

**Universidade Federal de Ouro Preto**

Núcleo de Pesquisa Exatas e Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
PPGCB

---

Tese

**ÓLEO DE LINHAÇA, ÁCIDO  
EICOSAPENTAENOICO E  
DOCOSAHEXAENOICO  
APRESENTAM EFEITOS  
DISTINTOS SOBRE O FIGADO E  
TECIDO ADIPOSEO EM RATOS  
ALIMENTADOS COM DIETA  
HIPERLIPIDICA.**

*Bruna Vidal Dias*

2021  
Ouro Preto



BRUNA VIDAL DIAS

**ÓLEO DE LINHAÇA, ÁCIDO EICOSAPENTAENOICO E  
DOCOSAHEXAENOICO APRESENTAM EFEITOS  
DISTINTOS SOBRE O FIGADO E TECIDO ADIPOSEO EM  
RATOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPIDICA.**

Tese de doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Ouro Preto como requisito  
parcial para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências Biológicas, área de  
Concentração: Fisiologia, Bioquímica e  
Biologia Molecular

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Caldeira Costa

Ouro Preto  
2021



**Universidade Federal  
de Ouro Preto**

*Reitora*

Dr<sup>a</sup> Cláudia Aparecida Marliére de Lima

*Vice-reitor*

Dr. Hermínio Arias Nalini Júnior

*Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação*

Dra. Renata Guerra de Sá Cota

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

*Coordenador*

*Alexandre Barbosa Reis*

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

D5416 Dias, Bruna Vidal.

Óleo de linhaça, ácido Eicosapentaenoico e Docosaheptaenoico apresentam efeitos distintos sobre o fígado e tecido adiposo em ratos alimentados com dieta hiperlipídica.. [manuscrito] / Bruna Vidal Dias. - 2021.

125 f.: il.: color., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa.

Tese (Doutorado). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Ácidos graxos Ômega-3. 2. EPA. 3. DHA. 4. Óleo de linhaça. 5. Tecido adiposo. 6. Fígado. I. Costa, Daniela Caldeira. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 577.12

Bibliotecário(a) Responsável: Luciana De Oliveira - SIAPE: 1.937.800



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Bruna Vidal Dias**

Óleo de linhaça, ácido eicosapentaenoico e docosaexaenoico apresentam efeitos metabólicos distintos sobre o fígado e tecido adiposo branco em ratos alimentados com dieta hiperlipídica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de doutor

Aprovada em 29 de outubro de 2021

### Membros da banca

Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa Calsavara - Orientador(a) Universidade Federal de Ouro Preto  
Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane - Universidade Estadual do Rio de Janeiro  
Profa. Dra. Marilene Porowski Garrido - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre  
Prof. Dr. Mauro Cesar Isoldi - Universidade Federal de Ouro Preto  
Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso - Universidade Federal de Ouro Preto

Daniela Caldeira Costa Calsavara, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 17/12/2021



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Caldeira Costa Calsavara, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 15/02/2022, às 17:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0280461** e o código CRC **428AD7CB**.

## **AGRADECIMENTO AO SUPORTE FINANCEIRO**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica Metabólica na Universidade Federal de Ouro Preto com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## **AGRADECIMENTO AOS LABORATÓRIOS COLABORADORES**

Laboratório de Nutrição Experimental (ENUT/UFOP)

Laboratório de Farmacologia Experimental (CIPHARMA/UFOP)

Laboratório de Imunopatologia (NUPEB/UFOP)

Laboratório Multiusuário de Pesquisa da Escola de Nutrição (ENUT/UFOP)

Laboratório de Imunobiologia da Inflamação (CBIOL/UFOP)

Laboratório de Genômica Nutricional (FCA/UNICAMP)

## AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Agradeço ao meu pai, Humberto (*in memoriam*), por sempre ter acreditado em mim, até mesmo quando eu duvidava. Por me dar força diariamente, mesmo de outro plano espiritual, para alcançar meus sonhos. Fiz por você e serei eternamente grata por ter me dado este pedido como presente.

À minha mãe, Helena, por ter batalhado tanto para me permitir dedicar aos estudos ao longo da minha vida. Obrigada por ser sempre minha base, minha parceira incondicional, minha inspiração diária para ir além e por dedicar sua vida à minha. Devo tudo que sou a vocês dois.

Ao Beto por sempre acreditar no meu potencial; pelo companheirismo, apoio e parceria de vida. Obrigada por ter se tornado também minha família.

Aos familiares que me apoiaram em cada etapa e foram essenciais para que eu não desistisse: tia Haydée, tia Jô e Maria Clara.

À professora Daniela, por ter me dado tamanha oportunidade de fazer parte do LBM. Obrigada por me acolher e permitir aprender e crescer tanto pessoal e profissionalmente. Serei eternamente grata por tudo que me ensinou ao longo destes anos e seguirei me espelhando em você como exemplo de profissional ética e competente.

Às amigadas que ganhei de presente no laboratório: obrigada Sttefany e Pedro por terem me acolhido e ensinado desde o “bêabá” com tanta paciência e dedicação; obrigada Luana e Fernanda também por todos os ensinamentos, parceria e amizade. Obrigada a toda equipe LBM por ter tornado meus dias mais leves e o trabalho mais prazeroso.

Ao Thales, Mariana, Fernanda e moradoras da república Seleta pela amizade e apoio. Ter vocês por perto durante toda essa jornada foi extremamente importante.

Agradeço à professora Karina por repassar tanto conhecimento e sempre estar disposta a ajudar.

Aos professores, técnicos e alunos que contribuíram em cada etapa e, muito além do conhecimento técnico, se dispuseram a ajudar com tanta dedicação: professora Cláudia, professor Marcelo, pós doutorandas Carolina e Débora, técnicas Rosália, Renata e Gustavo, aluna de iniciação Maria Laura e funcionário Aldo.

Agradeço ao professor Dennys por me abrir as portas de seu laboratório, por todos os ensinamentos de técnicas e discussões enriquecedoras e a toda equipe por me acolherem no LABGEN. Obrigada Camila, Marcella, Susana e Thaianne pela receptividade e ensinamentos.

Por fim, agradeço a Deus por permitir ter por perto todas essas pessoas e me conceder saúde para seguir em frente.

## RESUMO

O consumo excessivo de gorduras se tornou habitual após a evolução industrial e, concomitantemente, houve um aumento mundial de doenças cardiovasculares e distúrbios metabólicos como diabetes, resistência insulínica, esteatose hepática e obesidade. Pesquisas clínicas e experimentais vêm mostrando que a ingestão de AG  $\omega$ -3 podem atuar em diferentes vias metabólicas de forma benéfica. Contudo, dados experimentais e ensaios clínicos ainda apresentam resultados inconsistentes sobre a relação dose/resposta, o percentual de absorção do  $\omega$ -3 e sua bioconversão em seus subprodutos, assim como os mecanismos de ação. Desta forma, objetivamos avaliar o efeito do consumo do óleo de linhaça (LO) e proporções diferentes de EPA/DHA em ratos submetidos ao consumo crônico de uma dieta hiperlipídica rica em gordura *trans* e compreender algumas vias moleculares relacionadas. Para isso, foram utilizados 55 ratos machos da linhagem Fischer com 28 dias de idade, dos quais, inicialmente, foram distribuídos em 2 grupos: controle (C; n=15) e dieta hiperlipídica (HF; n=40). Após 18 semanas, foram eutanasiados 7 animais do grupo controle e 6 animais do grupo HF e restante dos animais foram redistribuídos em: Grupo controle (C, n=8; dieta padrão); Grupo HF (n=10; dieta hiperlipídica); Grupo LO (n=8; HF+ óleo de linhaça); Grupo EPA (n=8; HF + composto rico em EPA) e Grupo DHA (n=8; HF + composto rico em DHA). Após 14 dias de tratamento, foram analisadas: taxa de sobrevivência; ingestão calórica e eficácia alimentar; parâmetros antropométricos e peso relativo do coração, fígado e tecido adiposo; parâmetros glicometabólicos; perfil lipídico sérico e hepático; defesa antioxidante no tecido hepático e cardíaco; perfil inflamatório no soro, tecido adiposo e cardíaco; análise morfométrica do tecido hepático, adiposo e cardíaco; expressão de genes lipogênicos no fígado e composição de ácidos graxos no fígado e tecido adiposo branco (TAB). A dieta hiperlipídica induziu hiperglicemia, hipertensão, redução da sensibilidade à insulina, maior acúmulo de gordura ectópica no fígado e maior concentração de colesterol total no TAB. Todos os tratamentos foram eficazes em reduzir a deposição de colágeno tipo III hepático; reduzir a proporção de  $\omega$ -6/  $\omega$ -3 no fígado e TAB; reduzir a proporção da área/número de adipócitos, reduzir a expressão gênica das enzimas ACC e FAS, além de aumentar a expressão da enzima CPT1. Os tratamentos com EPA e DHA reduziram a glicemia, concentração sérica de TNF, quantidade de gordura do fígado, o grau de microesteatose e de deposição de colágeno tipo I no fígado; deposição dos colágenos tipo I e III no TAB, a expressão gênica do fator de transcrição SREBP e aumentaram a binucleação hepática. O tratamento com EPA foi mais eficaz em reduzir a área dos adipócitos, a concentração de triglicérides hepático, o peso da

gordura do TAB e aumentar a expressão gênica do fator de transcrição PPAR- $\alpha$ . O tratamento com DHA reduziu a concentração de MCP1 no TAB, de células inflamatórias no tecido cardíaco e espessura dos cardiomiócitos. O tratamento com LO não apresentou efeito isoladamente. Concluimos que os tratamentos com EPA e DHA foram mais eficazes em tratar os danos metabólicos induzidos pela dieta HF do que o tratamento com o LO, levando a um perfil metabólico mais favorável.

**PALAVRAS-CHAVE:** ômega 3; EPA; DHA; óleo de linhaça; tecido adiposo; fígado.

## ABSTRACT

Excessive fat consumption has become commonplace after the industrial evolution and, concomitantly, cardiovascular disease and metabolic disorders such as diabetes, insulin resistance, fatty liver and obesity have increased worldwide. Clinical and experimental research has shown that the intake of AG  $\omega$ -3 can act in different metabolic pathways in a beneficial pathway. However, experimental data and clinical trials still show inconsistent results on the dose / response relationship, the percentage of absorption of  $\omega$ -3 and the bioconversion into its by-products, as well as the mechanisms of action. Thus, we aimed to evaluate the effect of linseed oil, EPA and DHA on the treatment of metabolic disorders induced by a high-fat diet in rats subjected to chronic consumption of a high-fat diet rich in trans fat. For this, 55 male 28-day-old male Fischer rats were used and initially, they were distributed in 2 groups: control (C; n = 15) and high-fat diet (HF; n = 40). After 18 weeks, 7 animals from the control group and 6 animals from the HF group were euthanized and the rest of the animals were redistributed into: Control group (C, n = 8; standard diet); HF group (n = 10; high fat diet); LO Group (n = 8; HF + linseed oil); EPA Group (n = 8; HF + EPA-rich compound) and DHA Group (n = 8; HF + DHA-rich compound). After 14 days of treatment, were analyzed: survival rate; caloric intake and food efficiency; anthropometric parameters and relative weight of the heart, liver and adipose tissue; glycometabolic parameters; serum and liver lipid profile; antioxidant defense in liver and cardiac tissue; inflammatory profile in serum, adipose and cardiac tissue; histology of liver, adipose and cardiac tissue; expression of lipogenic genes in the liver and composition of fatty acids in the liver and adipose tissue (TA). The hyperlipidic diet induced hyperglycemia, hypertension, reduced insulin sensitivity, higher accumulation of ectopic fat in the liver and concentration of total cholesterol in HF. All treatments were effective in reducing the deposition of hepatic type III collagen; reduce the proportion of omega 6 / omega 3 in the liver and TA; reduce the proportion of the area / number of adipocytes, reduce the gene expression of the enzymes ACC and FAS and increase the CPT1 expression. Treatments with EPA and DHA reduced blood glucose, serum TNF concentration, amount of liver fat, the degree of microsteatosis and type I collagen deposition in the liver; deposition of type I and III collagen in TA, gene expression of the transcription factor SREBP and increased hepatic binucleation. EPA treatment was more effective in reducing the area of adipocytes, the hepatic triglyceride concentration, the fat weight of TA and increase gene expression of the PPAR- $\alpha$  transcription factor. Treatment with DHA

reduced the concentration of MCP1 in TA, inflammatory cells in cardiac tissue and thickness of cardiomyocytes. LO treatment did not have an isolated effect. We concluded that treatments with EPA and DHA were more effective in treating the metabolic damage than treatment with LO, leading to a more favorable metabolic profile.

**KEY WORDS:** omega 3; EPA; DHA; linseed oil; adipose tissue; liver.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Via da biossíntese de AG poli-insaturados ômega-3 e ômega-6 .....	32
<b>Figura 2.</b> Níveis globais da concentração de EPA+DHA eritrocitária.....	35
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de ação dos ácidos graxos alimentares sobre o metabolismo lipídico hepático.....	40
<b>Figura 4.</b> Média da ingestão calórica dos grupos experimentais por 18 semanas.....	61
<b>Figura 5.</b> Pressão arterial sistólica dos grupos experimentais após 18 semanas. ....	62
<b>Figura 6.</b> Teste de resposta insulínica e Teste de tolerância oral à glicose dos grupos experimentais após 18 semanas.....	63
<b>Figura 7.</b> Efeito da dieta hiperlipídica no perfil lipídico hepático e do tecido adiposo abdominal após 18 semanas. ....	64
<b>Figura 8.</b> Curva de sobrevivência dos grupos experimentais durante o período de tratamento.....	65
<b>Figura 9.</b> Média da ingestão calórica e eficiência alimentar durante o período de tratamento.....	65
<b>Figura 10.</b> Enzimas antioxidantes nos tecidos hepático e cardíaco.....	67
<b>Figura 11.</b> Efeito dos tratamentos nas concentrações de citocinas no soro, coração e tecido adiposo.....	68
<b>Figura 12.</b> Efeito dos tratamentos sobre a histoarquitetura e esteatose hepática.....	70
<b>Figura 13.</b> Efeito dos tratamentos sobre a deposição de colágeno hepático. ....	71
<b>Figura 14.</b> Efeito dos tratamentos sobre a histoarquitetura cardíaca e inflamação cardíaca. ..	72
<b>Figura 15.</b> Efeito dos tratamentos na histoarquitetura do tecido adiposo corado com Hematoxilina e Eosina.....	73
<b>Figura 16.</b> Efeito dos tratamentos sobre a deposição de colágeno no tecido adiposo.....	74
<b>Figura 17.</b> Efeito dos tratamentos no perfil lipídico hepático. ....	76
<b>Figura 18.</b> Efeito dos tratamentos no perfil lipídico do tecido adiposo.....	78
<b>Figura 19.</b> Efeito dos tratamentos na expressão gênica de enzimas lipogênicas hepáticas.....	79
<b>Figura 20.</b> Resumo gráfico dos resultados encontrados sobre os efeitos metabólicos dos tratamentos e mecanismos propostos. ....	92

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Ácidos graxos presentes na natureza. ....	26
<b>Tabela 2.</b> Composição média percentual de ácidos graxos alguns alimentos. ....	27
<b>Tabela 3.</b> Distribuição percentual da composição calórica das rações padrão e hiperlipídica	47
<b>Tabela 4.</b> Informação nutricional do óleo de linhaça doutorado utilizado no experimento ....	48
<b>Tabela 5.</b> Composição centesimal e % de ácidos graxos nas rações e compostos utilizados para tratamento. ....	60
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros antropométricos e bioquímicos dos grupos experimentais após 18 semanas.....	62
<b>Tabela 7.</b> Parâmetros antropométricos e bioquímicos dos grupos experimentais.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

A: absorbância  
AA: ácido araquidônico  
ACC: acetil-CoA carboxilase  
ACOX: acil-CoA oxidase  
AG: ácidos graxos  
AL: linoleico  
ALA: alfa-linolênico  
AMP: adenosina monofosfato  
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
Apo: apolipoproteína  
ARA: ácido araquidônico  
ATP: adenosina trifosfato  
BSA: soro fetal bovino  
CAT: catalase  
CETP: proteína de transferência de colesterol esterificado  
CEUA: Comitê de ética no uso de animais  
ChREBP: proteína de ligação ao elemento regulador de carboidratos  
cm: centímetros  
CNA: comprimento naso-anal  
COX: ciclooxigenase  
CPT: proteína carnitina palmitoiltransferase  
DCV: Doenças cardiovasculares  
DHA: ácido docosahexaenóico  
dl: decilitro  
DMSO: dimetilsulfóxido  
DPA: docosapentaenóico  
DSSBmT: disulfobutilmetatoluidina  
ELISA: *enzyme-linked immunoabsorbent assay*  
EPA: ácido eicosapentaenóico  
FAO : Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FAS: ácido graxo sintase  
g: gramas  
GJ: glicemia em jejum  
GLUT: transportador de glicose  
GOD: glicose – oxidase  
GSH: glutathiona reduzida  
GSSG: glutathiona oxidada  
HDL: lipoproteína de alta densidade  
HE: hematoxilina e eosina  
HETE: hidroxieicosatetraenóico  
IJ: insulinemia em jejum  
IKK: I Kappa B quinase  
IL: interleucina  
iNOS: de óxido nítrico-sintase induzida  
JNK: quinase c-Jun N-terminal  
L: litro  
LDL: lipoproteína de baixa densidade  
LO: óleo de linhaça  
LOX: lipoxigenase  
LT: leucotrienos  
M: molar  
MAPK: proteínas quinases ativadas por mitógenos  
mg: miligrama  
ml: mililitros  
mmol: milimolar  
MPC: proteína quimioatraente de monócitos  
MTT: brometo de dimetiltiazol difeniltetrazolium  
NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídio  
NFkB: fator de transcrição do fator nuclear Kappa B  
NO: óxido nítrico  
NRF2: fator de transcrição nuclear eritroide 2  
OMS: Organização Mundial de Saúde  
PCI: prostaciclina  
PCR: proteína C reativa

PG: prostaglandinas  
POD: peroxidase  
PPAR: receptores ativados por proliferadores de peroxissoma  
PT: proteínas totais  
PUFA n-3: Ácido graxo poli-insaturados  $\omega$ -3  
RDC: resolução de diretoria colegiada  
RNA: ácido ribonucleico  
Rpm: rotações por minuto  
SCD: estearoil coA dessaturase  
SOD: superóxido dismutase  
SREBP1: proteína de ligação ao elemento de resposta ao esteroide  
TAB: tecido adiposo branco  
TAG: triacilglicerol  
TMB: tetrametilbenzidina  
TNF: fator de necrose tumoral  
TX: tromboxanos  
U: unidade  
ul: microlitro  
umol: micromolar  
V: volume  
VA: volume da amostra  
VLDL: lipoproteína de densidade muito baixa  
VT: volume total

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
2.	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	22
2.1	Perfil da ingestão alimentar: histórico e atualidade .....	22
2.2	Características estruturais e químicas dos ácidos graxos.....	25
2.2.1	Metabolização de ácidos graxos <i>trans</i> .....	28
2.2.2	Metabolização de ácidos graxos poli-insaturados.....	30
2.3	Ômega 3: da ingestão à bioconversão .....	41
3.	<b>OBJETIVOS</b> .....	44
3.1	Objetivo geral.....	44
4.	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	45
4.1	Delineamento experimental .....	45
4.2	Composição nutricional e centesimal das rações experimentais.....	47
4.2.1	Composição centesimal das rações padrão e hiperlipídica .....	48
4.3	Parâmetros antropométricos.....	49
4.4	Pressão arterial .....	50
4.5	Parâmetros bioquímicos .....	50
4.5.1	Glicemia .....	50
4.5.2	Insulina .....	50
4.5.3	Frutosamina.....	51
4.5.4	Teste de tolerância oral a glicose e Teste de resposta insulínica .....	51
4.5.5	Índice HOMA.....	52
4.6	Colesterol Total, Colesterol HDL e Triglicérides .....	52
4.7	Enzimas antioxidantes.....	53
4.7.1	Atividade da Catalase (CAT) .....	53
4.7.2	Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) .....	54

4.7.3	Proteínas totais .....	55
4.8	Análises histológicas .....	56
4.9	Mediadores inflamatórios.....	57
4.10	Extração e dosagem de lipídeo no tecido hepático e adiposo .....	57
4.11	Análise da composição de ácidos graxos.....	58
4.12	Análise da expressão gênica quantitativa por PCR em tempo real.....	58
4.13	Análises estatísticas .....	59
5.	<b>RESULTADOS</b> .....	60
5.1	Composição centesimal e de ácidos graxos das rações e dos tratamentos.....	60
5.2	Resultados da 1ª eutanásia – 18 semanas (Avaliação do impacto da dieta hiperlipídica no estabelecimento de alterações metabólicas) .....	61
5.2.1	Ingestão alimentar .....	61
5.2.2	Parâmetros antropométricos e bioquímicos: .....	61
5.2.3	Perfil lipídico no fígado e tecido adiposo.....	63
5.3	Resultados da 2ª eutanásia – 20 semanas (Efeito dos tratamentos após consumo crônico de dieta hiperlipídica) .....	64
5.3.2	Ingestão e eficiência alimentar .....	65
5.3.3	Parâmetros antropométricos e bioquímicos .....	66
5.3.4	Perfil antioxidante .....	66
5.3.5	Concentração dos mediadores inflamatórios no soro, coração e tecido adiposo .....	67
5.3.6	Análises histológicas no tecido hepático.....	69
5.3.7	Análises histológicas no tecido cardíaco.....	72
5.3.8	Análise histológica do tecido adiposo .....	72
5.3.9	Análises da composição de ácidos graxos nos tecidos hepático e adiposo.....	74
5.4	Análises de expressão gênica no fígado.....	79
6.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	80
6.1	Sumário dos resultados .....	90

7.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	92
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	93
	<b>ANEXOS</b> .....	121

## 1. INTRODUÇÃO

O consumo excessivo de gorduras se tornou um hábito comum com o decorrer da evolução industrial e, concomitantemente, houve um aumento mundial de doenças cardiovasculares (DCV) e distúrbios metabólicos como diabetes, resistência insulínica, esteatose hepática e obesidade (BUETTNER *et al.*, 2007; ESKELINEN *et al.*, 2008; PANCHAL *et al.*, 2011; MAYYAS *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2018; BECERRA, 2019). Entretanto, as gorduras apresentam diferentes composições de ácidos graxos (AG) que variam de acordo com o comprimento da cadeia carbônica, a presença ou ausência de ligações duplas e a configuração destas ligações, sendo que tais características químicas e estruturais determinam suas ações metabólicas, modificando vias de sinalização celular, alterando parâmetros bioquímicos e fisiológicos, a histoarquitetura dos tecidos e a transcrição gênica (SAMPATH, 2004; LANDS *et al.*, 2008; CHAPMAN *et al.*, 2011; VOISIN, 2015; DE LA ROCHA *et al.*, 2016; GARCÍA *et al.*, 2017; PERFILYEV, 2017; GOMES *et al.*, 2020).

Os ácidos graxos saturados ou com dupla ligação do tipo *trans* são altamente consumidos por estarem presente em produtos animais como carnes, leite e derivados, e no processo de hidrogenação industrial para fabricação de produtos prontos para o consumo, duradouros e palatáveis como biscoitos, sorvetes, tortas, massas folhadas, entre outros (MARTIN *et al.*, 2005). Diversos estudos mostram que, quando prevalentes na ingestão dietética, estes tipos de AG levam à inúmeros danos metabólicos, principalmente por prejudicar a função hepática e a regulação adequada do tecido adiposo (GEBAUER, 2007; CALDER, 2015; KUHNT *et al.*, 2016 ABD EL-AAL, 2019; ZHOU, 2020). Por isso há diversas recomendações atuais para eliminar a ingestão de AG *trans* e limitar a ingestão de AG saturados, priorizando o consumo de AG *cis* mono e poli-insaturados (SANTOS, 2013; CALDER, 2015; NETTLETON, 2016; OTENG, 2020; INNES *et al.*, 2020; IZAR *et al.*, 2021).

Os ácidos graxos insaturados variam quanto ao número de dupla-ligações, podendo ser mono ou poli-insaturados e, em sua maioria, são encontrados na configuração *cis* da dupla ligação. Estes são classificados também quanto à localização da primeira dupla ligação da cadeia carbônica a partir do grupamento metila, sendo eles classificados como ácidos graxos das famílias ômega-3 ( $\omega$ -3), ômega-6 ( $\omega$ -6) e ômega-9 ( $\omega$ -9) (SIMOPOULOS, 2008).

Os ácidos graxos  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 são considerados essenciais, pois não podem ser

obtidos pela síntese de novo, sendo sintetizados a partir da ingestão dietética dos ácidos alfa-linolênico (ALA) e linoleico (AL), respectivamente, pela ação das enzimas alongases que adicionam 2 átomos de carbono à cadeia inicial e dessaturases que oxidam 2 átomos de carbonos, dando origem a uma dupla ligação com configuração *cis*. Essas reações ocorrem, predominantemente, nas células hepáticas, mais especificamente no retículo endoplasmático pela ação da  $\Delta 6$ -dessaturase (WIKTOROWSKA-OWCZAREK *et al.*, 2015).

Pesquisas clínicas e experimentais vêm mostrando que a ingestão de AG  $\omega$ -3 pode ser benéfica ao metabolismo, pois estes podem atuar em vias metabólicas que levam à redução da glicemia, da fração do colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL), da trigliceridemia e pressão arterial, remodelamento do tecido adiposo, redução de mediadores pró-inflamatórios, aumento da biogênese mitocondrial, redução da resistência insulínica e leptínica e aumento da síntese proteica (AILHAUD E GUESNET, 2004; SIMOPOULOS, 2008; SIMOPOULOS, 2013; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2015; PISANI *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016, SHAHIDI, 2018; INNES, 2020; GOMES *et al.*, 2020; NOVOTNY *et al.*, 2021).

Entretanto, sabe-se que AG  $\omega$ -6 competem com a metabolização dos AG  $\omega$ -3 pela ação da enzima  $\Delta 6$ -dessaturase e que AG saturados e *trans* prejudicam a ação desta enzima, ocasionando redução da metabolização do ácido alfa-linolênico em ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), prejudicando a subsequente produção de eicosanoides com ações anti-inflamatórias, como prostaglandinas (PGD) e tromboxanos (TX) da série 3, além das resolvinas, protectinas e maresinas, que também são mediadores com ação anti-inflamatória (WEYLANDT, 2012, DESSÌ, 2013; KUMMEROW, 2013; LICHTENSTEIN, 2014, FERLAY *et al.*, 2017). Dessa forma, o EPA e o DHA, quando presentes em concentrações adequadas no metabolismo são promissores na minimização ou prevenção de distúrbios metabólicos associados à inflamação como obesidade, diabetes, resistência insulínica, esteatose hepática não alcoólica, entre outras (BARBALHO, 2011; CALDER, 2017, FIGUEIREDO, 2017).

Contudo, dados experimentais e ensaios clínicos ainda apresentam resultados inconsistentes sobre a relação dose/resposta, o percentual de absorção do  $\omega$ -3 de acordo com as diferentes fontes alimentares e a bioconversão em seus subprodutos, e se estes efeitos protetores são eficazes em um ambiente metabólico alterado por uma alimentação inadequada (BALK *et al.*, 2006; HARTWEG *et al.*, 2008; SARAVANAN

*et al.*, 2010; BROSTOW *et al.*, 2011; MILLER *et al.*, 2011; SHAHIDI *et al.*, 2018; THOTA *et al.*, 2018; PUNIA *et al.*, 2019; WHELAN *et al.*, 2020).

Baseado no exposto, nossa hipótese é de que a suplementação com o óleo de linhaça (considerado a maior fonte vegetal de ALA), e razões diferentes de EPA e DHA possam exercer efeitos benéficos no fígado, coração e tecido adiposo branco (TAB), porém com respostas tecido-específicas, mesmo em animais que já apresentam alterações metabólicas induzidas por uma alimentação inadequada em longo prazo.

Para testarmos nossa hipótese, objetivamos avaliar o efeito do óleo de linhaça e de proporções diferentes de EPA/DHA no tratamento dos distúrbios metabólicos induzidos pela ingestão de uma dieta hiperlipídica em ratos.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Perfil da ingestão alimentar: histórico e atualidade**

A ascensão da industrialização dos últimos 200 anos aumentou a diversidade, disponibilidade e a diferenciação de hábitos alimentares individuais, o que gerou um aumento de relações sociais centradas nos alimentos, menor custo agregado à aquisição e preferências por alimentos e produtos alimentícios que agreguem palatabilidade e praticidade (PILCHER, 2017; de MIRANDA, 2020). Essa mudança advinda da revolução industrial acompanhou a transição de um cenário onde prevaleciam as mortes por doenças infecciosas e por agravos ocasionados por carências nutricionais para um aumento de mortalidade por distúrbios metabólicos como obesidade, doenças cardiovasculares e diabetes ocasionados por hábitos de vida não saudáveis como o sedentarismo, fumo e uma alimentação hipercalórica rica em gorduras saturadas, trans, açúcares e aditivos (WHO, 2002; El KHOURY *et al.*, 2015, PAHWA, 2020. IZAR *et al.*, 2021).

Com essa mudança no estilo de vida, observa-se um alto consumo de alimentos ultraprocessados (LOUZADA, 2018). Esse tipo de alimento, conforme classificação estabelecida no Guia Alimentar para a População Brasileira, “são formulações industriais feitas inteiramente ou majoritariamente de substâncias extraídas de alimentos (óleos, gorduras, açúcares, amido, proteínas), derivadas de constituintes de alimentos (gorduras hidrogenadas, amido modificado) ou sintetizadas em laboratório com base em matérias orgânicas como petróleo e carvão (corantes, aromatizantes, realçadores de sabor e vários tipos de aditivos usados para dotar os produtos de propriedades sensoriais

atraentes’’ (BRASIL, 2014). O atual Guia Alimentar alerta que se têm substituído alimentos como frutas, leite e preparações culinárias por alimentos ultraprocessados e que isto acarreta uma ingestão alimentar desequilibrada, visto que são alimentos pobres nutricionalmente, com baixo teor de fibras, ricos em sódio e em gordura saturada, hidrogenada e *trans* (MELO et al, 2014).

Monteiro e colaboradores (2019) destacam que países de alta renda como Canadá, Estados Unidos e Reino Unido consomem mais da metade da energia total da dieta em alimentos ultraprocessados e que, em países de renda média como o Brasil, México e Chile, o consumo deste tipo de alimento representa de um quinto a um terço da energia total consumida, com crescimento anual de até 10% na venda destes produtos. Este é um dado preocupante visto que, devido sua má qualidade nutricional, a alta ingestão de alimentos ultraprocessados ricos em gorduras *trans* pode acarretar resistência insulínica, glicemia elevada, obesidade, hipertensão, disbiose intestinal, dislipidemia e esteatose hepática (LOUZADA, 2015; RAUBER *et al*, 2015; FARDET, 2016; MENDONÇA *et al.*, 2016; FIOLET *et al.*, 2018; ZINÖCKER *et al.*, 2018; SROUR *et al.*, 2018; ZELBER-Sagi, 2019).

Além do alerta divulgado no Guia Alimentar para População Brasileira e recomendação para se evitar o consumo de alimentos ultraprocessados, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tornou obrigatória a informação sobre a presença e quantidade de ácidos graxos *trans* nos rótulos dos alimentos industrializados a partir de 2003, reforçando que é benéfico à saúde evitar alimentos que contenham este tipo de AG, como os produtos ultraprocessados, e enfatizando a necessidade de incluir na dieta alimentos ricos em ácidos graxos poli-insaturados, com o intuito de beneficiar funções metabólicas importantes (ANVISA, 2003). Em 2019, este mesmo órgão divulgou uma resolução de diretoria colegiada (RDC) estabelecendo normas graduais para banir a utilização de gorduras *trans* em alimentos industriais, inicialmente limitando a 2 gramas de AG *trans* a cada 100g de produto a partir do dia 1º de julho de 2021 até 1º de janeiro de 2023 e, a partir desta data, será proibida a adição de óleos e gorduras parcialmente hidrogenadas na fabricação de produtos alimentícios (ANVISA, 2019). Outro avanço importante também ocorreu em outubro de 2020, quando a ANVISA aprovou novas regras de rotulagem, tornando obrigatória a inclusão de um destaque para informar na embalagem alimentos que contenham alto teor de gordura saturada (sólidos acima de 6% e líquidos acima de 3%) (ANVISA, 2020).

Atualmente, o “Posicionamento sobre o Consumo de Gorduras e Saúde

Cardiovascular – 2021” elaborado por IZAR e colaboradores (2021), reforça que as diretrizes internacionais ainda aconselham a retirada de ácidos graxos *trans* com redução do consumo de ácidos graxos saturados e a inclusão de alimentos fontes de ácidos graxos insaturados em quantidades adequadas destacando que, não somente o excesso de gordura saturada pode ser prejudicial, mas também a ingestão insuficiente de PUFA. Porém, este documento também discute a importância de orientar a população quanto à manutenção de uma substituição isolocalórica, visto que quando retirada parte da ingestão de gordura saturada, mas adicionado carboidratos refinados, também há um risco aumentado de doenças cardiovasculares (DCV) e, quando há uma substituição por carboidratos complexos e AG insaturados, mantém-se o desfecho de DCV favorável.

Contudo, vale ressaltar que a indústria busca constantemente criar novas formas de adequar às normas estabelecidas por órgãos de saúde sem perder a palatabilidade dos produtos ultraprocessados, e assim acabam produzindo composições de AG prejudiciais à saúde, como a formulação da nova gordura *PrimexZ*, um tipo de gordura não *trans*, mas com alto teor de gordura saturada, sendo que estudos atuais já mostram seu potencial efeito tóxico às células hepáticas (ANTUNES et al., 2020).

Ao contrário dos AG *trans*, diversas pesquisas mostram os benefícios do consumo de ácidos graxos poli-insaturados  $\omega$ -3, presentes principalmente em peixes e alguns óleos vegetais. Sabe-se que regiões onde há alto consumo de ácidos graxos mono e poli-insaturados possuem menores índices de doenças cardiovasculares do que regiões que apresentam uma baixa ingestão deste tipo de gordura, principalmente pela ação benéfica dos seus subprodutos EPA e DHA no metabolismo. (SANTOS, 2013; BALK et al., 2006; HARTWEG et al., 2008; HARRIS et al., 2009; SARAVANAN et al., 2010; BROSTOW et al., 2011; MILLER et al., 2011; CALDER, 2015; NETTLETON, 2016; SHAHIDI et al., 2018; THOTA et al., 2018, BOASIAKO, 2019; ELAGIZI et al., 2021).

Estudos populacionais têm mostrado uma associação inversa entre o consumo de AG poli-insaturados ômega 3 (PUFA  $\omega$ -3) e doenças metabólicas (MOZAFFARIAN et al., 2011; WATANABE et al., 2017). A Organização Mundial de Saúde recomenda que deve-se limitar a no máximo 30% da ingestão energética de lipídeos, dando preferência a ácidos graxos insaturados à saturados e que AG *trans* não devem compor uma alimentação saudável (WHO, 2013). De acordo com a Diretriz sobre o Consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular publicado através dos Arquivos Brasileiros de

Cardiologia, é recomendado que se faça pelo menos duas refeições a base de peixe por semana como parte de uma dieta saudável para diminuir o risco cardiovascular, principalmente para indivíduos que apresentam alto risco para DCV. Estima-se que, em média, 2 refeições de peixes ricos em  $\omega$ -3 por semana fornecem entre 250 a 500 mg de EPA+DHA e doses acima desta recomendação podem auxiliar em prevenção e tratamento de DCV (ZARATE, 2017). Um estudo que objetivou avaliar a ingestão de alimentos fontes de  $\omega$ -3 em uma população idosa brasileira concluiu que o consumo de alimentos como peixes e nozes é diretamente proporcional à renda familiar, já a semente de linhaça é consumida independente da renda, o que se justifica pelo seu preço mais acessível (STEFANELLO et al., 2019).

Mundialmente, alguns países como Japão mantém uma alta ingestão de peixes, mas a população de países ocidentais como Estados Unidos e Reino Unido, assim como o Brasil, possui uma baixa ingestão de peixes gordurosos, fazendo com que a média da ingestão de EPA+DHA fique menor do que 0,2g/dia e, por isso, pode ser interessante suplementar EPA e DHA isoladamente (MEYER et al., 2003; HOWE et al., 2006; INNES et al., 2020).

## **2.2 Características estruturais e químicas dos ácidos graxos**

Os lipídeos são componentes essenciais ao metabolismo, pois funcionam como reserva energética, são componentes de membranas celulares, participam de transporte de nutrientes e vitaminas lipossolúveis, funcionam como isolante térmico, são precursores de hormônios e, além de função energética, ainda conferem sabor, textura e aroma aos alimentos (MASOODI *et al.*, 2015). O que diferencia suas ações metabólicas e diversificadas utilizações na alimentação são suas características químicas e estruturais. De forma geral, são constituídos por triacilgliceróis que são formados por ácidos graxos associados à molécula de glicerol, podendo apresentar ramificações, ser saturados ou insaturados e exibir configuração *cis* ou *trans* (AILHAUD e GUESNET, 2004).

Os ácidos graxos saturados podem apresentar cadeia média (entre 8 a 12 átomos de carbono) ou cadeia longa (acima de 12 átomos de carbono), sendo que os ácidos graxos com cadeia média apresentam sua absorção no intestino e, após ligarem-se à albumina, são transportados pela veia porta e metabolizados no fígado. Já os ácidos graxos de cadeia longa são esterificados nos enterócitos formando os triglicérides que

são transportados pelos quilomícrons no sistema linfático e na corrente sanguínea onde, após a ação da lipase lipoproteica, liberam os ácidos graxos para os tecidos de acordo com a demanda e disponibilidade, sendo re-esterificados a triglicérides e então armazenados (SANTOS *et al.*, 2013).

Os ácidos graxos insaturados variam quanto ao número de dupla-ligações, podendo ser mono ou poli-insaturados e são encontrados principalmente na configuração *cis* da dupla ligação. Estes são classificados também quanto à localização da primeira dupla ligação da cadeia carbônica a partir do grupamento metila identificados pela letra ômega ( $\omega$ ) seguida da localização, sendo principalmente:  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 e  $\omega$ -9 (SIMOPOULOS, 2008). Os ácidos graxos da família  $\omega$ -3 são compostos principalmente por DHA e EPA, presentes principalmente em peixes e ALA, presente em vegetais como a linhaça. Dentre os ácidos graxos da família  $\omega$ -6 há o AL, encontrado principalmente em vegetais como soja, milho e canola e entre os ácidos graxos da família  $\omega$ -9, o principal é o ácido oleico, encontrado por exemplo, no azeite de oliva (HARRIS *et al.*, 2009). Na tabela abaixo são apresentados os principais ácidos graxos presentes na natureza.

**Tabela 1.** Ácidos graxos presentes na natureza.

Nome oficial	Nome usual	Símbolo
Ácido butanoico	Ácido butírico	C4:0
Ácido hexanoico	Ácido capróico	C6:0
Ácido octanoico	Ácido caprílico	C8:0
Ácido decanoico	Ácido cáprico	C10:0
Ácido dodecanoico	Ácido láurico	C12:0
Ácido tetradecanoico	Ácido mirístico	C14:0
Ácido hexadecanoico	Ácido palmítico	C16:0
Ácido <i>cis</i> -hexadec-9-enóico	Ácido palmitoleico	C16:1(9)
Ácido octadecanoico	Ácido esteárico	C18:0
Ácido <i>cis</i> -octadec-9-enóico	Ácido oleico	C18:1(9)
Ácido <i>cis,cis</i> -octadec-9,12-dienóico	Ácido linoleico	C18:2(9,12)
Ácido <i>cis,cis,cis</i> -octadec-9,12,15-trienóico	Ácido linolênico	C18:2(9,12,15)
Ácido eicosanoico	Ácido araquídico	C20:0

Adaptado de: Solomons e Fryhle (2006).

A forma *cis* ocorre predominantemente na natureza e são termodinamicamente pouco estáveis, pois possuem as duplas ligações do mesmo lado da cadeia carbônica e por isso, para se obter óleos vegetais mais estáveis, realiza-se o processo de hidrogenação, onde se isomeriza as saturações, formando os ácidos graxos *trans* (HUNG *et al.*, 2016). Outra característica importante é que quanto mais insaturações na

cadeia carbônica, menor o ponto de fusão e quanto maior o número de átomos de carbono, maior o ponto de fusão em função do aumento na atração de *Van der Waals* entre as moléculas, por isso AG saturados são mais interessantes para utilização industrial (SOLOMONS, 2006).

Os ácidos graxos *trans* podem ser obtidos por micro-organismos em alimentos originados de animais ruminantes no qual os ácidos graxos de origens vegetais ingeridos por estes animais são parcialmente hidrogenados por sistemas enzimáticos da microbiota do rúmen ou também podem ser produzidos por processamento industrial pelas etapas de desodorização, aquecimento e hidrogenação parcial ou total de óleos vegetais, que visam a remoção de componentes voláteis de sabor e aroma desagradáveis e o aumento do tempo útil de óleos para frituras de alimentos (OTENG, 2020). Para que ocorra a hidrogenação, é feita uma mistura do óleo de interesse com hidrogênio e um catalisador a temperaturas acima de 180 °C onde ocorre, em suma, o rompimento da ligação  $\pi$ , a transferência dos átomos de hidrogênio e formação de uma nova ligação saturada entre a cadeia carbônica (RIBEIRO *et al.*, 2007).

A tabela abaixo mostra o percentual da composição de ácidos graxos saturados e insaturados de algumas fontes de gorduras consumidas.

**Tabela 2.** Composição média percentual de ácidos graxos em alguns alimentos.

Ácido graxo	Manteiga	Margarina	Banha	Azeite de oliva	Óleo de milho	Óleo de soja	Óleo de coco	Óleo de girassol	Óleo de linhaça
<b>C4:0</b>	3	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C6:0</b>	2	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C8:0</b>	1	-	-	-	-	-	6	-	-
<b>C10:0</b>	3	-	-	-	-	-	8	-	-
<b>C12:0</b>	5	5	-	-	-	-	45	-	-
<b>C14:0</b>	15	2	1	1	1	1	18	-	-
<b>C16:0</b>	27	15	28	10	8	10	9	8	7
<b>C18:0</b>	5	19	12	2	3	2	3	5	20
<b>C20:0</b>	-	-	-	-	-	-	-	1	-
<b>C16:1(9)</b>	5	-	3	-	1	1	1	-	-
<b>C18:1(9)</b>	30	14	48	70	36	28	7	25	9
<b>C18:2(9,12)</b>	4	40	8	17	51	50	2	61	21
<b>C18:3(9,12,15)</b>	-	5	-	-	-	8	-	-	43

Adaptado de LIDA *et al.*, 2002; SOLOMONS, 2006; CAVENDISH *ET AL.*, 2010.

Com isso, a diferença entre suas composições químicas e estruturais fazem com que cada tipo de gordura tenha diferentes efeitos no metabolismo, podendo apresentar efeito protetor ou danoso ao organismo sobre diferentes parâmetros como glicemia,

perfil lipídico, pressão arterial, estrutura das células dos tecidos adiposo, hepático, cardiovascular entre outros, conforme será apresentado nos tópicos a seguir (ELAGIZI *et al.*, 2018).

### **2.2.1 Metabolização de ácidos graxos *trans***

Os AG tipo *trans* são altamente consumidos por estarem presentes tanto em produtos animais como carnes, leite e derivados quanto pela ampla aplicação do processo de hidrogenação pela indústria (OTENG *et al.*, 2020). Quando ingeridos, são absorvidos em concentrações proporcionais à seu consumo e seu metabolismo compete com a metabolização dos ácidos graxos essenciais, reduzindo a incorporação destes ácidos graxos na membrana celular fosfolipídica e reduzindo a conversão dos ácidos graxos essenciais em eicosanoides, o que pode gerar danos à função vascular e alterações na agregação plaquetária (DAS, 2006; LICHTENSTEIN, 2014; MANTOVANI, 2018).

As primeiras evidências sobre os efeitos danosos ao metabolismo pelo consumo de AG *trans* surgiram na década de 1950, quando Johnston e colaboradores (1957) descobriram que o tecido adiposo, hepático e cardíaco de indivíduos que morreram por doenças cardiovasculares, continha entre 8,8% a 12,2% de AG *trans*. Posteriormente, pesquisadores avaliaram a ingestão de ácidos graxos *cis* e *trans* em pessoas saudáveis e concluíram que as concentrações de colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL) eram maiores no grupo que consumiu ácidos graxos *cis* e de colesterol LDL eram maiores no grupo que consumiu ácidos graxos *trans* (MENSINK e KATAN, 1990).

Estudos subsequentes elucidaram alguns mecanismos pelos quais este tipo de AG prejudica, principalmente, o metabolismo lipídico hepático. Um dos mecanismos responsáveis é pelo fato de que os ácidos graxos *trans* aumentam a atividade da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP), acarretando o aumento das concentrações de colesterol LDL e, conseqüentemente a redução do receptor de LDL, além do aumento no catabolismo da apolipoproteína A1 (Apo A1), uma proteína que exerce a função antiaterogênica. Além disto, os ácidos graxos *trans* possuem ação pró inflamatória por também estarem associados ao aumento das concentrações do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-6 (IL-6) e proteína C reativa (PCR). (RIBEIRO *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2015; BROUWER, 2016; OTENG *et al.*, 2020).

