeso + Ômega-3) (Figura 27).

CICLO DE KREBS

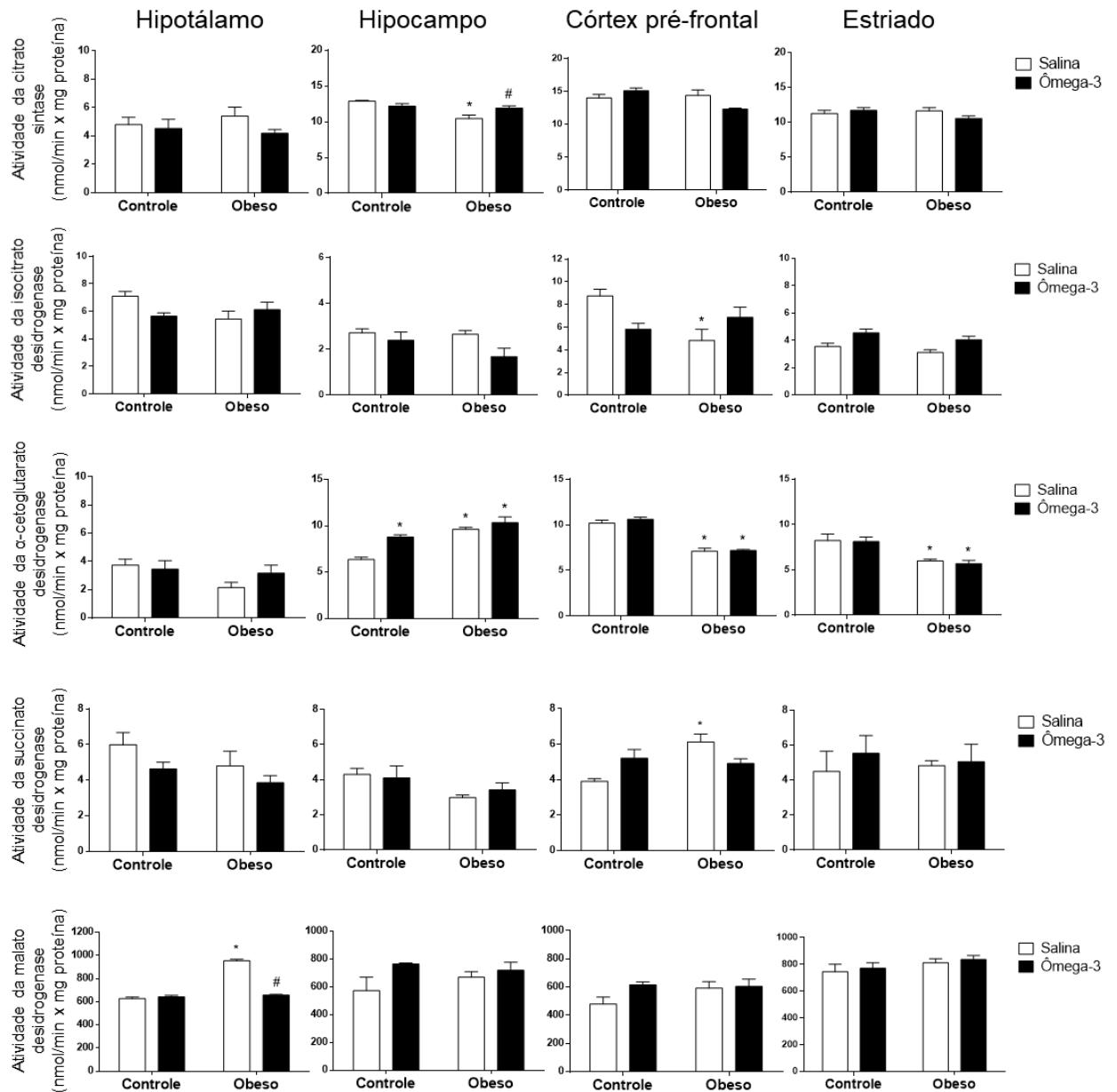


Figura 27 – Efeito do ômega-3 sobre a atividade de enzimas do ciclo de Krebs em cérebro de camundongos submetidos à obesidade. Valores expressos em média $\pm$ EPM (n=5); * vs. Controle + Salina; # vs. Obeso + Salina; $p < 0.05$ (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

Tanto a ativação como a inibição da atividade de enzimas do ciclo de Krebs podem trazer alterações intracelulares. No entanto, a inibição tende a trazer mais prejuízos, pois pode fazer com que menos elétrons sejam disponibilizados para os complexos I e II da cadeia respiratória mitocondrial, levando à inibição destes complexos, o que pode propiciar a uma menor produção de ATP, assim como que

mais elétrons escapem e formem EROs. Sabe-se que o estresse oxidativo pode ativar fatores de transcrição e estimular o aumento de citocinas pró-inflamatórias^{9,100,102}. Porém, de um modo geral, observou-se apenas leves alterações no ciclo de Krebs no cérebro após a indução de obesidade, nada que a princípio se acredita que causaria alguma repercussão clínica importante. Na mesma linha, o tratamento com ômega-3 apesar de ter corrigido poucas alterações, também não causou piora na atividade de enzimas do ciclo de Krebs.

Relativo à cadeia respiratória mitocondrial em estruturas cerebrais, os animais obesos apresentaram inibição dos complexos I, II e IV em todas estruturas cerebrais analisadas (hipotálamo $p=0,03$, $p=0,02$ e $p=0,0008$; hipocampo $p=0,0003$, $p=0,01$ e $p=0,02$; córtex pré-frontal $p=0,02$, $p=0,02$ e $p=0,0003$; estriado $p=0,002$, $p=0,001$ e $p=0,004$). O tratamento com ômega-3 reverteu a inibição dos complexos I e II no estriado ($p=0,02$ e $p=0,004$, respectivamente) (Obeso + Salina vs. Obeso + Ômega-3), bem como amenizou as alterações do complexo II no hipotálamo e no hipocampo (Figura 28).