A ingestão de AG *trans* também pode prejudicar o metabolismo hepático por

induzir o aumento da expressão de fatores de transcrição lipogênicos, como o fator de transcrição denominado proteína de ligação ao elemento de resposta ao esteroide (SREBP1), responsável pelo aumento da transcrição de enzimas lipogênicas, como a enzima acetil-CoA carboxilase (ACC), responsável pela síntese de malonil CoA e da enzima ácido graxo sintase (FAS), responsável pela biossíntese hepática de ácidos graxos. Este é o principal mecanismo envolvido no desenvolvimento da esteatose hepática não alcoólica induzida pelos AG *trans* industriais (OTENG *et al.*, 2019).

Hirata e colaboradores (2017) propuseram outra via de ação pela qual os AG *trans* possuem ação pró-inflamatória, ao observar que estes AG promovem a ativação extracelular da proteína p38 induzida por ATP, que ao se ligar ao receptor de membrana P2X<sub>7</sub>, leva à geração de espécies reativas de oxigênio pelo complexo NADPH oxidase e ativação da cascata de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) ASK1-p38, o que aumenta a atividade de caspase-3 e consequente morte celular. Essa cascata de sinalização pode gerar uma apoptose que excede a capacidade fagocítica dos macrófagos, prejudicando assim a função do tecido afetado.

Estudos observacionais e controlados mostram que os ácidos graxos *trans* prejudicam a ação da insulina, tanto em indivíduos obesos ou sedentários quanto em indivíduos saudáveis, aumentando em até 32% o risco de desenvolvimento de diabetes e doenças cardiovasculares (ODEGAARD e PEREIRA, 2006; MICHA e MOZAFFARIAN, 2009; MOZAFFARIAN e CLARKE, 2009; RISÉRUS *et al.*, 2009; De SOUZA *et al.*, 2015; MAZIDI *et al.*, 2019). Além de doenças coronarianas, o consumo deste tipo de AG também está relacionado à doença hepática gordurosa não alcoólica, principalmente por atuar em vias moleculares lipogênicas, como citado anteriormente (SULLIVAN, 2010; WANG *et al.*, 2016; MANTOVANI, 2018; SUN *et al.*, 2021).

Baseado em diversas evidências científicas sobre os danos ocasionados à saúde pelo consumo de ácidos graxos *trans*, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) publicou, em 2010, um relatório alertando quanto ao consumo deste tipo de AG e afirmando a existência de evidências concretas sobre o aumento do risco de morte por doenças arteriais e coronarianas, além de morte súbita. Também foi descrito um maior risco de desenvolvimento de diabetes e síndrome metabólica pelo consumo de AG *trans* (FAO, 2010). Posteriormente a esta publicação, em 2013, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou um “Plano de ação global para a prevenção e controle de doenças não transmissíveis 2013-2020”, onde alerta para

a necessidade do desenvolvimento de políticas e diretrizes que visem a substituição da ingestão de gordura *trans* por ácidos graxos insaturados (WHO, 2013). Posteriormente, a Anvisa também publicou recomendações alertando sobre os danos relacionados ao consumo de gordura *trans*, como relatado anteriormente.

Uma revisão sistemática de 2016 com estudos em humanos mostrou que a redução do consumo de ácidos graxos *trans* e sua substituição por ácidos graxos *cis* acarreta em melhora do perfil lipídico com aumento da concentração de colesterol HDL, redução de colesterol LDL e consequente redução do risco para doenças cardiovasculares, sendo que os estudos com ácidos graxos poli-insaturados apresentaram efeitos mais significativos, principalmente sobre as concentrações de triglicérides (BROUWER, 2016)

Em uma revisão recente, Oteng e colaboradores (2020) destacam que, como os órgãos de saúde visam reduzir os danos causados por este tipo de AG pelo estabelecimento de normas para removê-los dos alimentos, tem havido pouco incentivo para pesquisas investigarem os mecanismos de ação relacionados aos AG *trans*, gerando inúmeros dados epidemiológicos, entretanto uma compreensão limitada da ação molecular destes AGs.

### **2.2.2 Metabolização de ácidos graxos poli-insaturados**

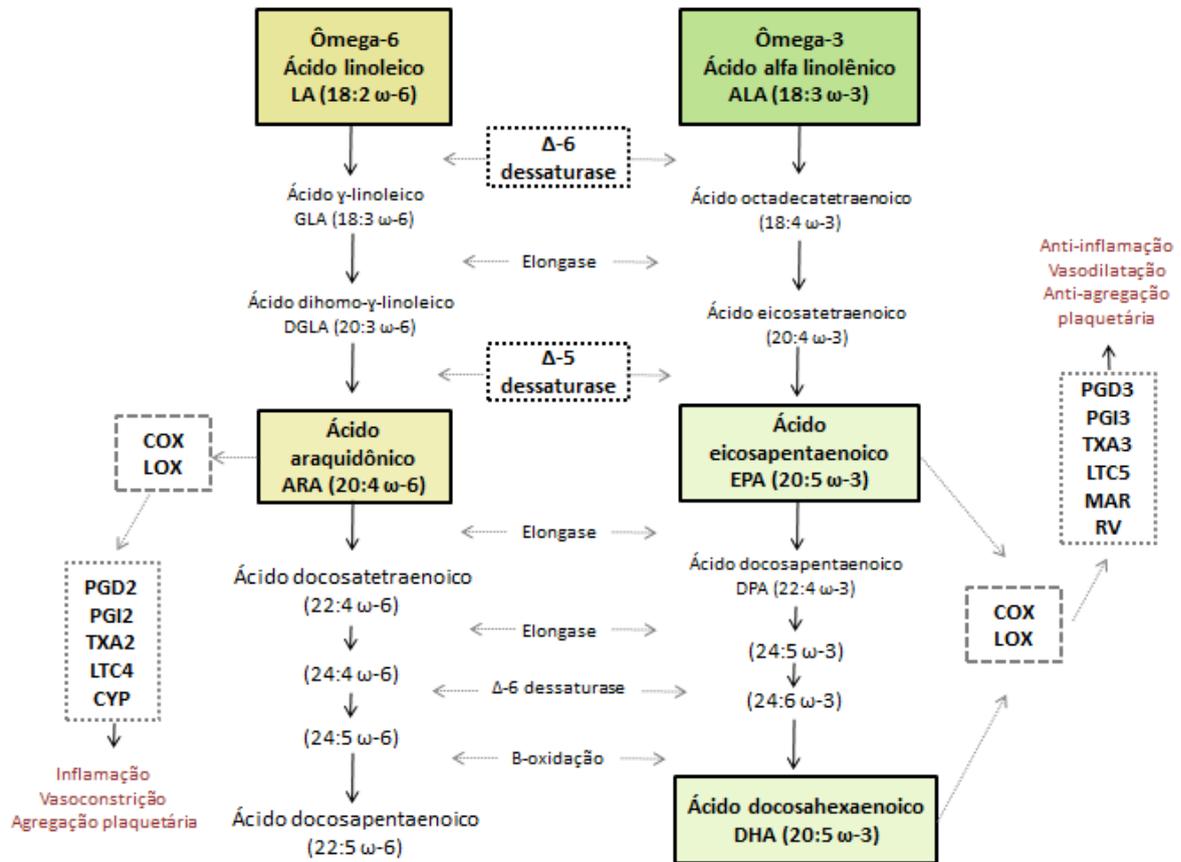
Os ácidos graxos das famílias  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 são considerados essenciais, pois não podem ser produzidos de forma endógena. Quando ingeridos, são convertidos em AG de cadeia longa pela ação das enzimas alongases que adicionam 2 carbonos à cadeia inicial e dessaturase que oxidam 2 carbonos, dando origem a uma dupla ligação *cis*. Essas duplas ligações, em mamíferos, podem ser adicionadas nas posições  $\Delta$ 5,  $\Delta$ 6 e  $\Delta$ 9, sendo que esta última é predominante na síntese de ácidos graxos monoinsaturados através do substrato principal, o ácido esteárico (18:0), dando origem ao ácido oleico (18:1  $\Delta$ 9). Já as enzimas dessaturases  $\Delta$ 5 e  $\Delta$ 6 agem principalmente na dessaturação de ácidos graxos poli-insaturados da família  $\omega$ -3, o que dá origem à formação dos subprodutos EPA e DHA, que desempenham importantes funções no metabolismo (BAZINET *et al.*, 2014; SAINI *et al.*, 2018).

Os ácidos graxos ALA e LA dietéticos são cruciais para manutenção dos níveis de PUFA ômega 3 e 6 nos tecidos, onde são armazenados para que seus subprodutos sejam produzidos em tecidos específicos, de acordo com sua necessidade e

disponibilidade (BARCELÓ-COBLIJN *et al.*, 2009). Um correto aporte de LA e ALA e a bioconversão em ácido araquidônico (ARA), EPA e DHA nos tecidos é importante, pois estes são responsáveis pela produção de eicosanoides pró e anti-inflamatórios através da ação das ciclooxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2), que levam à produção de prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) e prostaciclina (PCI); lipoxigenase (5-LOX e 15-LOX), que sintetizam leucotrienos (LT); ou pelas epoxigenases (citocromo P450 ou CYP), que fazem parte do processo de metabolização do ácido araquidônico e produção do 19-hidroxi-eicosatetraenóico (19-HETE). Estes mediadores exercem importantes efeitos fisiológicos como vasodilatação ou vasoconstrição, contração ou relaxamento da musculatura, hipotensão ou hipertensão e controle da resposta imunológica, através da modulação da agregação plaquetária, dependendo do subproduto no qual atuam (SAKATA *et al.*, 2010; KALINSKI, 2012; SAINI *et al.*, 2018).

Essas reações, até a etapa final de  $\beta$ -oxidação, acontecem no retículo endoplasmático das células hepáticas e a enzima  $\Delta 6$  dessaturase, responsável pela etapa final da síntese do DHA e docosapentaenóico (DPA), é a mesma enzima responsável pela dessaturação inicial dos ácidos graxos AL e ALA, sendo que uma alta concentração de ALA favorece a produção de eicosanoides anti-inflamatórios, o que reforça a importância de um adequado aporte nutricional de AG  $\omega$ -3. (ABEDI, 2014; SAINI *et al.*, 2018). A figura abaixo mostra as etapas da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6.

**Figura 1.** Via da biossíntese de AG poli-insaturados ômega-3 e ômega-6



LA: ácido linoleico; ALA: ácido alfa linolênico; GLA: ácido gama linoleico; DGLA: ácido dihomo-gama-linoleico; ARA: ácido araquidônico; EPA: ácido eicosapentaenoico; DPA: ácido docosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico; COX: cicloxigenase; LOX: lipoxigenase; PGD: prostaglandinas; TXA: tromboxanos; LTC: leucotrienos; CYP: citocromo P; MAR: maresinas; RV: resolvinas. Adaptado de WEYLANDT *et al.*, 2012; KAIN *et al.*, 2015; SCORLETTI *et al.*, 2018; SAINI *et al.*, 2018; DANNESKIOLD *et al.*, 2019.

As enzimas COX1 e COX 2 são isoformas com diferentes mecanismos de ação, sendo que a COX1 é constitutiva e está presente no sistema cardiovascular, onde é essencial para controle da agregação plaquetária através da produção de TX, e no sistema gastrointestinal, onde desempenha papel protetor da mucosa gástrica pela síntese de PGE2. Já a COX2 é induzida por agentes inflamatórios, por exemplo, por um dano tecidual, onde há estímulo da produção de PGE2 que desencadeia uma resposta inflamatória local, principalmente pela quimioatração de eosinófilos (DANNESKIOLD *et al.*, 2019).

Ao atuar sobre o ARA, a COX-1 leva à conversão de PGE<sub>2</sub>, um mediador pró inflamatório que desencadeia a ativação de mastócitos e atua na permeabilidade vascular, febre e dor, respostas importantes para a defesa contra patógenos invasores; PGI<sub>2</sub> que auxilia no controle da pressão arterial pela dilatação dos vasos sanguíneos e inibição da agregação plaquetária; PGF<sub>2</sub> $\alpha$  que atua na vasoconstrição e está envolvida na formação de aterosclerose e PGD<sub>2</sub>, responsável pela maturação dos mastócitos e aumento da migração de neutrófilos estimulados por TNF $\alpha$ . Pela ação da COX2 ocorre a formação de tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), que também tem um papel importante na agregação plaquetária, podendo estimular a formação de trombos e vasoespasmos. Há também a formação de LT da série 4 pela ação da LOX, que desempenha papel importante na manutenção da resposta inflamatória pelo aumento da permeabilidade vascular, inibição da agregação plaquetária e quimiotaxia ou ainda, por estimular a vasodilatação pela ação da CYP. (TAYLOR-CLARK *et al.*, 2008; AKAGI *et al.*, 2013; FONTANA *et al.*, 2013; LÄMMERMANN *et al.*, 2013; SCHUCK *et al.*, 2013; TAKETOMI *et al.*, 2013; LU *et al.*, 2014; MORIMOTO *et al.*, 2014; GOUPIL *et al.*, 2015; SAINI *et al.*, 2018).

Entretanto, quando a COX-2 age sobre o EPA, ocorre a formação de PGI<sub>3</sub>, que induz a redução da agregação plaquetária e vasoconstrição, aumento da angiogênese e redução da aterosclerose; PGD<sub>3</sub> que possui ação anti-inflamatória por reduzir a migração de neutrófilos e PGE<sub>3</sub> que reduz a síntese de PGE<sub>2</sub> (HAWCROFT *et al.*, 2013; OHNISHI *et al.*, 2013). Ao ser estimulada pela LOX, ocorre a produção de LT<sub>5</sub>, que possui ação anti-inflamatória e resolvinas da série 1 e 2 (RV1 e RV2), que reduz a infiltração de células inflamatórias e a produção de IL-6 e TNF (TJONAHEN *et al.*, 2006; BARDEN *et al.*, 2016).

Quando o DHA é metabolizado, ocorre a produção de resolvinas (RV1-4), maresinas (como a MAR1) e protectinas (PD1), que são moléculas mediadoras da resposta inflamatória e atuam reduzindo a migração de neutrófilos, TNF e interleucinas pro-inflamatórias (SERHAN *et al.*, 2012). Estes mediadores lipídicos agem em conjunto, de forma que as maresinas estimulam a regeneração tecidual; as resolvinas ativam o processo de apoptose celular e as protectinas ativam a fagocitose das células apoptóticas, cessando a inflamação local. Os eicosanoides também agem inibindo a geração de radicais superóxido e a liberação de TNF, IL-6, IL-2 e do fator nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) em células dendríticas; bloqueiam seletivamente o receptor de tromboxano e agregação plaquetária; regulam moléculas de adesão da superfície celular,

regulam a ação das L-selectinas e com isso modulam recrutamento de leucócitos, controlando a migração de neutrófilos para o local da inflamação (SERHAN e CHIANG, 2008; SEKI *et al.*, 2009; SPITE *et al.*, 2009; HEGDE *et al.*, 2011; NORDGREN *et al.*, 2013; WEYLANDT *et al.*, 2012; KAIN *et al.*, 2015).

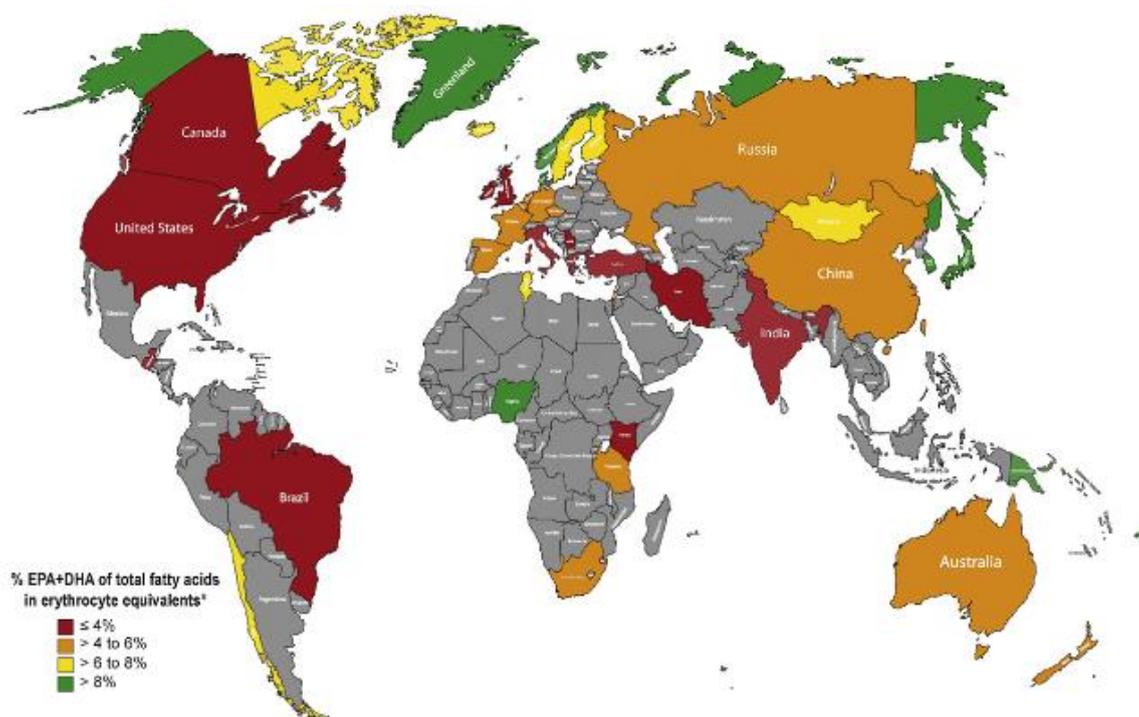
O ARA também sofre ação da fosfolipase A que ativa receptores de membrana acoplados a uma proteína regulatória ligada a um nucleotídeo guanínico (proteína G) que ativa a fosfolipase A2, acarretando um aumento da concentração de cálcio ( $Ca^{++}$ ) no meio intracelular, liberando o ARA das membranas celulares (BINDRA, 2012).

Entretanto, foi demonstrado que o  $\omega$ -3 inibe a ação da fosfolipase A, inibindo a ação da COX sobre o ARA e conseqüente redução da produção de mediadores pro-inflamatórios, além de estimular a formação de fatores anti-inflamatórios (KHANDOUZI *et al.*, 2020). Com isso, torna-se essencial uma ingestão de  $\omega$ -3 ou precursores de seus subprodutos em proporções adequadas, para que se prevaleça as vias anti-inflamatórias necessárias para a manutenção do controle metabólico.

Diversos estudos buscam avaliar a proporção adequada entre  $\omega$ -6/  $\omega$ -3 para uma ação anti-inflamatória efetiva, entretanto os dados ainda apresentam grande variabilidade, onde as recomendações variam de 5:1 a 25:1, sendo que estudos mostram que a dieta ocidental equivale, em média, à uma ingestão proporcional a 16:1 (CHARDIGNY *et al.*, 2001; SIMOPOULOS, 2011; PISANI *et al.*, 2015; SIMOPOULOS, 2016; ZHUANG *et al.*, 2019). A alimentação baseada na dieta ocidental pode prejudicar o metabolismo de gerações, pois estudos sugerem que a proporção de AG  $\omega$ -6/  $\omega$ -3 no leite materno também está maior, o que pode contribuir para o aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade na infância e vida adulta (AILHAUD *et al.*, 2004; RONDANELLI *et al.*, 2015).

Stark e colaboradores (2016), ao reunir resultados de pesquisas sobre o percentual de EPA+DHA no plasma de diferentes populações mundiais observou que as maiores concentrações de EPA e DHA plasmáticos são de regiões não totalmente adeptas à dieta ocidental e com alto consumo de frutos do mar como Dinamarca, Tailândia, Japão e áreas de populações indígenas. Em contraste, locais como Brasil, Estados Unidos, Canadá, onde se prevalece a alimentação ocidental, encontrou-se menores níveis plasmáticos de EPA+DHA, conforme mostrado no mapa abaixo:

**Figura 2.** Níveis globais da concentração de EPA+DHA eritrocitária



Fonte: Stark *et al.*, 2016

Em geral, recomenda-se a dose de 1g ao dia de EPA e DHA para populações com risco de DCNT, pois pesquisas mostram que esta ingestão está associada a 90% menos riscos de morte cardíaca súbita e entre 250 a 500 mg para população geral, visando prevenir DCNT (SCHACKY *et al.*, 2007; PRATO *et al.*, 2020).

Contudo esta dose ainda é controversa, como mostrado em uma revisão que reuniu resultados de ensaios controlados onde foram avaliados desfechos cardiovasculares após a suplementação com ômega 3 e obteve que doses abaixo de 2 gramas ao dia de ômega 3, não foram suficientes para interferir no desfecho de morte por DCV, mas estudos com doses entre 3 a 6 gramas ao dia, mostraram redução do desfecho, principalmente por estimular vias anti-inflamatórias (RIZOS *et al.*, 2021).

Apesar da inflamação ser um processo natural de resposta adaptativa do organismo e necessária para a manutenção das funções e estruturas celulares sob efeito de danos agudos, sua persistência em longo prazo pode causar danos cardiovasculares, hepáticos, neurais, entre outras (FURMAN *et al.*, 2019). Além disso, os ácidos graxos ômega 3 EPA e DHA favorecem a organização, fluidez e permeabilidade da membrana através do correto funcionamento das proteínas transmembrana; favorecem a

sinalização celular, acarretando em melhora da sensibilidade à insulina e ativação do transportador de glicose-4 (GLUT-4); modulam a atividade de canais iônicos como o canal de sódio, potássio e cálcio nas células cardíacas, estimulando o sistema  $\beta$ -adrenérgico, responsável pela adequada contratilidade; e estimulam a liberação de óxido nítrico (NO), apresentando efeito hipotensor (GÓMEZ-CANDELA *et al.*, 2011; DESSÌ *et al.*, 2013; GUO *et al.*, 2017).

Alguns destes efeitos foram mostrados por pesquisas que avaliaram o efeito da suplementação de  $\omega$ -3 em diferentes doses, como por exemplo, pesquisas mostram que a suplementação de 2 a 4 gramas acarretou na redução de, em média, 27% na concentração de triglicérides e aumento em até 3% na concentração da fração colesterol HDL, sendo os resultados mais significativos em grupos com as concentrações basais mais elevadas, como em indivíduos com diabetes tipo 2 e com obesidade abdominal (HARRIS, 1997; BALK *et al.*, 2006; HARTWEG *et al.*, 2008; JACOBSON, 2008; SKULAS-RAY *et al.*, 2010; MILLER *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2017; ZEHR *et al.*, 2018). Outros estudos mostraram também efeito hipotensor do  $\omega$ -3, onde a suplementação de aproximadamente 3,7g ao dia apresentou uma redução da pressão arterial sistólica de 3,5 mmHg e 2,4mmHg da diastólica (GELEIJNSE *et al.*, 2002; GRYNBERG, 2005; TOUSOULIS *et al.*, 2014).

Um estudo que avaliou os efeitos metabólicos de 2g de óleo de peixe por dia em pacientes diabéticos com doença renal crônica obteve redução da pressão sistólica, mas sem melhora no perfil glicêmico e lipídico (USTA *et al.*, 2020). Outro composto estudado por ser rico em  $\omega$ -3 é o óleo de krill. Bilinski e colaboradores (2020) observaram que a suplementação de 1g de óleo de krill contendo 160 mg de EPA e 80 mg de DHA por 12 semanas aumentou, em média, 10.1% o índice de  $\omega$ -3 plasmático dos participantes (índice citado na figura 2). Em outro estudo onde foi utilizada a suplementação deste mesmo óleo em homens obesos, o grupo tratado por 6 semanas obteve uma redução nos níveis séricos de triglicérides em 19 mg/dl, tanto na dose de 1,4g quanto 4g ao dia, entretanto não houve esse efeito no grupo tratado por 12 semanas, onde os autores levantaram a hipótese de ter ocorrido maior liberação de triglicérides hepático neste período (BERGE *et al.*, 2013).

Ainda sobre o perfil lipídico sérico, a suplementação de  $\omega$ -3 entre 600mg a 1,2 g foi eficaz em reduzir entre 8,9 a 37,69 mg/dL a concentração de triglicérides sérico em indivíduos obesos, havendo relação entre dose/resposta nestes estudos (DANGARDT *et al.*; 2010; JUÁREZ-LÓPEZ *et al.*, 2013; JANCZYK *et al.*, 2015). Skulas-Ray e

colaboradores (2019) reuniram dados sobre o efeito do  $\omega$ -3 no perfil lipídico e concluíram que, apesar de não haver dados suficientes sobre o efeito isolado do EPA ou DHA, a suplementação de 4g de  $\omega$ -3 composto por pelo menos 3g de EPA+DHA foi eficaz para a redução da hipertrigliceridemia como monoterapia ou adjuvante de outros hipolipemiantes. Uma revisão que reuniu intervenções utilizando óleo de canola mostrou que este pode ser benéfico no perfil lipídico pela redução de triglicérides, LDL colesterol e colesterol total quando substituído por aproximadamente 15% da ingestão calórica total (AMIRI *et al.*, 2020).

Os efeitos de EPA e DHA no metabolismo se devem, principalmente, à sua ligação em receptores de membrana e nucleares e subsequente regulação da expressão e atividade de fatores de transcrição como receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) e proteína de ligação a elemento regulador de esterol-1c (SREBP-1c), que regulam a expressão e ação de enzimas importantes em todo o metabolismo lipídico como acil-CoA oxidase (ACOX), carnitina palmitoiltransferase I (CPT-I), ácido graxo sintase (FAS) e acetil-CoA carboxilase (DENG *et al.*, 2016; ECHEVERRÍA *et al.*, 2016; SZÁNTÓ *et al.*, 2021).

Sabe-se que estudos em humanos são importantes para entendermos os efeitos de compostos alimentares no metabolismo, mas apresentam limitações quanto às análises e ao estudo aprofundado das vias moleculares envolvidas nos resultados apresentados em exames bioquímicos e antropométricos, além de apresentarem enorme variabilidade genética e dificuldade em se obter controle sobre a dieta alimentar. E ainda, a forma de manipulação ou processamento do alimento em estilo de vida livre (principalmente o aquecimento), modifica a complexidade da matriz alimentar, em particular dos AGs, no qual é essencial manter a integridade das insaturações para garantia da biodisponibilidade e maior possibilidade de analisar as vias moleculares afetadas (CURIONI *et al.*, 2019).

Dessa forma, torna-se relevante o uso de modelos animais onde é possível controlar o maior número de variáveis, garantir a oferta do composto de interesse e permitir análises bioquímicas, moleculares e histológicas mais amplas (REMYN, 2004; SCHNAIDER, 2008).

Como por exemplo, um estudo mostrou que a suplementação com óleo de canola (contendo 6% EPA e 5% DHA), estimula a expressão de adiponectina, um hormônio proteico importante no catabolismo de ácidos graxos em ratos machos da linhagem Wistar alimentados previamente com dieta hiperlipídica (FLACHS *et al.*,

2006).

Em camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica (35%) observaram que o tratamento com uma dieta suplementada com 3% de EPA/DHA acarretou em aumento da produção de moléculas anti-inflamatórias (ROSSMEISL *et al.*, 2012). Outro estudo com camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, ao suplementar a ração com óleo de peixe e óleo de linhaça por 16 semanas observou redução do colesterol total em ambos os grupos e redução das frações HDL-colesterol no grupo suplementado com óleo de peixe, além de obterem redução da gordura hepática em ambos os grupos (RIEDIGER *et al.*, 2008). Kim e colaboradores (2012), ao induzir a esteatose hepática não alcoólica através de uma dieta hiperlipídica por 5 meses, observaram que a suplementação com ácidos graxos poli-insaturados melhorou a esteatose hepática e a hiperlipidemia.

Alguns estudos mostram também benefícios ao perfil metabólico do tecido adiposo, como por exemplo, uma pesquisa onde foi realizado o tratamento com 400mg de óleo de peixe após 6 semanas de dieta hiperlipídica em camundongos, obteve redução em parâmetros pró inflamatórios no tecido adiposo visceral pela redução da proteína C reativa (de MELLO *et al.*, 2019). Outro estudo também obteve uma menor resposta inflamatória no tecido adiposo branco ao tratar ratos diabéticos e não diabéticos com a substituição das fontes de AG da dieta hiperlipídica (40%) de  $\omega$ -6 por EPA+DHA. Apesar de observarem também a redução na concentração da proteína C reativa, o tratamento não afetou a glicemia dos animais (TODORIC *et al.*, 2006).

Outra pesquisa realizada em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (60% gordura) por 12 semanas, ao avaliar o efeito da suplementação com óleo de peixe encapsulado (379mg EPA+DHA) por administração oral, observou que a suplementação com  $\omega$ -3 reduziu significativamente o acúmulo de gordura visceral hepática, apresentando efeito tanto em macro quanto em microesteatose, reduzindo também a inflamação induzida pela dieta hiperlipídica através do aumento da sinalização de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) e supressão do NFkB. Estes autores sugerem que o efeito anti-esteatótico poderia ser atribuído à redução na mobilização de glicerol a partir da lipólise de tecidos periféricos para o fígado, considerando que os ácidos graxos poli-insaturados  $\omega$ -3 aumentam o potencial antioxidante do fígado por meio, principalmente, da ativação do fator de transcrição nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), que é um regulador chave da resposta antioxidante do organismo, assim como pela regulação da lipogênese pela

redução da expressão do fator de transcrição SREBP-1 e consequente inibição da enzima ácido graxo sintase (TAPIA *et al.*, 2014).

White e colaboradores (2010), observaram que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram atividade prejudicada dos mediadores anti-inflamatórios provenientes de ácidos graxos  $\omega$ -3 como resolvinas, assim como apresentaram aumento de macrófagos e expressão de quimiocinas e citocinas, o que levou à resistência insulínica e maior ativação de óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) e da quinase c-Jun N-terminal (JNK), tanto no músculo quanto no fígado, e que a restauração de níveis de ácidos graxos poli-insaturados foram capazes de reverter estes efeitos, melhorando a atividade anti-inflamatória. Outro estudo onde ratos Wistar foram alimentados com dieta hiperlipídica + ômega 3 (62g de óleo de peixe por quilo de ração) por 8 semanas, a adição do  $\omega$ -3 reduziu a insulina plasmática e o índice HOMA-IR, aumentou a expressão da CPT1 (proteína carnitina palmitoiltransferase 1) e adiponectina no tecido adiposo e reduziu a concentração de ceramidas e da enzima diacilglicerol no mesmo tecido, favorecendo seu perfil metabólico (CHACIŃSKA *et al.*, 2019).

Um estudo recente *in vitro* e *in vivo* sugere que o efeito hipoglicemiante do  $\omega$ -3 se deve principalmente pelo remodelamento do tecido adiposo onde ocorre a hiperplasia em substituição à hipertrofia, o que favorece a geração de mais adipócitos com menor teor de gordura por adipócito, beneficiando também o metabolismo lipídico hepático, mecanismos mediados pela ativação do GPR120 observado principalmente pela ação do DHA (HILGENDORF *et al.*, 2019). Amos e colaboradores (2019) destacam também que o efeito anti-inflamatório do  $\omega$ -3 se deve ao *crossstalk* entre o GPR120 e o fator de transcrição Nrf2, responsável pela regulação da expressão de uma variedade de genes de enzimas com ação anti-inflamatórias.

Além disso, estudos mostraram que os AG  $\omega$ -3 também podem se ligar a PPARs; reduzir a expressão gênica do fator transcricional SREBP1 ou inibir também a expressão da proteína de ligação ao elemento regulador de carboidratos (ChREBP), modulando assim a expressão de enzimas lipogênicas chaves como FAS, ACC e estearoil coA dessaturase (SCD-1), o que leva à redução da lipogênese pela modulação da síntese hepática de triacilglicerol (TAG) e consequente aumento da oxidação de ácidos graxos (RICCIOTTI *et al.*, 2011; LOTTENBERG *et al.*, 2012; SCORLETTI e BYRNE, 2013; JALILI *et al.*, 2020). Com isso, os AG poli-insaturados podem favorecer o perfil lipídico hepático, conforme mostrado na figura a seguir.



OTENG *et al.*, 2020).

Dessa forma, o EPA e o DHA geram mediadores que atuam tanto no início quanto no fim dos processos inflamatórios, sendo promissores na minimização ou prevenção de distúrbios metabólicos associados a inflamação como obesidade, diabetes, resistência insulínica entre outras (BARBALHO *et al.*, 2011; JALILI *et al.*, 2020).

Diante do exposto, torna-se importante ampliar a compreensão dos mecanismos de ação dos AG ômega 3 e seus subprodutos EPA e DHA no metabolismo, os quais podem ser promissores não somente na prevenção dos distúrbios metabólicos, mas também no tratamento destes distúrbios ocasionados por hábitos de vida inadequados.

### **2.3 Ômega 3: da ingestão à bioconversão**

Um fator que pode contribuir para o agravamento de doenças crônicas na população é devido ao fato de que as sementes e óleos vegetais mais consumidos como soja, milho, óleo de canola e girassol são ricos em AG  $\omega$ -6 na forma de LA e possuem baixo teor de AG  $\omega$ -3 (em média 6% ômega 3 e 50% ômega 6). Dessa forma, o  $\omega$ -6 tem sua necessidade facilmente atingida pela alimentação, ao contrário do  $\omega$ -3 (MOGHADASIAN *et al.*, 2008). Sabe-se que as sementes de chia e linhaça possuem alto teor de  $\omega$ -3 e o óleo de linhaça é composto, em média, por 50% AG  $\omega$ -3.

Por haver comprovações de que grande parte da população não consome adequadamente fontes de  $\omega$ -3, concomitante a uma prevalente ingestão de alimentos ricos em gorduras industrialmente modificadas, busca-se constantemente tratamentos para reverter ou amenizar os danos metabólicos ocasionados por uma alimentação inadequada. Contudo, pesquisas têm mostrado que a suplementação com  $\omega$ -3 pode apresentar uma ampla variabilidade quanto às doses testadas, assim como a maioria dos estudos utiliza óleos ricos em  $\omega$ -3 que também possuem em sua composição outros tipos de AG e por isso os mecanismos isolados dos subprodutos do  $\omega$ -3 (EPA e DHA) não estão esclarecidos (KOZŁOWSKA *et al.*, 2016; SAINI *et al.*, 2018, ELAGIZI *et al.*, 2021).

Para que o  $\omega$ -3 atue no metabolismo, é necessário que ele esteja biodisponível nas células para que haja a conversão do ALA em seus metabólitos (PUNIA *et al.*, 2019). E ainda, sabe-se que há diversas etapas envolvidas entre a absorção dos AG pelos enterócitos, incorporação em quilomícrons e metabolização nos tecidos e estas são influenciadas por diversos mecanismos bioquímicos e moleculares. Estes fatos reforçam

a importância de investirmos em pesquisas sobre os mecanismos de ação que possam diferenciar os efeitos dose dependentes de EPA e DHA, isolados ou em associação, de modo a garantir a ingestão de  $\omega$ -3 em concentrações que favoreçam sua bioconversão e sua atuação nas vias de interesse (BAKER *et al.*, 2016; SHAHIDI *et al.*, 2018; INNES *et al.*, 2020).

Neste sentido, o *REDUCE-IT*, um grande estudo conduzido com pacientes de alto risco cardiovascular demonstrou que suplementar 4g ao dia de EPA em pacientes hipertrigliceridêmicos reduziu a incidência tanto de eventos cardiovasculares quanto de morte cardiovascular, tendo seu efeito comparado ao das estatinas (BHATT *et al.*, 2019).

Entretanto, uma revisão publicada pela *American Heart Association* mostrou que as pesquisas apresentam alta variabilidade nas doses testadas (376 a 4000 mg ao dia) e ainda não está claro o efeito de dose/resposta sobre as alterações metabólicas, mas que uma dose moderada parece ser mais benéfica do que superdoses (HU *et al.*, 2019).

Um estudo que analisou a dosagem plasmática de EPA e DHA após diferentes doses de suplementação de ômega 3 por 14 dias (1, 2 ou 4 gramas) em mulheres saudáveis, obteve que a biodisponibilidade obtida foi de 48, 50 e 52% respectivamente (LAPOINTE *et al.*, 2019). E, apesar de estudos mostrarem que a suplementação de  $\omega$ -3 aumenta a concentração de ALA e EPA plasmático, mas não de DHA, esta relação e mecanismos associados não estão claros (ARTERBURN *et al.*, 2006; BRENNAN *et al.*, 2009; BAKER *et al.*, 2016).

Este fato também foi ressaltado em outra revisão que buscou reunir dados sobre a relação entre absorção e biodisponibilidade do  $\omega$ -3, onde PUNIA e colaboradores (2019) destacam que dados sobre a relação entre a ingestão de ALA e conversão em EPA/DHA nos tecidos ainda são limitados.

De acordo com o exposto, os ácidos graxos poli-insaturados possuem potencial efeito protetor no metabolismo, sendo capazes de atuar como tratamento ou prevenção de agravos metabólicos, entretanto, os estudos apresentam grande variabilidade quanto ao tipo de ácido graxo utilizado e por isso não está esclarecida a relação entre as respostas encontradas e as diferentes concentrações de EPA e DHA utilizadas (JOVANOVSKI *et al.*, 2017).

Assim, este estudo utilizou-se das seguintes premissas:

1. Não existe uma consistência na literatura entre a associação das doses de EPA e DHA e seus efeitos metabólicos,

2. A maioria dos estudos disponíveis na literatura avalia os efeitos de EPA e DHA nas fases iniciais das alterações metabólicas e não após o agravamento e cronificação destas alterações;
3. A maioria dos estudos em modelo de dieta hiperlipídica utiliza compostos vegetais ricos em ômega 3 (como óleo de canola, de linhaça e de krill), mas que possuem também outros tipos de AG em sua composição ou outros compostos, como antioxidantes;
4. Ainda existe a necessidade de artigos que mostrem de forma comparativa, nas mesmas condições experimentais, o efeito de um óleo vegetal comercial rico em  $\omega$ -3 (como o óleo de linhaça) e EPA/DHA isolados para uma maior compreensão dos seus efeitos em diferentes tecidos.

Sendo assim, com base nestas premissas, nossa principal meta foi avaliar o efeito do consumo do óleo de linhaça e proporções diferentes de EPA/DHA nos tecidos hepático, adiposo e cardíaco, após o estabelecimento das alterações metabólicas induzidos pelo consumo crônico de uma dieta hiperlipídica rica em gordura *trans*, desde o início do pós desmame.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação com o óleo de linhaça e proporções diferentes de EPA e DHA em ratos, após o estabelecimento das alterações metabólicas induzidas pelo consumo crônico de uma dieta hiperlipídica rica em gordura *trans*.

Este trabalho foi dividido em duas etapas, a saber:

➤ 1ª etapa (1ª a 18ª semana):

Meta: Avaliar as alterações metabólicas induzidas pelo consumo crônico de uma dieta hiperlipídica. Para cumprir esta meta, foi avaliado os seguintes parâmetros:

- Ingestão alimentar e parâmetros antropométricos
- Parâmetros bioquímicos séricos
- Pressão arterial
- Resposta insulínica e tolerância oral a glicose
- Perfil lipídico do tecido adiposo e fígado

➤ 2ª etapa (18ª a 20ª semana):

Meta: Avaliar o efeito dos tratamentos com óleo de linhaça, EPA e DHA sobre os agravos metabólicos decorrentes do consumo crônico da dieta hiperlipídica. Para cumprir esta meta, foi avaliado os seguintes parâmetros:

- Taxa de sobrevivência;
- Ingestão calórica e eficácia alimentar;
- Parâmetros antropométricos e peso relativo do coração, fígado e tecido adiposo;
- Parâmetros glicometabólicos;
- Perfil lipídico sérico e hepático;
- Defesa antioxidante no tecido hepático e cardíaco;
- Perfil inflamatório no soro, tecido adiposo e cardíaco;
- Análise histológica do tecido hepático, adiposo e cardíaco;
- Análise da expressão de genes lipogênicos no fígado;
- Análise da composição de ácidos graxos no fígado e tecido adiposo.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento experimental

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (protocolo 2017/13) e todo o procedimento experimental foi executado de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os animais utilizados no estudo foram fornecidos pelo Laboratório de Nutrição Experimental (LABNEX) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Minas Gerais, Brasil.

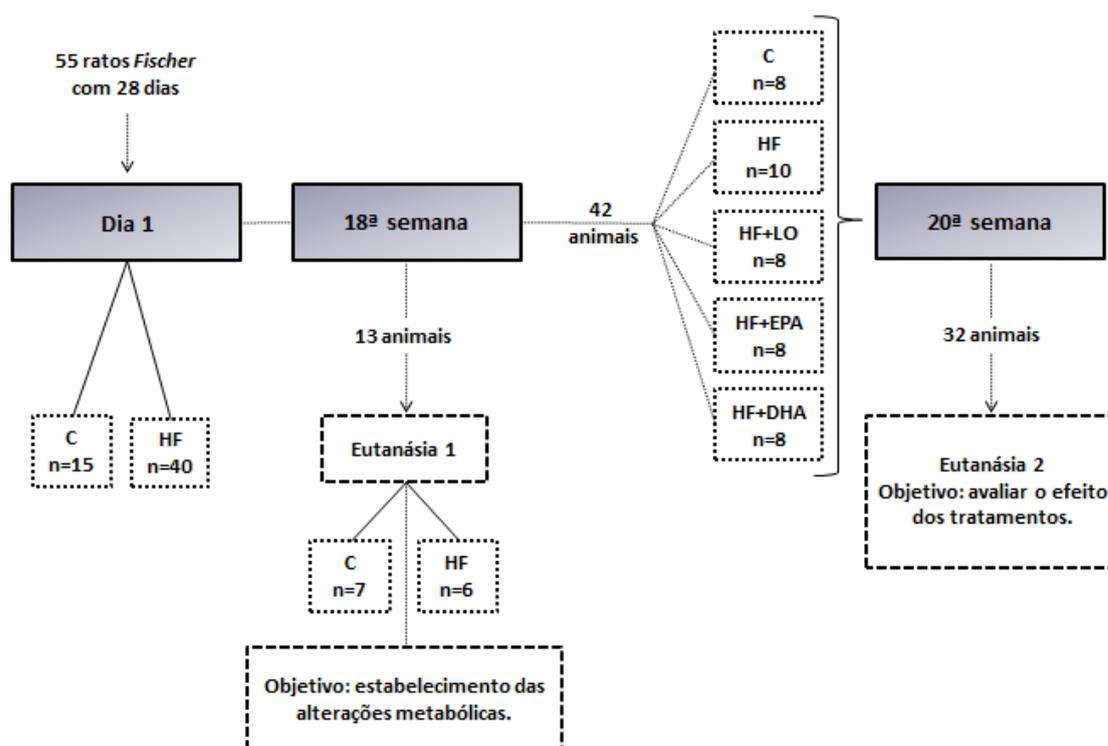
Para realização deste estudo foram utilizados 55 ratos machos da linhagem *Fischer* com 28 dias de idade, alocados no biotério da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) em gaiolas metabólicas. O estudo foi conduzido da seguinte forma: inicialmente os animais foram distribuídos em 2 grupos sendo: controle (C; n=15) e dieta hiperlipídica (HF; n=40). Após 18 semanas, foram eutanasiados 7 animais do grupo controle e 6 animais do grupo HF (após jejum por 8 horas) para coleta do material biológico e verificação dos parâmetros bioquímicos. O restante dos animais continuaram no estudo e foram distribuídos nos seguintes grupos: Grupo controle (C, n=8; dieta padrão); Grupo HF (n=10); Grupo LO (n=8); Grupo EPA (n=8) e Grupo DHA (n=8), onde o grupo C e HF receberam 1ml de água por gavagem; o grupo LO recebeu 1 ml de óleo de linhaça; o grupo EPA recebeu 1 ml de solução 3:1 de EPA:DHA e o grupo DHA recebeu 1 ml de solução 1:3 de EPA:DHA. Todos os tratamentos foram administrados oralmente através de gavagem oro gástrica, durante duas semanas.

Todos os grupos foram alimentados *ad libitum* com ração e água durante o período experimental. Ao final de 20 semanas, os animais restantes foram mantidos em jejum por 8 horas e, em seguida, anestesiados por inalação com isoflurano (Isoforine®, São Paulo, Brasil) e posteriormente eutanasiados por exsanguinação.

Após 18 e 20 semanas foram realizadas eutanásia parcial e total dos animais experimentais, respectivamente. Para isso, os animais ficaram sob jejum de 8 horas e, imediatamente antes da eutanásia, foram submetidos a inalação de isoflurano para anestesia e subsequente eutanásia. O sangue foi obtido por exsanguinação da veia braquial e colocado em tubos de polipropileno com ou sem 15µL de anticoagulante Glistab® (Labtest) para obtenção de plasma e soro, respectivamente. Posteriormente, o

material sanguíneo foi centrifugado a 10000rpm por 15 minutos e os respectivos sobrenadantes foram armazenados em freezer com temperatura a -80°C. Para a retirada dos órgãos foi realizada a perfusão pelo ventrículo esquerdo com soro fisiológico para limpeza dos tecidos e, então foram retirados: fígado, coração, tecido adiposo abdominal subcutâneo e rins. Todos os órgãos foram seccionados onde uma fração foi armazenada em tubo de polipropileno e armazenada em freezer de temperatura -80°C para as análises bioquímicas e outra parte foi armazenado em cassette imersos em formol tamponado 4% para as análises histológicas. Uma fração do fígado foi armazenada em tubo de polipropileno contendo RNA-later (Sigma®) em freezer a -80°C para posterior análise de expressão gênica.

### Fluxograma 1. Delineamento experimental



C: grupo controle; HF: grupo dieta hiperlipídica; LO: grupo óleo de linhaça; EPA: grupo EPA; DHA: grupo DHA; ml: mililitro.

Os compostos utilizados foram fornecidos pela empresa BASF® e continham a razão de 500:200mg ou 150:500mg de EPA:DHA. A dose experimental utilizada foi de 900mg/dia, considerando a densidade dos óleos experimentais igual à 0,9g/cm<sup>3</sup> conforme informações fornecidas pelo fabricante; a dose foi baseada em estudos anteriores (GOH *et al.*, 1997; THIES *et al.*, 2001; ERDOGAN *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2004; VINES *et al.*, 2012; HIRABARA *et al.*, 2013; FAMUREWA *et al.*, 2018).

#### 4.2 Composição nutricional e centesimal das rações experimentais

Os animais do grupo controle receberam ração NUVILAB® padrão balanceada à vontade e os animais do grupo experimental receberam dieta hiperlipídica à vontade, ambas de acordo com o padrão estabelecido pela AIN93.

A parte lipídica da ração hiperlipídica foi fornecida pela adição de gordura vegetal hidrogenada.

As rações padrão e hiperlipídica forneciam 419,27 e 515,92 quilocalorias (kcal) a cada 100g de ração, respectivamente, distribuídas da seguinte forma:

**Tabela 3.** Distribuição percentual da composição calórica das rações padrão e hiperlipídica

		<b>Dieta controle</b>	<b>Dieta hiperlipídica</b>
<b>% energia</b>	<b>Carboidratos</b>	71,22	39,04
	<b>Proteínas</b>	20,48	20,49
	<b>Lipídios</b>	8,3	40,47

- Composição do óleo de linhaça:

O óleo de linhaça dourada utilizado foi obtido da empresa DUOM<sup>®</sup> em site comercial. A composição nutricional presente no rótulo está descrita abaixo:

**Tabela 4.** Informação nutricional do óleo de linhaça doutorado utilizado no experimento

<b>INFORMAÇÃO NUTRICIONAL</b>	
	Quantidade em 1 ml
Valor Energético	8,3 kcal
Gorduras Totais, das quais:	0,9g
Gorduras Saturadas	0,1g
Gorduras Monoinsaturadas	0,19g
Ômega 9	0,18g
Gordura Poli-insaturadas	0,57g
Ômega 3	0,45g
Ômega 6	0,12g
Vitamina E	0,2g
Não contém quantidades significativas de carboidratos, proteínas, gorduras <i>trans</i> , fibra alimentar e sódio.	

ml: mililitro; Kcal: quilocalorias; g: gramas.

#### 4.2.1 Composição centesimal das rações padrão e hiperlipídica

Para garantia da oferta adequada e das proporções de nutrientes ofertados foi realizada análise da composição centesimal tanto da ração comercial quanto da dieta hiperlipídica manipulada. Foram analisados o teor de umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e carboidratos, conforme descrito resumidamente a seguir.

O teor de umidade foi avaliado pelo método de perda por dessecação em secagem direta onde foram pesados 5g de cada ração e colocados em estufa a 105°C por tempo suficiente para estabilização do peso. Quando foi detectado que o peso não apresentava mais variação, foi realizada nova pesagem das amostras e o cálculo da umidade foi feito por diferença entre o peso inicial e final.

O teor de cinzas reflete a quantidade de compostos inorgânicos (minerais) presente nos alimentos. Para quantificá-lo foi realizado o método de queima seca, onde

ocorre carbonização da matéria orgânica. Para isso foram pesados 5g de cada ração colados em cadinhos de porcelana e levados à mufla a temperatura aproximada de 500°C. Após a secagem completa, o material foi pesado novamente e o cálculo das cinzas foi feito por diferença entre o peso inicial e peso final.

A quantificação do teor de lipídeos das amostras foi feita pelo método de Soxhlet onde 5g de amostra foram acondicionadas no cartucho de extração e transferidas para o aparelho de extração. O extrator foi submetido a uma temperatura de 105°C e então foi adicionado o solvente (éter etílico) e então foi feita extração contínua por 16 horas. Após extração completa, o material resfriado foi recolhido e o lipídeo extraído foi pesado e o cálculo da quantidade de gordura foi feito por diferença entre o peso inicial e final (SOXHLET, 1879).

O teor de proteínas das rações foi avaliado pelo método de Kjeldahl, por determinação de nitrogênio orgânico. Para isso foram utilizados 5g de amostra submetidos às etapas de: digestão com ácido sulfúrico a 350-400°C + catalisador (sulfato de potássio); neutralização e destilação onde o sulfato de amônio reage com hidróxido de sódio, formando amônia, sulfato de sódio e água e, então, a amônia gerada reage com ácido bórico, formando o borato de amônio que é usado para titulação com ácido clorídrico. Considerando que a maioria das proteínas contém aproximadamente 16% de nitrogênio em suas moléculas, multiplica-se o conteúdo de proteína bruta por 6,25 (KJELDAHL, 1883). O cálculo foi feito baseado no volume necessário para titulação de cada amostra, aplicando a fórmula a seguir:

$$\text{Teor proteico (\%)} = \frac{V \times 0,14 \times \text{Fator proteico} \times \text{Fator de correção}}{\text{Peso da amostra}}$$

Onde:

V = volume de HCl gasto para titulação

Fator proteico = 6,25

Fator de correção do HCl = 1,02

### **4.3 Parâmetros antropométricos**

Para avaliação do perfil antropométrico dos animais, foi realizada aferição do comprimento naso-anal por fita métrica. Para a avaliação da massa corpórea os animais foram colocados em um contentor sob a balança, sendo a massa corpórea aferida

quando os animais estabilizavam as 4 patas na base.

Com estes dados, foram calculados o Índice de Lee (LEE, 1929) para avaliação do grau de obesidade, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de Lee (g/cm}^3\text{)} = \frac{\sqrt[3]{\text{PC}}}{\text{CNA}} \times 10$$

Onde:

$\sqrt[3]{\text{PC}}$ : Raiz cúbica do peso corporal (g)

CNA: comprimento naso-anal (mm)

#### **4.4 Pressão arterial**

Para a avaliação da presença ou não de hipertensão nos animais submetidos a dieta hiperlipídica, a pressão sistólica foi aferida pela técnica de pletismografia na veia caudal. Para isso, os animais foram ambientados ao túnel de contenção por três dias anteriores à análise. Para a aferição os animais foram colocados no túnel de contenção de forma que ficassem estáticos e com a cauda exposta. Para a dilatação da veia foi colocado uma fonte térmica sobre as caudas para favorecer a dilatação por 10 minutos e, posteriormente, foi colocado e afixado o esfigmomanômetro próximo a região retal.

Os dados de pressão foram obtidos em triplicata para obtenção da média, pelo programa Windoq Lite Data Acq DI-199.

#### **4.5 Parâmetros bioquímicos**

##### **4.5.1 Glicemia**

As concentrações de glicose foram analisadas em plasma utilizando kit comercial da empresa LABTEST<sup>®</sup> (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando método colorimétrico.

##### **4.5.2 Insulina**

A análise da concentração de insulina foi feita em soro, utilizando o kit comercial “Rat/Mouse Insulin ELISA kit” (Merck Millipore, USA) que se baseia no método “ELISA sanduíche” (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay).

Em suma, adicionou-se 10  $\mu$ L de soro na microplaca contendo o anticorpo (anti-insulina) para reação deste com o anticorpo imobilizado na placa. Lavou-se os poços e adicionou-se um segundo anticorpo anti-insulina ligado a uma peroxidase, permitindo a reação do complexo anticorpo/insulina. A placa foi lavada novamente e adicionou-se o substrato 3,3',5,5'tetrametilbenzidina (TMB) para emissão de cor proporcional à concentração de insulina e realizou-se a leitura do comprimento de onda emitido em 450 nm.

A concentração de insulina foi determinada a partir da equação da reta obtida a partir das diferentes diluições do padrão de insulina (10,000; 3,333; 1,111; 370,4 e 123,5 pg/mL).

#### **4.5.3 Frutosamina**

As concentrações de frutosamina foram avaliadas em soro utilizando kit comercial empresa LABTEST® (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando método colorimétrico.

O método parte do princípio que a glicose se liga aos grupamentos amino das proteínas formando uma base de aldimina, que após um rearranjo molecular, transforma-se em uma cetoamina estável denominada, a frutosamina. Em pH alcalino a frutosamina é convertida à forma enólica, que reduz o azul de nitrotetrazólio a um “formazan púrpura”. A medida da diferença de absorvância, após incubação aos 10 e 15 minutos, é proporcional à concentração de frutosamina na amostra.

#### **4.5.4 Teste de tolerância oral a glicose e Teste de resposta insulínica**

Para avaliação da presença ou não de resistência insulínica nos animais submetidos a dieta hiperlipídica foram realizados os testes de tolerância oral à glicose (TTOG) e teste de resposta insulínica (TRI).

Para o TTOG, foi dado por gavagem 1 ml de solução contendo 2,5g de glicose por quilograma do animal e então foram aferidas as concentrações de glicose nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos.

Para o TRI, foi aplicado por via intravenosa, 0,5 UI de insulina por quilograma do animal. Então foram aferidas as concentrações de glicose nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos.

#### 4.5.5 Índice HOMA

A partir das concentrações de glicose e insulina foi calculado o índice HOMA para verificar a sensibilidade à insulina (MATTHEWS *et al.*, 1985) de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{IJ} \times \text{GJ}}{22,5}$$

Onde:

IJ: insulinemia em jejum (um/L)

GJ: glicemia em jejum (mmol/L)

#### 4.6 Colesterol Total, Colesterol HDL e Triglicérides

Para a avaliação da presença ou não de hipercolesterolemia e/ou hipertrigliceridemia nos animais submetidos a dieta hiperlipídica foi avaliado as concentrações de colesterol total, da fração HDL-colesterol e triglicérides através de kits comerciais da empresa LABTEST® (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando método colorimétrico.

O método para dosagem de colesterol total baseia-se no princípio de que os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Dessa forma, na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina que tem absorvidade máxima em 500 nm.

O método usado para dosagem de colesterol HDL é feito baseado nas seguintes fases: primeiramente um surfactante específico presente no reagente 1 solubiliza os quilomícrons, as lipoproteínas de alta intensidade (HDL) e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). O colesterol solubilizado é consumido pela ação das enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase. Na segunda etapa, um surfactante presente no reagente 2 solubiliza o colesterol da LDL, que é hidrolisado pela colesterol esterase a colesterol livre de ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Em seguida, ocorre uma reação de acoplamento entre o peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e disulfobutilmetatoluidina sódica (DSBmT), catalisada pela peroxidase, produzindo uma

quinoneimina com absorvância máxíma em 546 nm.

A metodologia usada para dosar as concentrações de triglicérides é feita pela hidrólise dos triglicérides a partir da lipoproteína lipase, gerando glicerol, que é convertido, pela ação da glicerolquinase, em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença de glicerol fosfato oxidase. Em seguida, ocorre uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina com absorvância máxíma em 505 nm.

## **4.7 Enzimas antioxidantes**

### **4.7.1 Atividade da Catalase (CAT)**

A atividade da enzima catalase foi determinada seguindo os princípios de Aebi, onde a atividade dessa enzima é avaliada pela sua capacidade em clivar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (AEBI, 1984).

Para isso, foram homogeneizados 100 mg de tecido hepático e cardíaco em 1 mL de tampão fosfato 0,1 M e pH=7,2. O homogenato foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para análise.

As amostras dos animais experimentais foram diluídas 50x e então, 10µl da amostra diluída foram transferidos para um novo tubo de polipropileno. Foram adicionados 990 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para início da reação e então foi realizada leitura das absorvâncias a cada 30 segundos até 120 segundos a 240 nm em espectrofotômetro. O tampão fosfato 0,1M pH 7,2 foi utilizado como branco.

A atividade desta enzima é representada em unidade (U) por mL de amostra, considerando que uma unidade de catalase é equivalente à hidrólise de 1 mmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/minuto (AEBI, 1984). A absorvância utilizada para cálculo foi obtida pelo delta da média da absorvância final menos a inicial e o cálculo da atividade foi feito segundo a Lei de Lambert-Beer que estabelece uma relação entre a absorvância de uma solução e a sua concentração quando atravessada por uma radiação luminosa em raios paralelos (SWINEHART, 1962). Para o cálculo foi necessário dosar a quantidade de proteínas totais das amostras, conforme metodologia mostrada a seguir. Posteriormente, as fórmulas utilizadas foram:

$$\Delta A = \frac{\text{Absorbância final} - \text{absorbância inicial}}{2}$$

$$\text{Catalase (U/mg)} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{1}{\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2}} \times \frac{VT}{VA} \times 10^3 \times \text{Fator de diluição}$$

Sendo:

$\Delta A$  = Absorbância inicial – Absorbância final/2

$\Delta t$  = 2 minutos

$\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2}$  (coeficiente de extinção molar do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240 nm) = 40 L.mmol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

VT = Volume total de reação

VA = Volume de amostra

10<sup>3</sup> = Conversão de mmol para  $\mu\text{mol}$  (de acordo com a definição de atividade enzimática)

#### 4.7.2 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Para análise da atividade da enzima SOD, baseou-se no princípio de que essa enzima consome o  $\text{O}^{2-}$  (oxida) por competição pela auto-oxidação do pirogalol, reduzindo o MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2H)-2,5-difeniltetrazolium]) a cristais de formazana, responsáveis pela geração de cor proporcional à reação. Com isso, a atividade da enzima SOD é avaliada indiretamente em unidades relativas onde uma unidade de SOD é a quantidade necessária para inibir 50% da redução do MTT (MARKLUND, 1974).

Em suma, 100 mg de tecido hepático e cardíaco foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato 0,1M e pH=7,2. O homogenato foi centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado foi utilizado para análise.

Foi utilizada placa de 96 poços onde foi colado 30 $\mu\text{L}$  da amostra (diluída 20x). Foi adicionado 99 $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,1M, 6  $\mu\text{L}$  de MTT e 15  $\mu\text{L}$  de pirogalol às amostras experimentais. Nos poços do branco e padrão foram adicionados 144 $\mu\text{L}$  e 129  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,1M, respectivamente, e, posteriormente, 6  $\mu\text{L}$  de MTT e 15  $\mu\text{L}$  de pirogalol.

A placa foi incubada por 5 minutos a 37°C e então foi adicionado 150 $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) para parar as reações. Foi realizada leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 570 nm e a atividade da enzima foi expressa em U/mL de

amostra.

Para o cálculo foi necessário dosar a quantidade de proteínas totais das amostras, conforme metodologia mostrada, então, para obtenção do valor final foi feito o seguinte cálculo:

$$\text{SOD (U/mL)} = [ \frac{(\text{AA}-\text{AB})}{\text{AP}} \times \text{Fator de diluição} ] / \text{PT}$$

Onde:

AA – absorvância da amostra

AB – Absorvância do branco

AP – Absorvância do padrão

PT – proteínas totais da amostra expresso em mg/mL

#### **4.7.3 Proteínas totais**

Para determinação da concentração de proteínas totais das amostras experimentais, foi realizada análise de acordo com o método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). O método foi realizado nos homogenatos utilizados para dosagem da atividade da SOD e CAT conforme descrito anteriormente.

Este método utiliza 3 reagentes: reagente A, composto por se 0,25g de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) e 0,5g de citrato de sódio em 100 ml de água destilada; reagente B, composto por 5g de carbonato de sódio e 1g de hidróxido de sódio em 250ml de água destilada; reagente C composto por: 1 mL do reagente A em 50 mL do reagente B e reagente D, composto por: 1 mL de Folin Ciocalteau em 1 ml de água destilada.

Em suma, foram adicionados 100µL de amostra em tubos de polipropileno juntamente com 1 mL de reagente C, que foi adicionado também aos tubos correspondentes ao branco e padrões da dosagem. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos e, posteriormente, foram adicionados 100µL do reagente D. Foi feita nova incubação em temperatura ambiente por 30 minutos no escuro. Foi então realizada leitura das absorvâncias em espectrofotômetro a 660 nm e o cálculo foi feito a partir da equação da reta gerada pelo padrão albumina a 2 mg/mL e suas diluições.

#### 4.8 Análises histológicas

Foi realizada análise histológica do tecido adiposo abdominal, fígado (lóbulo esquerdo) e coração (ventrículo esquerdo). Para isso, os tecidos foram retirados do formol tamponado 4% e processados em uma série decrescente de álcoois para completa desidratação e embebidos em parafina para fixação. Os tecidos emblocados em parafinas foram seccionados em micrótomo semi-automático em lâminas de aproximadamente 4  $\mu\text{m}$  e, para a visualização da histoarquitetura do tecido, as lâminas foram coradas pela técnica de Hematoxilina & Eosina (HE) e PicroSirius Red (PS). As fotomicrografias foram obtidas por meio de um microscópio óptico Leica acoplado a câmera digital DM5000, utilizando o software de análises Leica Application Suite®.

A partir das imagens obtidas foram analisados no tecido hepático corado com HE o número total de hepatócitos, hepatócitos binucleados e o grau de macro e microesteatose hepática no aumento microscópico de 100 vezes (KLEINER, 2005) e no tecido hepático corado com PS foi analisado o grau de deposição de colágeno tipos I e III detectados sob luz polarizada no aumento microscópico de 30 vezes (COLEMAN, 2011). No tecido adiposo corado com HE foi avaliada a área e número de adipócitos e a razão entre a quantidade/área de adipócitos no aumento microscópico de 100 vezes e neste mesmo tecido corado com PS, analisamos o grau de deposição de colágeno tipos I e III também sob luz polarizada no aumento microscópico de 30 vezes (COLEMAN, 2011). A mensuração da espessura dos cardiomiócitos em tecidos corados com HE foi feita no aumento microscópico de 100 vezes. As análises morfométricas foram realizadas pelo software ImageJ®, versão 1.32j. As análises foram feitas a partir dos resultados obtidos em 30 campos capturados por fotomicroscopia, de cada animal.

O grau de esteatose foi definido segundo KLEINER *et al* (2005) através de uma análise semi quantitativa onde foi feito o gradeamento em 10 partes de 30 fotos por animal, calculou-se a média do percentual de grade contendo macro ou microesteatose e a partir deste percentual foi gerado um score onde 0% = grau 0; < 33% = grau 1 de esteatose; 33-66% = grau 2 de esteatose e > 66% = grau 3 de esteatose.

A análise de deposição de colágeno tipo I e III foram feitas por gradeamento em 10 partes de 10 fotos por animal, analisando a presença ou ausência da coloração amarelo ou vermelho alaranjado (colágeno tipo I) e verde ou amarelo esverdeado (colágeno tipo III) (HALBERG, 2009; SUN, 2013; GUPTA, 2017).

#### 4.9 Mediadores inflamatórios

Para análise das concentrações das citocinas inflamatórias IL-6 e TNF em tecidos cardíaco e soro e MCP-1 (CCL-2) e RANTES (CCL-5) em tecido adiposo foram utilizados kits comerciais *Rat-IL-6* e *Rat TNF- $\alpha$* , *Rat-RANTES* e *Rat-MCP-1* ELISA kits (Peprotech, Rocky Hill, NJ), seguindo as recomendações do fabricante.

Em suma, 30 mg de tecido cardíaco e 20 mg de tecido adiposo foram homogeneizados em 500  $\mu$ L e 250  $\mu$ L de PBS 1x, respectivamente, e o homogenato foi centrifugado a 3.500 RPM por 10 minutos a 4°C; o sobrenadante coletado e utilizado na dosagem. Para as análises no soro foram utilizados 100  $\mu$ L. A dosagem foi realizada em placas de 96 poços, onde foi realizada sensibilização com 100  $\mu$ L do anticorpo de captura diluído para cada citocina, na concentração de 1  $\mu$ g/ml, e incubadas *overnight* a 25°C. Após a incubação, as placas foram lavadas (0,05% de Tween-20, PBS) e bloqueadas com 300  $\mu$ L de BSA 1% em incubadas por 1 hora a 25°C. Em seguida, as placas foram lavadas novamente e foram adicionados 100  $\mu$ L das amostras (sobrenadantes e soro) e das citocinas padrões (a concentração inicial da curva foi de 5ng/mL para IL-6, 3 ng/mL para TNF e MCP-1 e 2 ng/mL para RANTES). Após incubação por 2 horas a 25°C e nova lavagem, adicionou-se 100  $\mu$ L do anticorpo de detecção (0,25  $\mu$ g/mL). Posteriormente, foram adicionados 100  $\mu$ L de avidina-HRP conjugado e as placas foram novamente incubadas a 25°C por 30 minutos para reação que emite coloração proporcional à conjugação da amostra com o anticorpo de detecção. As leituras das absorbâncias foram realizadas em leitor espectrofotômetro a 405 nm com correção do comprimento de onda estabelecido em 630 nm.

#### 4.10 Extração e dosagem de lipídeo no tecido hepático e adiposo

Foi realizada extração do lipídeo hepático e no tecido adiposo de acordo com o método de FOLCH (FOLCH *et al.*, 1957). Em suma, foram homogeneizados 200 mg de tecido hepático e 100 mg de tecido adiposo em 4 ml de solução clorofórmio-metanol (2:1 vol/vol). Em seguida, foram adicionados 400  $\mu$ L de metanol, agitado em vórtex por 3 minutos e centrifugado a 3.000 rpm a 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo previamente pesado e limpo com éter de petróleo e, em seguida, foram adicionados 800  $\mu$ L de clorofórmio e 320  $\mu$ L de solução de NaCl 0,73%. As amostras

foram agitadas por 1 min e centrifugadas novamente a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 ml da solução de Folch (composta por metanol, clorofórmio e água). O solvente restante foi evaporado em estufa semiaberta a 50°C para secagem total do precipitado. Após a evaporação total, os tubos foram pesados novamente para quantificação do lipídeo extraído pela diferença entre os pesos.

O lipídeo extraído do fígado e tecido adiposo foram solubilizados em 100 µL e 200 µL de álcool isopropílico, respectivamente, e dessa solução foi determinada a concentração de colesterol total e triglicérides utilizando-se kits comerciais LABTEST® (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) seguindo os protocolos descritos anteriormente.

#### **4.11 Análise da composição de ácidos graxos**

Foi realizada a análise da composição de ácidos graxos presentes nas rações, nos compostos utilizados nos tratamentos e nos tecidos hepático e adiposo. Para isso, utilizamos 5mg de cada ração (em triplicata), 50 µL de cada composto utilizado para tratamento (em triplicata) e 20mg de tecido hepático e adiposo, seguindo a extração de gordura em etapas com clorofórmio-metanol (2:1 v/v), reagente de esterificação, isoctano e NaCl saturado. Para caracterização dos AG foi utilizado cromatógrafo a gás (GC-6850 Agilent Technologies, Santa Clara, CA), onde os ésteres metílicos foram separados por uma coluna capilar DB-23, gerando picos diferentes de acordo com a cadeia carbônica presente.

#### **4.12 Análise da expressão gênica quantitativa por PCR em tempo real**

Para análise da expressão gênica o RNA total foi isolado em homogenato contendo 10mg de fígado e 1 mL de Trizol (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) em uma sequência de extração, precipitação e lavagem composta por clorofórmio, isopropanol e etanol 75% para posterior quantificação em Espectrofotômetro de Microplacas Epoch™ (BioTek 2010/18095-0), considerando aceitáveis razões entre as absorvâncias 260/280 superiores a 1.8 (Becker, Hammerle-Fickinger, Riedmaier, & Pfaffl, 2010). Posteriormente, foi utilizado 1 µg de RNA para a síntese de cDNA utilizando o Kit High-Capacity Transcrição Reversa (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante.

A PCR em tempo real foi realizada por RT-qPCR utilizando o Kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) com primers específicos dos oligonucleotídeos Forward e Reverse para detectar: SREBP1 [NM\_001276707.1; F: 5' 'GTGAGTGGAGGGACCATCCTG 3' e R: 5' CCAGCTGCTAGTCGGTGGATC 3']; ACC [NM\_022193; F: 5' TGTAGAAACCCGAACCGTGG 3' e R: 5' CTGGAAACCAAACCTTGGCC 3']; FAS [NM\_017332.1; F: 5' 'GCTTGGTGAACCTGTCTCCGA 3' e R: 5' 'GTGAGATGTGCTGCTGAGGT 3']; PPAR- $\alpha$  [NM\_013196.2; F:5'CATCGAGTGTCTCGAATATGTGG3' e R:5'GCAGTACTGGCATTGTCC3']; CPT-1 [NM\_031559.2; F:5'GCACCAAGATCTGGATGGCTATGG3' e R:5'TACCTGCTCACAGTATCTTTGAC3']; ACOX-1 [NM\_017340.2; F:5'CCATGGTTTTTGTGAGGTCCTT3' e R: 5'GTTCGCTTTGCTTGATTTCAGA3'].. A expressão gênica foi normalizada pelo primer GAPDH (NM\_017008; F: 5' TGAAGCTCATTTCCTGGTATGAC 3' e R: 5' CTCTTGCTCTCAGTATCCTTGCT 3'), expresso de forma semelhante em todos os grupos experimentais e todas as amostras foram pipetadas em triplicata técnica. A análise quantitativa da PCR em tempo real foi feita utilizando o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems).

#### 4.13 Análises estatísticas

A normalidade dos dados foi analisada utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para os dados que apresentaram distribuição normal foi realizado a análise de variância univariada Anova *one-way*, seguido do pós-teste de Bonferroni para comparação entre três ou mais médias. Para comparação entre duas médias foi utilizado o teste T de *Student*. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Para análise dos dados não paramétricos foi utilizado o Teste T não paramétrico ou Teste de *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de Dunn para comparação das medianas e os resultados foram expressos como mediana  $\pm$  intervalo interquartil.

A curva de sobrevida foi realizada pelo método de Kaplan-Meier e analisada pelo teste não paramétrico de log-rank.

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 6.0 e diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Composição centesimal e de ácidos graxos das rações e dos tratamentos

A análise da composição centesimal das rações utilizadas confirmou que a ração hiperlipídica possui maior teor e densidade calórica de lipídios e menor teor de carboidratos em comparação com a ração padrão, mantendo proporção aproximada de proteínas e cinzas.

A análise do perfil de AG confirmou que os compostos utilizados nos tratamentos possuem maior composição de AG ômega 3 e que a dieta hiperlipídica é composta, majoritariamente por AG saturados, com menor teor de ômega 3.

**Tabela 5.** Composição centesimal e % de ácidos graxos nas rações e compostos utilizados para tratamento.

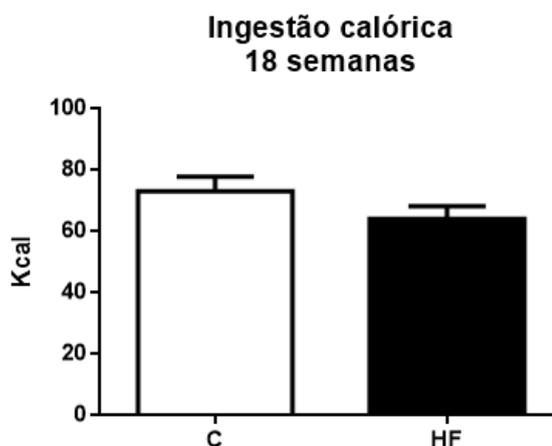
Composição centesimal/ % AG	Dieta controle	Dieta hiperlipídica	Óleo de linhaça	3:1 EPA/DHA	1:3 EPA/DHA
Carboidrato	74.65	50.35			
Proteína	21.46	26.43			
Lipídio	3.87	23.20			
Total de AG saturados	19.73	37.90	10.77	0.32	0.42
Total de MUFA	27.25	28.77	22.39	0.41	0.95
Total de PUFA	53.02	33.33	66.84	99.27	98.63
Total de AG $\omega$ -3	3.43	1.86	50.91	94.77	96.24
Total de AG $\omega$ -6	49.58	33.13	15.93	4.48	2.38
Razão entre AG $\omega$ -6/ $\omega$ -3	14.43	16.53	0.31	0.04	0.02
Total de AG C18:3 (ALA)	3.43	1.47	50.91	17.89	16.21
Total de AG C20:5 (EPA)	0	0	0	57.44	21.86
Total de AG C22:6 (DHA)	0	0	0	19.44	58.17

Os dados foram expressos como média das triplicatas. Onde AG: ácidos graxos; MUFA: ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: ácidos graxos poli-insaturados; ALA: ácido alfa linolênico; EPA: ácido eicosapentaenóico; DHA: ácido docosapentaenóico; g: gramas.

## 5.2 Resultados da 1ª eutanásia – 18 semanas (Avaliação do impacto da dieta hiperlipídica no estabelecimento de alterações metabólicas)

### 5.2.1 Ingestão alimentar

**Figura 4.** Média da ingestão calórica dos grupos experimentais por 18 semanas.



C: grupo controle; HF: grupo dieta hiperlipídica; Kcal: quilocalorias. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média e foram analisados por Teste T. Letras diferentes indicam diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

De acordo com o gráfico acima, os animais do grupo controle e alimentados com a dieta hiperlipídica não apresentaram diferença quanto às calorias médias ingeridas de cada ração durante 18 semanas.

### 5.2.2 Parâmetros antropométricos e bioquímicos:

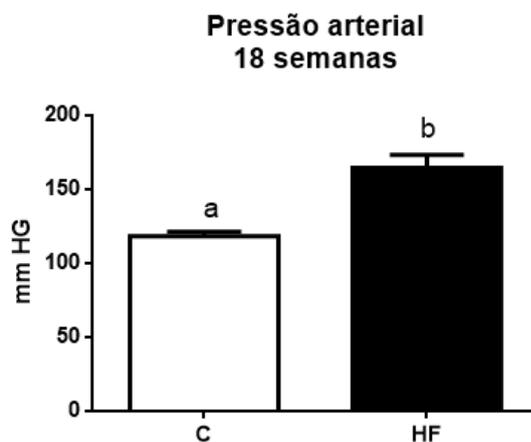
Dentre os parâmetros antropométricos e bioquímicos avaliados após 18 semanas, os animais não se diferiram quanto ao índice de Lee. Os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram maior glicemia ( $p=0,0071$ ), menores concentrações de colesterol total ( $p=0,0074$ ) e colesterol HDL ( $p=0,0194$ ) (Tabela 8), aumento da pressão arterial ( $p=0,0003$ ) (Figura 6) e alterações na resposta insulínica, visto que os animais do grupo HF precisaram de mais tempo para a metabolização da glicose, tanto no teste de tolerância oral a glicose ( $p=0,0363$ ) quanto no teste de resposta insulínica ( $p=0,0114$ ) (Figura 7).

**Tabela 6.** Parâmetros antropométricos e bioquímicos dos grupos experimentais após 18 semanas.

	C	HF
<b>Parâmetros antropométricos e bioquímicos</b>		
<b>Índice de Lee</b>	284,0 ± 3,51	283,2 ± 9,37
<b>Glicose (mg/dL)</b>	102,4 ± 4,49 <sup>a</sup>	122,2 ± 3,15 <sup>b</sup>
<b>Colesterol Total (mg/dL)</b>	112,6 ± 6,61 <sup>a</sup>	74,24 ± 8,51 <sup>b</sup>
<b>Colesterol HDL (mg/dL)</b>	60,53 ± 7,21 <sup>a</sup>	35,07 ± 5,46 <sup>b</sup>
<b>Triglicérides (mg/dL)</b>	45,45 ± 6,76	31,17 ± 4,52
<b>Frutosamina</b>	182,8 ± 25,66	212,2 ± 14,62

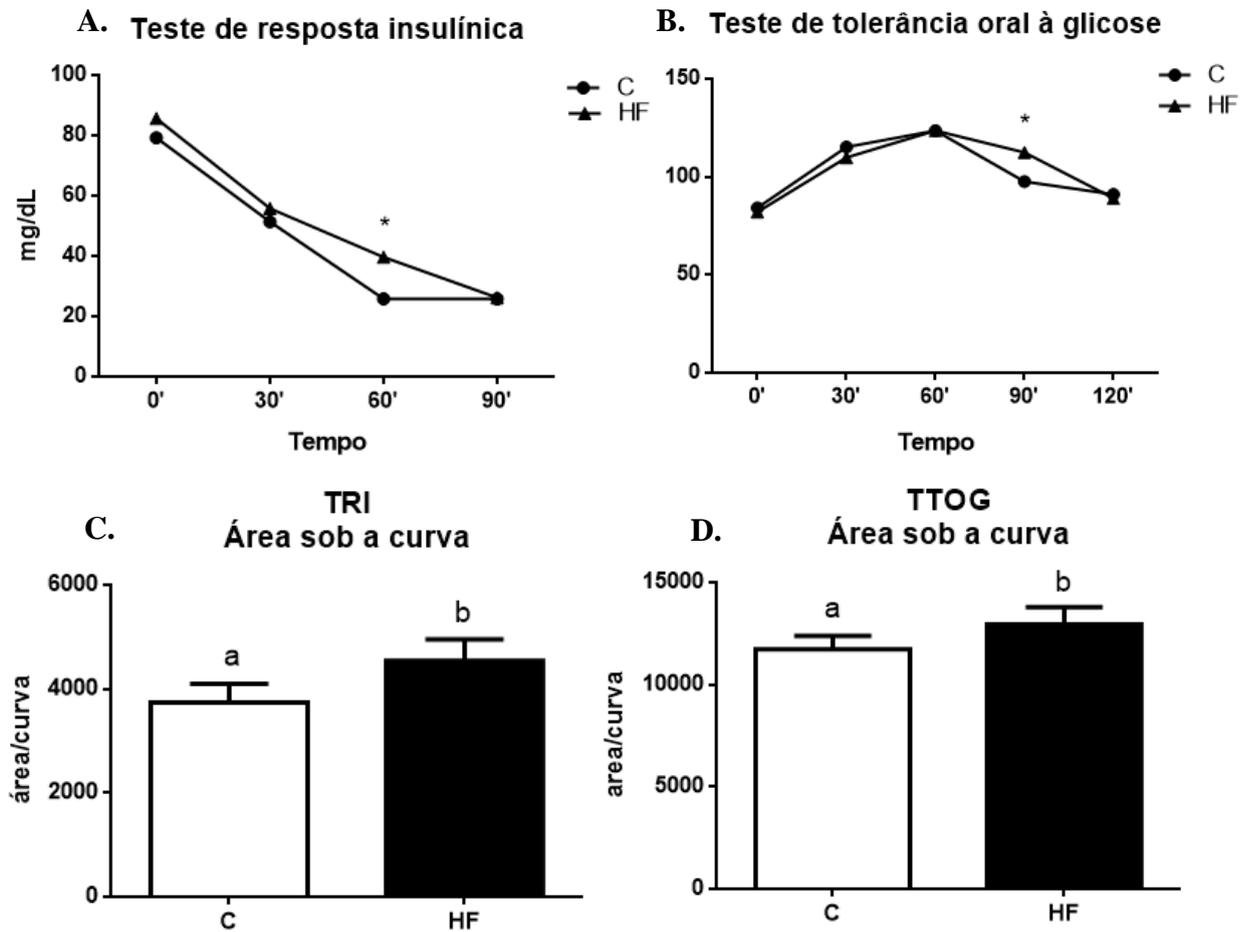
C: grupo controle e HF: grupo dieta hiperlipídica. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão da média e foram analisados por Teste T. Letras diferentes indicam diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

**Figura 5.** Pressão arterial sistólica dos grupos experimentais após 18 semanas.



Os dados foram expressos em média ± desvio padrão da média e foram analisados por Teste T. Letras diferentes indicam diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

**Figura 6.** Teste de resposta insulínica e Teste de tolerância oral à glicose dos grupos experimentais após 18 semanas.

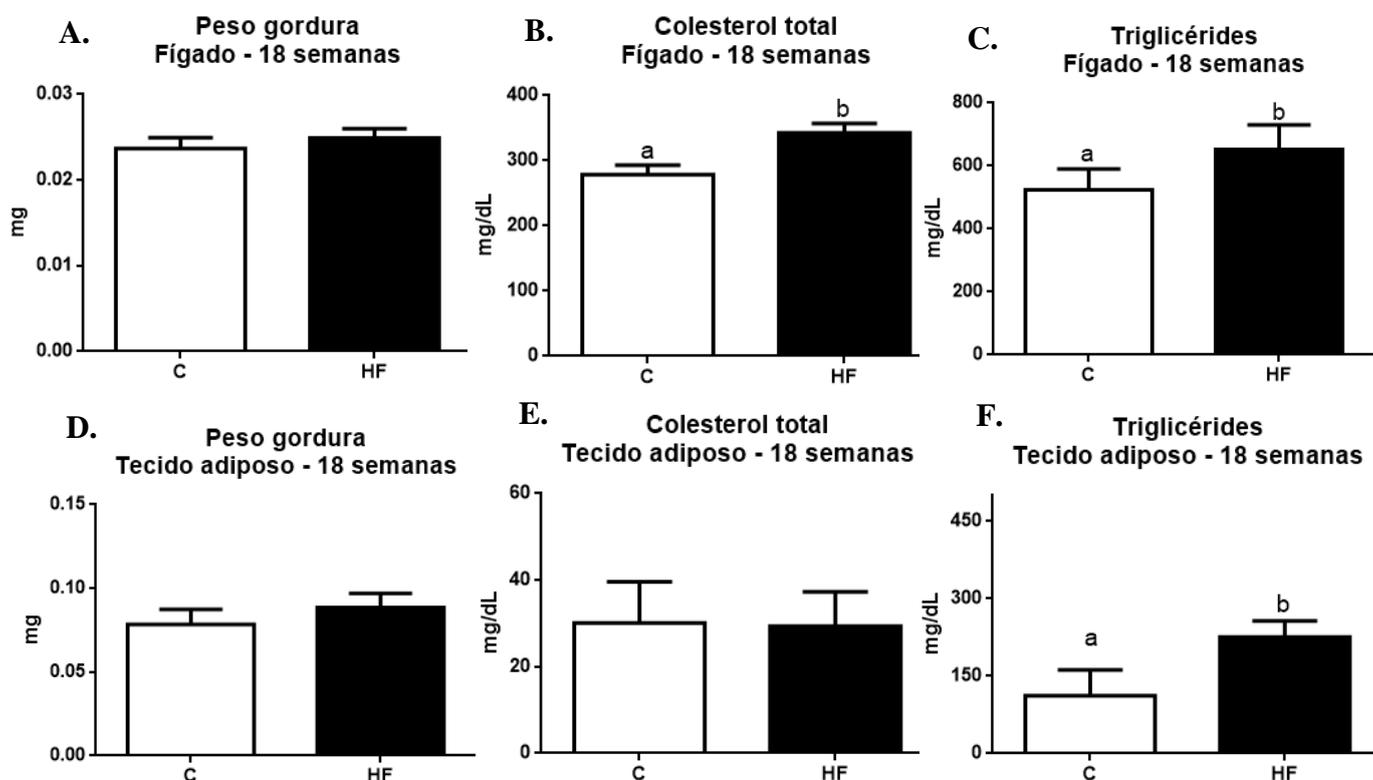


(A) Curva do Teste de resposta insulínica nos tempos 0', 30', 60' e 90'; (B) Curva do Teste de tolerância oral à glicose nos tempos 0', 30', 60', 90' e 120'; (C) Área sob a curva do TRI; (D) Área sob a curva do TTOG. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média e foram analisados pelo Teste T. Letras diferentes indicam diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

### 5.2.3 Perfil lipídico no fígado e tecido adiposo

Para maior compreensão do efeito do perfil lipídico hepático e do tecido adiposo após o consumo crônico da dieta hiperlipídica avaliamos a quantidade e composição das frações lipídicas no fígado e tecido adiposo. Conforme mostrado na figura a seguir, apesar de não ter alterado o peso das gorduras em nenhum órgão, o grupo HF apresentou maiores concentrações de colesterol total hepático ( $p < 0,0001$ ) e triglicérides tanto no fígado ( $p = 0,0163$ ) quanto no tecido adiposo ( $p = 0,0043$ ).

**Figura 7.** Efeito da dieta hiperlipídica no perfil lipídico hepático e do tecido adiposo abdominal após 18 semanas.



(A) Peso da gordura hepática total; (B) concentração de colesterol total hepático; (C) concentração de triglicérides hepático; (D) Peso da gordura do tecido adiposo total; (E) concentração de colesterol total no tecido adiposo; (F) concentração de triglicérides no tecido adiposo. Onde C: grupo controle; HF: grupo dieta hiperlipídica; mg: miligramas e dl: decilitro. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média e foram analisados por Teste T. Letras diferentes indicam diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

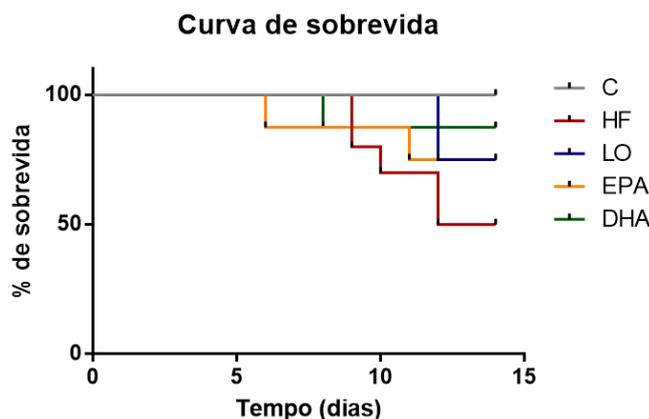
### 5.3 Resultados da 2<sup>a</sup> eutanásia – 20 semanas (Efeito dos tratamentos após consumo crônico de dieta hiperlipídica)

Após a confirmação da presença de alterações metabólicas em 18 semanas de consumo de dieta hiperlipídica foi iniciado o 2<sup>o</sup> estágio do experimento para avaliar o efeito dos tratamentos pela suplementação com óleo de linhaça, EPA e DHA, em diferentes proporções, nos animais alimentados com dieta hiperlipídica.

### 5.3.1 Sobrevida

Durante o período de tratamento, a sobrevida no grupo HF foi de 50%, no LO: 75%, EPA: 75% e DHA: 87,5%, entretanto os tratamentos não afetaram significativamente a taxa de sobrevida ( $p=0,1605$ ).

**Figura 8.** Curva de sobrevida dos grupos experimentais durante o período de tratamento

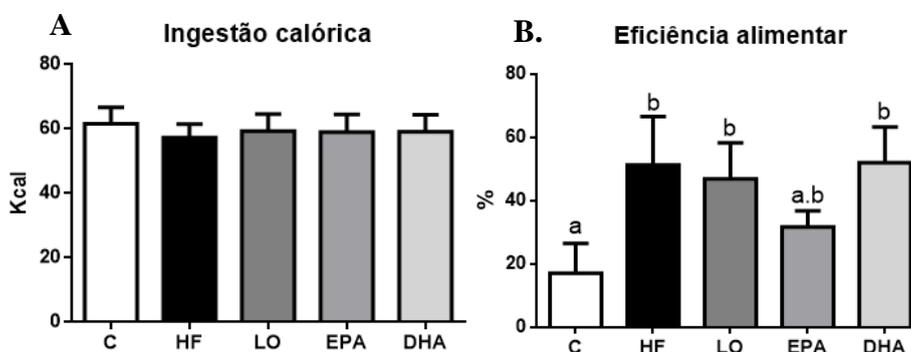


C: grupo controle; HF: grupo dieta hiperlipídica; LO: grupo óleo de linhaça; EPA: grupo EPA; DHA: grupo DHA.

### 5.3.2 Ingestão e eficiência alimentar

Os animais experimentais nos grupos HF, LO, EPA e DHA não apresentaram diferença na ingestão calórica, entretanto os grupos experimentais apresentaram eficácia alimentar superior ao grupo controle ( $p<0,0001$ ), conforme mostra o gráfico a seguir.

**Figura 9.** Média da ingestão calórica e eficiência alimentar durante o período de tratamento



(A) Ingestão calórica e (B) Eficiência alimentar. Onde C: grupo controle; HF: grupo dieta hiperlipídica; LO: grupo óleo de linhaça; EPA: grupo EPA; DHA: grupo DHA. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado  $p<0,05$ .