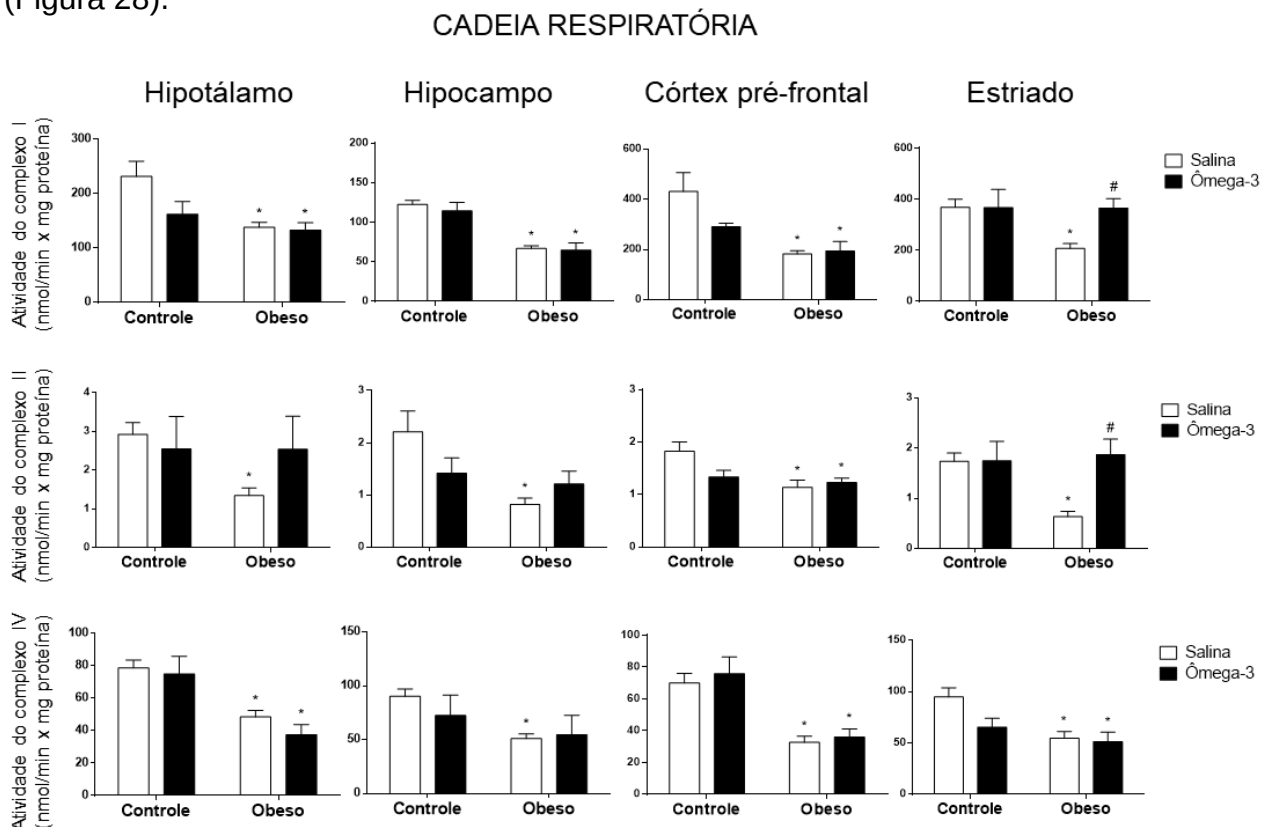


Figura 28 – Efeito do ômega-3 sobre a atividade de complexos da cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de camundongos submetidos à obesidade. Valores expressos em média $\pm$ EPM ($n=5$); * vs. Controle + Salina; # vs. Obeso + Salina; $p<0.05$ (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

A inibição de complexos da cadeia respiratória pode levar a uma menor produção de ATP e também propiciar o maior escape de elétrons, que podem aumentar a formação de EROs pela cadeia respiratória. Menor quantidade de ATP e mais EROs sendo formadas podem prejudicar a função celular. Considerando as funções importantes destas estruturas cerebrais, esta inibição pode estar relacionada as alterações já identificadas nestas estruturas na obesidade, que podem trazer prejuízos ao indivíduo. O tratamento com ômega-3 reverteu apenas a inibição dos complexos I e II no estriado, mas considerando o papel desta estrutura no sistema de recompensa, e como este encontra-se desregulado na obesidade, esta reversão é um efeito benéfico. Destaca-se que o ômega-3 não mostrou nenhum efeito prejudicial na cadeia respiratória em estruturas cerebrais.

Não foram localizados estudos que avaliassem o efeito do ômega-3 sobre o ciclo de Krebs e sobre a cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de animais obesos. Portanto, este é o primeiro estudo a relatar o efeito do ômega-3 sobre a atividade de enzimas do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

O fato de a cadeia respiratória mitocondrial ter sido inibida em todas estruturas cerebrais avaliadas e não ter sido alterada na gordura visceral, sugere que de fato, como colocado por alguns estudos^{18,75}, os danos relacionados à obesidade podem iniciar com o consumo em excesso de gordura saturada, antes mesmo do acúmulo excessivo de gordura ocorrer. Isso provavelmente se dá pela ativação do TLR pelos ácidos graxos saturados, o que ativa vias inflamatórias, que podem levar ao estresse oxidativo e à disfunção mitocondrial. Essa inibição da cadeia respiratória pode contribuir ainda mais para uma maior geração de EROs, levar ao estresse oxidativo e agravar a inflamação. Isto ocorrendo em estruturas cerebrais relacionadas ao comportamento alimentar pode levar ao descontrole alimentar, contribuir para maior consumo de alimentos recompensadores, geralmente ricos em gordura e açúcar, e levar ao acúmulo desse excesso no tecido adiposo, caracterizando a obesidade.

Em suma, neste estudo, o tratamento com ômega-3 mostrou inúmeros efeitos benéficos em camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica, o que destaca o potencial desta substância contribuir para o tratamento da obesidade. Apesar de não ter influenciado no consumo alimentar e nem no peso corporal, o tratamento com ômega-3 promoveu redução da gordura visceral. Na gordura visceral, o tratamento com ômega-3 reduziu o dano oxidativo e amenizou as alterações na

defesa antioxidante e no ciclo de Krebs. Em estruturas cerebrais, o tratamento com ômega-3 promoveu redução da inflamação e do dano oxidativo, assim como amenizou as alterações na defesa antioxidante, no ciclo de Krebs e na cadeia respiratória mitocondrial.

Especificamente em cada estrutura cerebral, no hipotálamo, o tratamento com ômega-3 amenizou diversas alterações causadas pela obesidade, o que pode contribuir para o melhor funcionamento desta estrutura cerebral tão relevante quando se trata de comportamento alimentar. O hipocampo se mostrou bastante alterado pela obesidade e o tratamento com ômega-3 foi muito benéfico nesta estrutura cerebral (reverteu totalmente a inflamação e o dano oxidativo e amenizou as demais alterações). Sabe-se que alterações no hipocampo podem trazer prejuízos de aprendizagem e memória. O pré-frontal foi a estrutura cerebral menos afetada pela obesidade, bem como onde o tratamento com ômega-3 mostrou menos benefícios. No estriado, o tratamento com ômega-3 reverteu boa parte das alterações em parâmetros inflamatórios e na cadeia respiratória, o que poderia refletir em alguma melhora relacionada ao sistema de recompensa. A não realização de testes comportamentais para verificar se as alterações bioquímicas refletiram em alterações comportamentais relacionadas às estruturas cerebrais avaliadas (como por exemplo verificar se a aprendizagem, a memória e o sistema de recompensa foram afetados pelo consumo de dieta hiperlipídica e se o ômega-3, ao reverter a alteração bioquímica, também melhora o aspecto comportamental relacionado) foi uma limitação deste estudo.

Observamos ainda que o que ocorre na periferia (gordura visceral) é semelhante ao que ocorre em estruturas cerebrais, com exceção da cadeia respiratória mitocondrial, que não mostrou alterações na gordura visceral e foi alterada em todas estruturas cerebrais analisadas. Os resultados detalhados dos efeitos do ômega-3 no tecido adiposo visceral e no cérebro de camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica estão sumarizados no Quadro 3.