### 5.3.3 Parâmetros antropométricos e bioquímicos

Nenhum tratamento afetou a composição corporal dos animais, avaliada pelo índice de Lee. Entretanto, obtivemos menor peso relativo do fígado dos animais tratados com DHA em relação ao HF ( $p=0,0067$ ). Ao avaliarmos o peso relativo do coração, obtivemos que o grupo HF apresentou maior peso ( $p=0,0292$ ) e o tratamento com DHA menor peso deste órgão ( $p=0,0292$ ). Os tratamentos com EPA e DHA apresentaram menor peso relativo do tecido adiposo abdominal ( $p=0,0115$ ). Dentre os parâmetros bioquímicos avaliados, o grupo HF apresentou maior glicemia que o controle ( $p=0,0008$ ) e os animais tratados com EPA apresentaram menor glicemia do que os animais sem tratamento ( $p=0,0008$ ). As concentrações de insulina e o índice HOMA IR não apresentaram diferença com ou sem tratamento. Sobre o perfil lipídico sérico, a concentração de colesterol total sérico foi menor nos grupos experimentais com ou sem tratamento em relação ao grupo controle ( $p<0,0001$ ). Sobre a concentração de triglicérides sérico foi obtido que o grupo HF apresentou concentração menor do que o grupo controle ( $p=0,0036$ ) e os tratamentos não alteraram este parâmetro.

Os resultados descritos estão mostrados na tabela a seguir:

**Tabela 7.** Parâmetros antropométricos e bioquímicos dos grupos experimentais.

	C	HF	LO	EPA	DHA
<b>Parâmetros antropométricos</b>					
Índice de Lee	284±9,2	279,9±8,8	287,5±8,8	269,6±9,4	283,6±11,9
Peso relativo fígado (%)	2,9±0,19 <sup>a</sup>	2,8±0,34 <sup>a</sup>	2,6±0,21 <sup>a,b</sup>	2,6±0,19 <sup>a,b</sup>	2,4±0,2 <sup>b</sup>
Peso relativo coração (%)	0,27±0,01 <sup>a</sup>	0,41±0,01 <sup>b</sup>	0,34±0,03 <sup>c</sup>	0,35±0,03 <sup>c</sup>	0,32±0,06 <sup>c</sup>
Peso relativo do tecido adiposo abdominal (%)	0,0108±0,002 <sup>a,b,c</sup>	0,01±0,003 <sup>a,b,c</sup>	0,0171±0,001 <sup>a,b,c</sup>	0,0087±0,001 <sup>b</sup>	0,0186±0,003 <sup>c</sup>
<b>Parâmetros bioquímicos</b>					
Glicose (mg/dL)	105,9±2,3 <sup>a</sup>	159,6±2,8 <sup>b</sup>	132,2±4,5 <sup>b</sup>	68,48±1,5 <sup>c</sup>	123,2±1,7 <sup>a</sup>
Insulina (pmol/L)	25,24±0,62	25,52±0,56	25,41±0,7	25,92±0,3	25,6±0,38
Índice HOMA IR	7,76±1,3	8,13±2,2	8,65±3,1	6,11±2,8	7,69±2
Colesterol total (mg/dL)	103,3±12,2 <sup>a</sup>	60,42±16,7 <sup>b</sup>	45,15±13,8 <sup>b</sup>	39,28±8,6 <sup>b</sup>	39,73±15,7 <sup>b</sup>
Triglicérides (mg/dL)	62,86±17,8 <sup>a</sup>	34,32±19,8 <sup>b</sup>	26,05±14 <sup>b</sup>	43,58±15,6 <sup>a,b</sup>	37,22±14 <sup>a,b</sup>

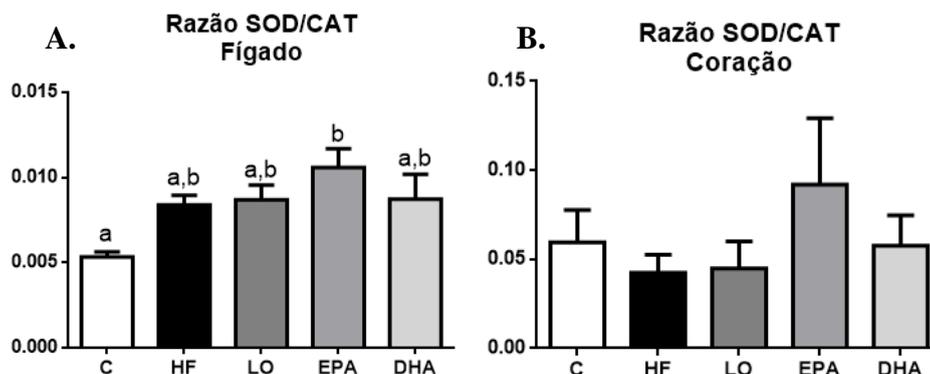
C: grupo controle; HF: grupo dieta hiperlipídica; LO: grupo óleo de linhaça; EPA: grupo EPA; DHA: grupo DHA; g: gramas; mg: miligramas; dL: decilitro. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado  $p<0,05$ .

### 5.3.4 Perfil antioxidante

Foi avaliado o perfil antioxidante hepático e cardíaco pela análise da relação das atividades das enzimas SOD e CAT. Em relação a razão SOD/CAT observamos um aumento

nesta razão no fígado dos animais do grupo EPA em relação ao controle. Entretanto, no tecido cardíaco não observamos nenhuma alteração na atividade das enzimas antioxidantes, conforme mostrado nos gráficos a seguir:

**Figura 10.** Enzimas antioxidantes nos tecidos hepático e cardíaco.



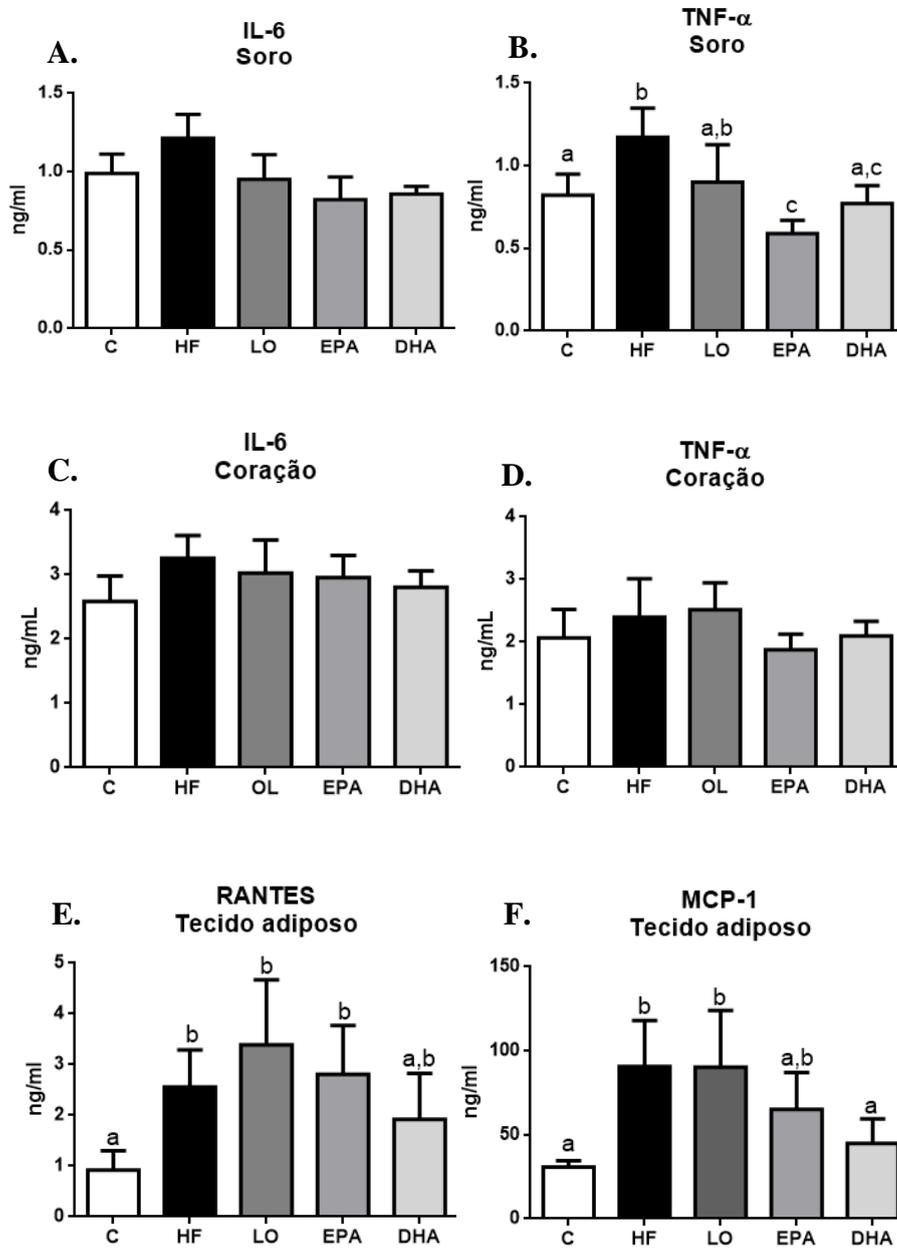
(A) razão entre a atividade das enzimas Superóxido Dismutase e Catalase no fígado e (B) razão entre a atividade das enzimas Superóxido Dismutase e Catalase no coração. Onde C: grupo controle; HF: grupo dieta hiperlipídica; LO: grupo óleo de linhaça; EPA: grupo EPA; DHA: grupo DHA. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado  $p < 0,05$ .

### 5.3.5 Concentração dos mediadores inflamatórios no soro, coração e tecido adiposo

Para avaliação dos parâmetros inflamatórios foi quantificado as citocinas IL-6 e TNF sérica e cardíaca, sendo que os tratamentos não afetaram essas citocinas no tecido cardíaco bem como os níveis de IL-6 sérica, entretanto, as concentrações de TNF no soro apresentaram-se aumentadas no grupo HF ( $p < 0,0001$ ) e os animais tratados com EPA ( $p < 0,0001$ ) e DHA ( $p < 0,0001$ ) apresentaram menores concentrações desta citocina.

No tecido adiposo avaliamos as concentrações das adipocinas MCP-1 (CCL-2) e RANTES (CCL-5), que são responsáveis pela atração de mediadores pró inflamatórios. Observamos que a dieta hiperlipídica aumentou a concentração destas adipocinas ( $p < 0,0001$  e  $p = 0,0003$ , respectivamente) e apenas o grupo DHA apresentou uma menor concentração da MCP-1 neste tecido ( $p < 0,0001$ ). Estes resultados estão demonstrados no painel a seguir:

**Figura 11.** Efeito dos tratamentos nas concentrações de citocinas no soro, coração e tecido adiposo.



(A) concentração de IL-6 no soro; (B) concentração de TNF no soro; (C) concentração de IL-6 no coração; (D) concentração de TNF no coração; (E) concentração de RANTES no tecido adiposo e (F) concentração de MCP-1 no tecido adiposo. Onde C: grupo controle; HF: grupo dieta hiperlipídica; LO: grupo óleo de linhaça; EPA: grupo EPA; DHA: grupo DHA; IL-6: interleucina 6; TNF: fator de necrose tumoral; RANTES: proteína secretada e regulada pela ativação de linfócitos T; MCP-1: proteína quimioatraente de monócitos-1; ng: nanogramas; ml . Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado  $p < 0,05$ .

### 5.3.6 Análises histológicas no tecido hepático

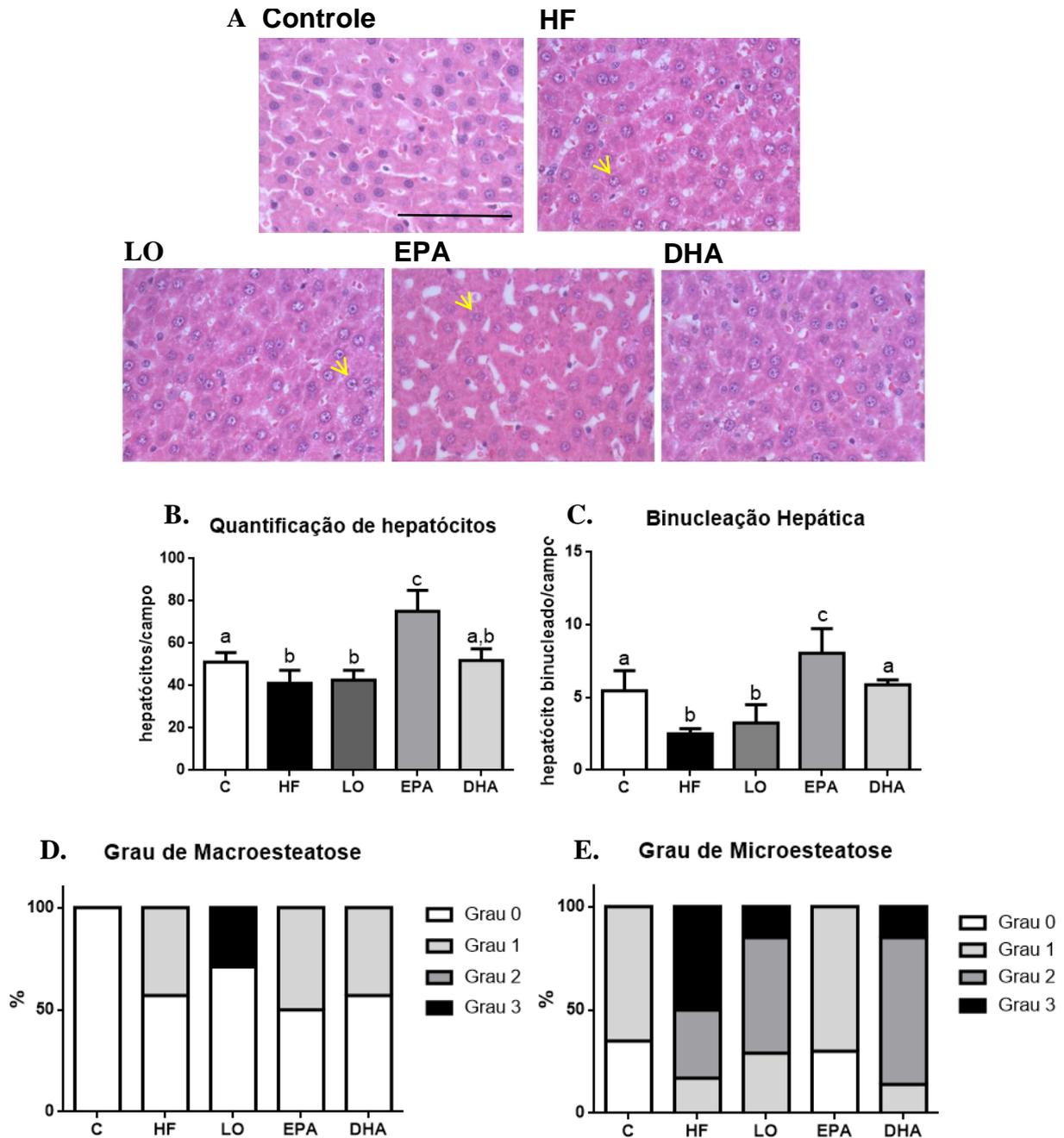
Em relação ao grau de macroesteatose, o grupo HF apresentou 57% dos animais com macroesteatose grau 0 e 43% grau 1, o grupo LO apresentou 71% grau 0 e 29% grau 3, o grupo tratado com EPA apresentou 50% dos animais com grau 0 e 50% grau 1 e o grupo DHA apresentou 57% dos animais com grau 0 e 43% com grau 1. O grupo de animais que receberam a dieta padrão não apresentaram macroesteatose.

Em relação ao grau de microesteatose, os animais do grupo controle apresentaram 35% com grau 0 e 65% com grau 1; HF: 17% grau 1, 33% grau 2 e 50% grau 3; LO: 29% grau 1, 56% grau 2 e 15% grau 3; EPA: 30% grau 0 e 70% grau 1; DHA: 14% grau 1, 71% grau 2 e 15% grau 3 de microesteatose.

Foi quantificado também o número de hepatócitos, sendo observado menor número desta célula nos grupos HF ( $p < 0,0001$ ) e LO ( $p < 0,0001$ ) e os animais tratados com EPA ( $p < 0,0001$ ) apresentaram maior número destas células, conforme mostrado na figura 12. Ao quantificarmos os hepatócitos binucleados, obtivemos que os grupos HF e LO apresentaram menor quantidade destas células ( $p < 0,0001$ ) e os tratamentos com EPA e DHA levaram ao aumento de células binucleadas, tendo o EPA apresentado resultado semelhante ao controle ( $p < 0,0001$ ).

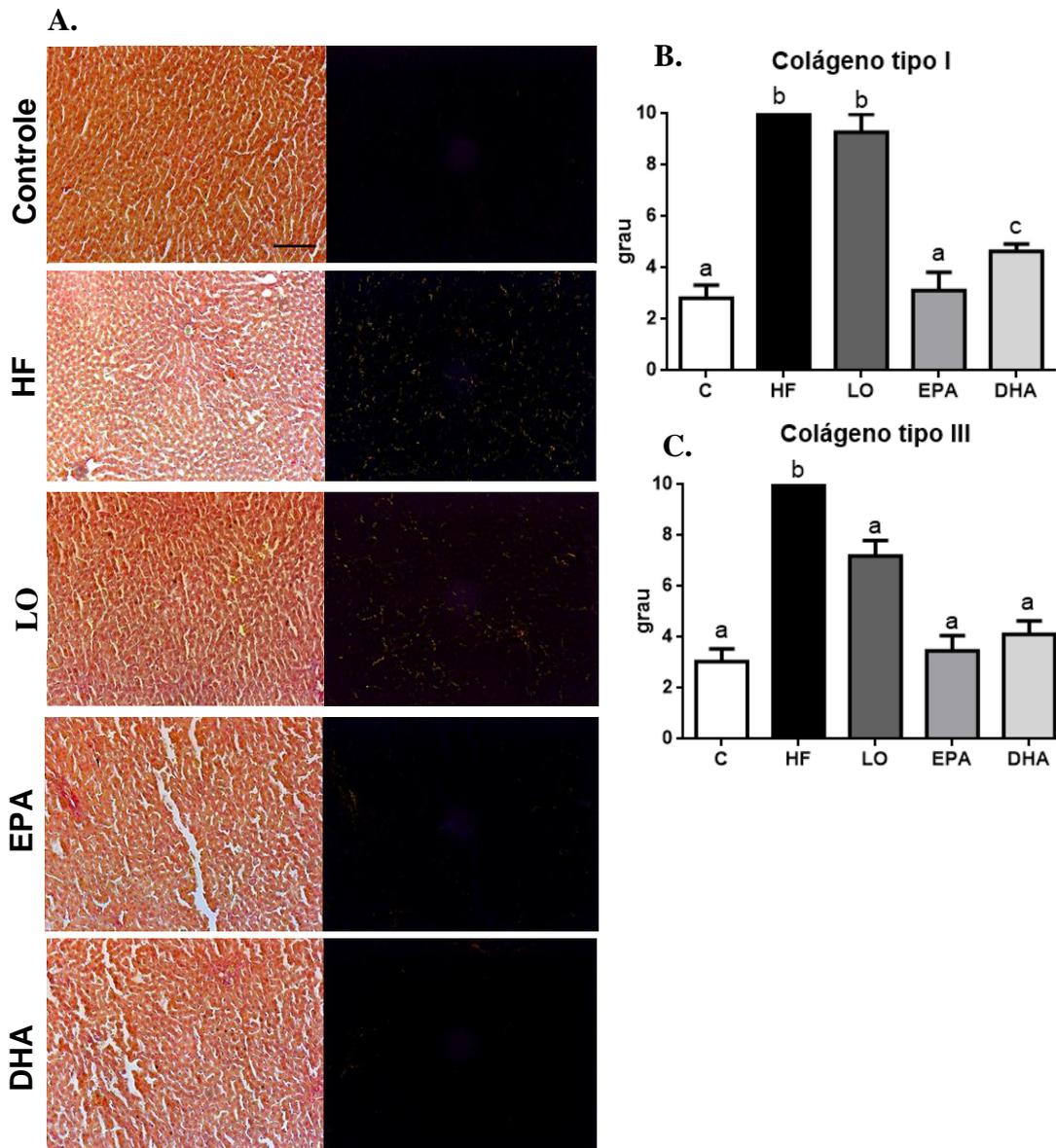
Avaliamos também se houve deposição de colágeno neste tecido e observamos que a dieta hiperlipídica acarretou na deposição tanto de colágeno tipo I quanto tipo III no tecido hepático e os tratamentos com EPA ( $p < 0,0001$ ) e DHA ( $p < 0,0001$ ) reverteram a deposição do colágeno tipo I. Em relação ao colágeno tipo III, todos os tratamentos foram eficazes em reduzir este parâmetro, apresentando resultado próximo ao grupo controle. Estes resultados estão expostos nos painéis a seguir.

**Figura 12.** Efeito dos tratamentos sobre a histoarquitetura e esteatose hepática.



(A) Fotomicroscopia hepática; (B) número de hepatócitos totais; (C) número de hepatócitos binucleados (D) grau de macroesteatose representado pelo % de cada grau entre os grupos; (E) Grau de microesteatose representado pelo % de cada grau entre os grupos. Onde C: grupo controle; HF: grupo dieta hiperlipídica; LO: grupo óleo de linhaça; EPA: grupo EPA; DHA: grupo DHA. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado  $p < 0.05$ .

**Figura 13.** Efeito dos tratamentos sobre a deposição de colágeno hepático.

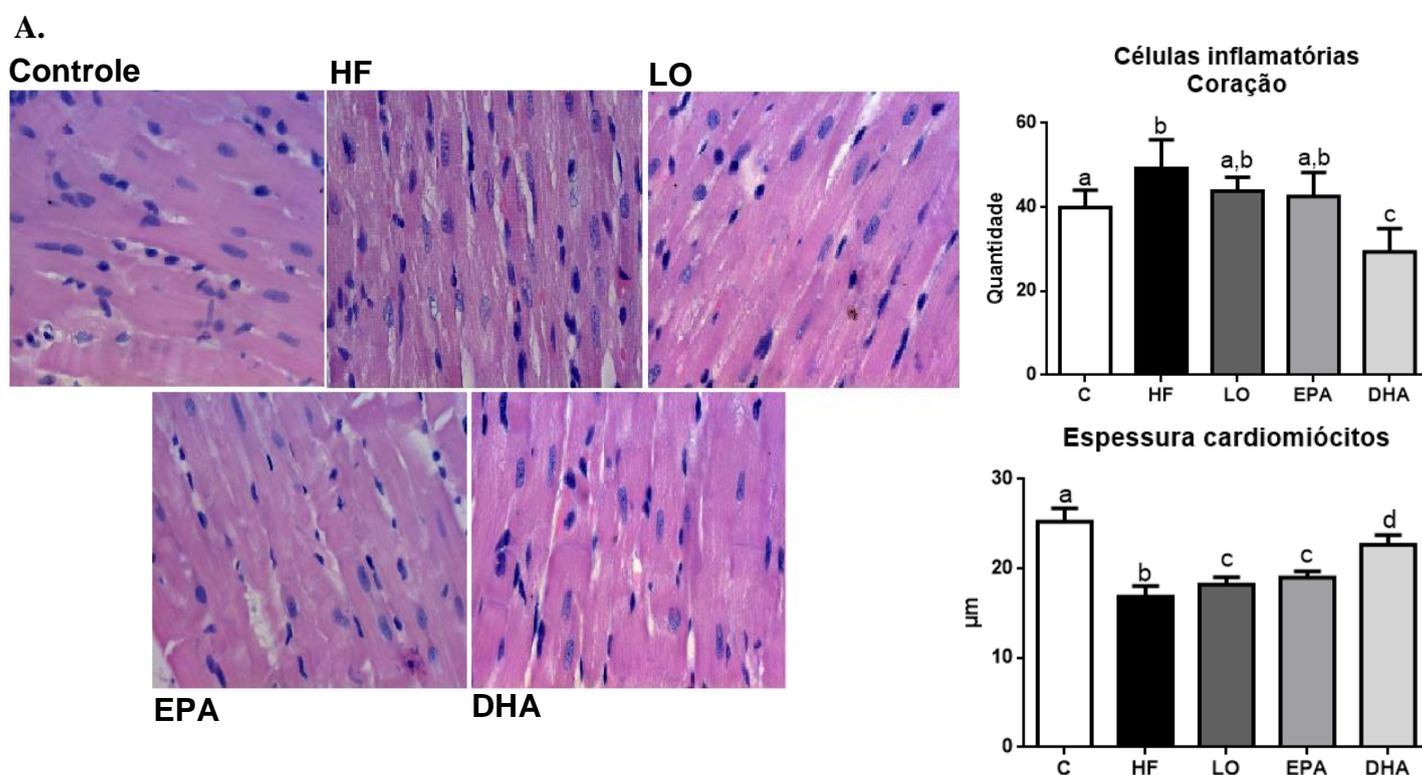


**Figura 13.** Efeito dos tratamentos na histoarquitetura hepática corada com Picro Sirius (A) Fotomicroscopia hepática; (B) Grau da deposição de colágeno tipo I e (C) Grau da deposição de colágeno tipo III. Onde C: grupo controle; HF: grupo dieta hiperlipídica; LO: grupo óleo de linhaça; EPA: grupo EPA; DHA: grupo DHA. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos

### 5.3.7 Análises histológicas no tecido cardíaco

No tecido cardíaco foi avaliado o número de células inflamatórias, onde o grupo HF apresentou maior quantidade ( $p < 0,0001$ ) e o tratamento com DHA foi eficaz em reduzir essas células no coração ( $p < 0,0001$ ). Foi mensurado também a espessura dos cardiomiócitos e os grupos que ingeriram dieta hiperlipídica sem tratamento apresentaram menor espessura destas células ( $p < 0,0001$ ) e os animais tratados com EPA e DHA apresentaram maior espessura destas células ( $p < 0,0001$ ) em comparação ao grupo não tratado, conforme mostra o painel a seguir:

**Figura 14.** Efeito dos tratamentos sobre a histoarquitetura cardíaca e inflamação cardíaca.



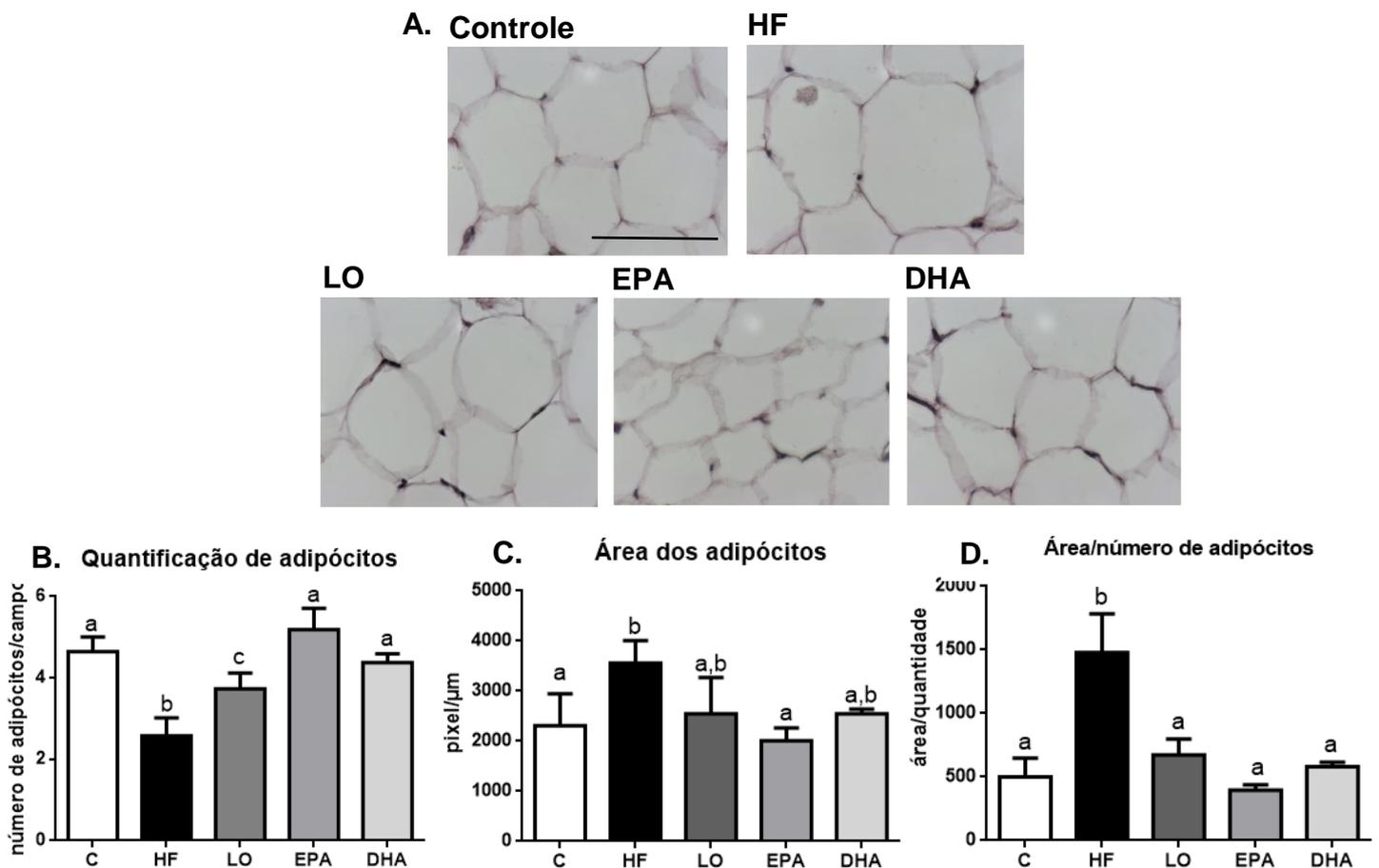
(A) Fotomicroscopia cardíaca; (B) número de células inflamatórias; (C) Espessura média dos cardiomiócitos. Onde C: grupo controle; HF: grupo dieta hiperlipídica; LO: grupo óleo de linhaça; EPA: grupo EPA; DHA: grupo DHA; N: número; um: micrômetro. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado  $p < 0,05$ .

### 5.3.8 Análise histológica do tecido adiposo

Quanto ao tecido adiposo foi avaliado a área dos adipócitos onde o grupo HF apresentou aumento ( $p = 0,003$ ), o que caracteriza hipertrofia deste tecido e o grupo tratado

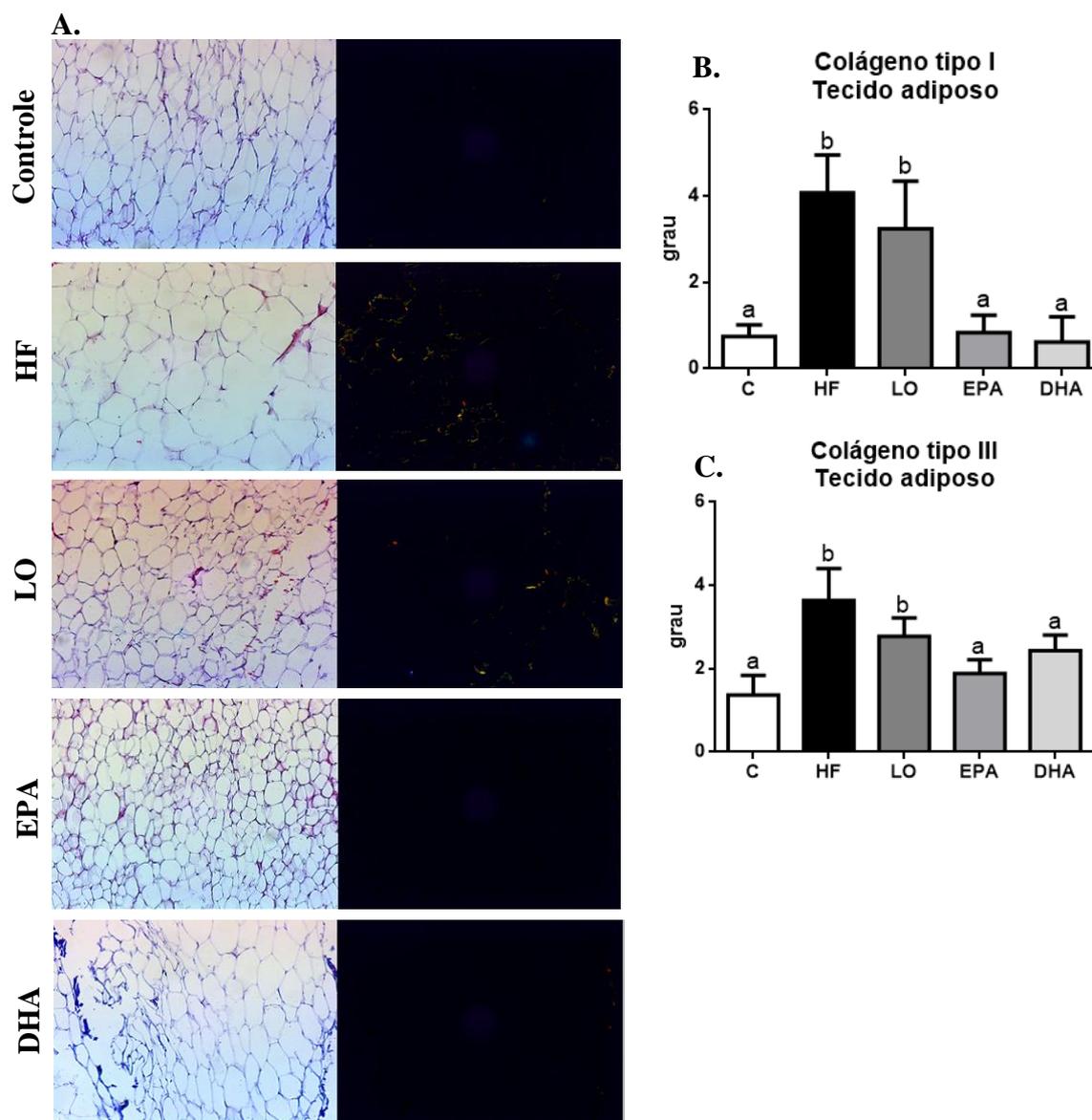
com EPA apresentou área adipocitária menor que o grupo não tratado ( $p=0,003$ ), apresentando resultado semelhante ao grupo controle. Foi avaliado também o número de adipócitos e o grupo HF apresentou redução do número destas células ( $p<0,0001$ ), e os tratamentos com EPA e DHA apresentaram maior quantidade de células adiposas ( $p<0,0001$ ), apresentando também resultados semelhantes ao controle, conforme demonstrado pelos painéis a seguir:

**Figura 15.** Efeito dos tratamentos na histoarquitetura do tecido adiposo corado com Hematoxilina e Eosina.



(A) Fotomicroscopia do tecido adiposo; (B) Área dos adipócitos por campo; (C) Número de adipócitos por campo; (D) Razão entre a área e a quantidade de adipócitos por campo. Onde C: grupo controle; HF: grupo dieta hiperlipídica; LO: grupo óleo de linhaça; EPA: grupo EPA; DHA: grupo DHA; um: micrômetro. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado  $p<0,05$

**Figura 16.** Efeito dos tratamentos sobre a deposição de colágeno no tecido adiposo.



(A) Fotomicroscopia do tecido adiposo em campo claro e escuro; (B) Grau da deposição de colágeno tipo I e (C) Grau da deposição de colágeno tipo III. Onde C: grupo controle; HF: grupo dieta hiperlipídica; LO: grupo óleo de linhaça; EPA: grupo EPA; DHA: grupo DHA. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado  $p < 0,05$

### 5.3.9 Análises da composição de ácidos graxos nos tecidos hepático e adiposo.

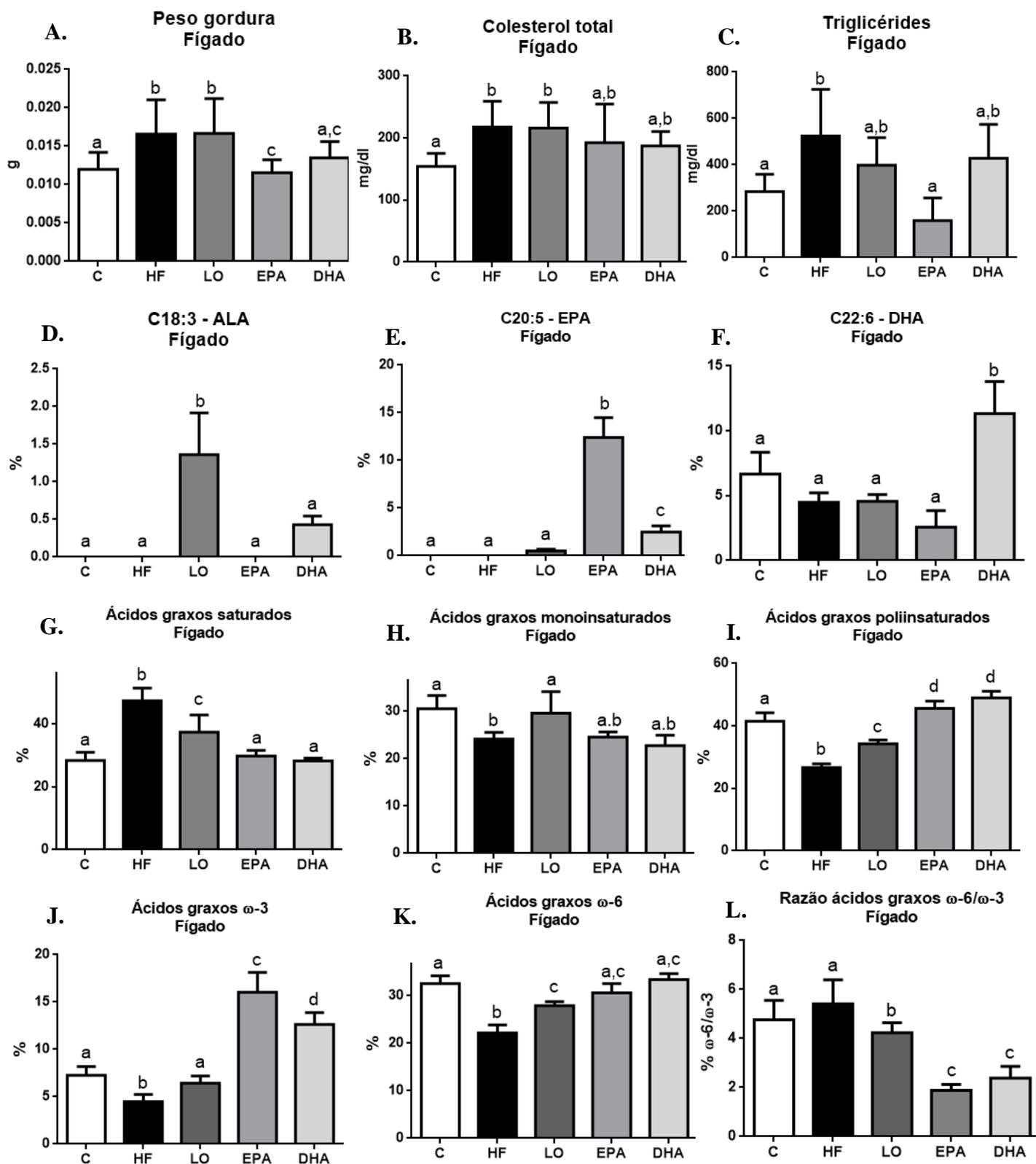
Após confirmarmos os danos no tecido hepático, avaliamos o perfil lipídico neste tecido e, ao extrair a gordura do órgão e realizar análise bioquímica desta, obtivemos que os

animais do grupo HF e tratados com LO apresentaram maior quantidade de gordura hepática, tendo o grupo tratado com EPA apresentado menor quantidade e, com DHA, quantidade semelhante ao controle. Em relação à concentração de colesterol total hepática, os tratamentos não alteraram este parâmetro. Entretanto, o grupo tratado com EPA apresentou uma redução na concentração de triglicérides hepático, com resultado estatisticamente igual ao grupo controle.

Ao analisar a composição de AG presente neste tecido, obtivemos que o grupo EPA incorporou majoritariamente este AG (C20:5), assim como o grupo DHA apresentou maior incorporação do AG (C22:6). Quanto às saturações, a dieta hiperlipídica levou à maior incorporação de AG saturado neste tecido e todos os tratamentos apresentaram menores concentrações deste tipo de AG. Em relação aos AG insaturados, o grupo HF apresentou menores teores de mono e poli-insaturados, o grupo LO apresentou maior teor de mono e poli-insaturado do que o grupo HF e os grupos EPA e DHA não apresentaram diferença no teor de monoinsaturado em relação ao HF, mas ambos apresentaram teores de AG poli-insaturados maiores que o grupo controle, HF ou LO.

Em relação aos AG insaturados, avaliamos também o teor de  $\omega$ -6,  $\omega$ -3 e a razão  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 onde obtivemos que apesar do grupo HF ter apresentado menores teores tanto de  $\omega$ -6 quanto  $\omega$ -3, sua razão  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 foi semelhante ao grupo controle. Dentre os grupos tratados, o LO apresentou maior teor de  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 que o grupo sem tratamento mas sua relação  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 foi menor, assim como os grupos EPA e DHA apresentaram maior teor de  $\omega$ -3 que todos os grupos, teor de  $\omega$ -6 semelhante ao controle e LO, mas ambos apresentaram a razão  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 menor que os grupos controle, HF e LO.

Figura 17. Efeito dos tratamentos no perfil lipídico hepático.

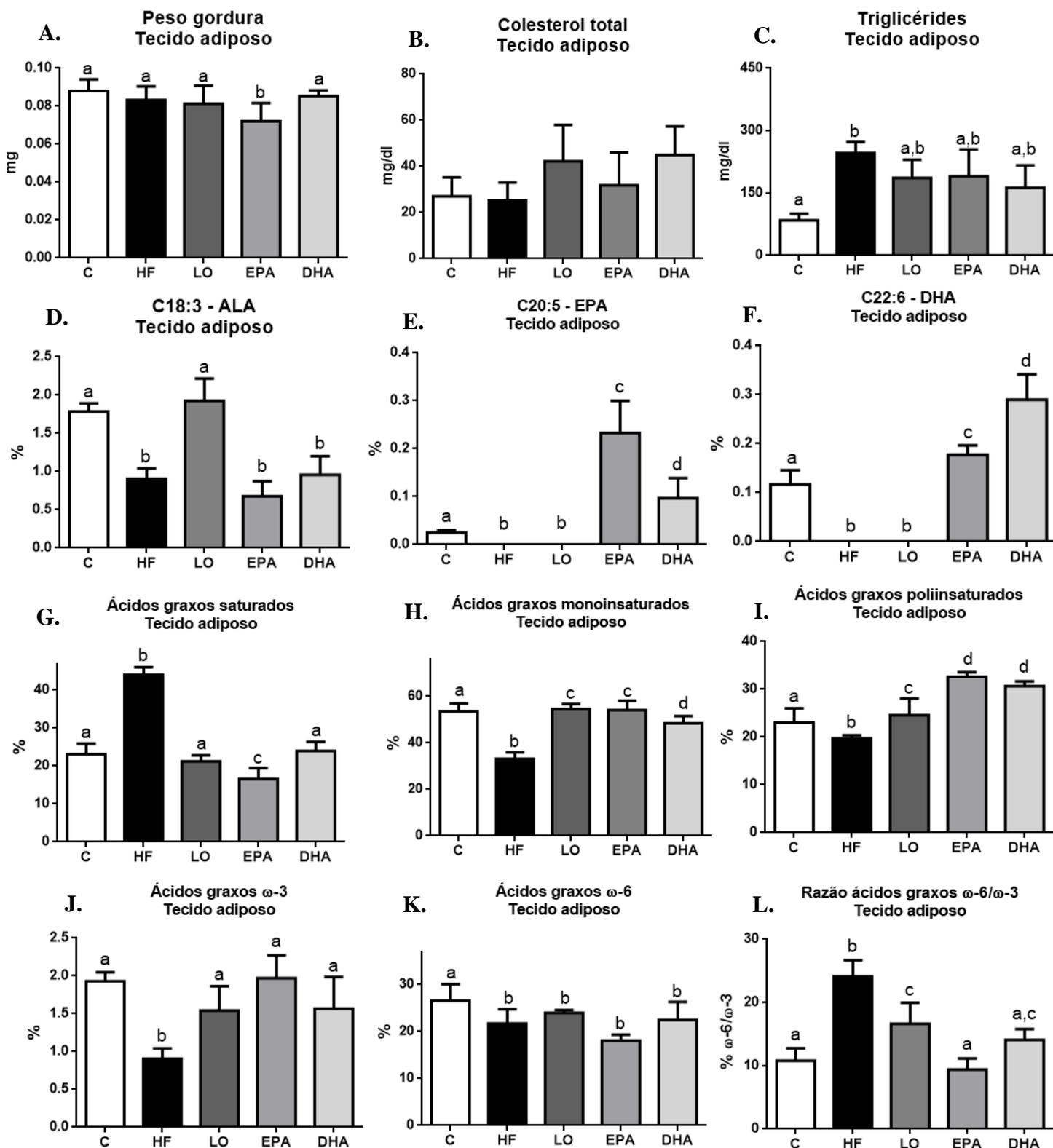


(A) Peso da gordura hepática total; (B) concentração de colesterol total hepático; (C) concentração de triglicérides hepático; (D-K) distribuição de ácidos graxos hepático; (L) razão entre ômega 6 e ômega 3 hepática. Onde C: grupo controle; HF: grupo dieta hiperlipídica; LO: grupo óleo de linhaça; EPA: grupo EPA; DHA: grupo DHA; mg: miligramas e dl: decilitro. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado  $p < 0,05$

Para compreender também os efeitos no tecido adiposo, avaliamos a quantidade e a composição bioquímica dos lipídios presentes neste tecido. Com isso observamos que o grupo EPA apresentou menor quantidade de lipídeo neste tecido, a concentração de colesterol total não se diferiu entre os grupos e a concentração de triglicérides foi maior nos grupos que ingeriram a dieta hiperlipídica, sendo que nenhum tratamento impediu este aumento.

Ao analisar a composição de AG deste tecido, obtivemos que os grupos tratados com EPA e DHA apresentaram maior teor deste AG no tecido. Quanto às saturações, o grupo sem tratamento apresentou maior incorporação de AG saturado no tecido adiposo, os grupos OL e DHA apresentaram teor semelhante ao controle e o grupo EPA apresentou menor teor deste tipo de AG. Em relação aos AG mono e poli-insaturados, o grupo alimentado com dieta hiperlipídica sem tratamento apresentou menor teor neste tecido e todos os tratamentos apresentaram teores maiores destes tipos de AG tanto em relação ao grupo sem tratamento quanto ao controle. Em relação à classificação pela posição das insaturações, o grupo HF apresentou menor incorporação tanto de  $\omega$ -6 quanto  $\omega$ -3 tendo os tratamentos apresentado teor semelhante ao controle de  $\omega$ -3 e teor semelhante ao grupo HF de  $\omega$ -6. Entretanto, quando avaliamos a razão  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 observamos que o grupo sem tratamento apresentou razão semelhante ao controle e todos os grupos tratados apresentaram a menor razão  $\omega$ -6/ $\omega$ -3.

**Figura 18.** Efeito dos tratamentos no perfil lipídico do tecido adiposo.



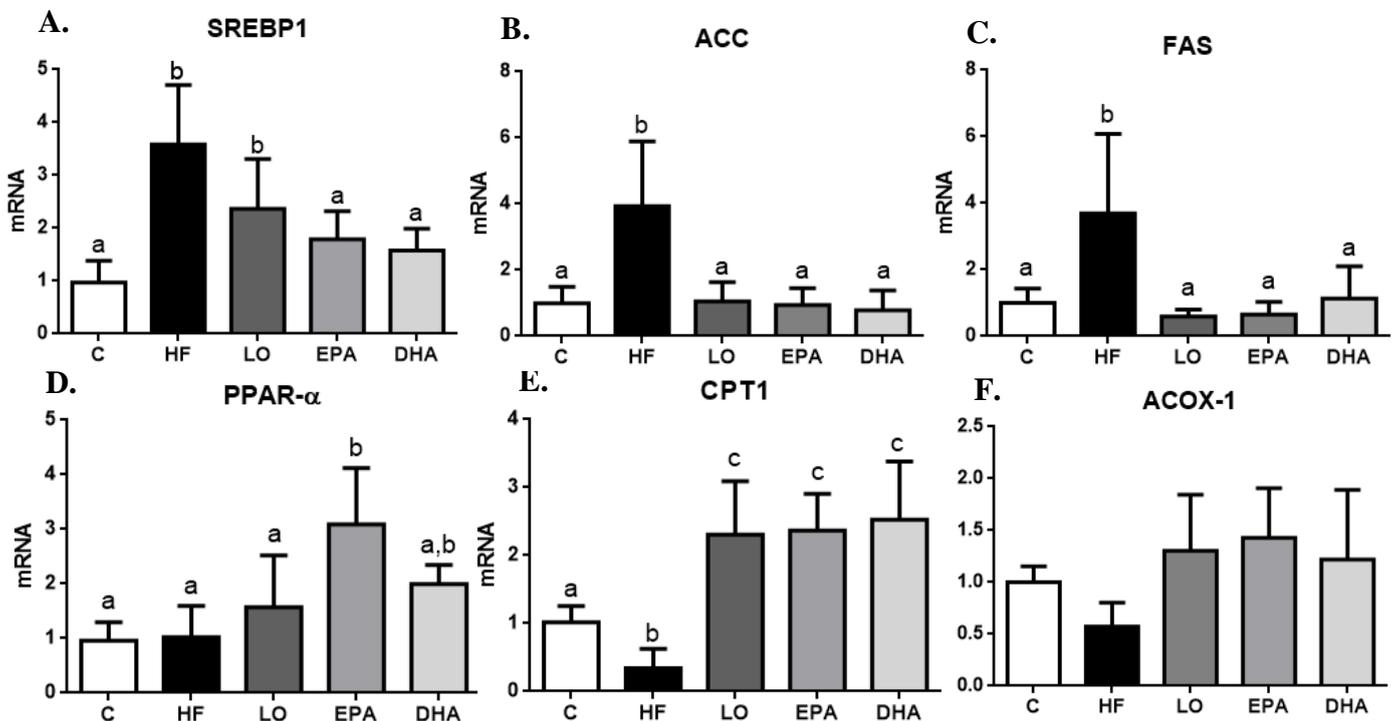
(A) Peso da gordura extraída do tecido adiposo; (B) concentração de colesterol total do tecido adiposo; (C) concentração de triglicérides do tecido adiposo; (D-K) distribuição de ácidos graxos no tecido adiposo; (L) razão entre ômega 6 e ômega 3 no tecido adiposo. Onde C: grupo controle; HF: grupo dieta hiperlipídica; LO: grupo óleo de linhaça; EPA: grupo EPA; DHA: grupo DHA; mg: miligramas e dl: decilitro. Os dados

foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado  $p < 0,05$

#### 5.4 Análises de expressão gênica no fígado

Para melhor compreensão do metabolismo lipídico no tecido hepático, avaliamos a expressão gênica relativa dos genes SREBP, ACC e FAS e ao analisarmos, obtivemos que o grupo HF apresentou maior expressão relativa de todos os genes lipogênicos e todos os tratamentos acarretaram na menor expressão relativa dos genes ACC ( $p=0,0003$ ) e FAS ( $p=0,0026$ ), com valores equivalentes ao grupo controle e apenas os tratamentos com EPA e DHA apresentaram este mesmo resultado na expressão gênica relativa do gene da SREBP ( $p=0,0205$ ). Em relação a expressão do fator de transcrição PPAR- $\alpha$ , o grupo EPA apresentou aumento significativo da sua expressão ( $p=0,0087$ ) e todos os tratamentos foram eficazes em aumentar a expressão gênica da enzima CPT1 ( $p < 0,0001$ ). Nenhum tratamento elevou significativamente a expressão da enzima ACOX-1.

**Figura 19.** Efeito dos tratamentos na expressão gênica.



(A) SREBP-1; (B) ACC; (C) FAS; (D) PPAR- $\alpha$ ; (E) CPT1 e (F) ACOX-1. Onde C: grupo controle; HF: grupo dieta hiperlipídica; LO: grupo óleo de linhaça; EPA: grupo EPA; DHA: grupo DHA; SREBP: Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol; ACC: Acetil-CoA carboxilase; FAS: Ácido graxo sintase; PPAR- $\alpha$ : receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alpha; CPT1: carnitina palmitoiltransferase 1; ACOX-1: acil-CoA oxidase 1; mRNA: ácido ribonucleico mensageiro. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado  $p < 0,05$ .

## 6. DISCUSSÃO

Nosso estudo buscou avaliar o efeito do tratamento com diferentes proporções de PUFA em um modelo de ingestão crônica de dieta hiperlipídica independente do fenótipo de obesidade, considerando que os animais não apresentaram maior massa corporal, conforme observado pelo Índice de Lee, mas desenvolveram danos metabólicos semelhantes àsquelas em humanos que, apesar de muitas vezes permanecerem eutróficos, sofrem prejuízos na saúde causados pela ingestão crônica de alimentos de qualidade inadequada (BECERRA *et al.*, 2019; REHUNEN *et al.*, 2021).

Assim, avaliamos os efeitos metabólicos em parte dos animais experimentais após 18 semanas de ingestão de dieta hiperlipídica e foi visto que essa dieta levou à hiperglicemia de jejum, hipertensão, aumento da lipogênese hepática e um maior acúmulo de TAG no tecido adiposo, gerando prejuízo na resposta insulínica, visto que os animais do grupo experimental precisaram de mais tempo para metabolização da glicose tanto no teste de tolerância oral a glicose quanto no teste de resposta insulínica. Apesar da resposta glicêmica prejudicada, os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram menores concentrações séricas de colesterol total, o que pode ter ocorrido devido a ação conjunta de três fatores: 1. redução sérica da fração HDL colesterol, 2. maior deposição ectópica de colesterol e triglicérides no fígado e, 3. maior mobilização de triglicérides para o tecido adiposo.

Outro estudo que avaliou a ingestão de uma dieta contendo aproximadamente 30% de lipídeo por 8 e 16 semanas também obtiveram aumento da pressão arterial sistólica dos animais que ingeriram dieta hiperlipídica, sem alterações quanto as concentrações de colesterol total e triglicérides em ambos períodos (PANCHAL *et al.*, 2011). Em outro estudo onde avaliaram a ingestão de uma dieta hiperlipídica (45%) também em 2 períodos, por 3 e 19 semanas, Melo e colaboradores (2019) obtiveram um aumento da glicemia e da deposição de lipídeo hepático em ambos os tempos, mas houve alteração da resposta glicêmica pelo teste de tolerância oral à glicose apenas em 19 semanas, tempo próximo ao utilizado em nosso estudo.

Extrapolando estes resultados para um indivíduo que consome alimentos industrializados ricos em AG *trans* cronicamente, os danos metabólicos encontrados em nosso estudo corresponderiam a um maior risco para doenças como diabetes, esteatose hepática não alcoólica e aumento da chance de mortalidade por doenças cardiovasculares (LI *et al.*, 2019). Dessa forma, nosso próximo passo foi avaliar os efeitos dos tratamentos com LO, EPA e DHA sobre estes agravos.

Com isso, da 18<sup>a</sup> a 20<sup>a</sup> semana, realizamos os tratamentos com óleo de linhaça, um

composto com 500:200mg de EPA:DHA e outro composto com 150:500mg EPA:DHA na tentativa de reverter os danos metabólicos já estabelecidos pela dieta hiperlipídica.

Inicialmente observamos que os tratamentos não afetaram a taxa de sobrevivência e, apesar de nenhum tratamento ter efeito sobre a composição corporal (avaliado pelo índice de Lee) ou a ingestão alimentar energética, o tratamento com EPA levou à uma eficiência alimentar próxima a do grupo controle, o que sugere que este tipo de AG pode ter interferido no armazenamento energético, considerando que este parâmetro reflete o quanto da ração ingerida foi armazenada e que todos os animais que ingeriram dieta hiperlipídica estocaram mais substrato energético do que o grupo controle (NOVELLI, 2007).

Da mesma forma como observado no período inicial do estudo, os tratamentos não apresentaram efeitos sobre o perfil lipídico sérico e, além das 3 possíveis justificativas mencionadas, é preciso considerar também que o rato é uma espécie deficiente em proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), responsável por transferir os ésteres de colesterol e triglicerídeos (TGs) entre as lipoproteínas séricas, incluindo HDL, LDL e VLDL e isso pode interferir na análise dos resultados séricos (HA, 1982; ZHU, 2018). Apesar disso, é importante considerar que observamos o mesmo padrão na 1ª fase do experimento, onde a dieta hiperlipídica levou à maior mobilização de colesterol total para o fígado e acarretou no aumento das concentrações de triglicerídeos tanto no fígado quanto no tecido adiposo, sendo também uma possível causa para redução destas concentrações séricas.

Após 20 semanas, a dieta hiperlipídica continuou gerando um aumento da concentração de glicose sérica nos animais sem tratamento de forma mais grave do que encontrado nas primeiras 18 semanas (50,7% após 20 semanas, 19,3% após 18 semanas) e os tratamentos com EPA e DHA foram eficazes em reduzir a glicemia, com um efeito mais acentuado observado pelo grupo EPA, que levou a uma redução de 57,2%, sendo que o grupo DHA reduziu a glicemia em 22,8%. Outros estudos mostraram que a suplementação, variando em doses entre 0,42 a 5,2g/dia de ômega 3, melhora a sensibilidade à insulina e acarreta na redução das concentrações de glicose e hemoglobina glicada em diabéticos, entretanto as concentrações de insulina em jejum não foram significativamente afetadas na maioria das pesquisas, assim como não houve uma relação dose/resposta diretamente dependente. (TAPSELL *et al.*, 2004; MA *et al.*, 2010; TAYLOR *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2015; COELHO *et al.*, 2017; BELURY *et al.*, 2018; DELPINO *et al.*, 2021).

Um possível mecanismo envolvido na resposta glicêmica seria pelo fato de que a ingestão de uma dieta hiperlipídica composta por AG *trans* e saturados aumenta a produção de citocinas pró inflamatórias, como o TNF e este aumenta a fosforilação do receptor de

insulina (IRS-1) em resíduos de serina e ativação da serina quinase IKK, impedindo a interação do receptor com a sua subunidade beta, interrompendo a sinalização da insulina com consequente aumento da glicemia. Entretanto, sabe-se que o EPA e DHA atuam favorecendo essa via e inibindo a fosforilação da IKK, o que reduz a produção de citocinas inflamatórias via NFκB, melhorando a atividade do receptor de insulina e a consequente translocação do receptor GLUT4 para a membrana (GUO *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2019; SENATOROV *et al.*, 2020). Assim, ao avaliarmos os efeitos de EPA e DHA sobre as citocinas inflamatórias séricas, IL-6 e TNF, obtivemos que, apesar de não atuarem sobre a IL-6, os tratamentos com EPA e DHA reduziram as concentrações séricas de TNF, sendo este um potencial mecanismo envolvido na redução da glicemia observada por estes tratamentos.

Os tratamentos com EPA e DHA também atuaram de forma benéfica no metabolismo lipídico em diversos parâmetros analisados. Primeiramente observamos que a ingestão crônica da dieta hiperlipídica reduziu a quantidade de hepatócitos tanto total quanto binucleados e apenas o tratamento com EPA acarretou em aumento no número destas células, mas os tratamentos com EPA e DHA foram eficazes em aumentar o número de hepatócitos binucleados, sugerindo uma tentativa de regeneração hepática e redução do dano causado pela dieta HF, pois a presença de binucleação hepática indica que a célula sofreu um dano grave, mas que há uma proliferação compensatória associada à lesão (GERLYNG, 2008; TORMOS *et al.*, 2015). Ao buscarmos compreender a relação destes efeitos morfológicos com a composição lipídica hepática, obtivemos que os tratamentos com EPA e DHA reduziram o acúmulo de gordura neste órgão, sendo que o tratamento com EPA apresentou quantidade de gordura semelhante ao controle. Considerando ainda que apenas o EPA apresentou redução da concentração de triglicérides hepático, é possível que este tratamento tenha favorecido também o menor acúmulo de gordura ectópica. Confirmamos este efeito no metabolismo lipídico hepático pelas análises do grau de esteatose, onde observamos que os grupos EPA e DHA foram eficazes em reduzir a formação de macroesteatose, e apesar de todos os tratamentos serem eficazes em reduzir o grau de microesteatose, o grupo EPA se mostrou mais eficiente neste parâmetro, apresentando resultado semelhante ao controle. Este resultado pode explicar também, em parte, o efeito hipoglicemiante no grupo EPA, visto que menor acúmulo de TAG hepático favorece também a redução da gliconeogênese hepática.

Ainda sobre a morfologia, obtivemos que os tratamentos com EPA e DHA foram eficazes em reduzir a deposição de colágeno tipo I e todos os tratamentos (LO, EPA e DHA) reduziram a deposição de colágeno tipo III, confirmando que os tratamentos, principalmente EPA e DHA, favoreceram a redução dos danos hepáticos ocasionados pela dieta HF. Apesar

do colágeno tipo I ser naturalmente abundante no metabolismo por atuar em processos de recuperação de lesões, migração celular e modificação da matriz extracelular, em condições de injúria crônica sua produção é aumentada (MEURER *et al.*, 2020), conforme observamos no grupo HF em relação ao grupo controle. O colágeno tipo III também possui uma importante ação cicatricial e é formado em maior quantidade durante a fibrogênese (KARSDAL *et al.*, 2016). Essa deposição de colágeno hepático ocorre pela ativação das células estreladas hepáticas (HSCs) desencadeada por um quadro de injúria, o que leva à secreção de componentes da matriz extracelular, como os colágenos tipo I e III na tentativa contínua de remodelamento da matriz extracelular, mas que pode levar à fibrose hepática quando estimulada cronicamente (BATALLER *et al.*, 2005; FRIEDMAN, 2008; SOON *et al.*, 2021). Li e colaboradores (2015), ao tratar pacientes com esteatose hepática não alcoólica com 50 ml de um composto contendo 1:1 EPA/DHA obteve redução da deposição de colágeno tipo III, mostrando também este efeito em proporção igual de EPA e DHA.

Dessa forma, sabe-se que a ingestão elevada de AG saturados e *trans* podem levar à progressão da esteatose hepática não alcoólica à medida que promove uma lesão hepática, principalmente pela ativação da caspase 3, aumento da migração de citocinas pró inflamatórias e da atividade de metaloproteinases, que levam à deposição de colágenos tipos I e III, alterando a composição da matriz extracelular que, de forma crônica, compromete a função do órgão (CARMIEL-HAGGAI *et al.*, 2005; GAO *et al.*, 2015; BEPPU *et al.*, 2017; NORRIS *et al.*, 2017; SOON *et al.*, 2021). Uma função hepática alterada pode afetar também outros órgãos, pois sabemos que o fígado desempenha um papel central na regulação do metabolismo lipídico, afetando o metabolismo lipídico adjacente, pois quanto mais TAG estocado no fígado, maior será a liberação de VLDL e captação destas por diversos órgãos. Entretanto, sabe-se que os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 são ligantes para vários receptores nucleares responsáveis pela regulação da expressão gênica de fatores transcricionais importantes na regulação do metabolismo lipídico (LOTTENBERG *et al.*, 2012; SCORLETTI e BYRNE, 2013, ARENDT, 2015, TIAN, 2018; ZHU, 2018; PALMISANO, 2018; ZHANG *et al.*, 2018; DAS, 2021).

O metabolismo lipídico hepático é regulado por fatores de transcrição, incluindo receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) e receptores nucleares que regulam genes envolvidos na lipogênese e na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos. Sabe-se que o excesso de gordura pode levar a um desequilíbrio nessas vias e promover o maior acúmulo de gordura hepática, progredindo para o quadro de esteatose hepática não alcoólica (NAFLD) por promover o aumento da expressão do PPAR $\gamma$  e a consequente migração de citocinas pró-

inflamatórias, aumentando a deposição de colágenos tipos I e III, gerando uma mudança na composição da matriz extracelular, como visto em nosso estudo (CARMIEL-HAGGAI *et al.*, 2005; TIAN *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019; SOON *et al.*, 2021). Outro mecanismo importante envolvido na patogênese da NAFLD é a redução da atividade das enzimas responsáveis pelo metabolismo dos PUFA ( $\Delta$ -5 e  $\Delta$ -6 dessaturase) no fígado que leva à diminuição da atividade do PPAR- $\alpha$  e aumento de vias lipogênicas, principalmente pelo aumento das razões  $\omega$ -6/  $\omega$ -3 e regulação positiva da expressão gênica do fator de transcrição SREBP-1 (ECHEVERRÍA *et al.*, 2016; RAFIEI *et al.*, 2019).

Por isso, uma vez que observamos uma diminuição na quantidade de gordura total e TAG hepático, além de uma diminuição no grau de micro e macroesteatose nos animais tratados e modificação da matriz celular, nosso próximo passo foi tentar esclarecer o mecanismo responsável por regular tais efeitos. Para isto avaliamos a expressão gênica no tecido hepático e observamos que a dieta hiperlipídica levou a uma maior expressão de todos os genes lipogênicos analisados (*ACC*, *FAS* e *SREBP*) e todos os tratamentos foram eficazes em diminuir a expressão dos genes *ACC* e *FAS* com valores equivalentes ao grupo controle, mas apenas os tratamentos com EPA e DHA reduziram a expressão do gene *SREBP*.

Apenas o tratamento com EPA aumentou a expressão de *PPAR- $\alpha$*  e, apesar de o grupo HF ter apresentado menor expressão de *CPT1*, todos os tratamentos foram eficazes em manter maior expressão desta enzima. Esses resultados mostram que os tratamentos foram eficazes na redução do acúmulo de AG hepático, com o EPA apresentando maior capacidade de estimular a  $\beta$ -oxidação, o que vai de acordo com os resultados encontrados neste trabalho sobre o menor grau de esteatose e deposição de colágeno.

O PPAR- $\alpha$  tem um papel importante no metabolismo do fígado, regulando a oxidação de AG por genes alvo, como *acil-CoA oxidase (ACOX)* e *carnitina palmitoiltransferase I (CPT-1)*, e assim previne a disfunção mitocondrial que pode ocorrer por excesso de AG neste tecido como uma consequência da ativação aumentada de NF $\kappa$ B e do aumento de fatores pró-inflamatórios (WAHLI *et al.*, 2012; CONTRERAS *et al.*, 2013; ZOLEZZI *et al.*, 2013; DAS, 2021). O *SREBP* também é um importante fator de transcrição que desempenha um papel fundamental na transcrição em cascata que desencadeia a lipogênese e regula *ACC*, que é responsável pela carboxilação de acetil CoA e a produção de malonil-CoA, que serve como substrato para *FAS* catalisar a biossíntese hepática de ácidos graxos saturados (FERRE *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018; SZÁNTÓ *et al.*, 2021). Assim, em nossos resultados observamos uma melhora do perfil lipogênico hepático nos animais tratados.

Sabe-se também que a ingestão crônica de dieta HF leva à depleção dos PUFA

hepáticos, favorecendo reações oxidativas dependentes de ROS, com a regulação positiva do SREBP que leva ao acúmulo de AG concomitante com a regulação negativa de PPAR- $\alpha$  e consequente diminuição da oxidação de AG. Desta forma, há um maior estímulo do estresse oxidativo, desencadeando a oxidação de proteínas e o estresse do retículo endoplasmático (ER), levando à disfunção mitocondrial do fígado e consequentes processos de peroxidação lipídica que aumentam o TNF sérico, com prejuízo do fluxo de elétrons e síntese de ATP. No entanto, há evidências de que a regulação positiva de PPAR- $\alpha$ , CPT1 e ACOX1 restabelecem os níveis de NAD<sup>+</sup> / NADH e protege a função mitocondrial, o que também pode ter favorecido ao menor acúmulo de gordura hepática encontrado nos grupos EPA e DHA (ORTIZ *et al.*, 2020).

Desta forma, a regulação da expressão gênica no tecido hepático explica, em parte, o mecanismo pelo qual os tratamentos apresentaram uma proteção hepática, onde uma redução da lipogênese acarretou em menor acúmulo de gordura hepática e recuperação da matriz celular hepática.

Para compreender se houve absorção/bioconversão dos AG nos tecidos, analisamos a composição de AG da gordura extraída do tecido hepático e observamos que os animais tratados com EPA e DHA incorporaram aproximadamente 10 a 15% destes compostos de acordo com a proporção dos tratamentos, com isso, os resultados hepatoprotetores observados com estes tratamentos, provavelmente se devem à maior incorporação destes AG (C20:5 e C22:6) no tecido, em comparação aos outros grupos. Os resultados da análise cromatográfica neste tecido mostraram também que o ácido alfa linolênico (ALA), composto principal do óleo de linhaça, possui uma baixa taxa de bioconversão em EPA e DHA, próximo de 1 e 5%, respectivamente. Outros estudos encontraram valores de bioconversão na faixa de 0 a 9% neste órgão (BURDGE, 2002; BAKER, 2016; CALDER, 2016). Sabe-se ainda que uma maior razão de  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 diminui a conversão de ALA em EPA/DHA pelo comprometimento da ação da enzima  $\Delta$ -6 dessaturase, o que pode justificar também o baixo teor de EPA/DHA encontrado nos tecidos dos animais do grupo LO, visto que a ração hiperlipídica continha uma alta razão  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 (16.53, conforme tabela 5), mas os tratamentos com EPA e DHA garantiram uma menor proporção de  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 e, dessa forma, houve um provável favorecimento da metabolização de eicosanoides como prostaglandinas e tromboxanos da série 3 e leucotrienos da série 5, que possuem ação anti-inflamatória (DAVIDSON *et al.*, 2006). Observamos também que os tratamentos com EPA e DHA acarretaram menor incorporação de AG saturado neste tecido, o que também favorece a redução dos danos que estes AGs podem causar no tecido hepático.

Apesar de esperado que parte dos efeitos protetores dos tratamentos se dessem pelo aumento das enzimas antioxidantes, os tratamentos não afetaram a atividade das enzimas SOD e CAT. Sabe-se que a enzima SOD é a primeira linha de defesa contra ataques de radicais livres e sua função é catalisar a conversão de radicais superóxido a peróxido de hidrogênio e, com isso, uma maior atividade desta enzima leva a maior eliminação de íons superóxido, inibindo a formação de radicais hidroxila. Já a catalase é uma enzima intracelular responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio, que é um produto gerado, principalmente, na beta oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, com isso, a atividade destas enzimas está diretamente relacionada com a capacidade antioxidante celular. Apesar de algumas pesquisas mostrarem que os ácidos graxos poli-insaturados levam a um aumento na atividade de enzimas antioxidantes no fígado, os efeitos hepatoprotetores ocasionados pelos tratamentos nas doses e tempo avaliados, ocorreram independente da atividade das enzimas SOD e CAT (GARRIDO *et al.*, 1989; TSUDUKI *et al.*, 2011; NOWAK, 2013; PATTEN *et al.*, 2013; GIORDANO *et al.*, 2014; HILGENDORF *et al.*, 2019).

Como citado anteriormente, os AG ômega 3 possuem potencial efeito cardioprotetor e, como obtivemos inicialmente uma variação do peso do coração, avaliamos alguns efeitos metabólicos neste órgão, como a concentração de citocinas inflamatórias TNF e IL-6, a quantificação das células inflamatórias e espessura dos cardiomiócitos, assim como a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase. Observamos que o grupo HF apresentou maior quantidade de células inflamatórias e menor espessura dos cardiomiócitos e o tratamento com DHA foi eficaz em melhorar estes parâmetros, entretanto, não obtivemos diferença na concentração de TNF e IL-6, assim como os tratamentos não afetaram a atividade das enzimas SOD e CAT neste órgão. Entretanto, é importante ressaltar que agravos metabólicos como o acúmulo de gordura hepática e aumento da glicemia são fatores de risco para doenças cardiovasculares (RHEE *et al.*, 2017; INNES *et al.*, 2020; PETRONI *et al.*, 2021). Dessa forma, nossos resultados sugerem um efeito cardioprotetor indireto, principalmente por EPA e DHA.

Considerando que o tecido adiposo também desempenha um papel central na captação, processamento, transporte e estocagem de nutrientes, e que há um importante circuito metabólico entre fígado e tecido adiposo, avaliamos também importantes parâmetros metabólicos neste tecido (DANCYGIER, 2010, GENTILE *et al.*, 2015; DUWAERTS, 2019).

Inicialmente obtivemos que a dieta hiperlipídica levou à formação de menos adipócitos com maior estoque de gordura, visto pela redução da quantidade e aumento da área das células adiposas. Entretanto, todos os tratamentos foram eficazes em melhorar este perfil

pela menor relação entre área do adipócito pela sua quantidade, levando a um remodelamento mais favorável do tecido adiposo. Sabe-se que o aumento do número de células adiposas (hiperplasia adipocitária) é mais favorável metabolicamente para o tecido, pois ela ocorre devido à maior proliferação e diferenciação de células precursoras (células progenitoras do tecido adiposo – APCs) que residem no estroma do tecido adiposo e formam adipócitos maduros pelo processo de mitose (RODEHEFFER, 2008; FARMER, 2006, MUIR *et al.*, 2016; ALZAIM *et al.*, 2020). Sendo assim, indivíduos que apresentam aumento do número de células adiposas podem desenvolver menor deposição lipídica ectópica (RYDÉN *et al.*, 2014). Ghandour e colaboradores (2018) também observaram remodelamento do tecido adiposo branco pela ingestão de um composto rico em EPA e DHA através do aumento da função termogênica dos adipócitos, avaliada pela expressão da UCP1 (proteína desacopladora 1), responsável pelo desacoplamento na produção de energia.

Vimos ainda que a dieta hiperlipídica também acarretou na deposição tanto de colágeno tipo I quanto tipo III no tecido adiposo, apesar de menor grau em comparação ao fígado. Entretanto, apenas os tratamentos com EPA e DHA diminuíram esta deposição, apresentando resultado semelhante ao grupo controle. Em condições normais, os adipócitos são circundados por uma rede de proteínas na matriz extracelular, como o colágeno e fibronectina, que auxiliam na estrutura do tecido. Contudo, assim como ocorre no fígado, quando há maior injúria tecidual que acarrete no aumento de recrutamento de macrófagos, ocorre maior produção de colágeno, como uma forma de reparar a estrutura tecidual, mas que, quando ocorre cronicamente, reduz a flexibilidade e plasticidade do tecido, causando eventual disfunção dos adipócitos (SUN *et al.*, 2013; ŹELECHOWSKA *et al.*, 2018). Com isso, o grupo tratado com EPA e DHA foram mais eficazes em levar a um remodelamento do tecido adiposo, tanto pela redução da área/quantidade de adipócitos, quanto por reduzir a deposição de colágeno neste tecido.

O remodelamento desfavorável do tecido adiposo ocasionado pela dieta hiperlipídica, que levou a formação de adipócitos com maior estoque de gordura e maior formação de colágeno, pode ter ocorrido também pelo aumento da concentração das citocinas inflamatórias MCP-1 (CCL-2) e RANTES (CCL-5) neste tecido. Entretanto, apenas o grupo DHA apresentou redução da concentração da MCP-1, sugerindo um papel importante do DHA na redução da migração de células pró inflamatórias para o tecido adiposo, visto que estas citocinas são proteínas quimiotáticas que levam ao maior recrutamento de monócitos e acúmulo de macrófagos (WEISBERG, 2003; MCEVER, 2015; (CINTI, 2005; GIORDANO, 2013; LEE, 2018; PORRO *et al.*, 2021). Com isso, o efeito do EPA parece ser independente

deste mecanismo, visto que apesar de ter favorecido também o remodelamento deste tecido, não afetou significativamente as concentrações das citocinas analisadas.

Sabe-se que no tecido adiposo branco, os ácidos graxos livres (AGLs) são esterificados em triglicerídeos que são acondicionados em gotículas lipídicas revestidas com proteínas reguladoras (MARCELIN, 2010). Quando há sobrecarga de sua capacidade de armazenamento, ocorre o prejuízo da atividade de sirtuínas (SIRT1) sobre a regulação da atividade do fator de transcrição PPAR $\gamma$  e este tecido se expande para continuar armazenando substrato energético, o que pode levar à ativação de células necróticas pelo rompimento de membranas plasmáticas e estresse do retículo endoplasmático, gerando detritos celulares no espaço extracelular e aparecimento de gotículas lipídicas no citoplasma, resultando no aumento da expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF, IL-6, IL-8, monócito quimioatraente de proteína 1 (MCP-1), entre outras (CINTI, 2005; GIORDANO, 2013; LEE, 2018; PORRO *et al.*, 2021). Com este aumento progressivo, ocorre elevada concentração de células imunes que podem levar ao acúmulo de matriz extracelular fibrótica do tecido adiposo (JERNÅS, 2006), o que justifica também nossos resultados encontrados sobre a concentração de MCP-1 e deposição de colágeno. Um outro mecanismo que explica a fibrose no tecido adiposo é que, devido ao aumento da sua expansão, ocorre uma redução da vascularização tecidual, levando à uma hipóxia local que também leva à necrose adipocitária e favorece a infiltração de leucócitos pró inflamatórios (SUN, 2011). Este acúmulo de material fibrótico prejudica o armazenamento adequado de energia e funções endócrinas do tecido adiposo, alterando o controle metabólico local e sistêmico (LEE, 2018).

Sabe-se também que PUFA pode levar a um fenótipo de adipócito menor e saudável ao se ligar e ativar PPAR- $\gamma$  no TA (TIAN *et al.*, 2018). Portanto, o remodelamento do TA também pode estar relacionada à regulação negativa do *SREBP* e regulação positiva de PPAR- $\alpha$ , com a recuperação da capacidade oxidativa mitocondrial e possível modulação de PPAR- $\gamma$ , refletindo a diminuição do fluxo de AG no fígado (ILLESCA *et al.*, 2020).

Ao buscarmos compreender também a composição de AGs no tecido adiposo que se relacionam com os efeitos observados, vimos que a concentração de triglicérides foi maior nos grupos que ingeriram a dieta hiperlipídica, sendo que nenhum tratamento foi eficaz em diminuir este parâmetro e, ao analisarmos o perfil de AG incorporado pelo tecido adiposo, observamos que a taxa de incorporação dos AG é menor do que as taxas encontradas no tecido hepático, entretanto, os tratamentos LO, EPA e DHA acarretaram em maior incorporação do ALA, EPA e DHA, respectivamente, garantindo uma menor razão  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 e menor incorporação de AG saturados, o que pode justificar também os efeitos benéficos dos

tratamentos.

Outros estudos que buscaram compreender o efeito da suplementação de EPA/DHA sobre os danos ocasionados por dieta hiperlipídica, obtiveram resultados dependentes da dose utilizada e do tecido analisado. Shang e colaboradores (2017) ao avaliarem o efeito do tratamento com EPA:DHA nas proporções de 2:1, 1:1 e 1:2, em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por 11 semanas, obtiveram menores concentrações séricas de TNF na maior proporção de DHA, menor concentração de IL-6 na maior proporção de EPA e expressão de genes lipogênicos semelhante entre as proporções. Em outra pesquisa, obtiveram que, em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, por 10 semanas, a substituição de lipídeos da ração em 3,2% com DHA melhorou parâmetros inflamatórios e fibrose tanto no fígado quanto músculo esquelético e a suplementação com a mesma quantidade de EPA foi mais eficaz em aumentar oxidação lipídica hepática (KUNZ *et al.*, 2019). Já Guo e colaboradores (2017) também avaliaram os efeitos da suplementação de 1% de EPA ou DHA sobre fatores de risco cardio-metabólicos em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por 6 semanas e observaram que todos os tratamentos reduziram a gordura hepática e glicose sérica, mas a suplementação com DHA foi mais eficaz em reduzir níveis séricos de adiponectina e alanina aminotransferase (ALT).

Um possível mecanismo que justifica os efeitos distintos do EPA e DHA em doses ou tecidos diferentes pode ser pelo estímulo de maior ou menor produção de eicosanoides. Norris (2012), em um estudo *in vitro* observou que as células suplementadas com EPA produziram níveis mais altos de ciclo oxigenases (COX), como prostaglandinas e prostaciclina da série 3 do que células controle, já células suplementadas com DHA foram mais eficazes em reduzir eicosanoides derivados de ácido araquidônico como prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos da série 2, sendo uma possível justificativa para os diferentes efeitos que observamos entre os tratamentos.

Contudo, em nosso estudo concluímos que os tratamentos com os subprodutos do ômega 3: EPA e DHA, em diferentes proporções, foram mais eficazes em tratar os danos metabólicos ocasionado pela ingestão de uma dieta hiperlipídica do que o tratamento com o óleo de linhaça, tanto no tecido hepático quanto no tecido adiposo, levando a um perfil metabólico mais favorável observado pelo menor acúmulo de gordura hepática e deposição de material fibrótico, modulação da expressão de genes que exercem uma importante regulação do metabolismo lipídico e remodelamento do tecido adiposo.

Assim, diante dos resultados apresentados neste trabalho podemos fazer as seguintes proposições: EPA e DHA foram eficazes em reduzir a glicemia, induzir um remodelamento

favorável do tecido adiposo, reduzir a deposição de gordura hepática através da regulação da expressão gênica tanto do fator de transcrição SREBP-1 e PPAR- $\alpha$  (pelo EPA) quanto das enzimas ACC, FAS e CPT, o que favoreceu o menor recrutamento de TNF, refletido em sua concentração sérica. No tecido hepático, essa regulação da expressão gênica de enzimas lipogênicas levou a uma menor biossíntese e deposição de gordura hepática, refletido na concentração de triglicérides (pelo EPA) e graus de macro e microesteatose (por ambos tratamentos) e ainda, pela eficaz absorção de EPA e DHA, que garantiu uma menor relação  $\omega$ -6/ $\omega$ -3, prevalecendo no tecido a ativação das vias anti-inflamatórias, o que permitiu uma menor deposição de colágeno e uma tentativa de regeneração tecidual, observado pela binucleação hepática. Em razão de uma menor lipogênese hepática, houve também menor demanda para deposição de gordura no tecido adiposo, refletido pelo menor peso de gordura extraído do tecido adiposo (pelo EPA). Apesar da menor taxa de absorção tecidual, a redução da razão  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 também favoreceu as vias anti-inflamatórias no tecido adiposo, o que levou também ao menor recrutamento da adipocina pró inflamatória MCP-1 (pelo DHA) e isso permitiu ao tecido promover a formação de mais adipócitos com menor quantidade de gordura (razão área/número de adipócitos) por todos os tratamentos, assim como menor deposição de colágenos tipo I e III pelo EPA e DHA. No coração, o DHA foi mais eficaz visto que, apesar de todos os tratamentos terem levado ao aumento da espessura dos cardiomiócitos, apenas este tratamento reduziu a contagem de células inflamatórias no tecido.

## 6.1 Sumário dos resultados

A dieta hiperlipídica ofertada em longo prazo induziu hiperglicemia, hipertensão, redução da sensibilidade à insulina, maior acúmulo de gordura ectópica no fígado e maior concentração de colesterol total no tecido adiposo.

Os tratamentos realizados com óleo de linhaça, EPA e DHA em diferentes proporções, apresentaram respostas metabólicas variadas, sugerindo efeitos tecidos-específicos.

Todos os tratamentos foram eficazes em reduzir a deposição de colágeno tipo III hepático; reduzir a proporção de  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 no fígado e tecido adiposo; levar à uma menor proporção da área pelo número de adipócitos, reduzir a expressão gênica das enzimas ACC e FAS e aumentar a expressão da CPT1.

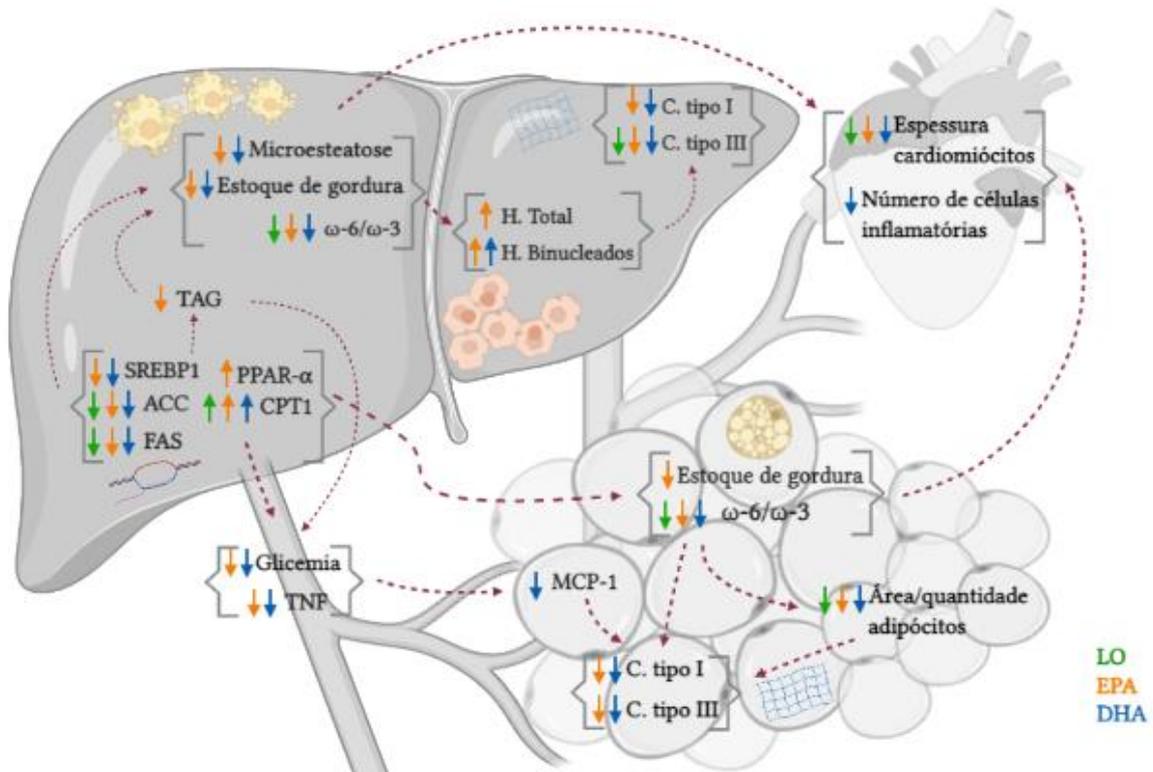
Os tratamentos com EPA e DHA foram eficazes em reduzir a glicemia e concentração sérica de TNF; reduzir a quantidade de gordura do fígado; aumentar a binucleação hepática, reduzir o grau de microesteatose e de deposição de colágeno tipo I no fígado; reduzir a deposição dos colágenos tipos I e III no tecido adiposo e reduzir a expressão gênica do fator

de transcrição SREBP.

O tratamento com EPA em maior proporção foi mais eficaz em reduzir a área dos adipócitos, a concentração triglicérides hepático, o peso da gordura do tecido adiposo e aumentar a expressão gênica do PPAR- $\alpha$ .

O tratamento com DHA em maior proporção foi mais eficiente em reduzir a concentração de MCP1 no tecido adiposo; reduzir a presença de células inflamatórias no tecido cardíaco e espessura dos cardiomiócitos.

**Figura 20.** Resumo gráfico dos resultados encontrados sobre os efeitos metabólicos dos tratamentos e mecanismos propostos.



LO: grupo óleo de linhaça; EPA: grupo EPA; DHA: grupo DHA; SREBP: Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol; ACC: Acetil-CoA carboxilase; FAS: Ácido graxo sintase; PPAR- $\alpha$ : receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alpha; CPT1: carnitina palmitoiltransferase 1; ACOX-1: acil-CoA oxidase 1; TAG: triglicérides; H.: hepatócitos; C.: colágeno; TNF: fator de necrose tumoral; MCP-1: proteína quimioatraente de monócitos-1.

## 7. CONCLUSÃO

Dessa forma, concluímos que EPA e DHA foram mais eficazes do que o óleo de linhaça no tratamento dos agravos metabólicos ocasionados pela ingestão crônica de uma dieta hiperlipídica.

## REFERÊNCIAS

ABD EL-AAL, Y.A.; ABDEL-FATTAH, D. M.; AHMED, K. E.D. Some biochemical studies on trans fatty acid-containing diet. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, v. 13, n. 3, p. 1753-1757, 2019.

ABEDI, E.; SAHARI, M. A. Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. *Food science & nutrition*, v. 2, n. 5, p. 443-463, 2014.

AEBI, H. Catalase in vitro. In: *Methods in enzymology*. Academic Press, . p. 121-126, 1984.

AILHAUD, G.; GUESNET, P. Fatty acid composition of fats is an early determinant of childhood obesity: a short review and an opinion. *Obesity reviews*, v. 5, n. 1, p. 21-26, 2004.

AKAGI, S. *et al.* Prostaglandin I<sub>2</sub> induces apoptosis via upregulation of Fas ligand in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *International journal of cardiology*, v. 165, n. 3, p. 499-505, 2013.

ALZAIM, I. *et al.* Adipose tissue immunomodulation: a novel therapeutic approach in cardiovascular and metabolic diseases. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, v. 7, p. 277, 2020.

AMIRI, M. *et al.* The effects of Canola oil on cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis with dose-response analysis of controlled clinical trials. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, v. 30, n. 12, p. 2133-2145, 2020.

AMOS, D.; COOK, C.; SANTANAM, N. Omega 3 rich diet modulates energy metabolism via GPR120-Nrf2 crosstalk in a novel antioxidant mouse model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1864, n. 4, p. 466-488, 2019.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 360: Aprova regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Brasília., 23 de dezembro 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO – RDC Nº 332, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019 – ANVISA. Define os requisitos para uso de gorduras trans

industriais em alimentos. DOU nº 249, de 26 de dezembro de 2019.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Rotulagem nutricional de alimentos. Proposta de RDC e IN. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: [https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/aprovada-norma-sobre-rotulagem-nutricional/apresentacao-rotulagem-nutricional\\_19a.pdf](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/aprovada-norma-sobre-rotulagem-nutricional/apresentacao-rotulagem-nutricional_19a.pdf)

ANTUNES, M. M. *et al.* Chronic ingestion of Primex-Z, compared with other common fat sources, drives worse liver injury and enhanced susceptibility to bacterial infections. *Nutrition*, v. 81, p. 110938, 2020.