Quadro 3 – Efeitos do ômega-3 no tecido adiposo visceral e no cérebro de camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

Análise \ Tecido	Gordura visceral	Cérebro			
		Hipotálamo	Hipocampo	Pré-frontal	Estriado
Peso gordura	Ob ↑ / ω-3 ↓	-	-	-	-
TNF-α	-	NA	Ob ↑ / ω-3 ↓	Ob ↑	Ob ↑ / ω-3 ↓
IL-1β	-	Ob ↑ / ω-3 ↓	Ob ↑ / ω-3 ↓	Ob ↑ / ω-3 ↓ (nr)	Ob ↑ / ω-3 ↓
IL-10	-	Ob ↓	Ob ↑ / ω-3 ↓	NA	Ob ↑ / ω-3 ↓
TBARS/ Malondialdeído	Ob ↑ / ω-3 ↓ (nr)	Ob ↑ / ω-3 ↓	Ob ↑ / ω-3 ↓	NA	NA
Carbonil	Ob ↑ / ω-3 ↓	Ob ↑ / ω-3 ↓	Ob ↑ / ω-3 ↓	NA	Ob ↑
SOD	NA	NA	NA	NA	NA
CAT	NA	NA	Ob ↓	NA	NA
GSH	Ob ↓ / ω-3 ↑ (nr)	Ob ↓ / ω-3 ↑ (nr)	Ob ↓ / ω-3 ↑ (nr)	NA	Ob ↓
Citrato sintase	Ob ↑ / ω-3 ↓ (nr)	NA	Ob ↓ / ω-3 ↑	NA	NA
Isocitrato desidrogenase	Ob ↑ / ω-3 ↓ (nr)	NA	NA	Ob ↓	NA
α-cetoglutarato desidrogenase	-	NA	Ob ↑	Ob ↓	Ob ↓
Succinato desidrogenase	NA	NA	NA	Ob ↑ / ω-3 ↓ (nr)	NA
Malato desidrogenase	Ob ↑ / ω-3 ↑	Ob ↑ / ω-3 ↓	NA	NA	NA
Complexo I	NA	Ob ↓	Ob ↓	Ob ↓	Ob ↓ / ω-3 ↑
Complexo II	NA	Ob ↓ / ω-3 ↑ (nr)	Ob ↓ / ω-3 ↑ (nr)	Ob ↓	Ob ↓ / ω-3 ↑
Complexo IV	NA	Ob ↓	Ob ↓	Ob ↓	Ob ↓

↓, reduz. ↑, aumenta. ω-3, ácidos graxos ômega-3. Ob, obesidade. NA, obesidade não alterou. (nr), não reverteu, apenas amenizou. Obs.: as células preenchidas com cinza destacam os efeitos benéficos do ômega-3

5. CONCLUSÃO

Este trabalho avaliou o potencial nutracêutico do ômega-3 em tecido adiposo e em cérebro de camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Para isso, foi avaliado o efeito do ômega-3 sobre parâmetros inflamatórios, de estresse oxidativo e de metabolismo energético. Como recomendado em qualquer estudo com indução de obesidade, o consumo alimentar, o peso corporal e o peso da gordura visceral também foram avaliados.

De modo geral, conclui-se que o tratamento com ômega-3 apresentou efeito benéfico na gordura visceral e no cérebro de camundongos obesos. O ômega-3 não alterou o consumo alimentar nem o peso corporal, mas reduziu a gordura visceral. Nas análises bioquímicas da gordura visceral, o tratamento com ômega-3 reduziu o dano oxidativo e amenizou as alterações na defesa antioxidante e em enzimas do ciclo de Krebs causadas pela ingestão de dieta hiperlipídica e obesidade. Os complexos da cadeia respiratória mitocondrial não foram alterados pela obesidade nem pelo tratamento com ômega-3 na gordura visceral. Em estruturas cerebrais, o tratamento com ômega-3 reduziu parcialmente a inflamação e o dano oxidativo, assim como amenizou as alterações na defesa antioxidante, no ciclo de Krebs e na cadeia respiratória mitocondrial causadas pela ingestão de dieta hiperlipídica e obesidade.

Destaca-se que os efeitos benéficos do ômega-3 observados neste estudo ocorreram mesmo se mantido o consumo em excesso de gordura saturada. Além disso, esta tese expandiu o foco do estudo da obesidade para outras estruturas cerebrais além do hipotálamo. Hoje já se sabe que o hipotálamo não é a única região cerebral envolvida com o comportamento alimentar e nosso estudo abre espaço para uma maior exploração de outras estruturas cerebrais (hipocampo, córtex pré-frontal e estriado) que até então receberam menor atenção.

Os resultados desta tese contribuem para elucidar mecanismos pelos quais o ômega-3 pode amenizar alterações causadas pelo consumo de uma dieta hiperlipídica, que muitas vezes caracteriza os hábitos nutricionais de indivíduos obesos. Assim, considerando-se os efeitos benéficos do ômega-3 observados neste estudo, os vários outros benefícios para a saúde já relatados pela literatura, os poucos efeitos colaterais (geralmente apenas um sabor de peixe é relatado após a ingestão de cápsulas de óleo de peixe), a segurança, as poucas interações com fármacos,

sugerem que o ômega-3 pode ser uma boa opção para auxiliar no tratamento da obesidade. Além disso, os resultados podem servir para o estímulo ao maior consumo de fontes naturais de ômega-3 (peixes) por indivíduos obesos.

Futuros estudos poderiam avaliar o efeito do ômega-3 sobre o dano oxidativo ao DNA e marcadores de morte celular em modelo animal de obesidade. No entanto, a partir dos resultados obtidos sugere-se que os próximos estudos utilizem um óleo de peixe com mais DHA, bem como que o tratamento seja superior a quatro semanas. Acredita-se que mais DHA e por mais tempo trarão mais resultados benéficos, especialmente nas estruturas cerebrais. Sugere-se também a realização de testes comportamentais para verificar se o ômega-3 ao reverter a alteração bioquímica em determinada estrutura cerebral também melhora o aspecto comportamental relacionado. Associar o uso de ômega-3 com antioxidantes e/ou com exercício físico também seriam possíveis abordagens a serem exploradas.

REFERÊNCIAS

1. World Obesity Federation. About obesity. Page Updated: 10th October 2015 [acesso em 2017 Jun 20]. Disponível em: <http://www.worldobesity.org/resources/aboutobesity/>
2. González-Muniesa P, Martínez-González MA, Hu FB, Després JP, Matsuzawa Y, Loos RJF, et al. Obesity. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17034.
3. Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;314(1):1-16.
4. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;316(2):129-39.
5. Johnson AR, Milner JJ, Makowski L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunol Rev*. 2012;249(1):218-38.
6. Mathis D. Immunological goings-on in visceral adipose tissue. *Cell Metab*. 2013;17(6):851-9.
7. Mraz M, Haluzik M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. *J Endocrinol*. 2014;222(3):R113-27.
8. Noeman SA, Hamooda HE, Baalash AA. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetol Metab Syndr*. 2011;3(1):17.
9. Bondia-Pons I, Ryan L, Martinez JA. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J Physiol Biochem*. 2012;68(4):701-11.
10. Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obes Res Clin Pract*. 2013;7(5):e330-41.
11. Putti R, Sica R, Migliaccio V, Lionetti L. Diet impact on mitochondrial bioenergetics and dynamics. *Front Physiol*. 2015;6:109.
12. Heinonen S, Buzkova J, Muniandy M, Kaksonen R, Ollikainen M, Ismail K, et al. Impaired mitochondrial biogenesis in adipose tissue in acquired obesity. *Diabetes*. 2015;64(9):3135-45.
13. Jheng HF, Huang SH, Kuo HM, Hughes MW, Tsai YS. Molecular insight and pharmacological approaches targeting mitochondrial dynamics in skeletal muscle during obesity. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1350:82-94.
14. Convit A. Obesity is associated with structural and functional brain abnormalities: where do we go from here? *Psychosom Med*. 2012;74(7):673-4.

15. Shefer G, Marcus Y, Stern N. Is obesity a brain disease? *Neurosci Biobehav Rev.* 2013;37(10 Pt 2):2489-503.
16. Freeman LR, Zhang L, Nair A, Dasuri K, Francis J, Fernandez-Kim SO, et al. Obesity increases cerebrocortical reactive oxygen species and impairs brain function. *Free Radic Biol Med.* 2013;56:226-33.
17. Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR, et al. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One.* 2009;4(4):e5045.
18. Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest.* 2012;122(1):153-62.
19. Williams LM. Hypothalamic dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc.* 2012;71(4):521-33.
20. Boitard C, Cavaroc A, Sauvant J, Aubert A, Castanon N, Laye S, et al. Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. *Brain Behav Immun.* 2014;40:9-17.
21. Sobesky JL, Barrientos RM, De May HS, Thompson BM, Weber MD, Watkins LR, et al. High-fat diet consumption disrupts memory and primes elevations in hippocampal IL-1 β , effect that can be prevented with dietary reversal or IL-1 receptor antagonism. *Brain Behav Immun.* 2014;42:22-32.
22. Stranahan AM. Models and mechanisms for hippocampal dysfunction in obesity and diabetes. *Neuroscience.* 2015;309:125-39.
23. Nummenmaa L, Hirvonen J, Hannukainen JC, Immonen H, Lindroos MM, Salminen P, et al. Dorsal striatum and its limbic connectivity mediate abnormal anticipatory reward processing in obesity. *PLoS One.* 2012;7(2):e31089.
24. Tomasi D, Volkow ND. Striatocortical pathway dysfunction in addiction and obesity: differences and similarities. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2013;48(1):1-19.
25. Farr OM, Li CS, Mantzoros CS. Central nervous system regulation of eating: Insights from human brain imaging. *Metabolism.* 2016;65(5):699-713.
26. Velloso LA, Schwartz MW. Altered hypothalamic function in diet induced obesity. *Int J Obes (Lond).* 2011;35(12):1455-65.
27. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, 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.* 2014;384(9945):766-81.

28. Kleinridders A, Könner AC, Brüning JC. CNS- targets in control of energy and glucose homeostasis. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(6):794-804.
29. Muñoz A, Costa M. Nutritionally mediated oxidative stress and inflammation. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:610950.
30. Golub N, Geba D, Mousa SA, Williams G, Block RC. Greasing the wheels of managing overweight and obesity with omega-3 fatty acids. *Med Hypotheses.* 2011;77(6):1114-20.
31. Campbell SC, Bello NT. Omega-3 fatty acids and obesity. *J Food Nutr Disor.* 2012;1(2):1-2.
32. Rokling-Andersen MH, Rustan AC, Wensaas AJ, Kaalhus O, Wergedahl H, Røst TH, et al. Marine n-3 fatty acids promote size reduction of visceral adipose depots, without altering body weight and composition, in male Wistar rats fed a high-fat diet. *Br J Nutr.* 2009;102(7):995-1006.
33. Samane S, Christon R, Dombrowski L, Turcotte S, Charrouf Z, Lavigne C, et al. Fish oil and argan oil intake differently modulate insulin resistance and glucose intolerance in a rat model of dietary-induced obesity. *Metabolism.* 2009;58(7):909-19.
34. Kalupahana NS, Claycombe K, Newman SJ, Stewart T, Siriwardhana N, Matthan N, et al. Eicosapentaenoic acid prevents and reverses insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice via modulation of adipose tissue inflammation. *J Nutr.* 2010;140(11):1915-22.
35. Liu X, Xue Y, Liu C, Lou Q, Wang J, Yanagita T, et al. Eicosapentaenoic acid-enriched phospholipid ameliorates insulin resistance and lipid metabolism in diet-induced-obese mice. *Lipids Health Dis.* 2013;12:109.
36. Rossmeisl M, Medrikova D, van Schothorst EM, Pavlisova J, Kuda O, Hensler M, et al. Omega-3 phospholipids from fish suppress hepatic steatosis by integrated inhibition of biosynthetic pathways in dietary obese mice. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1841(2):267-78.
37. Bargut TC, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. A high-fish-oil diet prevents adiposity and modulates white adipose tissue inflammation pathway in mice. *J Nutr Biochem.* 2015;26(9):960-9.
38. Itariu BK, Zeyda M, Hochbrugger EE, Neuhofer A, Prager G, Schindler K, et al. Long-chain n-3 PUFAs reduce adipose tissue and systemic inflammation in severely obese nondiabetic patients: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2012;96(5):1137-49.
39. Kiecolt-Glaser JK, Epel ES, Belury MA, Andridge R, Lin J, Glaser R, et al. Omega-3 fatty acids, oxidative stress, and leukocyte telomere length: a randomized controlled trial. *Brain Behav Immun.* 2013;28:16-24.

40. González-Acevedo O, Hernández-Sierra JF, Salazar-Martínez A, Mandeville PB, Valadez-Castillo FJ, De La Cruz-Mendoza E, et al. Efecto de la suplementación de omega 3 sobre IMC, ICC y composición corporal en mujeres obesas. *Arch Latinoam Nutr.* 2013;63(3):224-31.
41. Juárez-López C, Klünder-Klünder M, Madrigal-Azcárate A, Flores-Huerta S. Omega-3 polyunsaturated fatty acids reduce insulin resistance and triglycerides in obese children and adolescents. *Pediatr Diabetes.* 2013;14(5):377-83.
42. Trépanier MO, Hopperton KE, Orr SK, Bazinet RP. N-3 polyunsaturated fatty acids in animal models with neuroinflammation: An update. *Eur J Pharmacol.* 2016;785:187-206.
43. Pimentel GD, Lira FS, Rosa JC, Oller do Nascimento CM, Oyama LM, Harumi Watanabe RL, et al. High-fat fish oil diet prevents hypothalamic inflammatory profile in rats. *ISRN Inflamm.* 2013;2013:419823.
44. Viggiano E, Mollica MP, Lionetti L, Cavaliere G, Trinchese G, De Filippo C, et al. Effects of an high-fat diet enriched in lard or in fish oil on the hypothalamic amp-activated protein kinase and inflammatory mediators. *Front Cell Neurosci.* 2016;10:150.
45. Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, Pauli JR, Morari J, Souza CT, et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One.* 2012;7(1):e30571.
46. Barbalho SM, Bechara MD, Quesada KR, Goulart RA. Papel dos ácidos graxos ômega 3 na resolução dos processos inflamatórios. *Medicina (Ribeirão Preto).* 2011;44(3):234-40.
47. Organização Mundial da Saúde (OMS). Obesity and overweight – Fact sheet Updated June 2016. [acesso em 2017 Jun 29]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
48. Tchernof A, Després JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev.* 2013;93(1):359-404.
49. Walker GE, Marzullo P, Ricotti R, Bona G, Prodam F. The pathophysiology of abdominal adipose tissue depots in health and disease. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2014;19(1):57-74.
50. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO). Diretrizes brasileiras de obesidade 2009/2010 / ABESO. 3rd ed. Itapevi: AC Farmacêutica; 2009. Disponível em: http://www.abeso.org.br/pdf/diretrizes_brasileiras_obesidade_2009_2010_1.pdf
51. Williams EP, Mesidor M, Winters K, Dubbert PM, Wyatt SB. Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. *Curr Obes Rep.* 2015;4(3):363-70.

52. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. [acesso em 2017 Jun 29]. Disponível em: http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/07/vigitel_2016_jun17.pdf
53. Knight JA. Diseases and disorders associated with excess body weight. *Ann Clin Lab Sci.* 2011;41(2):107-21.
54. Bhaskaran K, Douglas I, Forbes H, dos-Santos-Silva I, Leon DA, Smeeth L. Body-mass index and risk of 22 specific cancers: a population-based cohort study of 5.24 million UK adults. *Lancet.* 2014;384(9945):755-65.
55. Bahia LR, Araújo DV. Impacto econômico da obesidade no Brasil. *Revista HUPE.* 2014;13(1):13-7.
56. Haslam D. Obesity: a medical history. *Obes Rev.* 2007;8 Suppl 1:31-6.
57. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet.* 2011;378(9793):804-14.
58. Ponterio E, Gnessi L. Adenovirus 36 and obesity: An Overview. *Viruses.* 2015;7(7):3719-40.
59. Rui L. Brain regulation of energy balance and body weight. *Rev Endocr Metab Disord.* 2013;14(4):387-407.
60. Halberg N, Wernstedt-Asterholm I, Scherer PE. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008;37(3):753-68.
61. Damiani D, Damiani D. Sinalização cerebral do apetite. *Rev Bras Clin Med.* 2011;9(2):138-45.
62. Schneeberger M, Gomis R, Claret M. Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling energy balance. *J Endocrinol.* 2014;220(2):T25-46.
63. Jung CH, Kim MS. Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity. *Arch Pharm Res.* 2013;36(2):201-7.
64. Koch L, Wunderlich FT, Seibler J, Könnert AC, Hampel B, Irlenbusch S, et al. Central insulin action regulates peripheral glucose and fat metabolism in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(6):2132-47.
65. Guillemot-Legris O, Muccioli GG. Obesity-induced neuroinflammation: beyond the hypothalamus. *Trends Neurosci.* 2017;40(4):237-53.

66. McArdle MA, Finucane OM, Connaughton RM, McMorrow AM, Roche HM. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:52.
67. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):85-97.
68. Exley MA, Hand L, O'Shea D, Lynch L. Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity. *J Endocrinol*. 2014;223(2):R41-8.
69. Wood IS, de Heredia FP, Wang B, Trayhurn P. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc*. 2009;68(4):370-7.
70. Patel PS, Buras ED, Balasubramanyam A. The role of the immune system in obesity and insulin resistance. *J Obes*. 2013;2013:616193.
71. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:415-45.
72. Ballak DB, Stienstra R, Tack CJ, Dinarello CA, van Diepen JA. IL-1 family members in the pathogenesis and treatment of metabolic disease: Focus on adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Cytokine*. 2015;75(2):280-90.
73. Lee H, Lee IS, Choue R. Obesity, inflammation and diet. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*. 2013;16(3):143-52.
74. Fessler MB, Rudel LL, Brown JM. Toll-like receptor signaling links dietary fatty acids to the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol*. 2009;20(5):379-85.
75. Kälén S, Heppner FL, Bechmann I, Prinz M, Tschöp MH, Yi CX. Hypothalamic innate immune reaction in obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(6):339-51.
76. Cai D. Neuroinflammation and neurodegeneration in overnutrition-induced diseases. *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24(1):40-7.
77. Mauro C, De Rosa V, Marelli-Berg F, Solito E. Metabolic syndrome and the immunological affair with the blood-brain barrier. *Front Immunol*. 2015;5:677.
78. Buckman LB, Hasty AH, Flaherty DK, Buckman CT, Thompson MM, Matlock BK, et al. Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. *Brain Behav Immun*. 2014;35:33-42.
79. Miller AA, Spencer SJ. Obesity and neuroinflammation: A pathway to cognitive impairment. *Brain Behav Immun*. 2014;42:10-21.

80. Gupta S, Knight AG, Gupta S, Keller JN, Bruce-Keller AJ. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *J Neurochem*. 2012;120(6):1060-71.
81. Argente-Arizón P, Freire-Regatillo A, Argente J, Chowen JA. Role of non-neuronal cells in body weight and appetite control. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6:42.
82. Faulconbridge LF, Hayes MR. Regulation of energy balance and body weight by the brain: a distributed system prone to disruption. *Psychiatr Clin North Am*. 2011;34(4):733-45.
83. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci*. 2009;29(2):359-70.
84. Posey KA, Clegg DJ, Printz RL, Byun J, Morton GJ, Vivekanandan-Giri A, et al. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(5):E1003-12.
85. Kanoski E, Davidson TL. Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. *Psychophysiol Behav*. 2011;103(1):59-68.
86. Davidson TL, Hargrave SL, Swithers SE, Sample CH, Fu X, Kinzig KP, et al. Inter-relationships among diet, obesity and hippocampal-dependent cognitive function. *Neuroscience*. 2013;253:110-22.
87. Jeon BT, Jeong EA, Shin HJ, Lee Y, Lee DH, Kim HJ, et al. Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet. *Diabetes*. 2012;61(6):1444-54.
88. Dutheil S, Ota KT, Wohleb ES, Rasmussen K, Duman RS. High-fat diet induced anxiety and anhedonia: impact on brain homeostasis and inflammation. *Neuropsychopharmacology*. 2016;41(7):1874-87.
89. Park HR, Park M, Choi J, Park KY, Chung HY, Lee J. A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neurosci Lett*. 2010;482(3):235-9.
90. Stice E, Figlewicz DP, Gosnell BA, Levine AS, Pratt WE. The contribution of brain reward circuits to the obesity epidemic. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013; 37(9 Pt A):2047-58.
91. García-García I, Horstmann A, Jurado MA, Garolera M, Chaudhry SJ, Margulies DS, et al. Reward processing in obesity, substance addiction and non-substance addiction. *Obes Rev*. 2014;15(11):853-69.

92. Murray S, Tulloch A, Gold MS, Avena NM. Hormonal and neural mechanisms of food reward, eating behaviour and obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(9):540-52.
93. Kenny PJ. Reward mechanisms in obesity: New insights and future directions. *Neuron*. 2011;69(4):664-79.
94. Burger KS, Stice E. Variability in reward responsivity and obesity: Evidence from brain imaging studies. *Curr Drug Abuse Rev*. 2011;4(3):182-9.
95. Landeiro FM, Quarantini LC. Obesidade: controle neural e hormonal do comportamento alimentar. *R Ci Med Biol*. 2011;10(3):236-45.
96. Zheng H, Lenard NR, Shin AC, Berthoud HR. Appetite control and energy balance regulation in the modern world: reward-driven brain overrides repletion signals. *Int J Obes (Lond)*. 2009;33 Suppl 2:S8-13.
97. Denis RG, Joly-Amado A, Webber E, Langlet F, Schaeffer M, Padilla SL, et al. Palatability can drive feeding independent of AgRP neurons. *Cell Metab*. 2015;22(4):646-57.
98. Geiger BM, Behr GG, Frank LE, Caldera-Siu AD, Beinfeld MC, Kokkotou EG, et al. Evidence for defective mesolimbic dopamine exocytosis in obesity-prone rats. *FASEB J*. 2008;22(8):2740-6.
99. Stice E, Yokum S, Blum K, Bohon C. Weight gain is associated with reduced striatal response to palatable food. *J Neurosci*. 2010;30(39):13105-9.
100. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)*. 2006;30:400-18.
101. Roberts CK, Sindhu KK: Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci*. 2009;84(21-22):705-12.
102. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci*. 2011;12(5):3117-32.
103. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):9-19.
104. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*. 2012;142(w13659):1-14.
105. Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids*. 2012;2012:736837.
106. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr*. 2010; 23(4):629-43.