ARENDRT, B. M. *et al.* Altered hepatic gene expression in nonalcoholic fatty liver disease is associated with lower hepatic n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Hepatology*, v. 61, n. 5, p. 1565-1578, 2015.

ARTERBURN, L. M.; HALL, E. B.; OKEN, H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *The American journal of clinical nutrition*, v. 83, n. 6, p. 1467S-1476S, 2006.

BAKER, E. J. *et al.* Metabolism and functional effects of plant-derived omega-3 fatty acids in humans. *Progress in Lipid Research*, v. 64, p. 30-56, 2016.

BALK, E. M. *et al.* Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review. *Atherosclerosis*, v. 189, n. 1, p. 19-30, 2006.

BALVERS, M. G. J. *et al.* Docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid are converted by 3T3-L1 adipocytes to N-acyl ethanolamines with anti-inflammatory properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1801, n. 10, p. 1107-1114, 2010.

BARBALHO, S. M. *et al.* Papel dos ácidos graxos ômega 3 na resolução dos processos inflamatórios. *Medicina (Ribeirão Preto. Online)*, v. 44, n. 3, p. 234-240, 2011.

BARCELÓ-COBLIJN, G.; MURPHY, E. J. 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. *Progress in lipid research*, v. 48, n. 6, p. 355-374, 2009.

- BARDEN, A. E.; MAS, E.; MORI, Trevor A. n-3 Fatty acid supplementation and proresolving mediators of inflammation. *Current opinion in lipidology*, v. 27, n. 1, p. 26-32, 2016.
- BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, v. 115, n. 2, p. 209-218, 2005.
- BAZINET, R. P.; LAYÉ, S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 15, n. 12, p. 771-785, 2014.
- BELURY, M. A. *et al.* Linoleic acid, glycemic control and Type 2 diabetes. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 132, p. 30-33, 2018.
- BEPPU, F. *et al.* Dietary starfish oil prevents hepatic steatosis and hyperlipidemia in C57BL/6N mice fed high-fat diet. *Journal of Oleo Science*, v. 66, n. 7, p. 761-769, 2017.
- BERGE, K. *et al.* Chronic treatment with krill powder reduces plasma triglyceride and anandamide levels in mildly obese men. *Lipids in health and disease*, v. 12, n. 1, p. 78, 2013.
- BHATT, D. L. *et al.* Cardiovascular risk reduction with icosapent ethyl for hypertriglyceridemia. *New England Journal of Medicine*, v. 380, n. 1, p. 11-22, 2019.
- BILINSKI, K. *et al.* Effect of omega-3 supplementation on the omega-3 blood index and fatty acid biomarkers in healthy individuals. *Advances in Integrative Medicine*, v. 7, n. 1, p. 23-28, 2020.
- BINDRA, J. *Prostaglandin synthesis*. Elsevier, 2012.
- BRENNA, J. T. *et al.*  $\alpha$ -Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, v. 80, n. 2-3, p. 85-91, 2009.
- BROSTOW, D. P. *et al.* Omega-3 fatty acids and incident type 2 diabetes: the Singapore Chinese Health Study. *The American journal of clinical nutrition*, v. 94, n. 2, p. 520-526, 2011.
- BROUWER, I. A. *et al.* Effect of trans-fatty acid intake on blood lipids and lipoproteins: a systematic review and meta-regression analysis. 2016.

BUETTNER, R.; SCHÖLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*, v. 15, n. 4, p. 798-808, 2007.

BURDGE, G. C.; WOOTTON, S. A. Conversion of  $\alpha$ -linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *British Journal of Nutrition*, v. 88, n. 4, p. 411-420, 2002.

CALDER, P. C. n-3 fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 72, n. 3, p. 326-336, 2013.

CALDER, P. C. Functional roles of fatty acids and their effects on human health. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, v. 39, p. 18S-32S, 2015.

CALDER, P. C. Docosahexaenoic acid. *Annals of Nutrition and Metabolism*, v. 69, n. Suppl. 1, p. 8-21, 2016.

CALDER, P. C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochemical Society Transactions*, v. 45, n. 5, p. 1105-1115, 2017.

CARMIEL-HAGGAI, M.; CEDERBAUM, A. I.; NIETO, N. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *The FASEB Journal*, v. 19, n. 1, p. 136-138, 2005.

CAVENDISH, T. A. *et al.* Composição de ácidos graxos de margarinas à base de gordura hidrogenada ou interesterificada. *Food Science and Technology*, v. 30, n. 1, p. 138-142, 2010.

CHACIŃSKA, M. *et al.* The Impact of omega-3 fatty acids supplementation on insulin resistance and content of adipocytokines and biologically active lipids in adipose tissue of high-fat diet fed rats. *Nutrients*, v. 11, n. 4, p. 835, 2019.

CHAPMAN, M. J. *et al.* Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. *European heart journal*, v. 32, n. 11, p. 1345-1361, 2011.

CHARDIGNY, J. M.; BRETILLON, L.; SÉBÉDIO, J. L. New insights in health effects of trans  $\alpha$ -linolenic acid isomers in humans. *European journal of lipid science and technology*, v. 103, n. 7, p. 478-482, 2001.

CINTI, S. *et al.* Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of lipid research*, v. 46, n. 11, p. 2347-2355, 2005.

COELHO, O. G. L. *et al.* Polyunsaturated fatty acids and type 2 diabetes: impact on the glycemic control mechanism. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 57, n. 17, p. 3614-3619, 2017.

COLEMAN, R. Picrosirius red staining revisited. *Acta histochemica*, v. 3, n. 113, p. 231-233, 2011.

CONTRERAS, A. V., TORRES, N., TOVAR, A. R. PPAR- $\alpha$  as a key nutritional and environmental sensor for metabolic adaptation. *Advances in nutrition*, 4(4), 439-452; 2013.

COSTA, A. G. V.; BRESSAN, J.; SABARENSE, C. M. Ácidos graxos trans: alimentos e efeitos na saúde. *Archivos Latinoamericanos de nutrición*, v. 56, n. 1, p. 12-21, 2006.

CURIONI, C. C.; ALVES, N. N. R.; ZAGO, L. Omega-3 supplementation in the treatment of overweight and obese children and adolescents: A systematic review. *Journal of Functional Foods*, v. 52, p. 340-347, 2019.

DANCYGIER, H. The liver as an immune organ. In: *Clinical Hepatology*. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 141-152, 2010.

DANGARDT, F. *et al.* Omega-3 fatty acid supplementation improves vascular function and reduces inflammation in obese adolescents. *Atherosclerosis*, v. 212, n. 2, p. 580-585, 2010.

DANNESKIOLD S. N. B. *et al.* Overexpression of cyclooxygenase-2 in adipocytes reduces fat accumulation in inguinal white adipose tissue and hepatic steatosis in high-fat fed mice. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.

DAS, U. N. Essential fatty acids-a review. *Current pharmaceutical biotechnology*, v. 7, n. 6, p. 467-482, 2006.

DAS, U. N. “Cell Membrane Theory of Senescence” and the Role of Bioactive Lipids in Aging, and Aging Associated Diseases and Their Therapeutic Implications. *Biomolecules*, v. 11, n. 2, p. 241, 2021.

DAVIDSON, M. H. Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. *The American journal of cardiology*, v. 98, n. 4, p. 27-33, 2006.

DE LA ROCHA, C. *et al.* Associations between whole peripheral blood fatty acids and DNA methylation in humans. *Scientific reports*, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.

DE MELLO, A. H. *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids have beneficial effects on visceral fat in diet-induced obesity model. *Biochemistry and Cell Biology*, v. 97, n. 6, p. 693-701, 2019.

DE MIRANDA, R. C. *et al.* Consumption of ultra-processed foods and non-communicable disease-related nutrient profile in Portuguese adults and elderly (2015–2016): the UPPER project. *British Journal of Nutrition*, p. 1-11, 2020.

DE SOUZA, R. J. *et al.* Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Bmj*, v. 351, p. h3978, 2015.

DELPINO, Felipe Mendes *et al.* Omega-3 supplementation and diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, p. 1-14, 2021.

DENG, X.; Dong, Q.; Bridges, D.; Raghov, R.; Park, E.A.; Elam, M.B. Docosahexaenoic acid inhibits proteolytic processing of sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) via activation of AMP-activated kinase. *Biochim. Biophys. Acta*. 1851(12), 1521-1529. 2015.

DESSÌ, M. *et al.* Atherosclerosis, dyslipidemia, and inflammation: the significant role of polyunsaturated fatty acids. v. 2013, 2013.

DUWAERTS, C. C.; MAHER, J. J. Macronutrients and the adipose-liver axis in obesity and fatty liver. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, v. 7, n. 4, p. 749-761, 2019.

ECHEVERRÍA, F.; Ortiz, M.; Valenzuela, R.; Videla, L.A. Long-chain polyunsaturated fatty acids regulation of PPARs, signaling: relationship to tissue development and aging. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 2016, 114, 28-34, 2016.

EL KHOURY, D.; GOFF, H. D.; ANDERSON, G. H. The role of alginates in regulation of food intake and glycemia: a gastroenterological perspective. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 55, n. 10, p. 1406-1424, 2015.

ELAGIZI, A. *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular health: a comprehensive review. *Progress in cardiovascular diseases*, v. 61, n. 1, p. 76-85, 2018.

ELAGIZI, A. *et al.* An update on omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular health. *Nutrients*, v. 13, n. 1, p. 204, 2021.

ERDOGAN, H. *et al.* Effect of fish oil supplementation on plasma oxidant/antioxidant status in rats. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, v. 71, n. 3, p. 149-152, 2004.

ESKELINEN, M. H. *et al.* Fat intake at midlife and cognitive impairment later in life: a population-based CAIDE study. *International Journal of Geriatric Psychiatry: A journal of the psychiatry of late life and allied sciences*, v. 23, n. 7, p. 741-747, 2008.

FAMUREWA, A. C. *et al.* Dietary supplementation with virgin coconut oil improves lipid profile and hepatic antioxidant status and has potential benefits on cardiovascular risk indices in normal rats. *Journal of dietary supplements*, v. 15, n. 3, p. 330-342, 2018.

FARDET, A. Minimally processed foods are more satiating and less hyperglycemic than ultra-processed foods: a preliminary study with 98 ready-to-eat foods. *Food & function*, v. 7, n. 5, p. 2338-2346, 2016.

FARMER, S. R. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell metabolism*, v. 4, n. 4, p. 263-273, 2006.

FERLAY, A. *et al.* Production of trans and conjugated fatty acids in dairy ruminants and their putative effects on human health: A review. *Biochimie*, v. 141, p. 107-120, 2017.

FERRE, P., FOUFELLE, F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes, obesity and metabolism*; 12, 83-92; 2010.

FINUCANE, O. M. *et al.* Monounsaturated fatty acid-enriched high-fat diets impede adipose NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 $\beta$  secretion and insulin resistance despite obesity. *Diabetes*, v. 64, n. 6, p. 2116-2128, 2015.

FIOLET, T. *et al.* Consumption of ultra-processed foods and cancer risk: results from NutriNet-Santé prospective cohort. *bmj*, v. 360, 2018.

FLACHS, P. *et al.* Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia*, v. 49, n. 2, p. 394-397, 2006.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FONTANA, P. *et al.* Antiplatelet therapy: Targeting the TxA<sub>2</sub> pathway. *Journal of cardiovascular translational research*, v. 7, n. 1, p. 29-38, 2014.

FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*, v. 134, n. 6, p. 1655-1669, 2008.

FURMAN, D. *et al.* Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature medicine*, v. 25, n. 12, p. 1822-1832, 2019.

GAO, M.; MA, Y.; LIU, D. High-fat diet-induced adiposity, adipose inflammation, hepatic steatosis and hyperinsulinemia in outbred CD-1 mice. *PloS one*, v. 10, n. 3, p. e0119784, 2015.

GARCÍA-ESCOBAR, E. *et al.* Dietary fatty acids modulate adipocyte TNF $\alpha$  production via regulation of its DNA promoter methylation levels. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 47, p. 106-112, 2017.

GARRIDO, A. *et al.* Ingestion of high doses of fish oil increases the susceptibility of cellular membranes to the induction of oxidative stress. *Lipids*, v. 24, n. 9, p. 833-835, 1989.

GEBAUER, S. K.; PSOTA, T. L.; KRIS-ETHERTON, P. M. The diversity of health effects of individual trans fatty acid isomers. *Lipids*, v. 42, n. 9, p. 787-799, 2007.

GELEIJNSE, J. M. *et al.* Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials: LWW 2002.

GENTILE, C. L. *et al.* The role of visceral and subcutaneous adipose tissue fatty acid composition in liver pathophysiology associated with NAFLD. *Adipocyte*, v. 4, n. 2, p. 101-

112, 2015.

GERLYNG, P. *et al.* Binucleation and polyploidization patterns in developmental and regenerative rat liver growth. *Cell proliferation*, v. 26, n. 6, p. 557-565, 1993.

GHANDOUR, R. A. *et al.* Impact of dietary  $\omega$ 3 polyunsaturated fatty acid supplementation on brown and white adipocyte function. *Journal of lipid research*, v. 59, n. 3, p. 452-461, 2018.

GIORDANO, A. *et al.* Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis. *Journal of lipid research*, v. 54, n. 9, p. 2423-2436, 2013.

GOH, Y. K. *et al.* Effect of  $\omega$ 3 fatty acid on plasma lipids, cholesterol and lipoprotein fatty acid content in NIDDM patients. *Diabetologia*, v. 40, n. 1, p. 45-52, 1997.

GOMES, P. M. *et al.* Supplementation of  $\alpha$ -linolenic acid improves serum adiponectin levels and insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *Nutrition*, v. 31, n. 6, p. 853-857, 2015.

GOMES, S. V. *et al.* Different source of commercial vegetable oils may regulate metabolic, inflammatory and redox status in healthy rats. *Journal of Functional Foods*, v. 66, p. 103780, 2020.

GÓMEZ; C. C.; LÓPEZ, L. M. A.; KOHEN, V. L. Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health. *Nutritional recommendations. Nutricion hospitalaria*, v. 26, n. 2, p. 323-329, 2011.

GONZALEZ-BECERRA, K. *et al.* Fatty acids, epigenetic mechanisms and chronic diseases: a systematic review. *Lipids in health and disease*, v. 18, n. 1, p. 178, 2019.

GOUPIL, E. *et al.* Angiotensin II type I and prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  receptors cooperatively modulate signaling in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 5, p. 3137-3148, 2015.

GRYNBERG, A. Hypertension prevention: from nutrients to (fortified) foods to dietary patterns. Focus on fatty acids. *Journal of human hypertension*, v. 19, n. 3, p. S25-S33, 2005.

GUO, X. F. *et al.* n-3 polyunsaturated fatty acids and metabolic syndrome risk: A meta-analysis. *Nutrients* v. 9, n. 7, p. 703, 2017.

GUPTA, S. *et al.* Picrosirius red: a better polarizing stain. *Journal of Histotechnology*, v. 40, n. 2, p. 46-53, 2017.

HA, Y. C.; BARTER, P. J. Differences in plasma cholesteryl ester transfer activity in sixteen vertebrate species. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, v. 71, n. 2, p. 265-269, 1982.

HALBERG, N. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Molecular and cellular biology*, 29(16), 4467-4483, 2009.

HARRIS, H. S. n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *The American journal of clinical nutrition* v. 65, n. 5, p. 1645S-1654S, 1997.

HARRIS, W. S. *et al.* Omega-6 fatty acids and risk for cardiovascular disease: a science advisory from the American Heart Association Nutrition Subcommittee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Epidemiology and Prevention. v. 119, n. 6, p. 902-907, 2009.

HARTWEG, J. *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database* n. 1, 2008.

HAWCROFT, G. *et al.* Effect of Eicosapentaenoic Acid on E-type Prostaglandin Synthesis and EP4 Receptor Signaling Human Colorectal Cancer Cells. *Neoplasia*, v. 12, n. 8, p. 618-627, 2010.

HEGDE, S. *et al.*  $\Delta$ 12-prostaglandin J3, an omega-3 fatty acid-derived metabolite, selectively ablates leukemia stem cells in mice. *Blood*, v. 118, n. 26, p. 6909-6919, 2011.

HILGENDORF, K. I. *et al.* Omega-3 fatty acids activate ciliary FFAR4 to control adipogenesis. *Cell*, v. 179, n. 6, p. 1289-1305. e21, 2019.

HIRABARA, S. M. *et al.* Fish oil supplementation for two generations increases insulin sensitivity in rats. *The Journal of nutritional biochemistry* v. 24, n. 6, p. 1136-1145, 2013.

HIRATA, Y. *et al.* trans-Fatty acids promote proinflammatory signaling and cell death by stimulating the apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-p38 pathway. *Journal of Biological Chemistry*, v. 292, n. 20, p. 8174-8185, 2017.

HOWE, P. *et al.* Dietary intake of long-chain  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids: contribution of meat sources. *Nutrition*, v. 22, n. 1, p. 47-53, 2006.

HU, Y.; HU, F. B.; MANSON, J. E. Marine omega-3 supplementation and cardiovascular disease: an updated meta-analysis of 13 randomized controlled trials involving 127 477 participants. *Journal of the American Heart Association*, v. 8, n. 19, p. e013543, 2019.

HUNG, W. L. *et al.* Endogenous formation of trans fatty acids: Health implications and potential dietary intervention. *Journal of Functional Foods*, v. 25, p. 14-24, 2016.

INNES, J. K.; CALDER, P. C. Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 132, p. 41-48, 2018.

ILLESCA, P. *et al.* The metabolic dysfunction of white adipose tissue induced in mice by a high-fat diet is abrogated by co-administration of docosahexaenoic acid and hydroxytyrosol. *Food & Function*, v. 11, n. 10, p. 9086-9102, 2020.

INNES, J. K.; CALDER, P. C. Marine omega-3 (n-3) fatty acids for cardiovascular health: an update for 2020. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 4, p. 1362, 2020.

IZAR, M. C. O. *et al.* Posicionamento sobre o Consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular–2021. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 116, p. 160-212, 2021.

JACOBSON, T. A. Role of n–3 fatty acids in the treatment of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition* v. 87, n. 6, p. 1981S-1990S, 2008.

JALILI, M.; HEKMATDOOST, A. Dietary n-3 fatty acids and their influence on inflammation via toll-like receptor pathways. *Nutrition*, p. 111070, 2020.

JANCZYK, W. *et al.* Omega-3 Fatty acids therapy in children with nonalcoholic Fatty liver disease: a randomized controlled trial. *The Journal of pediatrics*, v. 166, n. 6, p. 1358-1363. e3, 2015.

JERNÅS, M. *et al.* Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *The FASEB Journal*, v. 20, n. 9, p. 1540-1542, 2006.

JOHNSTON, P. V.; JOHNSON, O. C.; KUMMEROW, F. A. Occurrence of trans fatty acids in human tissue. *Science*, v. 126, n. 3276, p. 698-699, 1957.

JOVANOVSKI, E. *et al.* The effect of alpha-linolenic acid on glycemic control in individuals with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Medicine* v. 96, n. 21, 2017.

JUÁREZ-LÓPEZ, C. *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids reduce insulin resistance and triglycerides in obese children and adolescents. *Pediatric diabetes*, v. 14, n. 5, p. 377-383, 2013.

KAIN, V. *et al.* Resolvin D1 activates the inflammation resolving response at splenic and ventricular site following myocardial infarction leading to improved ventricular function. *Journal of molecular and cellular cardiology*, v. 84, p. 24-35, 2015.

KALINSKI, P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *The Journal of Immunology* v. 188, n. 1, p. 21-28, 2012.

KARSDAL, M. A. *et al.* Fibrogenesis assessed by serological type III collagen formation identifies patients with progressive liver fibrosis and responders to a potential antifibrotic therapy. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2016.

KHALFOUN, B. *et al.* Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6. *Advances in experimental medicine and biology*, v. 400, p. 589, 1997.

KHANDOUZI, N.; ZAHEDMEHR, A.; NASROLLAHZADEH, J. Effects of canola or olive oil on plasma lipids, lipoprotein-associated phospholipase A 2 and inflammatory cytokines in patients referred for coronary angiography. *Lipids in health and disease*, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2020.

KIM, E. H. *et al.* Endogenously synthesized n-3 polyunsaturated fatty acids in fat-1 mice ameliorate high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Biochemical pharmacology*, v. 84, n. 10, p. 1359-1365, 2012.

KIM, N. *et al.* Eicosapentaenoic Acid (EPA) Modulates Glucose Metabolism by Targeting AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Pathway. *International journal of molecular*

sciences, v. 20, n. 19, p. 4751, 2019.

KJELDAHL, J. G. C. T. Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen körpern. Zeitschrift für analytische Chemie, v. 22, n. 1, p. 366-382, 1883.

KLEINER, D. E. *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology, v. 41, n. 6, p. 1313-1321, 2005.

KOZŁOWSKA, M. *et al.* Fatty acids and sterols composition, and antioxidant activity of oils extracted from plant seeds. Food chemistry, v. 213, p. 450-456, 2016.

KUHNT, K. *et al.* Evaluation of the impact of ruminant trans fatty acids on human health: important aspects to consider. v. 56, n. 12, p. 1964-1980, 2016.

KUMMEROW, F. A. *et al.* Effects of trans fats on prostacyclin production. Scandinavian Cardiovascular Journal, v. 47, n. 6, p. 377-382, 2013.

KUNZ, H. E.; DASARI, S.; LANZA, I. R. EPA and DHA elicit distinct transcriptional responses to high-fat feeding in skeletal muscle and liver. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, v. 317, n. 3, p. E460-E472, 2019.

LÄMMERMANN, T. *et al.* Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo. Nature, v. 498, n. 7454, p. 371-375, 2013.

LANDS, B. A critique of paradoxes in current advice on dietary lipids. Progress in lipid research, v. 47, n. 2, p. 77-106, 2008.

LAPOINTE, J. F. *et al.* Evaluation of OM3-PL/FFA Pharmacokinetics After Single and Multiple Oral Doses in Healthy Volunteers. Clinical therapeutics, v. 41, n. 12, p. 2500-2516, 2019.

LEE, M. J. Transforming growth factor beta superfamily regulation of adipose tissue biology in obesity. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, v. 1864, n. 4, p. 1160-1171, 2018.

LEE, M. O. Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. American journal of physiology-legacy content, v. 89, n. 1, p. 24-33, 1929.

LI, C. *et al.* Peer Reviewed: Global Surveillance of trans-Fatty Acids. Preventing Chronic Disease, v. 16, 2019.

LI, X. *et al.* Therapeutic potential of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids in human autoimmune diseases. *Frontiers in Immunology*, v. 10, 2019.

LI, Y.H. *et al.* Efficacy of poly-unsaturated fatty acid therapy on patients with nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, v. 21, n. 22, p. 7008, 2015.

LICHTENSTEIN, A. H. Dietary trans fatty acids and cardiovascular disease risk: past and present. *Current atherosclerosis reports*, v. 16, n. 8, p. 433, 2014.

LIDA, H. M. D N. *et al.* TAG composition and solid fat content of palm oil, sunflower oil, and palm kernel olein blends before and after chemical interesterification. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 79, n. 11, p. 1137-1144, 2002.

LIU, X. *et al.* Eicosapentaenoic acid-enriched phospholipid ameliorates insulin resistance and lipid metabolism in diet-induced-obese mice. *Lipids in health and disease*, v. 12, n. 1, p. 109, 2013.

LO, C. J. *et al.* Fish oil decreases macrophage tumor necrosis factor gene transcription by altering the NF $\kappa$ B activity. *Journal of Surgical Research*, v. 82, n. 2, p. 216-221, 1999.

LOTTENBERG, A. M. *et al.* The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. *The Journal of nutritional biochemistry*, v. 23, n. 9, p. 1027-1040, 2012.

LOUZADA, M. L. D. C. *et al.* Consumption of ultra-processed foods and obesity in Brazilian adolescents and adults. *Preventive medicine*, v. 81, p. 9-15, 2015.

LOUZADA, M. L. D. C. *et al.* The share of ultra-processed foods determines the overall nutritional quality of diets in Brazil. *Public health nutrition*, v. 21, n. 1, p. 94-102, 2018.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, D.; HAN, C.; WU, T. 15-PGDH inhibits hepatocellular carcinoma growth through 15-keto-PGE<sub>2</sub>/PPAR $\gamma$ -mediated activation of p21 WAF1/Cip1. *Oncogene*, v. 33, n. 9, p. 1101-1112, 2014.

MA, Y. *et al.* Effects of walnut consumption on endothelial function in type 2 diabetic subjects: a randomized controlled crossover trial. *Diabetes care*, v. 33, n. 2, p. 227-232, 2010.

MANTOVANI, A. Plasma trans-fatty acid and risk of nonalcoholic fatty liver disease: New data from National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *International journal of cardiology*, v. 272, p. 329-330, 2018.

MARCELIN, G.; CHUA, J. R.. Contributions of adipocyte lipid metabolism to body fat content and implications for the treatment of obesity. *Current opinion in pharmacology*, v. 10, n. 5, p. 588-593, 2010.

MARKLUND, S. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MARTIN, C. A. *et al.* Trans fatty acid content of Brazilian biscuits. *Food Chemistry*, v. 93, n. 3, p. 445-448, 2005.

MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, L. *et al.* Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome. *Prostaglandins & other lipid mediators*, v. 121, p. 24-41, 2015.

MASOODI, M. *et al.* Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1851, n. 4, p. 503-518, 2015.

MATTHEWS, D. R. *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, v. 28, n. 7, p. 412-419, 1985.

MAYYAS, F.; ALZOUBI, K. H.; AL-TALEB, Z. Impact of high fat/high salt diet on myocardial oxidative stress. *Clinical and Experimental Hypertension*, v. 39, n. 2, p. 126-132, 2017.

MAZIDI, M. *et al.* Ideal cardiovascular health associated with fatty liver: results from a multi-ethnic survey. *Atherosclerosis*, v. 284, p. 129-135, 2019.

MCEVER, R. P. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovascular research*, v. 107, n. 3, p. 331-339, 2015.

MELO, B. F. *et al.* Evaluating the impact of different hypercaloric diets on weight gain, insulin resistance, glucose intolerance, and its comorbidities in rats. *Nutrients*, v. 11, n. 6, p. 1197, 2019.

MELO, E. A.; JAIME, P. C.; MONTEIRO, C. A. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed., 1. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014.

MENDONÇA, R. *et al.* Ultra-processed food consumption and the incidence of hypertension in a Mediterranean cohort: the Seguimiento Universidad de Navarra Project. *American Journal of Hypertension*, v. 30, n. 4, p. 358-366, 2017.

MENSINK, R. P.; KATAN, M. B. Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *New England Journal of Medicine*, v. 323, n. 7, p. 439-445, 1990.

MEURER, S. K.; KARSDAL, M. A.; WEISKIRCHEN, R. Advances in the clinical use of collagen as biomarker of liver fibrosis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, v. 20, n. 9, p. 947-969, 2020.

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

MICHA, R.; MOZAFFARIAN, D. Trans fatty acids: effects on metabolic syndrome, heart disease and diabetes. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 5, n. 6, p. 335, 2009.

MILLER, M. *et al.* Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, v. 123, n. 20, p. 2292-2333, 2011.

- MOGHADASIAN, M. H. Advances in dietary enrichment with n-3 fatty acids. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 48, n. 5, p. 402-410, 2008.
- MONTEIRO, C. A. *et al.* Ultra-processed foods: what they are and how to identify them. *Public health nutrition*, v. 22, n. 5, p. 936-941, 2019.
- MORIMOTO, K. *et al.* Prostaglandin E2–EP3 signaling induces inflammatory swelling by mast cell activation. *The Journal of Immunology*, v. 192, n. 3, p. 1130-1137, 2014.
- MOZAFFARIAN, D.; CLARKE, R. Quantitative effects on cardiovascular risk factors and coronary heart disease risk of replacing partially hydrogenated vegetable oils with other fats and oils. *European journal of clinical nutrition*, v. 63, n. 2, p. S22-S33, 2009.
- MOZAFFARIAN, D.; WU, J. H. Y. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 58, n. 20, p. 2047-2067, 2011.
- MUIR, L. A. *et al.* Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: correlations with diabetes in human obesity. *Obesity*, v. 24, n. 3, p. 597-605, 2016.
- NETTLETON, J. A. *et al.* Dietary fatty acids: is it time to change the recommendations?. *annals of nutrition and metabolism*, v. 68, n. 4, p. 249-257, 2016.
- NISHIDA, C.; UAUY, R. WHO Scientific Update on health consequences of trans fatty acids: introduction. 2009.
- NORDGREN, T. M. *et al.* Maresin-1 reduces the pro-inflammatory response of bronchial epithelial cells to organic dust. *Respiratory research*, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2013.
- NORRIS, G. H. *et al.* Dietary sphingomyelin attenuates hepatic steatosis and adipose tissue inflammation in high-fat-diet-induced obese mice. *The Journal of nutritional biochemistry*, v. 40, p. 36-43, 2017.
- NORRIS, P. C.; DENNIS, E. A. Omega-3 fatty acids cause dramatic changes in TLR4 and purinergic eicosanoid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 22, p. 8517-8522, 2012.

NOVAK, T. E. *et al.* NF- $\kappa$ B inhibition by  $\omega$ -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF- $\alpha$  transcription. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 284, n. 1, p. L84-L89, 2003.

NOVELLI, E. L. B. *et al.* Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory animals*, v. 41, n. 1, p. 111-119, 2007.

NOVOTNY, K.; FRITZ, K.; PARMAR, M. Omega-3 Fatty Acids. *StatPearls*, 2021.

NOWAK, J. Z. Oxidative stress, polyunsaturated fatty acids-derived oxidation products and bisretinoids as potential inducers of CNS diseases: focus on age-related macular degeneration. *Pharmacological reports*, v. 65, n. 2, p. 288-304, 2013.

ODEGAARD, A. O.; PEREIRA, M. A. Trans fatty acids, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Nutrition reviews*, v. 64, n. 8, p. 364-372, 2006.

OHNISHI, H.; SAITO, Y. Eicosapentaenoic acid (EPA) reduces cardiovascular events: relationship with the EPA/arachidonic acid ratio. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, p. 18002, 2013.

ORTIZ, M. *et al.* Suppression of high-fat diet-induced obesity-associated liver mitochondrial dysfunction by docosahexaenoic acid and hydroxytyrosol co-administration. *Digestive and Liver Disease*, 52(8), 895-904; 2020.

OTENG, A. B.; KERSTEN, S. Mechanisms of action of trans fatty acids. *Advances in Nutrition*, v. 11, n. 3, p. 697-708, 2020.

OTENG, A. B. *et al.* Industrial Trans Fatty Acids Stimulate SREBP2-Mediated Cholesterologenesis and Promote Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Molecular nutrition & food research*, v. 63, n. 19, p. 1900385, 2019.

PAHWA, R.; JIALAL, I. Chronic inflammation. In: *StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)*; 2020.

PALMISANO, B. T. *et al.* Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism. *Molecular metabolism*, v. 15, p. 45-55, 2018.

PANCHAL, S. K. *et al.* High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and

cardiovascular remodeling in rats. *Journal of cardiovascular pharmacology*, v. 57, n. 1, p. 51-64, 2011.

PATTEN, A. R.; BROCARDO, P. S.; CHRISTIE, B. R. Omega-3 supplementation can restore glutathione levels and prevent oxidative damage caused by prenatal ethanol exposure. *The Journal of nutritional biochemistry*, v. 24, n. 5, p. 760-769, 2013.

PERFILYEV, A. *et al.* Impact of polyunsaturated and saturated fat overfeeding on the DNA-methylation pattern in human adipose tissue: a randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*, v. 105, n. 4, p. 991-1000, 2017.

PETRONI, M. L. *et al.* Management of non-alcoholic fatty liver disease. *bmj*, v. 372, 2021.

PILCHER, J. M. *Food in world history*. Taylor & Francis, 2017.

PISANI, D. F.; AMRI, E. Z.; AILHAUD, G. Disequilibrium of polyunsaturated fatty acids status and its dual effect in modulating adipose tissue development and functions. *Ocl*, v. 22, n. 4, p. D405, 2015.

PORRO, S. *et al.* Dysmetabolic adipose tissue in obesity: Morphological and functional characteristics of adipose stem cells and mature adipocytes in healthy and unhealthy obese subjects. *Journal of Endocrinological Investigation*, v. 44, n. 5, p. 921-941, 2021.

PRATO, E. *et al.* Bioactive fatty acids in seafood from Ionian Sea and relation to dietary recommendations. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, p. 1-13, 2020.

PUNIA, S. *et al.* Omega 3-metabolism, absorption, bioavailability and health benefits—A review. *PharmaNutrition*, v. 10, p. 100162, 2019.

RAFIEI, H., OMIDIAN, K., BANDY, B. Dietary polyphenols protect against oleic acid-induced steatosis in an in vitro model of NAFLD by modulating lipid metabolism and improving mitochondrial function. *Nutrients*, 11(3), 541; 2019.

RAUBER, F. *et al.* Consumption of ultra-processed food products and its effects on children's lipid profiles: a longitudinal study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, v. 25, n. 1, p. 116-122, 2015.

- REMYINGTON, J. P. Remington: a ciência e a prática da farmácia. Rio de Janeiro. 2004.
- REHUNEN, S. K., KAUTIAINEN, H., KORHONEN, P. E., ERIKSSON, J. G. A high lean body mass is not protecting from type 2 diabetes in the presence of a high body fat mass. *Diabetes & Metabolism*, 47(6), 101219; 2021.
- RHEE, J. J. *et al.* Fish consumption, omega-3 fatty acids, and risk of cardiovascular disease. *American journal of preventive medicine*, v. 52, n. 1, p. 10-19, 2017.
- RIBEIRO, A. P. B. *et al.* Interesterificação química: alternativa para obtenção de gorduras zero trans. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1295-1300, 2007.
- RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.
- RIEDIGER, N. D. *et al.* Low n-6: n-3 fatty acid ratio, with fish-or flaxseed oil, in a high fat diet improves plasma lipids and beneficially alters tissue fatty acid composition in mice. *European journal of nutrition*, v. 47, n. 3, p. 153-160, 2008.
- RISÉRUS, U. L. F.; WILLETT, W. C.; HU, F. B. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Progress in lipid research*, v. 48, n. 1, p. 44-51, 2009.
- RIZOS, Evangelos C. *et al.* Omega-3 supplementation and cardiovascular disease: formulation-based systematic review and meta-analysis with trial sequential analysis. *Heart*, v. 107, n. 2, p. 150-158, 2021.
- RODEHEFFER, M. S.; BIRSOY, K.; FRIEDMAN, J. M. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell*, v. 135, n. 2, p. 240-249, 2008.
- RONDANELLI, M. *et al.* Effects of two-months balanced diet in metabolically healthy obesity: lipid correlations with gender and BMI-related differences. *Lipids in health and disease*, v. 14, n. 1, p. 139, 2015.
- ROSSMEISL, M. *et al.* Metabolic effects of n-3 PUFA as phospholipids are superior to triglycerides in mice fed a high-fat diet: possible role of endocannabinoids. *PloS one*, v. 7, n. 6, p. e38834, 2012.

RYDÉN, M. *et al.* Adipose tissue and metabolic alterations: regional differences in fat cell size and number matter, but differently: a cross-sectional study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 99, n. 10, p. E1870-E1876, 2014.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance—A review. *Life sciences*, v. 203, p. 255-267, 2018.

SAKATA, D.; YAO, C.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E2, an immunoactivator. *Journal of pharmacological sciences*, p. 0912160328-0912160328, 2010.

SAMPATH, H.; NTAMBI, J. M. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *Nutrition reviews*, v. 62, n. 9, p. 333-339, 2004.

SANTOS, R. D. *et al.* I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 100, n. 1, p. 1-40, 2013.

SARAVANAN, P. *et al.* Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids. *The Lancet*, v. 376, n. 9740, p. 540-550, 2010.

SCHNAIDER, T. B. Ética e pesquisa. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 23, n. 1, p. 107-111, 2008.

SCHUCK, R. N. *et al.* Cytochrome P450-derived eicosanoids and vascular dysfunction in coronary artery disease patients. *Atherosclerosis*, v. 227, n. 2, p. 442-448, 2013.

SCORLETTI, E.; BYRNE, C. D. Omega-3 fatty acids and non-alcoholic fatty liver disease: Evidence of efficacy and mechanism of action. *Molecular aspects of medicine*, v. 64, p. 135-146, 2018.

SCORLETTI, E.; BYRNE, C. D. Omega-3 fatty acids, hepatic lipid metabolism, and nonalcoholic fatty liver disease. *Annual review of nutrition*, v. 33, p. 231-248, 2013.

SEKI, H.; TANI, Y.; ARITA, M. Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvin E1. *Prostaglandins & other lipid mediators*, v. 89, n. 3-4, p. 126-130, 2009.

SENATOROV, I. S. *et al.* Carboxy-terminal phosphoregulation of the long splice isoform of Free-Fatty Acid Receptor-4 mediates  $\beta$ -arrestin recruitment and signaling to ERK1/2. *Molecular Pharmacology*, v. 97, n. 5, p. 304-313, 2020.

SERHAN, C. N. *et al.* Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. *The FASEB Journal*, v. 26, n. 4, p. 1755-1765, 2012.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *British journal of pharmacology*, v. 153, n. S1, p. S200-S215, 2008.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and their health benefits. *Annual review of food science and technology*, v. 9, p. 345-381, 2018.

SHANG, T. *et al.* Protective effects of various ratios of DHA/EPA supplementation on high-fat diet-induced liver damage in mice. *Lipids in health and disease*, v. 16, n. 1, p. 65, 2017.

SILVA, P. F. *et al.* Fatty acids consumption: The role metabolic aspects involved in obesity and its associated disorders. *Nutrients*, v. 9, n. 10, p. 1158, 2017.

SIMOPOULOS, A. P. An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients*, v. 8, n. 3, p. 128, 2016.

SIMOPOULOS, A. P. Dietary omega-3 fatty acid deficiency and high fructose intake in the development of metabolic syndrome, brain metabolic abnormalities, and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*, v. 5, n. 8, p. 2901-2923, 2013.

SIMOPOULOS, A. P. Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Molecular neurobiology*, v. 44, n. 2, p. 203-215, 2011.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental biology and medicine*, v. 233, n. 6, p. 674-688, 2008.

SKULAS-RAY, A. C. *et al.* Dose-response effects of omega-3 fatty acids on triglycerides, inflammation, and endothelial function in healthy persons with moderate hypertriglyceridemia. *The American journal of clinical nutrition*, v. 93, n. 2, p. 243-252, 2011.

SOLOMONS, T. W G.; FRYHLE, C. B. *Química orgânica*. Limusa, 1999.

SOON, Gwyneth; WEE, Aileen. Updates in the quantitative assessment of liver fibrosis for nonalcoholic fatty liver disease: Histological perspective. *Clinical and Molecular Hepatology*,

v. 27, n. 1, p. 44, 2021.

SOXHLET, F. Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes. Polytechnisches J, v. 232, p. 461-465, 1879.

SPITE, M. et al. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. Nature, v. 461, n. 7268, p. 1287-1291, 2009.

SROUR, B. *et al.* Consommation d'aliments ultra-transformés et risque de maladies cardiovasculaires dans la cohorte NutriNet-Santé. Nutrition Clinique et Métabolisme, v. 33, n. 1, p. 29, 2019.

STARK, K. D. *et al.* Global survey of the omega-3 fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the blood stream of healthy adults. Progress in lipid research, v. 63, p. 132-152, 2016.

STEFANELLO, F. P. S.; PASQUALOTTI, A.; PICHLER, N. A. Análise do consumo de alimentos fontes de ômega 3 por participantes de grupos de convivências. Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia, v. 22, n. 6, 2019.

SULLIVAN, S. Implications of diet on nonalcoholic fatty liver disease. Current opinion in gastroenterology, v. 26, n. 2, p. 160, 2010.

SUN K. *et al.* Fibrosis and adipose tissue dysfunction. Cell Metab, 18: 470–477, 2013.

SUN, K. *et al.* Adipose tissue remodeling and obesity. The Journal of clinical investigation, v. 121, n. 6, p. 2094-2101, 2011.

SUN, L. *et al.* Fatty acids and cardiometabolic health: a review of studies in Chinese populations. European Journal of Clinical Nutrition, v. 75, n. 2, p. 253-266, 2021.

SWINEHART, D. F. The beer-lambert law. Journal of chemical education, v. 39, n. 7, p. 333, 1962.

SZÁNTÓ, M. *et al.* PARPs in lipid metabolism and related diseases. Progress in Lipid Research, p. 101117, 2021.

TAKETOMI, Y. *et al.* Mast cell maturation is driven via a group III phospholipase A 2-prostaglandin D 2–DP1 receptor paracrine axis. *Nature immunology*, v. 14, n. 6, p. 554-563, 2013.

TALUKDAR, S. *et al.* GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*, v. 142, n. 5, p. 687-698, 2010.

TAPIA, G. *et al.* N-3 long-chain PUFA supplementation prevents high fat diet induced mouse liver steatosis and inflammation in relation to PPAR- $\alpha$  upregulation and NF- $\kappa$ B DNA binding abrogation. *Molecular nutrition & food research*, v. 58, n. 6, p. 1333-1341, 2014.

TAPSELL, L. C. *et al.* Including walnuts in a low-fat/modified-fat diet improves HDL cholesterol-to-total cholesterol ratios in patients with type 2 diabetes. *Diabetes care*, v. 27, n. 12, p. 2777-2783, 2004.

TAYLOR, C. G. *et al.* Dietary milled flaxseed and flaxseed oil improve N-3 fatty acid status and do not affect glycemic control in individuals with well-controlled type 2 diabetes. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 29, n. 1, p. 72-80, 2010.

TAYLOR-CLARK, T. E. *et al.* Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1). *Molecular pharmacology*, v. 73, n. 2, p. 274-281, 2008.

THIES, F. *et al.* Dietary supplementation with  $\gamma$ -linolenic acid or fish oil decreases T lymphocyte proliferation in healthy older humans. *The Journal of nutrition*, v. 131, n. 7, p. 1918-1927, 2001.

THOTA, R. N. *et al.* Science behind the cardio-metabolic benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: biochemical effects vs. clinical outcomes. *Food & function*, v. 9, n. 7, p. 3576-3596, 2018.

TIAN, F. *et al.* N-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis via the PPAR- $\alpha$ /CPT-1 $\alpha$  pathway in a mouse model of parenteral nutrition. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 501, n. 4, p. 974-981, 2018.

TJONAHEN, E. *et al.* Resolvin E2: identification and anti-inflammatory actions: pivotal role of human 5-lipoxygenase in resolvin E series biosynthesis. *Chemistry & biology*, v. 13, n. 11,

p. 1193-1202, 2006.

TODORIC, J. *et al.* Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia*, v. 49, n. 9, p. 2109-2119, 2006.

TORMOS, Ana M.; TALÉNS-VISCONTI, Raquel; SASTRE, Juan. Regulation of cytokines and its clinical significance. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, v. 52, n. 4, p. 159-167, 2015.

TOUSOULIS, D. *et al.* Omega-3 PUFAs improved endothelial function and arterial stiffness with a parallel antiinflammatory effect in adults with metabolic syndrome. *Atherosclerosis*, v. 232, n. 1, p. 10-16, 2014.

TSUDUKI, T. *et al.* Long-term intake of fish oil increases oxidative stress and decreases lifespan in senescence-accelerated mice. *Nutrition*, v. 27, n. 3, p. 334-337, 2011.

USTA, M. *et al.* Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on glycemic control and renal function in type 2 diabetic patients with chronic kidney disease. *Acta Medica Mediterranea*, v. 36, n. 2, p. 821-828, 2020.

VINES, A. *et al.* The role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in fish oil-mediated increased BDNF expression in the rat hippocampus and cortex: a possible antidepressant mechanism. *Neuropharmacology*, v. 62, n. 1, p. 184-191, 2012.

VOISIN, S. *et al.* Dietary fat quality impacts genome-wide DNA methylation patterns in a cross-sectional study of Greek preadolescents. *European Journal of Human Genetics*, v. 23, n. 5, p. 654-662, 2015.

VON S. C.; HARRIS, W. S. Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids. *Cardiovascular research*, v. 73, n. 2, p. 310-315, 2007.

WAHLI, W., MICHALIK, L. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(7), 351-363; 2012.

WANG, F. *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. *European*

journal of nutrition, v. 56, n. 7, p. 2415-2422, 2017.

WANG, L. et al. A prospective study of erythrocyte polyunsaturated fatty acid, weight gain, and risk of becoming overweight or obese in middle-aged and older women. *European journal of nutrition*, v. 55, n. 2, p. 687-697, 2016.

WANG, D. D. *et al.* Association of specific dietary fats with total and cause-specific mortality. *JAMA internal medicine*, v. 176, n. 8, p. 1134-1145, 2016.

WATANABE, Y.; TATSUNO, I. Omega-3 polyunsaturated fatty acids for cardiovascular diseases: present, past and future. *Expert review of clinical pharmacology*, v. 10, n. 8, p. 865-873, 2017.

WEISBERG, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*, v. 112, n. 12, p. 1796-1808, 2003.

WEYLANDT, K. H. *et al.* Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: towards an understanding of resolvin and protectin formation. *Prostaglandins & other lipid mediators*, v. 97, n. 3-4, p. 73-82, 2012.

WHELAN, J. Conversion of dietary polyunsaturated fats between humans and rodents: A review of allometric scaling models. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 158, p. 102094, 2020.

WHITE, P. J. *et al.* Transgenic restoration of long-chain n-3 fatty acids in insulin target tissues improves resolution capacity and alleviates obesity-linked inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice. *Diabetes*, v. 59, n. 12, p. 3066-3073, 2010.

WIKTOROWSKA O. A.; BEREZIŃSKA, M.; NOWAK, J. Z. PUFAs: structures, metabolism and functions. *AdvClinExp Med* 24 (6): 931–941. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *World Health Organ Tech Rep Ser*, v. 916, n. i-viii, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020. 2013.

World Health Organization. Regional Office for the Eastern Mediterranean. (2019). Healthy

diet. World Health Organization. Regional Office for the Eastern Mediterranean.

WU, A.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *Journal of neurotrauma*, v. 21, n. 10, p. 1457-1467, 2004.

YAN, J. H. *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine*, v. 97, n. 37, 2018.

ZÁRATE, R. *et al.* Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and translational medicine*, v. 6, n. 1, p. 1-19, 2017.

ZEHR, K. R.; WALKER, M. K. Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve endothelial function in humans at risk for atherosclerosis: A review. *Prostaglandins & other lipid mediators*, v. 134, p. 131-140, 2018.

ZELBER-SAGI, S. Minding the gap between clinical trials and treatment with the Mediterranean dietary pattern for patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 17, n. 7, p. 1248-1250, 2019.

ŻELECHOWSKA, P. *et al.* Mast cells participate in chronic low-grade inflammation within adipose tissue. *Obesity Reviews*, v. 19, n. 5, p. 686-697, 2018.

ZHANG, M. *et al.* Long noncoding RNA lncARSR promotes hepatic lipogenesis via Akt/SREBP-1c pathway and contributes to the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 499, n. 1, p. 66-70, 2018.

ZHAO, Y. *et al.* Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF- $\alpha$  expression by preventing NF- $\kappa$ B activation. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 23, n. 1, p. 71-78, 2004.

ZHOU, H.; URSO, C. J.; JADEJA, V. Saturated Fatty Acids in Obesity-Associated Inflammation. *Journal of Inflammation Research*, v. 13, p. 1, 2020.

ZHU, J. *et al.* Ganoderic Acid A improves high fat diet-induced obesity, lipid accumulation and insulin sensitivity through regulating SREBP pathway. *Chemico-biological interactions*,

v. 290, p. 77-87, 2018.

ZHU, L. *et al.* CETP inhibition improves HDL function but leads to fatty liver and insulin resistance in CETP-expressing transgenic mice on a high-fat diet. *Diabetes*, v. 67, n. 12, p. 2494-2506, 2018.

ZHUANG, P. *et al.* Polyunsaturated fatty acids intake, omega-6/omega-3 ratio and mortality: Findings from two independent nationwide cohorts. *Clinical Nutrition*, v. 38, n. 2, p. 848-855, 2019.

ZINÖCKER, M. K.; LINDSETH, I. A. The Western diet–microbiome–host interaction and its role in metabolic disease. *Nutrients*, v. 10, n. 3, p. 365, 2018.

ZOLEZZI, J. M. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  and PPAR $\alpha$  agonists modulate mitochondrial fusion-fission dynamics: relevance to reactive oxygen species (ROS)-related neurodegenerative disorders?. *PloS one*, 8(5), e64019; 2013.

## ANEXOS



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29  
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil  
Fone (31) 3559 -1368 Fax: (31) 3559-1370  
Email: [ceua@propq.ufop.br](mailto:ceua@propq.ufop.br)



### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. **2017/13**, intitulado "**Avaliação dos efeitos da ingestão de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 na modulação do balanço redox e do perfil metabólico em ratos com síndrome metabólica**", que tem como responsável o/a **Prof(a). Dr(a). Daniela Caldeira Costa**, foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP, de acordo com tabela abaixo:

Dados dos Animais Aprovados				
Espécie/linhagem	N.º de Animais	Idade	Sexo	Procedência
Rato Fisher	58	4 semanas	Macho	CCA

Restrição de dieta: ( x ) sim ( ) não

Especificar a dieta: Dieta hiperglicídica e hiperlipídica, acrescidas de sacarose e gordura hidrogenada, respectivamente

**Este Certificado expira em: 01/05/2021.**

Ouro Preto, 13 de junho de 2017.

**Prof.ª Dr.ª Paula Melo de Abreu Vieira**  
Coordenadora da CEUA/UFOP.

# II International Symposium on Biological Sciences

*Celebrating 30 years of Biological Sciences Research at UFOP  
Aiming high for the future*

Ouro Preto  
Minas Gerais, Brazil  
November 22<sup>th</sup> to 24<sup>th</sup>, 2017

## Certificate

We hereby certify that the work entitled

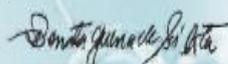
**Diet standardized for induction of Metabolic Syndrome in rats**

by authors

**Dias, BV; Gomes, SV; Silva, ME; Costa, DC**

was presented during the poster session in the II International Symposium

on Biological Sciences in Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil, on November 22<sup>th</sup> to 24<sup>th</sup>, 2017.



Renata Guerra de Sá Cota, Phd  
Coordinator of ISBS



Camila Carrião Machado Garcia, Phd  
Coordinators of ISBS

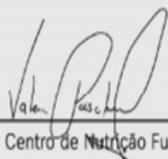




**04 A 05  
DE MAIO**  
FLORIANÓPOLIS/SC

## CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho **“Efeito do consumo de EPA e DHA na modulação de parâmetros relacionados à síndrome metabólica em ratos”** foi apresentado no I Congresso Sul Brasileiro de Nutrição Funcional realizado nos dias de 04 e 05 de maio de 2018 em Florianópolis | SC, tendo como autores:  
Bruna Vidal Dias, Sttefany Viana Gomes e Daniela Caldeira Costa.

  
VP Centro de Nutrição Funcional

  
2B Cursos e Eventos

REALIZAÇÃO:  Centro de Nutrição Funcional





República Federativa do Brasil  
Ministério da Educação  
Universidade Federal de Ouro Preto



## CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho **AVALIAÇÃO DO EFEITO CARDIOPROTETOR DO ÓLEO DE LINHAÇA EM RATOS COM SÍNDROME METABÓLICA**, de autoria de **MARIA LAURA DA CRUZ CASTRO, CLAUDIA MARTINS CARNEIRO, BRUNA VIDAL DIAS e DANIELA CALDEIRA COSTA**, foi apresentado na modalidade Poster, no **SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA** do ENCONTRO DE SABERES – UFOP, realizado de *08 de Agosto a 07 de Novembro de 2019*.

Ouro Preto, 07 de Novembro de 2019.

Autenticidade



Código: 16067557455fc525a1b60d5



República Federativa do Brasil  
Ministério da Educação  
Universidade Federal de Ouro Preto



## CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho **EPA E DHA SÃO MAIS EFICAZES DO QUE O ÓLEO DE LINHAÇA NA PROTEÇÃO CONTRA OS DANOS CAUSADOS POR UMA DIETA HIPERLIPÍDICA NO TECIDO ADIPOSE E FÍGADO DE RATOS.**, de autoria de **BRUNA VIDAL DIAS, STEFANY VIANA GOMES, MARIA LAURA DA CRUZ CASTRO, LUANA CRISTINA FARIA CARVALHO, DÉBORA MARIA SOARES DE SOUZA, CAMILA DE OLIVEIRA RAMOS, MARCELLA RAMOS SANT'ANA, SUSANA CASTELO BRANCO RAMOS NAKANDAKARI, ANDRÉ TALVANI, CLÁUDIA MARTINS CARNEIRO, DENNYS ESPER CORRÊA CINTRA e DANIELA CALDEIRA COSTA**, foi apresentado no **V MOSTRA DA PÓS-GRADUAÇÃO** do ENCONTRO DE SABERES – UFOP, realizado de 30 de Novembro a 04 de Dezembro de 2020.

Ouro Preto, 04 de Dezembro de 2020.

Autenticidade



Código: 16083149675fdcf0570eb12

*Denata Guanais de Costa*  
Prof.<sup>a</sup> Renata Guanais de Sá Costa  
Pró-Reitora Adjunta de Pesquisa, Pós-Graduação  
e Inovação

*Tânia Rossi Garbin*  
Prof.<sup>a</sup> Tânia Rossi Garbin  
Pró-Reitora de Graduação

*Marcos Knupp*  
Prof. Marcos Eduardo Canhoto G. Knupp  
Pró-Reitor de Extensão

*Natália de Souza Libório*  
Prof.<sup>a</sup> Natália de Souza Libório  
Pró-Reitora de Assuntos Comunitários e Estudantis

*Arquimedes Schultz*  
Arquimedes Schultz  
Coordenadora de Assuntos Internacionais

Este certificado foi gerado eletronicamente e sua autenticidade poderá ser atestada informando o código em [www.encontrodesaberes.ufop.br/certificados](http://www.encontrodesaberes.ufop.br/certificados)

## Confirming submission to Prostaglandins and Other Lipid Mediators

---

De: Prostaglandins and Other Lipid Mediators (em@editorialmanager.com)

Para: brunavidaldias@yahoo.com.br

Data: quarta-feira, 25 de agosto de 2021 11:47 BRT

---

\*This is an automated message.\*

Manuscript Number: POLM-D-21-00044R1

EPA/DHA AND LINSEED OIL HAVE DIFFERENT EFFECTS ON LIVER AND ADIPOSE TISSUE IN RATS FED WITH A HIGH-FAT DIET

Dear Ms Dias,

We have received the above referenced manuscript you submitted to Prostaglandins and Other Lipid Mediators.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/polm/>, and navigate to the "Revisions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your revision to this journal.

Kind regards,  
Prostaglandins and Other Lipid Mediators

More information and support

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?

[https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/28452/supporthub/publishing/](https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/)

For further assistance, please visit our customer service site:

<https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

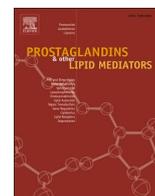
---

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/polm/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.



Contents lists available at ScienceDirect

## Prostaglandins and Other Lipid Mediators

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/prostaglandins](http://www.elsevier.com/locate/prostaglandins)

Original Research Article



## EPA/DHA and linseed oil have different effects on liver and adipose tissue in rats fed with a high-fat diet

Bruna Vidal Dias<sup>a</sup>, Sttefany Viana Gomes<sup>a</sup>, Maria Laura da Cruz Castro<sup>a</sup>,  
Luana Cristina Faria Carvalho<sup>a</sup>, Gustavo Silveira Breguez<sup>b</sup>, Débora Maria Soares de Souza<sup>c</sup>,  
Camila de Oliveira Ramos<sup>d</sup>, Marcella Ramos Sant'Ana<sup>d</sup>,  
Susana Castelo Branco Ramos Nakandakari<sup>d</sup>, Carolina Morais Araujo<sup>f</sup>,  
Andrea Grabe-Guimarães<sup>f</sup>, André Talvani<sup>c</sup>, Cláudia Martins Carneiro<sup>e</sup>,  
Dennys Esper Corrêa Cintra<sup>d</sup>, Daniela Caldeira Costa<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM), Departamento de Ciências Biológicas (DECBI), Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório Multiusuário de Pesquisa, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Imunobiologia da Inflamação, Departamento de Ciências Biológicas (DECBI), Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

<sup>d</sup> Laboratório de Genômica Nutricional, Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade de Campinas (UNICAMP), Limeira, São Paulo, Brazil

<sup>e</sup> Laboratório de Imunopatologia, Programas de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

<sup>f</sup> Laboratório de Farmacologia Experimental, CiPharma, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

n-3 polyunsaturated fatty acids  
Eicosapentaenoic acid  
Docosahexaenoic acid  
Liver metabolism  
White adipose tissue

## ABSTRACT

The incidence of cardiovascular diseases and metabolic disorders has increased worldwide. Clinical and experimental research has shown that the consumption of  $\omega$ -3 FAs can be beneficial to metabolism in several ways, as they can act on metabolic pathways. Our objective was to evaluate the effect of treatment with linseed oil, a vegetable oil rich in alpha-linolenic acid, and EPA and DHA in different proportions (3:1 EPA:DHA, and 1:3 EPA:DHA), on the metabolic disorders induced by a high-fat diet (20 % lipids) in rats for 2 weeks, after 18 weeks of consumption of a high-fat diet. In 18 weeks, the high-fat diet increased blood glucose, systolic blood pressure, triglyceride concentration in the liver and adipose tissue, and impaired insulin sensibility without interfering in the weight of the animals. All treatments were effective in reducing the deposition of hepatic type III collagen, the proportion of  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 in the liver and WAT (white adipose tissue), the proportion of area/number of adipocytes, and the gene expression of the ACC, FAS, and CPT1 enzymes. In addition, treatment with EPA and DHA reduced blood glucose, serum TNF- $\alpha$  concentration, amount of liver fat, degree of microsteatosis and type I collagen deposition in the liver, deposition of type I and III collagen in TA, gene expression of the transcription factor SREBP-1c, and increased hepatic binucleation. EPA in major proportion was more effective in reducing the area of adipocytes, hepatic triglyceride concentration, PPAR- $\alpha$  expression, and WAT fat weight. DHA in a major proportion reduced the concentration of MCP1 in WAT. LO treatment did not have any isolated effects. We concluded that EPA and DHA were more effective in treating metabolic damage than treatment with LO, leading to a more favorable metabolic profile.

## 1. Introduction

Cardiovascular disease and metabolic disorders such as diabetes, insulin resistance, fatty liver disease, and obesity have increased

worldwide [1]. This increase is mainly due to poor eating habits that are affected by social, economic and cultural factors which can lead to increased caloric intake from foods rich in sugar and fat [2]. Fats can differ according to their fatty acids (FAs) composition, the length of the

\* Corresponding author at: Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: [daniela.costa@ufop.edu.br](mailto:daniela.costa@ufop.edu.br) (D.C. Costa).

<https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2022.106622>

Received 28 May 2021; Received in revised form 20 December 2021; Accepted 21 January 2022

Available online 25 January 2022

1098-8823/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

carbon chains, the presence or absence of double bonds, and the configuration of these bonds. Such chemical and structural characteristics determine different metabolic activities of the fatty acids and can modify cellular signaling pathways, change the biochemical and physiological parameters of serum, and alter tissue histoarchitecture, gene transcription, and protein content [3,4]. Several studies have reported that saturated and *trans* FAs can lead to various forms of metabolic damage when prevalent in the diet [5]. This effect depends on the length of the chain and long-chain FAs have been reported to be more harmful, mainly palmitic acid (C16:0). Palmitic acid increases the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) including p38, JNK, and extracellular-signal-regulated kinases (ERKs) and enhances the activation of transcription factors including activator protein (AP)-1 and nuclear factor (NF)- $\kappa$ B. Stearic acid (C18:0) causes the release of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6, whereas arachidic acid (C20:0) induces mRNA expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-10 [6]. Further, saturated FAs may induce inflammation by binding to G-protein-coupled receptors (GPRs) and the recruitment of toll-like receptors (TLRs) to lipid rafts and their dimerization [7,8]. The *trans*-FA can be incorporated into the cell membrane phospholipids (PL), altering the membrane composition and function by changing membrane-bound receptor function and the signaling cascades linked with inflammatory pathways, increasing the activity of free radicals in the phospholipid bilayer and causing oxidative stress [9]. There are several current recommendations to eliminate *trans* FA intake and limit saturated FA intake, prioritizing the consumption of *cis*-, mono-, and polyunsaturated FAs (PUFAs) [10].

Clinical and experimental evidence has shown that the ingestion of omega 3 ( $\omega$ -3) FAs can act on metabolic pathways that lead to a reduction in blood glucose, triglyceridemia, and blood pressure mainly by acting on pathways that favor mechanisms with anti-inflammatory action [11–13].

The biosynthesis of  $\omega$ -3 PUFA occurs mainly in the liver; therefore, this organ plays an important role in providing these FAs to other tissues including the white adipose tissue (WAT) [14].  $\alpha$ -Linolenic acid (18:3 n-3, ALA) is the metabolic precursor of the other n-3 PUFAs (C22:5 n-2, EPA, and C22:6 n-3, DHA) that are formed by a process involving desaturation and elongation of the carbon structure [15]. The effects of EPA and DHA on metabolism are mainly due to regulation of the activity of transcription factors such as peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ) and sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) that play important roles in lipid metabolism by controlling the expression of genes involved in FA absorption, transport, oxidation, ketogenesis, acyl-CoA oxidase (ACOX), carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I), nuclear transcription factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and its target inflammatory factors such as interleukin-6 (IL-6), interleukin-12 (IL-12), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [16,17]. The isolated effects of ALA are unclear and seem to activate the isoform beta of PPAR expressed in the brain, adipose tissue, skin, skeletal muscle, and heart muscle [17,18].

Although there is scientific evidence on the benefits of supplementation with  $\omega$ -3, the relationship between dose and effect has been discussed since in population studies, there is an interference of cultural habits and supplementation in populations that habitually ingest high amounts of  $\omega$ -3 that can correspond to double the total ingested by a population with low habitual intake [19]. However, in animal studies, it is possible to standardize intake since birth and to evaluate the effects of supplementation in different proportions as determined by food-intake patterns.

Thus, our main objective was to investigate whether the effects of omega 3 present in linseed oil or the compounds EPA and DHA used in different proportions are effective in reversing damage caused by a long-term high-fat diet in rats.

## 2. Methodology

### 2.1. Experimental design

This project was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Federal University of Ouro Preto (protocol 2017/13). The experimental procedure was carried out following the rules established by the National Council for the Control of Animal Experimentation and following ARRIVE guidelines. The animals used in the study were provided by the Experimental Nutrition Laboratory (LAB-NEX) at the Federal University of Ouro Preto (UFOP), Minas Gerais, Brazil.

Fifty-four four week old, male Fisher rats (F344) were randomly divided into two groups initially: control (C, n = 14 - received a standard diet for 20 weeks) and high-fat diet (HF, C = 40 - received a high-fat diet for 20 weeks). Six animals from the C group and six from the HF group were first euthanized to establish metabolic damage. Next, the animals were redistributed into the following groups: the C group with eight animals and HF with 10 animals. In addition, twenty four animals of HF were also divided into three other groups to receive the respective treatments: linseed oil (LO, n = 8) received a high-fat diet for 20 weeks and treatment with linseed oil from the eighteenth week; eicosapentaenoic acid (EPA, n = 8) received a high-fat diet for 20 weeks, and treatment with the compound rich in EPA from the eighteenth week; docosahexaenoic acid (DHA, n = 8) received a high-fat diet for 20 weeks and treatment with the DHA-rich compound from the eighteenth week. The C and HF groups received 1 mL of water per gavage from the eighteenth week. LO, EPA, and DHA received 1 mL, at a dose of 900 mg/day, of the compounds linseed oil, 3:1 EPA:DHA, and 1:3 EPA:DHA, respectively. All gavages were applied in each animal between 8 and 9 a. m., and the dose used was based on previous studies [20,21].

All groups were fed *ad libitum* with diet and water and were placed in identified animal cages with a maximum of three animals per cage; the response research was aware of the group allocation at the different stages of the experiment. At the end of 20 weeks, the animals were kept in a fasting state for 8 h, anesthetized with isoflurane (Isoforine®, São Paulo, Brazil), and euthanized. Food and energy intake were analyzed to determine the average intake, calculated by using total food offered and rest intake and dividing this by the number of animals in the cage (2 or 3).

Blood samples were collected from each animal. The liver and abdominal adipose tissues were immediately removed and frozen in liquid nitrogen. The biological samples were stored at -80 °C, or in buffered formaldehyde. All animals sacrificed were used in the following analyses, and no exclusion criteria were used.

### 2.2. Composition of diets and oils used for treatment

The control and high-fat diets showed similar proportions of fiber, a mixture of minerals and vitamins (14 %) and protein (22 %), and contained 60 % and 44 % carbohydrates and 4% and 20 % lipids, respectively (Table 1), according to AIN93. Soybean oil was the source of lipids in the control diet, and hydrogenated vegetable fat was the main source of lipids in the high-fat diet.

We used three compounds for treatment: LO (Duom®, Colombo, Paraná, Brazil) and two compounds rich in EPA or DHA (BASf®, São Paulo, Brazil).

The LO contains a total of 12 g of fats in a 13 mL portion; 1.3 g of saturated fats, 2.5 g of monounsaturated fats, 7.5 g of polyunsaturated fats, 2.4 g of  $\omega$ -9, 1.6 g of  $\omega$ -6, and 5.9 g of  $\omega$ -3. The compounds rich in EPA or DHA have a ratio of 3:1 EPA:DHA or 1:3 EPA:DHA, respectively. All the compounds were isolated from light and heat.

**Table 1**

Establishment of metabolic damage caused by ingestion of a high-fat diet for 18 weeks.

	Control	High-fat
Weight (g)	262.3 ± 9.2	271.2 ± 7.8
Systolic blood pressure (mmHg)	118.4 ± 7.8 <sup>a</sup>	164.6 ± 8.6 <sup>b</sup>
Glucose (mg/dL)	102.4 ± 4.4 <sup>a</sup>	122.2 ± 3.1 <sup>b</sup>
Insulin response test (AUC)	3738 ± 359.1 <sup>a</sup>	4539 ± 414 <sup>b</sup>
Oral glucose tolerance (AUC)	11720 ± 295.8 <sup>a</sup>	12939 ± 384.8 <sup>b</sup>
Triglycerides concentration in liver (mg/g)	1.31 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.63 ± 0.08 <sup>b</sup>
Triglycerides concentration in adipose tissue (mg/g)	0.55 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.12 ± 0.01 <sup>b</sup>

Data are expressed as mean ± standard error and were analyzed by a Student's *t*-test. Significant differences were considered when *p* < 0.05. g: grams; mmHg: millimeter of mercury; mg: milligrams; dL: deciliter; AUC: area under the curve.

### 2.3. Analysis of the centesimal composition of the diet

The lipid content of the samples was analyzed by the Soxhlet method, where 5 g of sample was stored in the extraction cartridge and transferred to the extraction device. After completion, the extracted lipids were weighed to calculate the amount of fat present [22]. The protein content was evaluated by the Kjeldahl method to determine organic nitrogen in a 5 g sample [23]. The carbohydrate content was calculated from the difference between the total mass and total lipid and protein content.

### 2.4. Analysis of the composition of fatty acids present in the diet, in the liver, and WAT

We used 5 mg of each ration (in triplicate), 50 µL of each compound used for treatment (in triplicate), and 20 mg of liver and adipose tissue (Table 2).

The lipid fractions from the diet and tissues were esterified according to the method proposed by [24], using BF<sub>3</sub>-methanol (boron trifluoride, Sigma-Aldrich) for the derivation of fatty acids.

The chromatographic analysis was performed in a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GCMS-QP2010 Ultra; Shimadzu®), using a Stabilwax fused silica column (30 m long; 0.25 mm internal diameter; 0.25 µm thick; Restek®). Ultrapure helium gas was used as the carrier gas at a flow of 1.3 mL/min. Through an automatic injector (AOC-20i), 1 µL of sample was injected, at a ratio of 1:30. The injector temperature was maintained at 250 °C, while the furnace heating schedule began at 80 °C, with a programmed heating speed

**Table 2**

Composition, centesimal composition, and fatty acid profile of diets and oils.

		Control diet	High-fat diet	Linseed oil	3:1 EPA/DHA	1:3 EPA/DHA
Composition of diets (g/kg)	Fiber, a mixture of minerals and vitamins	140	138.13			
	Carbohydrate	600	434			
	Protein	220	227.87			
	Lipid	40	200			
Centesimal composition (%)	Carbohydrate	74.65	50.35			
	Protein	21.46	26.43			
	Lipid	3.87	23.20			
	Saturated FA	19.73	37.90	10.77	0.32	0.42
	Monounsaturated FA	27.25	28.77	22.39	0.41	0.95
	Polyunsaturated FA	53.02	33.33	66.84	99.27	98.63
	ω-3 FA	3.43	1.86	50.91	94.77	96.24
Total Fatty Acid (%)	ω-6 FA	49.58	33.13	15.93	4.48	2.38
	Ratio ω-6/ω-3 FA	14.43	16.53	0.31	0.04	0.02
	C18:3n-3 FA (ALA)	3.43	1.47	50.91	17.89	16.21
	C20:5n-3 FA (EPA)	0	0	0	57.44	21.86
	C22:6n-3 FA (DHA)	0	0	0	19.44	58.17
	Kilocalories of diets	Kcal in 100g	419.27	515.92		

Data are expressed as the mean of triplicates, in percentage. ALA, alpha-linolenic acid; DHA, docosapentaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; FA, fatty acids; g, grams; kcal, kilocalories.

ramp of 5 °C/min to 175 °C, followed by a heating rate of 3 °C/min to 230 °C, where the temperature was maintained for 20 min. The mass spectrometer followed the following conditions: ionization voltage of 70 eV, ionization source temperature of 200 °C, full scan mode with amplitude of 35–500 *m/z* and speed of 0.2 s by scanning.

### 2.5. Establishment of the metabolic disorders by a HF diet

To establish the metabolic disorders caused by the intake of a high-fat diet for 18 weeks, we evaluated: (1) Systolic blood pressure by caudal plethysmography: the animals were acclimated to the containment tunnel for three days prior to the analysis. For the measurement, the animals were placed in the containment tunnel so that they remained static and with the tail exposed. A hot light source was placed over the tails for 10 min for vein dilation and, subsequently, the transducer (sphynginomanometer) was affixed to the tail near the rectal. Data were measured in triplicate using the program Windoq Lite Data Acq DI-199. (2) Oral glucose tolerance (OGT) was tested using 1 mL of a solution containing 2.5 g of glucose per kilogram of the animal given by gavage, next the glucose concentrations were measured at 0, 30, 60, 90 and 120 min. (3) Insulin response (IR) was tested by administering 0.5 UI of insulin per kilogram of the animal intravenously and measuring glucose concentrations at 0, 30, 60 and 90 min.

Body weight, concentration of glucose in the serum, and concentration of triglycerides in liver and adipose tissue were determined using the following methodologies.

### 2.6. Anthropometric parameters, food intake, and serum glycometabolic profile

Body weight was measured individually after the treatments. Total energy intake was assessed by the difference between the mass of feed offered and the mass not eaten by day multiplied by the caloric value of the respective diets, added to the caloric value of the treatment. Using these data, the coefficient of feed efficiency (FE) was calculated; it reflects how much of the ingested feed was converted to energy storage substrate considering the amount of energy ingested (in KJ) and weight gain of the animals [25].

Serum concentrations of glucose, triacylglycerol, and total cholesterol were analyzed using the Labtest® kit (Lagoa Santa, MG, Brazil) following the manufacturer's instructions.

### 2.7. Morphometric analysis of liver and WAT

The tissues were stored in 4% buffered formaldehyde, fractionated,

embedded in paraffin, and stained using hematoxylin & eosin (HE) or picrosirius red (PS). Photomicrographs were obtained using a Leica optical microscope coupled to a DM5000 digital camera associated with the Leica Application Suite© analysis software.

From the images obtained from liver tissue stained with HE, we calculated the total number of hepatocytes, binucleated hepatocytes, and the grade of macro and hepatic microsteatosis using a magnification of 100x [26]. Liver tissue stained with PS was analyzed for the degree of deposition of collagen types I and III detected under polarized light at a magnification of 30x [27]. The area and number of adipocytes in the AT stained with HE were recorded at a magnification of 100x and the ratio of quantity/area of adipocytes was calculated. In WAT stained with PS, we recorded the grade of collagen deposition for types I and III, also under polarized light at 30x magnification [27]. Morphometric analyses were performed using the ImageJ® software, version 1.32 j.

## 2.8. Quantification of lipids from hepatic and white adipose tissue

Lipids were extracted from samples of 200 mg of liver and 100 mg of WAT using a sequence of solvents such as chloroform/methanol (2:1, v/v), methanol, and chloroform, as previously described by [28]. The total mass of lipids was measured after solvent evaporation and the extracted lipids were resuspended in isopropanol to analyze the concentration of total cholesterol and triacylglycerol using Labtest® kits following the manufacturer's recommendations.

## 2.9. Analysis of quantitative gene expression by real-time PCR (RT-qPCR)

Total RNA was isolated from a homogenate containing 10 mg of liver and 1 mL of TRIzol (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) in an extraction, precipitation, and washing sequence comprising chloroform, isopropanol, and 75 % ethanol. Subsequent quantification was carried out using an Epoch™ Microplate Spectrophotometer (BioTek 2010/18095–0), considering acceptable fractions between absorbances at 260/280 greater than 1.8 [29]. Subsequently, 1 µg of RNA was used for cDNA synthesis using the High-Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's recommendations.

RT-qPCR was performed using the GoTaq® qPCR Master Mix Kit (Promega), with specific primers from the Forward and Reverse oligonucleotides to detect SREBP1–1c [NM\_001276707.1; F:5'GTGAGTGGAGGGACCATCCTG3' and R:5'CCAGTGCTAGTTCGGTGGATC3']; ACC [NM\_022193; F:5'TGTAGAAACCCGAACCGTGG3' and R:5'CTGGAAACCAAACCTGGCC3']; and FAS [NM\_017332.1; F:5'GCTGGTGAAGTGTCTCCGA3' and R:5'GTGAGATGTGCTGCTGAGGT3'], PPAR-α [NM\_013196.2; F:5'CATCGAGTGTGCAATATGTGG3' and R:5'GCAGTACTGGCATTGTGCC3'], CPT-1 [NM\_031559.2; F:5'GCACC AAGATCTGGATGGCTATGG3' and R:5'TACCTGCTCACAGTATCTTTGAC3'] and ACOX-1 [NM\_017340.2; F:5'CCATGGTTTTTGTGAGGTCCTT3' and R:5'GTTCGCTTTGCTTGATTCAGA3']. Gene expression was normalized to GAPDH [NM\_017008; F:5-TGAAGCTCATTTCCTGTATGAC3' and R:5'CTCTTGCTCTCAGTATCCTTGCT3'), expressed at similar levels in all experimental groups; all samples were pipetted in technical triplicates. Quantitative analysis of RT-qPCR was performed using 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems).

## 2.10. Analysis of inflammatory mediators in serum and white adipose tissue

The concentrations of TNF-α and IL-6 cytokines in 100 µL of serum, and RANTES (CCL-5) and MCP-1 (CCL-2) in 20 mg of adipose tissue were analyzed using kits Rat-IL-6, Rat-TNF-α, Rat-RANTES, and Rat-MCP1 (Peprotech, Rocky Hill, NJ), following the manufacturer's recommendations.

## 2.11. Statistical analysis

The sample size calculation was based on effects of a high fat diet and treatments in metabolic parameters using GPower 3.0 program. The power of the experiment was set to 80 %. A total of 7 animals per group were considered necessary.

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software, version 6.01 (GraphPad Software Inc., Irvine, CA, USA). The oral glucose tolerance test and insulin response were analyzed by using the area under the curve. A Student's *t*-test was performed to compare the two means. The normality of the data was analyzed using the Kolmogorov-Smirnov test. For data showing normal distribution, a one-way ANOVA univariate analysis of variance was performed, followed by the Bonferroni post-test. The non-parametric data were evaluated using the non-parametric *t*-test or the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-test, and the results were expressed as mean ± standard deviation (SD) or median and interquartile range (IQR) (non-parametric). Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Centesimal composition and fatty acid profile of diets and oils

The high-fat diet provided 515.92 kcal/100 g and the control diet provided 419.27 kcal/100 g; the two diets were composed of 23.2 % and 3.87 % of lipid, respectively (Table 1). The LO contained 10 % of saturated FA, approximately 22 % and 66 % of monounsaturated FA (MUFA) and PUFA, respectively, and the percentages of the ω-6/ω-3 ratio of 0.31. EOs rich in EPA or DHA comprised approximately 99 % PUFAs (Table 1).

### 3.2. Metabolic alterations by a HF diet in 18 weeks

In 18 weeks, the high-fat diet increased blood glucose, systolic blood pressure, triglyceride concentration in the liver and adipose tissue, and impaired insulin sensibility without interfering in the weight of the animals (Table 1).

### 3.3. Anthropometric parameters and serum glycometabolic profile

We did not observe differences in total energy intake (Fig. 1, panel A) and in weight (Fig. 1, panel C), and no treatments interfered in feed efficiency (Fig. 1, panel B).

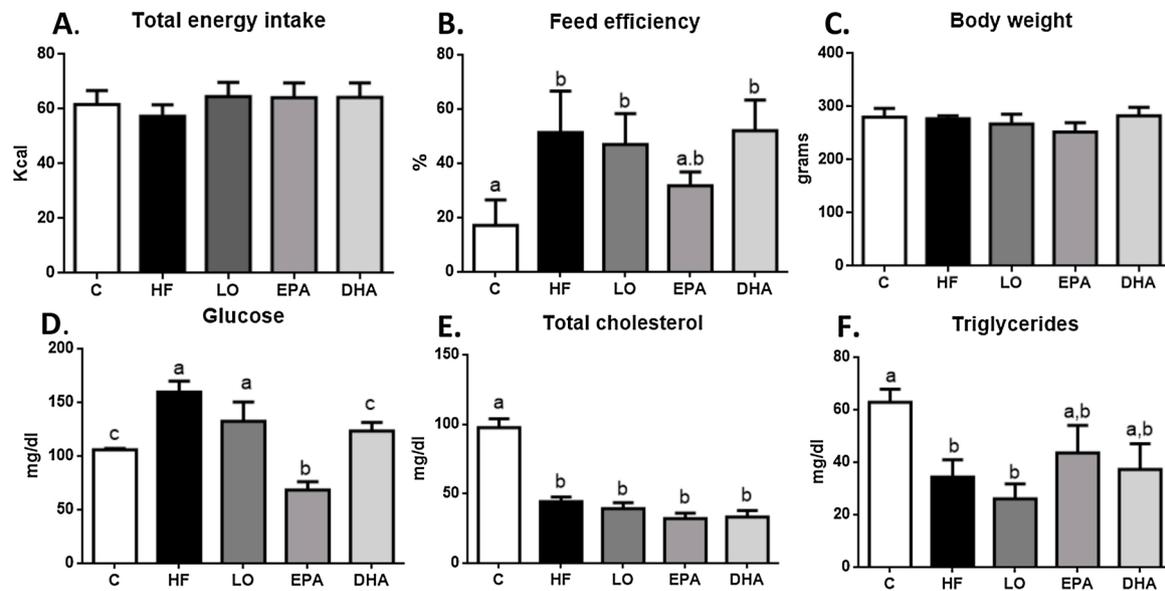
EPA and DHA were effective in reducing glycemia levels (Fig. 1, panel D). The treatments did not change the concentrations of total cholesterol (Fig. 1, panel E) or triglyceride concentration (Fig. 1, panel F).

### 3.4. Liver morphometric analysis

Fig. 2 shows a representative photomicrograph of tissues stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histoarchitecture evaluation (panel A) and Picro Sirius for the evaluation of collagen deposition (panel B) in the liver.

A lower total number of hepatocytes was observed in the HF and LO, whereas EPA presented a higher number (Fig. 3, panel A). EPA was effective in increasing the number of binucleated hepatocytes (Fig. 3, panel B).

HF presented 57 % of animals with grade 0 and 43 % with grade 1 macrosteatosis; LO presented 71 % grade 0 and 29 % grade 3; EPA presented 50 % of animals with grade 0 and 50 % grade 1; the DHA group presented 57 % of animals with grade 0 and 43 % with grade 1 (Fig. 3, panel C). Regarding microsteatosis, C presented 35 % with grade 0 and 65 % with grade 1; HF presented 17 % grade 1, 33 % grade 2, and 50 % grade 3; LO presented 29 % grade 1, 56 % grade 2, and 15 % grade 3; EPA presented 30 % grade 0 and 70 % grade 1; DHA had 14 % grade 1, 71 % grade 2, and 15 % grade 3 (Fig. 3, panel D).



**Fig. 1.** Effects on energy metabolism and serum glycometabolic profile.

Effects assessed by comparative data on total energy intake (A), food efficiency (B), Body weight (C), fasting glucose in serum (D), total cholesterol in serum (E), and triglycerides in serum (F). Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) and were evaluated using one-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ . C, control group; DHA, docosapentaenoic acid group; dL, deciliter; EPA, eicosapentaenoic acid group; HF, high-fat diet group; Kcal, kilocalories; LO, linseed oil group; mg, milligrams.

HF presented a greater deposition of type I collagen (Fig. 3, panel E) and III collagen (Fig. 3, panel F), and EPA and DHA were effective in attenuating collagen deposition.

### 3.5. Hepatic lipid profile

HF and LO had a higher mass of liver fat than the other treatments (Fig. 4, panel A). HF showed a higher total cholesterol concentration and the treatments did not change this gap (Fig. 4, panel B). We observed an increase in the triacylglycerol (TAG) concentration in the HF group, and the EPA showed a reduction in this parameter (Fig. 4, panel C).

The liver of the LO group had a higher amount of ALA (Fig. 4, panel D), whereas the liver of the animals in the EPA group showed mostly EPA (Fig. 4, panel E), and the DHA group showed a higher amount of DHA (Fig. 4, panel F). The HF diet led to greater incorporation of saturated FA in the liver and all treatments showed lower concentrations of this type of FA (Fig. 4, panel G). Concerning the unsaturated FA, the HF group had lower levels of MUFA (Fig. 4, panel H) and PUFA (Fig. 4, panel I), the LO had a higher content of both, and the EPA and DHA did not present differences in MUFA content but both had higher levels of PUFAs than the control groups, HF and LO.

The HF group had lower levels of  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 FAs, and their  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 ratio was similar to that of the control group (Fig. 4, panels J–L). LO had a higher content of  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 but the  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 ratio was lower. The EPA and DHA had a higher  $\omega$ -3 content than the other groups and a  $\omega$ -6 content similar to the control and LO, but both treatments had lower  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 ratios than the control, HF, and LO.

### 3.6. Expression of hepatic lipogenic genes

EPA and DHA decreased the gene expression of the transcription factors *SREBP-1c* and *EPA*, leading to greater expression of *PPAR- $\alpha$* . HF presented the highest relative expression of *ACC* and *FAS* genes and lower expression of *CPT1*. All treatments resulted in the lowest relative expression of the *ACC* and *FAS* genes and increased expression of *CPT1* (Fig. 5, panels A–F).

### 3.7. Serum and adipocyte inflammatory profile

HF had a higher concentration of TNF- $\alpha$ , and the treatment with EPA and DHA decreased this (Fig. 6, panels A and B). The HF diet increased the concentration of the adipokines MCP-1 and RANTES, and DHA showed a lower concentration of MCP-1 in AT (Fig. 6, panels C and D).

### 3.8. Morphometric analysis of WAT

Fig. 2 shows the representative photomicrograph of tissues stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histoarchitecture evaluation (panel C) and Picro Sirius for the evaluation of collagen deposition (panel D) in the WAT.

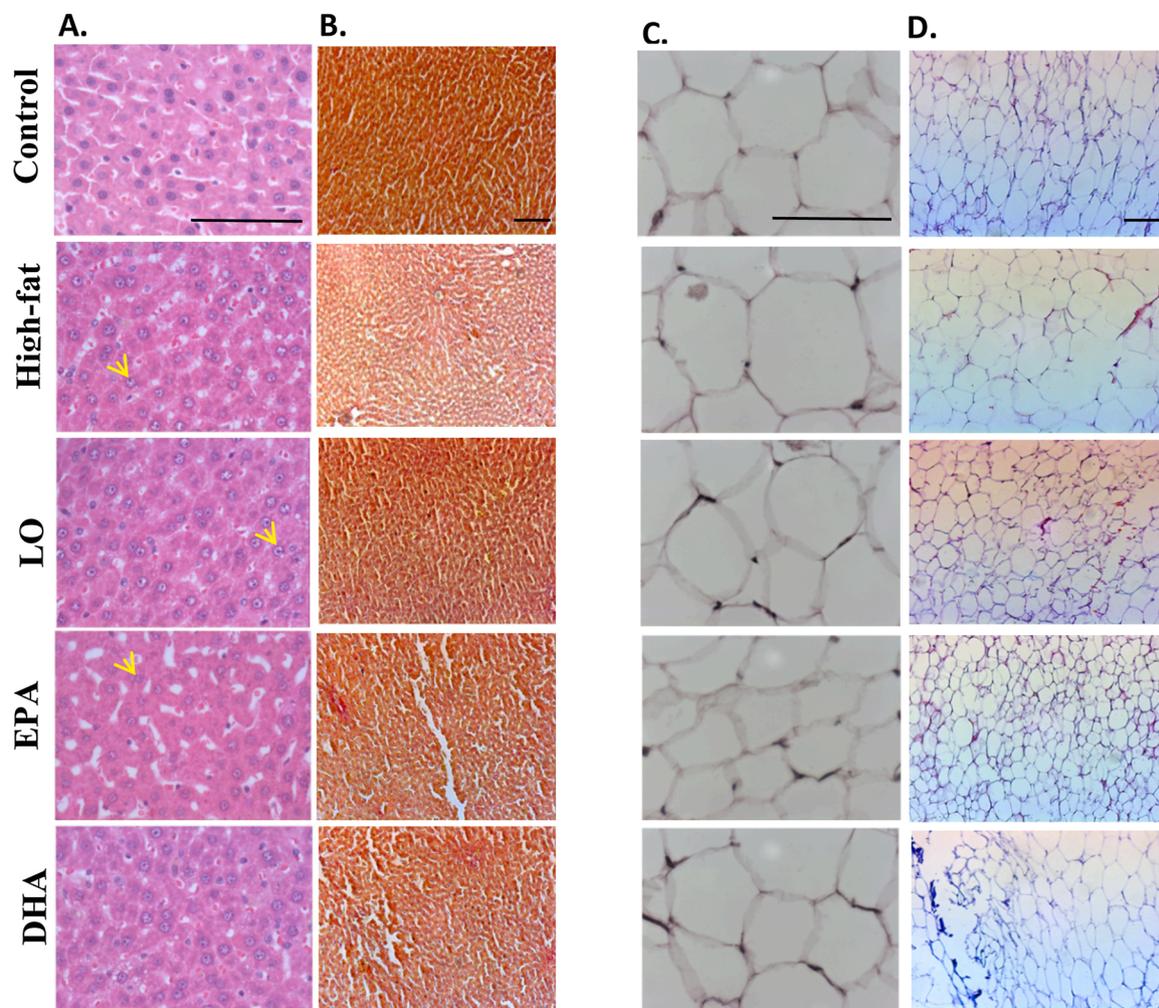
EPA and DHA reduced the number of adipocytes (Fig. 3, panel G). EPA decreased the adipocyte area (Fig. 3, panel H). HF had a higher A/N ratio, and all treatments were effective in reducing this (Fig. 3, panel I).

EPA and DHA decreased collagen type I and III depositions (Fig. 3, panels J and K).

### 3.9. Lipid profile of WAT

EPA had the lowest proportion of lipids in WAT (Fig. 7, panel A). The concentration of total cholesterol did not differ between the groups (Fig. 7, panel B). We did not observe differences between the LO, EPA, and DHA groups related to the triglyceride concentration in the control group (Fig. 7, panel C).

LO had a higher content of ALA compared to the HF, EPA, and DHA groups (Fig. 7, panel D). We observed (Fig. 7, panel E) that EPA and DHA had a higher EPA content than the other groups and that EPA and DHA groups had higher levels of DHA (Fig. 7, panel F). The HF group had a higher content of saturated FA in adipose tissue, the LO and DHA had content similar to that of the control, and the EPA group had a lower content of this type of FA (Fig. 7, panel G). Concerning MUFAs (Fig. 7, panel H) and PUFAs (Fig. 7, panel I), the HF group had a lower content of these FAs, and all treatments showed higher levels of these types of FA compared to the HF and control groups. The HF group showed less incorporation of  $\omega$ -3 (Fig. 7, panel J) and  $\omega$ -6 (Fig. 7, panel K), whereas the treatments had content similar to the control group of  $\omega$ -3 and



**Fig. 2.** Histological analysis of liver and WAT.

(A, C) Liver and WAT stained with H&E at 100x magnification, respectively. (B, D) Liver and WAT stained with Picrus Sirius at 30x magnification in clear fields under polarized light, respectively. C, control group; DHA, docosapentaenoic acid group; dL, deciliter; EPA, eicosapentaenoic acid group; HF, high-fat diet group; LO, linseed oil group.

similar content to the HF group for  $\omega$ -6. However, all treated groups had a lower  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 ratio (Fig. 7, panel L). The content of EPA and DHA in the adipose tissue is below their limit of detection.

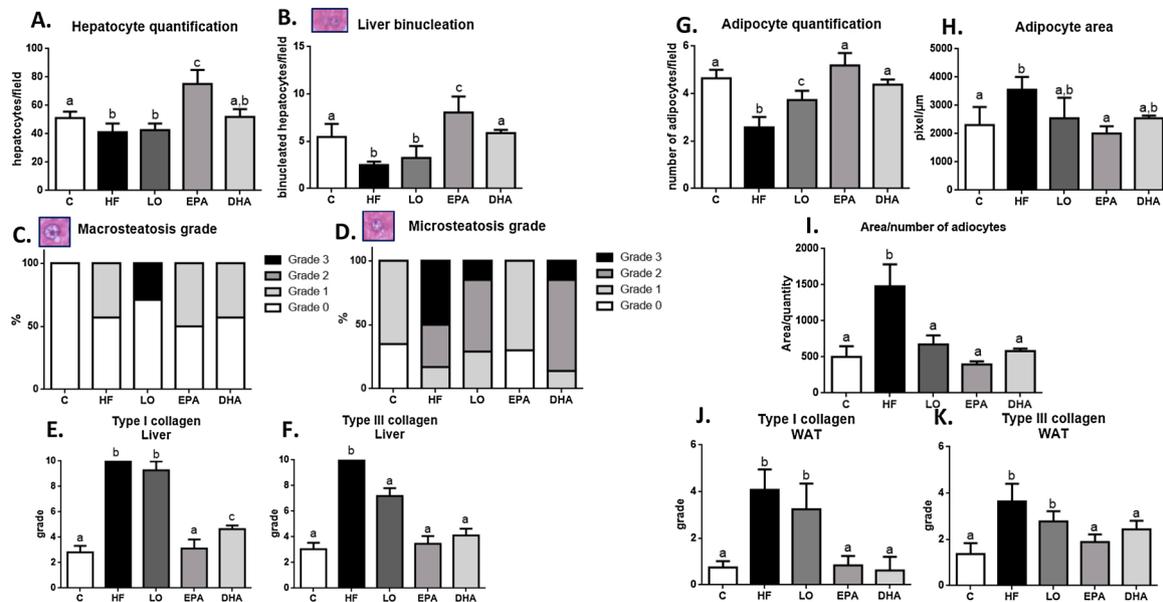
#### 4. Discussion

Our aim was to evaluate whether the treatment of omega 3 present in linseed oil or the compounds EPA and DHA were effective in reversing obesity-compatible metabolic damage, regardless of the obese phenotype. In the first phase of the study (18 weeks of consumption of a high-fat diet), we established the metabolic changes induced by diet as increased blood pressure and serum glucose, impaired insulin response and greater accumulation of triglycerides in the liver and adipose tissue (Table 1); however there was no effect on body weight. These changes are similar to a eutrophic human possessing inadequate eating habits and thus, developing metabolic changes regardless of weight [30]. In the second phase of the study (18–20 weeks) we evaluated the differential effect of oils in reversing metabolic damages. After 20 weeks, the animals in the HF group without treatment continued to develop metabolic damage regardless of the obesity phenotype such as increased serum glucose, higher accumulation of liver fat and higher presence of collagen in this tissue, adipocytes with the major area and smaller quantity and with higher accumulation of collagen in this tissue, regulation of gene expression favorable to fat storage and unfavorable to lipid oxidation in

the liver, and increased production of pro-inflammatory cytokines.

The treatment with a higher proportion of EPA led to a feed efficiency (FE) close to that of the control group, suggesting that this type of FA may have interfered with energy storage, considering that this parameter reflects how much of the ingested feed was stored and that the HF, LO, and DHA groups showed more FE than the control group [25].

The treatments did not affect the serum lipid profile, possibly because the rat model is deficient in cholesterol ester transfer protein (CETP) that is responsible for transferring cholesterol and triglyceride esters (TGs) among serum lipoproteins, including HDL, LDL, and VLDL [31,32]. Despite this, the high-fat diet led to a greater mobilization of total cholesterol and triglycerides to the liver and may also be a contributing cause for the reduction of these serum concentrations. Animals fed with the HF diet presented hyperglycemia, and the EPA and DHA groups had a reduction in blood glucose to the levels close to half by treatment with a major proportion of EPA. The  $\omega$ -3 fatty acids coupled to the G protein (GPR120) can bind to a membrane receptor present on the surface of cells such as hepatocytes and adipocytes, resulting in the activation of signaling pathways responsible for increasing insulin sensitivity [33,34]. Other studies have shown that supplementation with omega 3 at doses between 0.42–5.2 g/day improves insulin sensitivity, reduces glucose and glycated hemoglobin concentrations in diabetics, however, fasting insulin concentrations



**Fig. 3.** Morphometric analysis of liver and WAT.

(A) Number of hepatocytes; (B) binucleate hepatocytes; (C) grade of macrosteatosis (D) grade of microsteatosis (E) grade of type I collagen in the liver; (F) grade of type III in the liver; (G) adipocyte quantification; (H) adipocyte area; (I) area/number of adipocytes. (J) Grade of type I collagen in WAT; (K) grade of type III collagen in WAT. Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) and were evaluated using one-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ . C, control group; DHA, docosapentaenoic acid group; EPA, eicosapentaenoic acid group; HF, high-fat diet group; LO, linseed oil group.

were not significantly affected in most studies, showing no directly dependent dose/response relationship [35,36].

Treatments with EPA and DHA, in both proportions, were effective in decreasing the amount of liver fat induced by the HF diet, and treatment with a major proportion of EPA showed a similar amount of fat to the control and also reduced the concentration of hepatic triglycerides that can favor less ectopic fat accumulation.

We confirmed this effect on hepatic lipid metabolism by analyzing the grade of steatosis, showing that the EPA and DHA treatments, in both proportions, were effective in avoiding macrosteatosis; although all treatments were effective in reducing the grade of microsteatosis, the EPA group was more efficient in this parameter, presenting a result similar to the control. This result may also explain, in part, the hypoglycemic effect of the EPA group, considering that less accumulation of hepatic triglycerides can lead to a reduction in hepatic gluconeogenesis.

In addition, a reduction in the total number of hepatocytes and binucleated hepatocytes in the HF group and treatment with EPA in major proportion increasing the numbers of these cells, total and binucleated, suggests a trend towards liver regeneration [37]. Treatment with EPA and DHA in different proportions protected the integrity of the liver tissue by reducing the deposition of type I collagen, and all treatments (LO, EPA, and DHA) also reduced the deposition of type III collagen. Although type I collagen is naturally abundant in metabolism because it acts in processes of injury recovery, cell migration, and modification of the extracellular matrix, this production is increased in conditions of chronic injury [38] as observed in the HF group. Type III collagen is also important in the healing process and is formed in higher quantities during fibrogenesis [39]. This deposition of hepatic collagen occurs because of the activation of hepatic stellate cells (HSCs) triggered by a chronic injury and leads to the secretion of components of the extracellular matrix such as collagen types I and III, in a continuous attempt to remodel the extracellular matrix that can ultimately lead to liver fibrosis [40]. Li et al. [41] treated patients with non-alcoholic hepatic steatosis with 50 mL of a compound containing 1:1 EPA/DHA and obtained a reduction in the deposition of type III collagen, also showing this effect in an equal proportion of EPA and DHA.

Hepatic lipid metabolism is regulated by transcription factors

including *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs) and nuclear receptors that regulate genes involved in lipogenesis and fatty acid  $\beta$ -oxidation; excess fat (from SFA, MUFA, or PUFA) can lead to an imbalance in these pathways and promote the greater accumulation of liver fat [42].

However, high intake of saturated FA can lead to the progression of non-alcoholic liver steatosis (NAFLD) by promoting liver damage mainly caused by the increase in  $PPAR\gamma$  expression and the consequent migration of pro-inflammatory cytokines, increasing deposition of type I and III collagens, and leading to a change in the composition of the extracellular matrix [43,44]; Li et al., 2019). Another important mechanism involved in the pathogenesis of NAFLD is the reduction in the activity of enzymes responsible for PUFA metabolism ( $\Delta$ -5 and  $\Delta$ -6 desaturase) in the liver that leads to a decrease in  $PPAR-\alpha$  activity and an increase in the pro-lipogenic status mainly by deteriorating the n-6/n-3 ratios and upregulating the gene expression of *sterol regulatory element-binding protein 1c* (SREBP-1c) [17].

Considering that polyunsaturated fatty acids are ligands for several nuclear receptors responsible for the regulation of gene expression of important transcriptional factors in the regulation of lipid metabolism, we evaluated *SREBP-1c* and  $PPAR-\alpha$  gene expression and enzymes regulated in the liver (Tian, 2018; [45]).

$PPAR-\alpha$  has an important role in liver metabolism by regulating FA oxidation by target genes such as *acyl-CoA oxidase* (*ACOX*) and *carnitine palmitoyltransferase I* (*CPT-1*), and prevents mitochondrial dysfunction that could occur by excess FA in this tissue as a consequence of the increase in pro-inflammatory factors such as  $NF\kappa B$  activation, attenuating cell damage and endothelial dysfunction caused by reactive oxygen species [46–48].

*SREBP-c* is also an important transcription factor that plays a key role in the cascade transcription that triggers lipogenesis and regulates *ACC* that is responsible for the carboxylation of acetyl CoA and the production of malonyl-CoA, serving as a substrate for FAS to catalyze hepatic biosynthesis of saturated fatty acids; therefore, there was an improvement in the liver lipogenic profile of the treated animals [49,31,32,45].

Only EPA and DHA decreased the gene expression of the transcription factors *SREBP-1c*; EPA increased the expression of  $PPAR-\alpha$ .

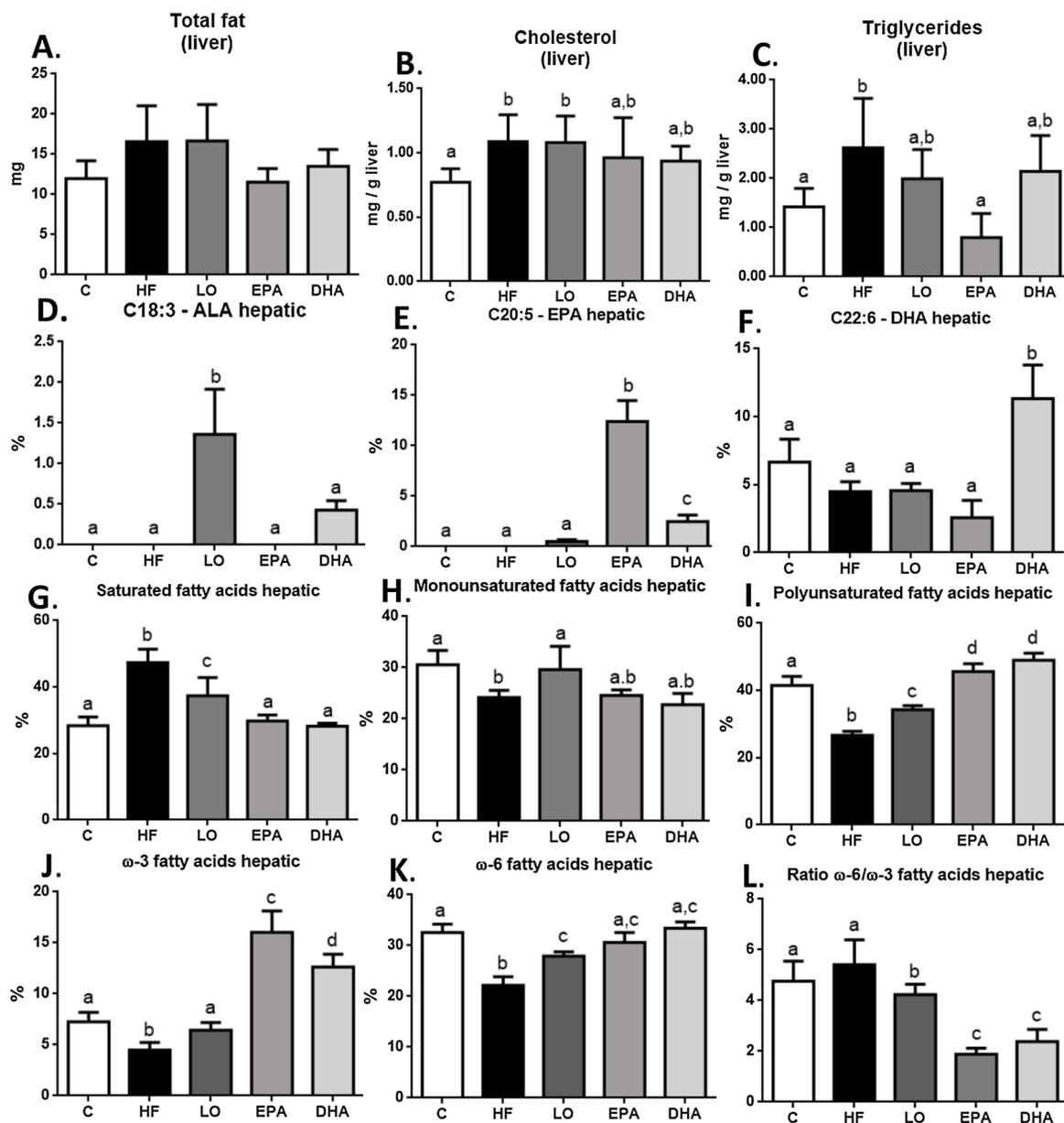


Fig. 4. Fatty acid composition in the liver.

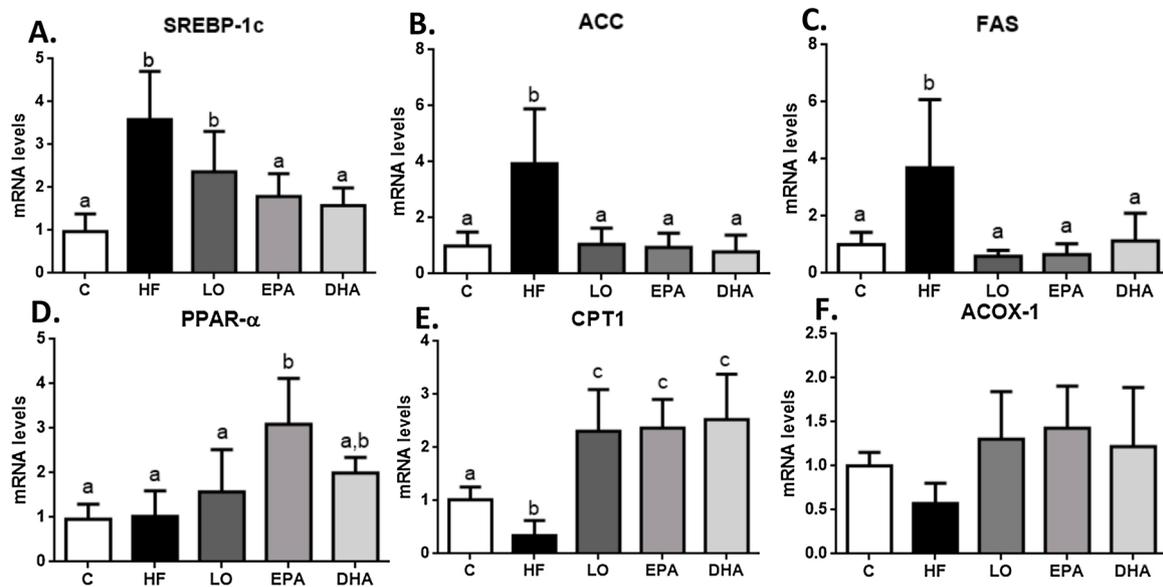
(A) Total hepatic fat; (B) Hepatic total cholesterol; (C) Hepatic triglycerides; (D–I) Fatty acid profile in the liver (J–L); Omega6/omega3 content and ratio. Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) and were evaluated using one-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ . C, control group; DHA, docosapentaenoic acid group; EPA, eicosapentaenoic acid group; g, grams; HF, high-fat diet group; LO, linseed oil group; mg, milligrams.

Regarding the gene expression of enzymes, HF presented the highest relative expression of *ACC* and *FAS* genes and lower expression of *CPT1*. All treatments resulted in the lowest relative expression of *ACC* and *FAS* genes and increased expression of *CPT1*. These results show that the treatments were effective in reducing the accumulation of FA, with the EPA presenting a major capacity to increase *PPAR- $\alpha$*  expression, in parallel with the fact that this was the group with better results in steatosis degree by higher stimulation of  $\beta$ -oxidation.

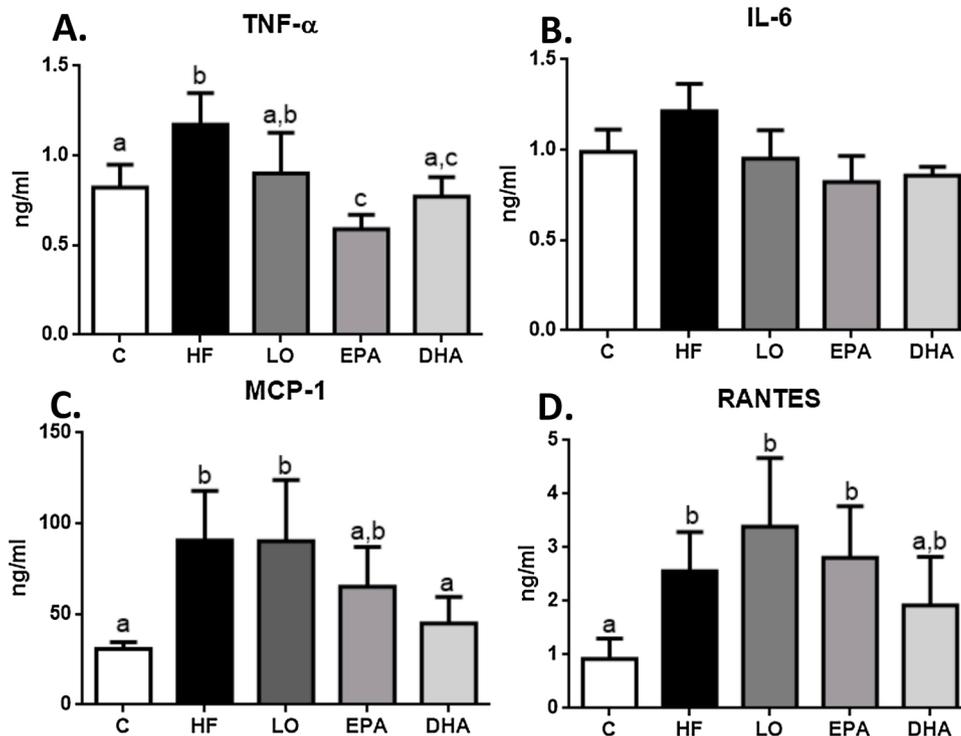
To understand if there was absorption/bioconversion of FA in the tissues, we analyzed the FA composition. The EPA and DHA groups incorporated approximately 10–15% of these compounds in the liver, respectively. The hepatoprotective results observed with these treatments are probably due to the greater incorporation of these FAs (C20:5 and C22:6) in the tissue compared to the other groups. The results also showed that ALA, the main component of linseed oil, has a low rate of bioconversion to EPA and DHA of approximately 1% and 5%,

respectively. Other studies have found bioconversion values in the range of 0%–9% in this organ [50]. It is known that a higher ratio of  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 decreases the conversion of ALA to EPA/DHA by competition for the  $\Delta$ -6 desaturase enzyme, possibly also explaining the low content of EPA/DHA found in the tissues of animals treated with LO, considering that the HF diet contained FA  $\omega$ -6, but treatments with EPA and DHA ensured a lower proportion of  $\omega$ -6/ $\omega$ -3; treatments with EPA and DHA resulted in less incorporation of saturated FA in the tissue, reducing the damage caused by these FAs in the liver.

The chronic ingestion of HF diet leads to a depletion of hepatic PUFA, favoring ROS-dependent oxidative reactions and upregulation *SREBP-1* and consequent FA accumulation concomitant with downregulation of *PPAR- $\alpha$*  and a decrease in FA oxidation; this contributes to oxidative stress triggering protein oxidation and endoplasmic reticulum (ER) stress, leading to liver mitochondrial dysfunction and consequent lipid peroxidation processes that enhance the TNF- $\alpha$  blood (as obtained by



**Fig. 5.** Expression of genes of lipid metabolism in the liver. (A) *SREBP1-1c*; (B) *ACC*, (C) *FAS*, (D) *PPAR-α*, (E) *CPT1* e (F) *ACOX-1*. Data were expressed as mean ± standard deviation (SD) and were evaluated using one-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ . ACC, acetyl-CoA carboxylase; ACOX-1, acyl-CoA oxidase-1; C, control group; CPT1, carnitine palmitoyltransferase-1; DHA, docosapentaenoic acid group; EPA, eicosapentaenoic acid group; FAS, fatty acid synthase; HF, high-fat diet group; LO, linseed oil group; PPAR-α, proliferator-activated receptor alpha; SREBP-1c, sterol regulatory element-binding proteins.



**Fig. 6.** Evaluation of inflammatory cytokines in serum and WAT. Serum cytokines: (A) TNF-α, (B) IL-6, and WAT: (C) MCP1 and (D) RANTES concentrations. Data were expressed as mean ± standard deviation (SD) and were evaluated using one-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ . C: control group; DHA: docosapentaenoic acid group; EPA: eicosapentaenoic acid group; HF: high-fat diet group; IL: interleukin; LO: linseed oil group; MCP: monocyte chemoattractant protein; mL: milliliter; ng: nanograms; RANTES: Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted; TNF-α: tumor necrosis factor alpha.

EPA and DHA) with deterioration of electron flow and ATP synthesis. However, there is evidence that the upregulation of *PPAR-α*, *CPT1*, and *ACOX1* reestablishes the NAD<sup>+</sup>/NADH levels and protects the mitochondria functionally [51].

Besides the liver, adipose tissue also plays a central role in the uptake, processing, transport, and storage of nutrients, and these two tissues form an important metabolic circuit [52]. We observed that the HF diet resulted in a reduction in the number and an increase in the area of adipose cells, and treatment with EPA and DHA increased the number of

these cells. HF also presented a higher ratio of area/quantity of adipose cells, and all treatments were effective in reducing the hypertrophy of these cells. It is known that the increase in the number of adipose cells (adipocyte hyperplasia) is more metabolically favorable for the tissue because it occurs due to the greater proliferation and differentiation of precursor cells (adipose tissue progenitor cells (APCs)) that reside in the stroma tissue and form mature adipocytes through mitosis [53]. Thus, an increased number of fat cells can lead to less ectopic lipid deposition of lipids [54].

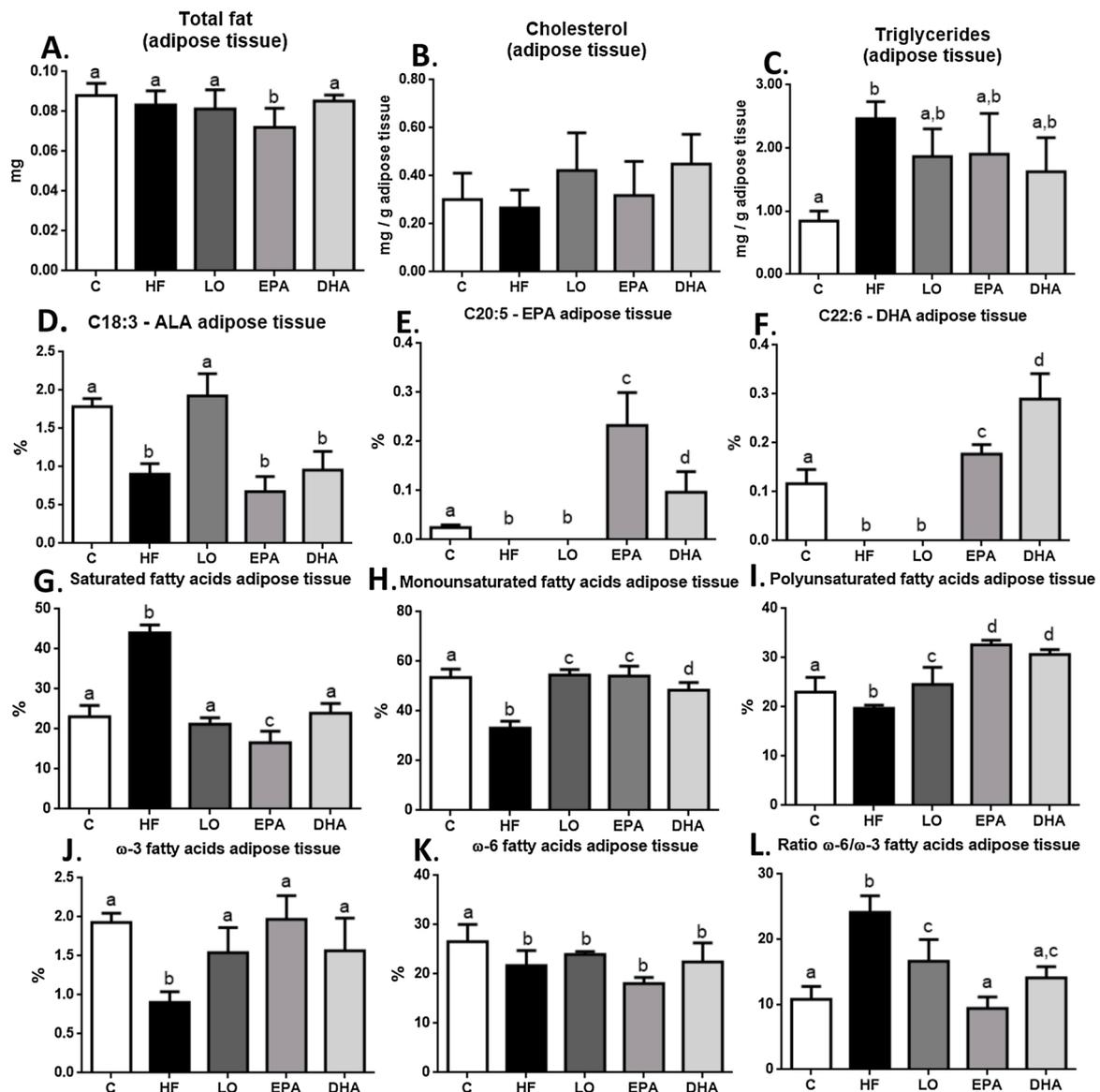


Fig. 7. Fatty acid composition in the WAT.

(A) Total WAT fat; (B) WAT total cholesterol; (C) WAT triglycerides; (D–I) Fatty acid profile in WAT (J–L); Omega6/omega3 content and ratio. Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) and were evaluated using one-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ . C, control group; DHA, docosapentaenoic acid group; EPA, eicosapentaenoic acid group; g, grams; HF, high-fat diet group; LO, linseed oil group; mg, milligrams. The content of EPA and DHA in the adipose tissue is below their limit of detection.

The HF diet also resulted in the deposition of type I and type III collagen in adipose tissue, and treatment with EPA and DHA reduced this deposition. Thus, the group treated with EPA presented with hypotrophy and hyperplasia of adipocytes, characterizing a remodeling of the adipose tissue confirmed by the assessment of the degree of tissue fibrosis. As in the liver, increased tissue damage leads to higher recruitment of macrophages and collagen production as a way to repair tissue structure, but can reduce the flexibility and plasticity of the tissue, causing eventual dysfunction of adipocytes [55]. However, treatment with EPA and DHA in both proportions was effective in leading to remodeling of the adipose tissue.

Cytokines in WAT showed higher concentrations in animals on the HF diet but only the DHA group showed a lower MCP-1 concentration. This suggests an important role for DHA, in major proportion, in reducing the migration of pro-inflammatory cells to this tissue because these cytokines are chemotactic proteins that enhance the recruitment of monocytes and accumulation of macrophages [56].

Regarding the absorption/bioconversion of FA in WAT, treatments

with LO, EPA, and DHA resulted in higher incorporation of ALA, EPA, and DHA, respectively, ensuring a lower ratio of  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 and less incorporation of saturated FA in AT, possibly supporting the protective effects of these lipids. A study by Punia et al. [57] revealed that the absorption of EPA and DHA in tissues can vary according to metabolic conditions and can be influenced by the  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 ratio. Thus, the low content of EPA and DHA in the adipose tissue can be explained by the higher  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 ratio, impairing the action of desaturases and their elongase enzymes.

It is also known that PUFA can lead to a smaller and healthy adipocyte phenotype by binding and activating *PPAR- $\gamma$*  in WAT (Yang et al., 2017). Therefore, the remodeling of WAT could also be related to *SREBP-1c* downregulation, pathways involved in *de novo* lipogenesis, and *PPAR- $\alpha$*  upregulation, with the recovery of the mitochondrial oxidative capacity and possible *PPAR- $\gamma$*  modulation, reflecting the decreased FA flux in the liver (Illesca et al., 2020).

A possible mechanism that justifies the differential effects of EPA and DHA in different doses or tissues may be the action of eicosanoids. In an

*in vitro* study, [58] observed that cells supplemented with EPA produced higher levels of cyclooxygenases (COX), prostaglandins in series 3, and prostacyclins that control cells. However, cells supplemented with DHA were more effective in reducing the eicosanoid derivatives of arachidonic acid such as prostaglandins, prostacyclins, and thromboxanes of series 2.

We conclude that treatment with EPA in higher proportions was more effective in reducing the area of adipocytes, the hepatic triglyceride concentration, and the quantity of fat in the adipose tissue. Treatment with a higher proportion of DHA was more efficient in reducing the concentration of MCP1 in the WAT, and treatment with LO did not have any isolated effect.

However, treatments with EPA and DHA, in different proportions, were more effective in treating the metabolic damage caused by ingestion of saturated FA than treatment with LO in the liver and WAT, leading to a more favorable metabolic profile due to the lower accumulation of hepatic fat, remodeling of the adipose tissue, and less deposition of fibrotic material, effects mainly caused by the regulation of the expression of lipogenic genes.

### Funding sources

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) Brazil.

Costa, D. C.; Talvani, A. and Carneiro, C. M. were supported by CNPq with the Fellowship of Research Productivity and no funding sources were involved in the analysis and interpretation of data.

### Data statement

Data are available on request from the authors. The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

### Author's contributions

BVD, DCC: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review and editing; SVG, LCF, GSB, DMSS, COR, MRS, SCBR: Data curation, Methodology; Software; MLCC: Data curation, Methodology; AT: Funding acquisition; Resources; CMC, DECC: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Resources; Software; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft. All authors have read and approved the final manuscript.

### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no competing interests.

### Acknowledgments

We thank Laboratório Multiusuários de Microscopia - UFOP - FINEP - CT-INFRA2004 for their collaboration in the microscopic analysis.

### References

- [1] K. González-Becerra, O. Ramos-Lopez, E. Barrón-Cabrera, J.I. Riezu-Boj, F. I. Milagro, E. Martínez-López, et al., Fatty acids, epigenetic mechanisms and chronic diseases: a systematic review, *Lipids Health Dis.* 18 (1) (2019) 1–18, <https://doi.org/10.1186/s12944-019-1120-6>.
- [2] M. Blüher, Obesity: global epidemiology and pathogenesis, *Nat. Rev. Endocrinol.* 15 (5) (2019) 288–298, <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>.
- [3] J.K. Innes, P.C. Calder, Marine omega-3 (n-3) fatty acids for cardiovascular health: an update for 2020, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (4) (2020) 1362, <https://doi.org/10.3390/ijms21041362>.
- [4] S.V. Gomes, B.V. Dias, R.R. Pereira, K. de Pádua Lúcio, D.M.S. de Souza, A. Talvani, et al., Different source of commercial vegetable oils may regulate metabolic, inflammatory and redox status in healthy rats, *J. Funct. Foods* 66 (2020), 103780, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103780>.
- [5] H. Zhou, C.J. Urso, V. Jadeja, Saturated fatty acids in obesity-associated inflammation, *J. Inflamm. Res.* 13 (2020) 1, <http://doi.org/10.2147%2FJIR.S229691>.
- [6] L. Haversen, K.N. Danielsson, L. Fogelstrand, O. Wiklund, Induction of proinflammatory cytokines by long-chain saturated fatty acids in human macrophages, *Atherosclerosis*. 202 (2) (2009) 382–393, <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.05.033>.
- [7] F. Rodriguez-Pacheco, C. Gutierrez-Repiso, S. Garcia-Serrano, M.A. Alaminos-Castillo, A. Ho-Plagaro, S. Valdes, E. Garcia-Fuentes, et al., The pro-/anti-inflammatory effects of different fatty acids on visceral adipocytes are partially mediated by GPR120, *Eur. J. Nutr.* 56 (4) (2017) 1743–1752, <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1222-0>.
- [8] D.A. Nicholas, K. Zhang, C. Hung, S. Glasgow, A.W. Aruni, J. Unteraehrer, M. De Leon, et al., Palmitic acid is a toll-like receptor 4 ligand that induces human dendritic cell secretion of IL-1 $\beta$ , *PLoS One* 12 (5) (2017) e0176793, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176793>.
- [9] Y.A. Abd El-Aal, D.M. Abdel-Fattah, K.E.D. Ahmed, Some biochemical studies on trans fatty acid-containing diet, *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* 13 (3) (2019) 1753–1757, <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.03.029>.
- [10] R.D. Santos, A.C.M. Gagliardi, H.T. Xavier, C.D. Magnoni, R. Cassani, A.M. P. Lottenberg, et al., I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular, *Arq. Bras. Cardiol.* 100 (1) (2013) 1–40, <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2013000900001>.
- [11] A.P. Simopoulos, The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases, *Exp. Biol. Med.* 233 (6) (2008) 674–688, <https://doi.org/10.3181/0711-MR-311>.
- [12] F. Shahidi, P. Ambigaipalan, Omega-3 polyunsaturated fatty acids and their health benefits, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 9 (2018) 345–381, <https://doi.org/10.1146/annurev-food-111317-095850>.
- [13] T. Shibabaw, Omega-3 polyunsaturated fatty acids: anti-inflammatory and anti-hypertriglyceridemia mechanisms in cardiovascular disease, *Mol. Cell. Biochem.* (2020) 1–11, <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03965-7>.
- [14] M.A. Rincón-Cervera, R. Valenzuela, M.C. Hernandez-Rodas, M. Marambio, A. Espinosa, S. Mayer, L.A. Videla, et al., Supplementation with antioxidant-rich extra virgin olive oil prevents hepatic oxidative stress and reduction of desaturation capacity in mice fed a high-fat diet: effects on fatty acid composition in liver and extrahepatic tissues, *Nutrition* 32 (11–12) (2016) 1254–1267, <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.04.006>.
- [15] A.H. Metherel, A.F. Domenichiello, A.P. Kitson, K.E. Hopperton, R.P. Bazinet, Whole-body DHA synthesis-secretion kinetics from plasma eicosapentaenoic acid and alpha-linolenic acid in the free-living rat, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Mol. Cell Biol. Lipids* 1861 (9) (2016) 997–1004, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.05.014>.
- [16] X. Deng, Q. Dong, D. Bridges, R. Raghov, E.A. Park, M.B. Elam, Docosahexaenoic acid inhibits proteolytic processing of sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) via activation of AMP-activated kinase, *Biochim. Biophys. Acta* 1851 (12) (2015) 1521–1529, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.08.007>.
- [17] F. Echeverría, M. Ortiz, R. Valenzuela, L.A. Videla, Long-chain polyunsaturated fatty acids regulation of PPARs, signaling: relationship to tissue development and aging, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 2016 (114) (2016) 28–34, <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2016.10.001>.
- [18] H. Su, R. Liu, M. Chang, J. Huang, Q. Jin, X. Wang, Effect of dietary alpha-linolenic acid on blood inflammatory markers: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *Eur. J. Nutr.* 57 (3) (2018) 877–891, <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1386-2>.
- [19] A. Elagizi, C.J. Lavie, E. O'Keefe, K. Marshall, J.H. O'Keefe, R.V. Milani, An update on Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular health, *Nutrients* 13 (1) (2021) 204, <https://doi.org/10.3390/nu13010204>.
- [20] S.M. Hirabara, A. Follador, J. Fiamoncini, R.H. Lambertucci, C.F. Rodrigues Jr., Rocha, et al., Fish oil supplementation for two generations increases insulin sensitivity in rats, *J. Nutr. Biochem.* 24 (6) (2013) 1136–1145, <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.08.014>.
- [21] A.C. Famurewa, C.A. Ekeleme-Egedigwe, S.C. Nwali, N.N. Agbo, J.N. Obi, G. C. Ezechukwu, Dietary supplementation with virgin coconut oil improves lipid profile and hepatic antioxidant status and has potential benefits on cardiovascular risk indices in normal rats, *J. Diet. Suppl.* 15 (3) (2018) 330–342, <https://doi.org/10.1080/19390211.2017.1346031>.
- [22] F.V. Soxhlet, Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes, *Dingler's Polytechnisches J.* 232 (1879) 461–465.
- [23] J.G.C.T. Kjeldahl, Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen körpern, *Zeitschrift für analytische Chem.* 22 (1) (1883) 366–382, <https://doi.org/10.1007/BF01338151>.
- [24] N. Shirai, H. Suzuki, S. Wada, Direct methylation from mouse plasma and from liver and brain homogenates, *Anal. Biochem.* 343 (1) (2005) 48–53, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.04.037>.
- [25] E.L.B. Novelli, Y.S. Diniz, C.M. Galhardi, G.M.X. Ebaid, H.G. Rodrigues, F. Mani, et al., Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats, *Lab. Anim.* 41 (1) (2007) 111–119, <https://doi.org/10.1258/00236770779399518>.

- [26] D.E. Kleiner, E.M. Brunt, M. Van Natta, C. Behling, M.J. Contos, O.W. Cummings, et al., Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease, *Hepatology* 41 (6) (2005) 1313–1321, <https://doi.org/10.1002/hep.20701>.
- [27] R. Coleman, Picrosirius red staining revisited, *Acta Histochem.* 113 (3) (2010) 231–233, <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2010.02.002>.
- [28] J. Folch, M. Lees, G.S. Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226 (1) (1957) 497–509.
- [29] C. Becker, A. Hammerle-Pickinger, I. Riedmaier, M.W. Pfaffl, mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis, *Methods* 50 (4) (2010) 237–243, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.010>.
- [30] S.K. Rehunen, H. Kautiainen, P.E. Korhonen, J.G. Eriksson, A high lean body mass is not protecting from type 2 diabetes in the presence of a high body fat mass, *Diabetes Metab.* 47 (6) (2021) 101219, <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2020.101219>.
- [31] J. Zhu, J. Jin, J. Ding, S. Li, P. Cen, K. Wang, et al., Ganoderic Acid A improves high fat diet-induced obesity, lipid accumulation and insulin sensitivity through regulating SREBP pathway, *Chem. Biol. Interact.* 290 (2018) 77–87, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.05.014>.
- [32] L. Zhu, T. Luu, C.H. Emfinger, B.A. Parks, J. Shi, E. Trefets, et al., CETP inhibition improves HDL function but leads to fatty liver and insulin resistance in CETP-expressing transgenic mice on a high-fat diet, *Diabetes* 67 (12) (2018) 2494–2506, <https://doi.org/10.2337/db18-0474>.
- [33] S. Talukdar, E.J. Bae, T. Imamura, H. Morinaga, W. Fan, P. Li, et al., GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects, *Cell* 142 (5) (2010) 687–698, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.041>.
- [34] D. Amos, C. Cook, N. Santanam, Omega 3 rich diet modulates energy metabolism via GPR120-Nrf2 crosstalk in a novel antioxidant mouse model, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Mol. Cell Biol. Lipids* 1864 (4) (2019) 466–488, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.01.002>.
- [35] O.G.L. Coelho, B.P. da Silva, D.M.U.P. Rocha, L.L. Lopes, R.D.C.G. Alfenas, Polyunsaturated fatty acids and type 2 diabetes: impact on the glycemic control mechanism, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57 (17) (2017) 3614–3619, <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1130016>.
- [36] M.A. Belury, R.M. Cole, D.B. Snoko, T. Banh, A. Angelotti, Linoleic acid, glycemic control and Type 2 diabetes, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 132 (2018) 30–33, <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2018.03.001>.
- [37] P. Gerlyng, A. Åbyholm, T. Grotmol, B. Erikstein, H.S. Huitfeldt, T. Stokke, et al., Binucleation and polyploidization patterns in developmental and regenerative rat liver growth, *Cell Prolif.* 26 (6) (1993) 557–565. <http://10.1111/j.1365-2184.1993.tb00033.x>.
- [38] S.K. Meurer, M.A. Karsdal, R. Weiskirchen, Advances in the clinical use of collagen as biomarker of liver fibrosis, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 20 (9) (2020) 947–969, <https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1814746>.
- [39] M.A. Karsdal, K. Henriksen, M.J. Nielsen, I. Byrjalsen, D.J. Leeming, S. Gardner, et al., Fibrogenesis assessed by serological type III collagen formation identifies patients with progressive liver fibrosis and responders to a potential antifibrotic therapy, *Am. J. Physiol. Gastrointestinal and Liver Physiol.* (2016), <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00283.2016>.
- [40] S.L. Friedman, Mechanisms of hepatic fibrogenesis, *Gastroenterology* 134 (6) (2008) 1655–1669, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.003>.
- [41] Y.H. Li, L.H. Yang, K.H. Sha, T.G. Liu, L.G. Zhang, X.X. Liu, Efficacy of polyunsaturated fatty acid therapy on patients with nonalcoholic steatohepatitis, *World J. Gastroenterol.* 21 (22) (2015) 7008, <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i22.7008>.
- [42] H. Rafiei, K. Omidian, B. Bandy, Dietary polyphenols protect against oleic acid-induced steatosis in an in vitro model of NAFLD by modulating lipid metabolism and improving mitochondrial function, *Nutrients* 11 (3) (2019) 541, <https://doi.org/10.3390/nu11030541>.
- [43] M. Carmiel-Haggai, A.I. Cederbaum, N. Nieto, A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats, *Faseb J.* 19 (1) (2005) 136–138, <https://doi.org/10.1096/fj.04-2291fj>.
- [44] F. Tian, J. Wang, H. Sun, J. Yang, P. Wang, S. Wan, et al., N-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis via the PPAR- $\alpha$ /CPT-1 $\alpha$  pathway in a mouse model of parenteral nutrition, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 501 (4) (2018) 974–981, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.095>.
- [45] M. Zhang, X. Chi, N. Qu, C. Wang, Long noncoding RNA lncARSR promotes hepatic lipogenesis via Akt/SREBP-1c pathway and contributes to the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 499 (1) (2018) 66–70, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.127>.
- [46] W. Wahli, L. Michalik, PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation, *Trends Endocrinol. Metab.* 23 (7) (2012) 351–363, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.05.001>.
- [47] A.V. Contreras, N. Torres, A.R. Tovar, PPAR- $\alpha$  as a key nutritional and environmental sensor for metabolic adaptation, *Adv. Nutr.* 4 (4) (2013) 439–452, <https://doi.org/10.3945/an.113.003798>.
- [48] J.M. Zolezzi, C. Silva-Alvarez, D. Ordenes, J.A. Godoy, F.J. Carvajal, M.J. Santos, N.C. Inestrosa, Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  and PPAR $\alpha$  agonists modulate mitochondrial fusion-fission dynamics: relevance to reactive oxygen species (ROS)-related neurodegenerative disorders? *PLoS One* 8 (5) (2013) e64019, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064019>.
- [49] P. Ferre, F. Foufelle, Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c, *Diabetes Obes. Metab.* 12 (2010) 83–92, <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01275.x>.
- [50] P.C. Calder, Docosahexaenoic acid, *Ann. Nutr. Metab.* 69 (Suppl. 1) (2016) 8–21, <https://doi.org/10.1159/000448262>.
- [51] M. Ortiz, S.A. Soto-Alarcón, P. Orellana, A. Espinosa, C. Campos, S. López-Arana, L. A. Videla, et al., Suppression of high-fat diet-induced obesity-associated liver mitochondrial dysfunction by docosahexaenoic acid and hydroxytyrosol co-administration, *Dig. Liver Dis.* 52 (8) (2020) 895–904, <https://doi.org/10.1016/j.dld.2020.04.019>.
- [52] C.C. Duwaerts, J.J. Maher, Macronutrients and the adipose-liver axis in obesity and fatty liver, *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 7 (4) (2019) 749–761, <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.02.001>.
- [53] L.A. Muir, C.K. Neeley, K.A. Meyer, N.A. Baker, A.M. Brosius, A.R. Washabaugh, et al., Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: correlations with diabetes in human obesity, *Obesity* 24 (3) (2016) 597–605, <https://doi.org/10.1002/oby.21377>.
- [54] M. Rydén, D.P. Andersson, I.B. Bergström, P. Arner, Adipose tissue and metabolic alterations: regional differences in fat cell size and number matter, but differently: a cross-sectional study, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99 (10) (2014) E1870–E1876, <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1526>.
- [55] P. Zelechowska, J. Agier, E. Kozłowska, E. Brzezińska-Błaszczak, Mast cells participate in chronic low-grade inflammation within adipose tissue, *Obes. Rev.* 19 (5) (2018) 686–697, <https://doi.org/10.1111/obr.12670>.
- [56] Y.S. Lee, J. Wollam, J.M. Olefsky, An integrated view of immunometabolism, *Cell* 172 (1–2) (2018) 22–40, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.025>.
- [57] S. PUNIA, et al., Omega 3-metabolism, absorption, bioavailability and health benefits—A review, *PharmaNutrition* 10 (2019) 100162, <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2019.100162>.
- [58] P.C. Norris, E.A. Dennis, Omega-3 fatty acids cause dramatic changes in TLR4 and purinergic eicosanoid signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (22) (2012) 8517–8522, <https://doi.org/10.1073/pnas.1200189109>.