107. Frohnert BI, Bernlohr DA. Protein carbonylation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance. *Adv Nutr.* 2013;4(2):157-63.
108. Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism.* 2008;57(8):1071-7.
109. Amirkhizi F, Siassi F, Minaie S, Djalali M, Rahimi A, Chamari M. Is obesity associated with increased plasma lipid peroxidación and oxidative stress in women. *ARYA Atheroscler J.* 2007;2(4):189-92.
110. Gil-Ortega M, Condezo-Hoyos L, García-Prieto CF, Arribas SM, González MC, Aranguez I, et al. Imbalance between pro and anti-oxidant mechanisms in perivascular adipose tissue aggravates long-term high-fat diet-derived endothelial dysfunction. *PLoS One.* 2014;9(4):e95312.
111. Hernández-Aguilera A, Rull A, Rodríguez-Gallego E, Riera-Borrull M, Luciano-Mateo F, Camps J, et al. Mitochondrial dysfunction: a basic mechanism in inflammation-related non-communicable diseases and therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:135698.
112. Ma W, Yuan L, Yu H, Xi Y, Xiao R. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in the brain of diet-induced obese rats but not in diet-resistant rats. *Life Sci.* 2014;110(2):53-60.
113. Osellame LD, Blacker TS, Duchon MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012;26(6):711-23.
114. Kusminski CM, Scherer PE. Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(9):435-43.
115. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Bioquímica*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2014. 1162 p.
116. Dashty M. A quick look at biochemistry: carbohydrate metabolism. *Clin Biochem.* 2013;46(15):1339-52.
117. Hüttemann M, Lee I, Pecinova A, Pecina P, Przyklenk K, Doan JW. Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease. *J Bioenerg Biomembr.* 2008;40(5):445-56.
118. Bournat JC, Brown CW. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010;17(5):446-52.
119. Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012(936486):1-14.

120. Yu EP, Bennett MR. Mitochondrial DNA damage and atherosclerosis. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(9):481-7.
121. Rogge MM. The role of impaired mitochondrial lipid oxidation in obesity. *Biol Res Nurs.* 2009;10(4):356-73.
122. Liesa M, Shrihai OS. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab.* 2013;17(4):491-506.
123. Zorzano A, Liesa M, Palacín M. Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(10):1846-54.
124. Yin X, Lanza IR, Swain JM, Sarr MG, Nair KS, Jensen MD. Adipocyte mitochondrial function is reduced in human obesity independent of fat cell size. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(2):E209-16.
125. Rong JX, Qiu Y, Hansen MK, Zhu L, Zhang V, Xie M, et al. Adipose mitochondrial biogenesis is suppressed in db/db and high-fat diet-fed mice and improved by rosiglitazone. *Diabetes.* 2007;56(7):1751-60.
126. Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseane E, Chauvin MA, Morio B, et al. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest.* 2008;118(2):789-800.
127. Pintus F, Floris G, Rufini A. Nutrient availability links mitochondria, apoptosis, and obesity. *Aging (Albany NY).* 2012;4(11):734-41.
128. Muñoz-Pinedo. Signaling pathways that regulate life and cell death: evolution of apoptosis in the context of self-defense. *Adv Exp Med Biol.* 2012;738:124-43.
129. Tinahones FJ, Coín Aragüez L, Murri M, Oliva Olivera W, Mayas Torres MD, Barbarroja N, et al. Caspase induction and BCL2 inhibition in human adipose tissue: a potential relationship with insulin signaling alteration. *Diabetes Care.* 2013;36(3):513-21.
130. Rivera P, Martín MP, Pavón FJ, Serrano A, Crespillo A, Cifuentes M, et al. Pharmacological administration of the isoflavone daidzein enhances cell proliferation and reduces high fat diet-induced apoptosis and gliosis in the rat hippocampus. *PLoS One.* 2013;8(5):e64750.
131. Rosini TC, Silva ASR, Moraes C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. *Rev Assoc Med Bras.* 2012;58(3):383-7.
132. Nilsson C, Raun K, Yan FF, Larsen MO, Tang-Christensen M. Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacol Sin.* 2012;33(2):173-81.

133. Lutz TA, Woods SC. Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol*. 2012;Chapter 5:Unit5.61.
134. Wang CY, Liao JK. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods Mol Biol*. 2012;821:421-33.
135. Cesaretti MLR, Kohlmann Junior O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006;50(2):190-7.
136. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15(4):798-808.
137. Chusyd DE, Wang D, Huffman DM, Nagy TR. Relationships between rodent white adipose fat pads and human white adipose fat depots. *Front Nutr*. 2016;3:10.
138. Catalano KJ, Stefanovski D, Bergman RN. Critical role of the mesenteric depot versus other intra-abdominal adipose depots in the development of insulin resistance in young rats. *Diabetes*. 2010;59(6):1416-23.
139. Tchkonja T, Thomou T, Zhu Y, Karagiannides I, Pothoulakis C, Jensen MD, et al. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab*. 2013;17(5):644-56.
140. Paumgartten FJR. Tratamento farmacológico da obesidade: a perspectiva da saúde pública. *Cad. Saúde Pública*. 2011;27(3):404-5.
141. Pucci A, Finer N. New medications for treatment of obesity: metabolic and cardiovascular effects. *Can J Cardiol*. 2015;31(2):142-52.
142. Surette ME. The science behind dietary omega-3 fatty acids. *CMAJ*. 2008;178(2):177-80.
143. Gómez Candela C, Bermejo López LM, Loria Kohen V. Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health: nutritional recommendations. *Nutr Hosp*. 2011;26(2):323-9.
144. Arbex AK, Bizarro VR, Santos JCS, Araújo LMM, de Jesus ALC, Fernandes MSA, et al. The impact of the essential fatty acids (EFA) in human health. *OJEMD*. 2015;5:98-104.
145. Anderson BM, Ma DW. Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal? *Lipids Health Dis*. 2009;8(33):1-20.
146. Yates CM, Calder PC, Ed Rainger G. Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. *Pharmacol Ther*. 2014;141(3):272-82.

147. Ellulu MS, Khaza'ai H, Abed Y, Rahmat A, Ismail P, Ranneh Y. Role of fish oil in human health and possible mechanism to reduce the inflammation. *Inflammopharmacology*. 2015;23(2-3):79-89.
148. Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008;233(6):674-88.
149. Barceló-Coblijn G, Murphy EJ. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog Lipid Res*. 2009;48(6):355-74.
150. Calder PC. Mechanisms of action of (n-3) fatty acid. *J Nutr*. 2012;142(3):592-9.
151. Agrawal R, Gomez-Pinilla F. 'Metabolic syndrome' in the brain: deficiency in omega-3 fatty acid exacerbates dysfunctions in insulin receptor signalling and cognition. *J Physiol*. 2012;590(Pt 10):2485-99.
152. Farooqui AA. n-3 fatty acid-derived lipid mediators in the brain: new weapons against oxidative stress and inflammation. *Curr Med Chem*. 2012;19(4):532-43.
153. Janssen CI, Kiliaan AJ. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. *Prog Lipid Res*. 2014;53:1-17.
154. Chapkin RS, Kim W, Lupton JR, McMurray DN. Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: emerging mediators of inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2009;81(2-3):187-91.
155. Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutr Rev*. 2010;68(5):280-9.
156. Lorente-Cebrián S, Costa AG, Navas-Carretero S, Zabala M, Laiglesia LM, Martínez JA, et al. An update on the role of omega-3 fatty acids on inflammatory and degenerative diseases. *J Physiol Biochem*. 2015;71(2):341-9.
157. Flock MR, Rogers CJ, Prabhu KS, Kris-Etherton PM. Immunometabolic role of long-chain omega-3 fatty acids in obesity-induced inflammation. *Diabetes Metab Res Rev*. 2013;29(6):431-45.
158. Martínez-Fernández L, Laiglesia LM, Huerta AE, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ. Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2015;121(Pt A):24-41.
159. Lee JH, O'Keefe JH, Lavie CJ, Marchioli R, Harris WS. Omega-3 fatty acids for cardioprotection. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(3):324-32.
160. Bermúdez Menéndez de la Granda M, Sinclair AJ. Fatty acids and obesity. *Curr Pharm Des*. 2009;15(36):4117-25.

161. Buckley JD, Howe PR. Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids may be beneficial for reducing obesity-a review. *Nutrients*. 2010;2(12):1212-30.
162. Abdel-Maksoud SM, Hassanein SI, Gohar NA, Attia SMM, Gad MZ. Investigation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene expression in hypothalamus of obese rats: Modulation by omega-3 fatty acids. *Nutr Neurosci*. 2016;1-6.
163. Kiecolt-Glaser JK, Belury MA, Andridge R, Malarkey WB, Hwang BS, Glaser R. Omega-3 supplementation lowers inflammation in healthy middle-aged and older adults: a randomized controlled trial. *Brain Behav Immun*. 2012;26(6):988-95.
164. Mori T, Kondo H, Hase T, Tokimitsu I, Murase T. Dietary fish oil upregulates intestinal lipid metabolism and reduces body weight gain in C57BL/6J mice. *J Nutr*. 2007;137(12):2629-34.
165. LeMieux MJ, Kalupahana NS, Scoggin S, Moustaid-Moussa N. Eicosapentaenoic acid reduces adipocyte hypertrophy and inflammation in diet-induced obese mice in an adiposity-independent manner. *J Nutr*. 2015;145(3):411-7.
166. Ávila PR, Marques SO, Luciano TF, Vitto MF, Engelmann J, Souza DR, et al. Resveratrol and fish oil reduce catecholamine-induced mortality in obese rats: role of oxidative stress in the myocardium and aorta. *Br J Nutr*. 2013;110(9):1580-90.
167. Philp LK, Heilbronn LK, Janovska A, Wittert GA. Dietary enrichment with fish oil prevents high fat-induced metabolic dysfunction in skeletal muscle in mice. *PLoS One*. 2015;10(2):e0117494.
168. Yook JS, Kim KA, Park JE, Lee SH, Cha YS. Microalgal oil supplementation has an anti-obesity effect in C57BL/6J mice fed a high fat diet. *Prev Nutr Food Sci*. 2015;20(4):230-7.
169. Ferramosca A, Conte A, Zara V. Krill oil ameliorates mitochondrial dysfunctions in rats treated with high-fat diet. *Biomed Res Int*. 2015;2015:645984.
170. Cavaliere G, Trinchese G, Bergamo P, De Filippo C, Mattace Raso G, Gifuni G, et al. Polyunsaturated fatty acids attenuate diet induced obesity and insulin resistance, modulating mitochondrial respiratory uncoupling in rat skeletal muscle. *PLoS One*. 2016;11(2):e0149033.
171. de Sá RD, Crisma AR, Cruz MM, Martins AR, Masi LN, do Amaral CL, et al. Fish oil prevents changes induced by a high-fat diet on metabolism and adipokine secretion in mice subcutaneous and visceral adipocytes. *J Physiol*. 2016;594(21):6301-17.

172. Go RE, Hwang KA, Park GT, Lee HM, Lee GA, Kim CW, et al. Effects of microalgal polyunsaturated fatty acid oil on body weight and lipid accumulation in the liver of C57BL/6 mice fed a high fat diet. *J Biomed Res.* 2016;30(3):234-42.
173. Haghavan S, Keshavarz SA, Mazaheri R, Alizadeh Z, Mansournia MA. Effect of omega-3 PUFAs supplementation with lifestyle modification on anthropometric indices and Vo₂ max in overweight women. *Arch Iran Med.* 2016;19(5):342-7.
174. Ellulu MS, Khaza'ai H, Patimah I, Rahmat A, Abed Y. Effect of long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids on inflammation and metabolic markers in hypertensive and/or diabetic obese adults: a randomized controlled trial. *Food Nutr Res.* 2016;60:29268.
175. Wang F, Wang Y, Zhu Y, Liu X, Xia H, Yang X, et al. Treatment for 6 months with fish oil-derived n-3 polyunsaturated fatty acids has neutral effects on glycemic control but improves dyslipidemia in type 2 diabetic patients with abdominal obesity: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur J Nutr.* 2016:1-8.
176. 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.* 2009;116(1):1-16.
177. Lorente-Cebrián S, Costa AG, Navas-Carretero S, Zabala M, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ. Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence. *J Physiol Biochem.* 2013;69(3):633-51.
178. Bender N, Portmann M, Heg Z, Hofmann K, Zwahlen M, Egger M. Fish or n3-PUFA intake and body composition: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev.* 2014;15(8):657-65.
179. Du S, Jin J, Fang W, Su Q. Does fish oil have an anti-obesity effect in overweight/obese adults? A meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One.* 2015;10(11):e0142652.
180. Zhang YY, Liu W, Zhao TY, Tian HM. Efficacy of omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in managing overweight and obesity: A meta-analysis of randomized clinical trials. *J Nutr Health Aging.* 2017;21(2):187-92.
181. Bashir S, Sharma Y, Elahi A, Khan F. Amelioration of obesity-associated inflammation and insulin resistance in c57bl/6 mice via macrophage polarization by fish oil supplementation. *J Nutr Biochem.* 2016;33:82-90.
182. Inoue T, Tanaka M, Masuda S, Ohue-Kitano R, Yamakage H, Muranaka K, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress the inflammatory responses of lipopolysaccharide-stimulated mouse microglia by activating SIRT1 pathways. *Biochim Biophys Acta.* 2017;1862(5):552-60.

183. González-Pérez A, Horrillo R, Ferré N, Gronert K, Dong B, Morán-Salvador E, et al. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB J*. 2009;23(6):1946-57.
184. Neuhofer A, Zeyda M, Mascher D, Itariu BK, Murano I, Leitner L, et al. Impaired local production of proresolving lipid mediators in obesity and 17-HDHA as a potential treatment for obesity-associated inflammation. *Diabetes*. 2013;62(6):1945-56.
185. Moritz B, Wazlawik E, Minatti J, Miranda RC. Interferência dos ácidos graxos ômega-3 nos lipídeos sanguíneos de ratos submetidos ao exercício de natação. *Rev Nutr*. 2008;21(6):659-69.
186. Razolli DS, Moraes JC, Morari J, Moura RF, Vinolo MA, Velloso LA. TLR4 expression in bone marrow-derived cells is both necessary and sufficient to produce the insulin resistance phenotype in diet-induced obesity. *Endocrinology*. 2015;156(1):103-13.
187. Warden CH, Fisler JS. Comparisons of diets used in animal models of high-fat feeding. *Cell Metab*. 2008;7(4):277.
188. Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRN. Animais de laboratório: o camundongo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2007;28(1):11-23.
189. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
190. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990;186:421-31.
191. Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;43(2):619-24.
192. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1994;233:346-57.
193. Bannister JV, Calabrese L. Assays for SOD. *Meth. Biochem. Anal. Methods Biochem Anal*. 1987;32:279-312.
194. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.
195. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976;74(1):214-26.
196. Faloona GR, Srere PA. Escherichia coli citrate synthase. Purification and the effect of potassium on some properties. *Biochemistry*. 1969;8(11):4497-503.

197. Plaut GWE. Isocitrate dehydrogenase from bovine heart. In: Lowenstein JM. *Methods in enzymology*. New York: Academic Press; 1969. p. 34-42.
198. Tretter L, Adam-Vizi V. Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of [alpha]-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *J Neurosci*. 2000;20(24):8972-9.
199. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta*. 1985;153(1):23-36.
200. Kitto GB. Intra- and extra mitochondrial malate dehydrogenases from chicken and tuna heart. *Methods Enzymol*. 1969;13:106-16.
201. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*. 1996;328(2):309-16.
202. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta*. 1994;228(1):35-51.
203. De Assis AM, Rech A, Longoni A, Rotta LN, Denardin CC, Pasquali MA, et al. Ω 3-Polyunsaturated fatty acids prevent lipoperoxidation, modulate antioxidant enzymes, and reduce lipid content but do not alter glycogen metabolism in the livers of diabetic rats fed on a high fat thermolyzed diet. *Mol Cell Biochem*. 2012;361(1-2):151-60.
204. Ahmed AA, Balogun KA, Bykova NV, Cheema SK. Novel regulatory roles of omega-3 fatty acids in metabolic pathways: a proteomics approach. *Nutr Metab (Lond)*. 2014;11(1):6.
205. Ferramosca A, Conte L, Zara V. A krill oil supplemented diet reduces the activities of the mitochondrial tricarboxylate carrier and of the cytosolic lipogenic enzymes in rats. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2012;96(2):295-306.
206. Ferramosca A, Conte A, Burri L, Berge K, De Nuccio F, Giudetti AM, et al. A krill oil supplemented diet suppresses hepatic steatosis in high-fat fed rats. *PLoS One*. 2012;7(6):e38797.
207. Federico A, Cardaioli E, Da Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J Neurol Sci*. 2012;322(1-2):254-62.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigos relacionados à tese

Mello AH, Uberti MF, Farias BX, Souza NAR, Rezin GT. Omega-3 and obesity: from peripheral tissues to the brain. *Artigo de revisão submetido à British Journal of Nutrition*

Mello AH, Costa AB, Engel JDG, Rezin GT. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Artigo de revisão submetido à Life Sciences*

Mello AH, Schraiber RB, Goldim MPS, Garcez ML, Gomes ML, Silveira GB, Zaccaron RP, Budni J, Schuck PF, Silveira PCL, Petronilho F, Rezin GT. Omega-3 alleviates brain alterations in high-fat diet-induced obesity model (título provisório). *Artigo está sendo redigido e será submetido à Nutritional Neuroscience*

Mello AH, Schraiber RB, Goldim MPS, Mathias K, Silveira GB, Mendes C, Gomes ML, Silveira PCL, Schuck PF, Petronilho F, Rezin GT. Omega-3 has beneficial effects on visceral fat in high-fat diet-induced obesity model (título provisório). *Artigo está sendo redigido (revista não definida)*

APÊNDICE B – Artigos publicados durante o período do Doutorado (não relacionados à tese)

Mello AH, Gassenferth A, Souza LR, Fortunato JJ, Rezin GT. ω -3 and major depression: a review. *Acta Neuropsychiatr.* 2014;26(3):178-85.

de Mello AH, Gassenferth A, Schraiber Rde B, Souza Lda R, Florentino D, Danielski LG, Cittadin-Soares Eda C, Fortunato JJ, Petronilho F, Quevedo J, Rezin GT. Effects of omega-3 on behavioral and biochemical parameters in rats submitted to chronic mild stress. *Metab Brain Dis.* 2014;29(3):691-9.

de Mello AH, Prá M, Cardoso LC, de Bona Schraiber R, Rezin GT. Incretin-based therapies for obesity treatment. *Metabolism.* 2015;64(9):967-81.

de Mello AH, Souza Lda R, Cereja AC, Schraiber Rde B, Florentino D, Martins MM, Petronilho F, Quevedo J, Rezin GT. Effect of subchronic administration of agomelatine on brain energy metabolism and oxidative stress parameters in rats. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2016;70(4):159-66.

Prá M, Ferreira GK, **de Mello AH**, Schraiber RB, Cardoso LC, Souza LD, da Rosa N, Fortunato JJ, Rezin GT. Single dose and repeated administrations of liraglutide alter energy metabolism in the brains of young and adult rats. *Biochem Cell Biol.* 2016;94(5):451-8.

Mazon JN, **de Mello AH**, Ferreira GK, Rezin GT. The impact of obesity on neurodegenerative diseases. *Life Sci.* 2017;182:22-8.

ANEXO

ANEXO A – Pareceres Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 01 de outubro de 2015

Registro na CEUA (código): 15.021.4.01.IV

Ao pesquisador: Gislaine Tezza Rezín; Aline Haas de Mello

Curso : Medicina - Tubarão

Prezado(a) Pesquisador(a),

Vimos, através deste, informar que o projeto de pesquisa “Efeito do ômega-3 sobre parâmetros comportamentais de adiposidade e bioquímicos em um modelo animal de obesidade” foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da UNISUL.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, o disposto na legislação federal aplicável à criação e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informado imediatamente à Comissão de Ética no Uso de Animais da UNISUL.

Atenciosamente,


Sandro Melim Sgrott

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNISUL

Unisul - Universidade do Sul de Santa Catarina

☎ (48) 3279-1036

✉ ceua@unisul.br sandro.sgrott@gmail.com



Antes de imprimir este e-mail pense em sua responsabilidade e compromisso com o MEIO AMBIENTE



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 13 de dezembro de 2016
Registro na CEUA (código): 16.023.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Gislaine Tezza Rezin

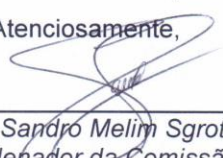
Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada “Parâmetros inflamatórios e bioquímicos em um modelo animal de obesidade: o papel do ômega-3”, registrada com o nº 16.023.4.01.IV, sob a responsabilidade de Gislaine Tezza Rezin - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 13 de dezembro de 2016.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,



Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão