UNIVERSIDADE DO BRASIL
UFRJ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO

AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO GRAXO ALFA-LINOLÊNICO [N-3] DOS ÓLEOS DE ROSA MOSQUETA [*ROSA AFF. RUBIGINOSA*] E CHIA [*SALVIA HISPANICA L.*] E EFEITO DESTES ÓLEOS SOBRE A ATIVIDADE INFLAMATÓRIA TECIDUAL

Natalia Gomes Casanova de Oliveira e Castro

RIO DE JANEIRO

2017

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO

AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO GRAXO ALFA-LINOLÊNICO [N-3] DOS ÓLEOS DE ROSA MOSQUETA [*ROSA AFF. RUBIGINOSA*] E CHIA [*SALVIA HISPANICA L.*] E EFEITO DESTES ÓLEOS SOBRE A ATIVIDADE INFLAMATÓRIA TECIDUAL

Natalia Gomes Casanova de Oliveira e Castro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de **Mestre em Nutrição Humana**.

Orientadora: Profª. Drª. Fátima Lúcia de Carvalho Sardinha

Coorientadora: Drª. Patricia Coelho de Velasco

Rio de Janeiro

Outubro- 2017

Castro, Natalia Gomes Casanova de Oliveira e

Avaliação da incorporação do ácido graxo alfa-linolênico [N-3] dos óleos de rosa mosqueta [*Rosa Aff. Rubiginosa*] e chia [*Salvia Hispanica L.*] e efeito destes óleos sobre a atividade inflamatória tecidual / Natalia Gomes Casanova de Oliveira e Castro. – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2017.

103 f. il. ; 31 cm.

Orientadora: Fátima Lúcia de Carvalho Sardinha.

Coorientadora: Patricia Coelho de Velasco

Dissertação (mestrado) -- UFRJ, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2017.

Referências: p. 47-52.

1. Ácido alfa-Linolênico. 2. Ácidos Graxos Insaturados / efeitos adversos. 3. Adipocinas. 4. Citocinas. 5. Colesterol. Nutrição. - Dissertação. I. Sardinha, Fátima Lúcia de Carvalho. II. Velasco, Patricia Coelho de. III. Instituto de Nutrição Josué de Castro. IV. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. V. Título.

NATALIA GOMES CASANOVA DE OLIVEIRA E CASTRO

Avaliação da incorporação do ácido graxo alfa-linolênico [n-3] dos óleos de rosa mosqueta [*Rosa aff. rubiginosa*] e chia [*Salvia hispanica L.*] e efeito destes óleos sobre a atividade inflamatória tecidual

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de **mestre em Nutrição Humana**.
Aprovada em ...../...../2017

Banca examinadora

Prof.ª Dr.ª Kelse Tibau de Albuquerque- Examinadora titular e revisora
Doutora em Ciências - UNIFESP

Prof.ª Dr.ª Marcia Soares da Mota e Silva Lopes- Examinadora titular
Doutora em Ciências Biológicas - UFRJ

Prof.ª Dr.ª Maria das Graças Tavares do Carmo - Examinadora titular
Doutora em Farmacologia - UNIFESP

Profª Drª Fátima Lúcia de Carvalho Sardinha – Orientadora e Presidente da banca
Doutora em Ciências - UNIFESP

Rio de Janeiro, RJ – Brasil
Outubro/ 2017

Ao André e ao Lucas, minhas maiores forças.

À minha mãe Maura pelo apoio.

Aos meus cachorros Pucca, Lola e Amadeu, companheiros de todas as horas.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Professora Fátima Lúcia de Carvalho Sardinha, por ter me acolhido e compartilhado, sempre com leveza e carinho, todo seu conhecimento. Agradeço seu preciosismo nos detalhes, que sempre me estimulou a buscar aperfeiçoamento não apenas acadêmico e profissional, mas também pessoal. Obrigada por ser um grande exemplo de professora, pesquisadora, orientadora e amiga!

Agradeço à minha atual co-orientadora, Patrícia Coelho de Velasco, pela amizade, companheirismo, compreensão e dedicação. Seu conhecimento e sua ajuda, sempre me apoiando e sugerindo melhorias, foram imprescindíveis em muitos momentos.

À minha primeira co-orientadora, Flavia Spreaficco Fernandes, agradeço a amizade e a leveza com que compartilhou comigo todo seu conhecimento acerca deste maravilhoso tema da nutrição. Obrigada por ter me acolhido e confiado a mim este projeto de pesquisa. À Professora Kelse Tibau de Albuquerque, agradeço o carinho, acolhimento e apoio em tantos momentos em seu laboratório em Macaé, onde tive a oportunidade de adquirir ainda mais conhecimentos técnicos e científicos. Agradeço também sua dedicada revisão, imprescindível para melhoria de minha dissertação.

À Professora Maria das Graças Tavares do Carmo, agradeço o constante interesse em meu projeto, sempre com muita paciência, amizade e delicadeza. Seu amplo conhecimento foi um grande diferencial para o andamento da pesquisa, bem como para a interpretação de resultados e conclusão de minha dissertação.

Àos Professores Marcia Soares da Mota e Silva Lopes, Eliane Fialho de Oliveira e Gilson Teles Boaventura, agradeço a disponibilidade de participarem de minha banca, colaborando com suas experiências.

Ao Professor e amigo Leandro Oliveira Batista, agradeço todo o carinho com que abriu suas portas e me acolheu, como amiga e como aprendiz. Seu conhecimento, sua boa vontade constante em ajudar, seu estímulo, seu bom humor e sua amizade foram imprescindíveis para o meu aprendizado, contribuindo imensamente com o andamento do projeto e conclusão desta dissertação.

Ao Professor José Mauro Peralta, agradeço o acolhimento em seu laboratório e toda disponibilidade de seus alunos.

Ao Doutor Mauro Jorge Cabral Castro, agradeço todo ensinamento compartilhado, toda ajuda nas análises imunológicas e todas as muitas horas dedicadas aos experimentos, que contribuíram com resultados tão esperados para minha dissertação.

Ao meu companheiro de vida André Apel Zoffoli, agradeço o apoio diário e incondicional, o carinho, a compreensão, as risadas que você sempre consegue extrair de mim, o ombro acolhedor nos momentos difíceis, as consultorias técnicas de informática, e principalmente o estímulo constante que você me dá. Obrigada por ser um exemplo e fazer brotar o melhor em mim! Você torna meu caminho muito mais leve e toda conquista ao seu lado é uma recompensa imensurável.

Ao meu filho Lucas, que despertou forças que eu não sabia que tinha. Você foi o pequeno grande impulso para tudo.

À minha mãe Maura Moreira Gomes, por ter sido um grande exemplo de mulher e de profissional. O seu exemplo me faz querer ser sempre melhor e mais forte. Obrigada por todo apoio incondicional, desde a escola, passando pelas (muitas) universidades, pós-graduação e, enfim, conclusão deste mestrado!

Aos meus avós João Gomes Assumpção e Zenith Moreira Gomes, que me criaram com tanto carinho e me possibilitaram trilhar este caminho acadêmico.

À minha irmã Renata Gomes Casanova de Oliveira e Castro e meu primo Rodrigo Moreira Gomes, que sempre foram grandes exemplos de profissionais comprometidos, dedicados e estudiosos.

Ao meu pai, Francisco José Casanova de Oliveira e Castro, pelo exemplo de pesquisador e professor.

Ao amigo Luiz Lannes Loureiro, pelo apoio constante, auxílios técnicos imprescindíveis e pelo ombro amigo sempre presente.

RESUMO

CASTRO, Natalia Gomes Casanova de Oliveira. Avaliação da incorporação do ácido graxo alfa-linolênico [n-3] dos óleos de rosa mosqueta [*Rosa aff. rubiginosa*] e chia [*Salvia hispanica L.*] e efeito destes óleos sobre a atividade inflamatória tecidual. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana)-Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2017.

O consumo de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) ômega-3 (n-3) está associado a benefícios diversos à saúde, como menor ativação de vias inflamatórias e menor risco para desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. Estes AGPI são encontrados em alimentos como animais marinhos, fontes dos ácidos docosahexaenoico (DHA) e eicosapentaenoico (EPA), e também em sementes, fontes de ácido alfa-linolêncio (ALA). Em contrapartida, o elevado consumo de AGPI ômega-6 (n-6), encontrado em carnes como a bovina e óleos vegetais, como os de milho e soja, quando associado a baixo consumo de AGPI n-3, pode caracterizar inadequada ingestão dietética da razão n-6/n-3. O consumo desbalanceado destas famílias de AGPI está relacionado a malefícios à saúde, dentre os quais podemos destacar maior risco de desenvolvimento de obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 e inflamação tecidual e sistêmica. No presente estudo buscou-se investigar se a origem do AGPI n-3 dietético (marinho ou vegetal) produz efeitos distintos sobre a modulação do metabolismo lipídico e de mediadores da atividade inflamatória tecidual. Camundongos machos C57BL/6 foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos experimentais, de acordo com a ração manipulada, normolipídica e isoenergética, oferecida do quadragésimo segundo dia de vida até o sexto mês de vida, contendo fontes lipídicas distintas (grupo soja = GS, grupo chia = GCh, grupo rosa mosqueta = GRM, grupo peixe = GP). Aos 180 dias de idade, os animais foram submetidos ao teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTIG), e, aos 200 dias, à coleta de sangue por punção cardíaca, seguida de eutanásia. Conteúdos plasmáticos de glicose, triacilglicerois, colesterol total e fração HDL foram determinados por ensaios enzimáticos colorimétricos. A composição de AG do plasma e tecidos foi determinada por cromatografia gasosa. Teores plasmáticos e teciduais de adiponectina, leptina, resistina, insulina, IL-6, IL-10 e TNF-α foram analisados por ensaio imunológico multiplex. A quantificação de proteínas envolvidas na via inflamatória modulada por TLR4 e NF-kB foi feita por *western Blotting*. As análises estatísticas foram realizadas

com programa *GraphPad Prism*, versão 5.0, sendo estabelecido $p<0,05$. A modificação da fonte lipídica na dieta dos animais não influenciou o consumo alimentar nem a evolução ponderal dos mesmos. Plasma, fígado e cérebro de animais do mesmo grupo incorporam diferentes concentrações de AG, demonstrando que cada tecido apresenta suas peculiaridades metabólicas, que favorece sua maior ou menor incorporação de cada AG. Valores plasmáticos de colesterol total foram reduzidos pela maior ingestão de AGPI n-3. A manipulação das razões n6:n3 dietéticas não alterou concentrações plasmáticas de glicose, triglicerídeos, adiponectina e nem tolerância à glicose. Ingestão de maiores quantidades de AGPI n-6 não resultou em maior conteúdo das proteínas da via inflamatória modulada pelo TLR-4/NF-κB.

Palavras-chave: razão n-6/n-3, ácido alfa-linolênico, óleo de chia, óleo de rosa mosqueta, inflamação, adipocinas, citocinas, homeostase glicêmica, colesterol.

ABSTRACT

CASTRO, Natalia Gomes Casanova de Oliveira. Alpha-linolenic acid derived from chia [*Salvia hispanica L.*] and rosa mosqueta [*Rosa aff. rubiginosa*] and its effects on tissue inflammation. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana)-Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2017.

Omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids (PUFA) consumption is associated with numerous health benefits, such as lower activation of inflammatory pathways and lower risk for metabolic diseases development. Food sources of n-3 PUFA include marine animals, wich provide docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), and also plant sources, such as seeds, wich provide alpha-linolenic acid (ALA). High ingestions of omega-6 (n-6) PUFA, found in bovine meet and vegetable oils such as soy and corn oils, associated with low ingestions of n-3 PUFA, may characterize an inadequate n-6/n-3 dietetic ingestion, associated with higher risks for obesity, type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease development, and also greater tissue and systemic inflammation. The present study evaluated if the source of n-3 PUFA (vegetable or marine) produces different effects on lipid metabolism and inflammatory tissue mediators. C57BL/6 mice were randomly distributed in four experimental groups, according to the normocaloric and isoenergetic chow they were fed, from weaning to the sixth month. Diets varied only according to the lipid source added, constituiting soy group (GS), chia group (GCh), rosa mosqueta group (GRM) and fish group (GP). When animals completed 180 days, they were submitted to intraperitoneal glucose tolerance test, and at 200 days of life, they were submitted to blood arrest through cardiac punction and euthanized. Plasma glucose, triglyceride, total cholesteral and HDL were determined through enzymatic colorimetric assay. Fatty acid composition of plasma and tissues was determined with gas chromatography. Plasma and tissue levels of adiponectin, leptin, resistin, insulin, IL-6, IL-10 and TNF-α were determined with multiplex immunoassay. Western Blotting analyses quantified proteins envolved in the inflammatory pathway modulated by TLR4 and NF-κB. GraphPad Prism 5.0 software was used for the statistical analysis, with $p<0.05$. Chow consumption and body weight evolution were not influenced by modifications in dietary lipids. Plasma, liver and brain obtained from animals of the same groups incorporated fatty acids in distinct manners, demonstrationg that each tissue has metabolic singularities wich favour the greater or lower incorporation of each fatty

acid. Plasma total cholesterol was lower in the groups consuming diets with higher n-3 PUFA content. Dietetic n-6/n-3 ratio manipulation did not alter plasma glucose, triglyceride, adiponectin nor glucose tolerance. Higher n-6 PUFA ingestion did not result in higher contents of the proteins involved in the TLR-4/NF-κB inflammatory pathway.

Keywords: n-6/n-3 ratio, alpha-linolenic acid, chia oil, rosa mosqueta oil, inflammation, adipokine, citokine, glucose homeostasis, cholesterol.

LISTA DE FIGURAS

Descrição		Página
Figura 1.	Síntese e ação de mediadores lipídicos produzidos a partir de ácido araquidônico, EPA e DHA	22
Figura 2.	Metabolismo dos ácidos graxos das famílias n-6 e n-3	24
Figura 3.	Via inflamatória modulada por TLR-4 e NF-kB	30
Figura 4.	Esquema representativo da interação entre estímulos pró-inflamatórios e o ácido docosahexaenoico (DHA) na regulação da sinalização do fator nuclear kappa B (NF-κB).	32
Figura 5.	Ilustração da *Salvia hispanica* L. – planta com flores roxas e folhas largas	40
Figura 6.	Ilustração da *Rosa affins rubiginosa*– frutos e sementes	41
Figura 7A.	Consumo de ração ajustado por 100g de massa corporal (MC) de camundongos C57BL/6	54
Figura 7B.	Evolução de massa corporal (g) de camundongos C57BL/6	55
Figura 8 A e B.	Gráfico representativo das curvas glicêmicas dos diferentes grupos experimentais, obtidas no teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTIG) (A) e área sob a curva glicêmica (AUC) (B) calculada no TTIG aos 180 dias de vida de camundongos C57BL/6	63
Figura 9.	Conteúdo hepático de TLR-4	69
Figura 10.	Conteúdo hepático de Myd88	69
Figura 11.	Conteúdo hepático de NF-κB p50	70
Figura 12.	Conteúdo hepático de NF-κB P50 fosforilado	70
Figura 13.	Conteúdo hepático de NF-κB P65 fosforilado	71
Figura 14.	Conteúdo encefálico de TLR-4	72
Figura 15.	Conteúdo encefálico de NF-κB P65	72

LISTA DE TABELAS

Descrição		Página
Tabela 1.	Composição modificada das rações AIN-93G de crescimento (g/100g)	47
Tabela 2.	Composição modificada da ração AIN-93M manutenção (g/100g)	48
Tabela 3.	Distribuição percentual de ácidos graxos nas rações experimentais	49
Tabela 4.	Perfil de ácidos graxos do plasma	57
Tabela 5.	Perfil de ácidos graxos do tecido hepático	59
Tabela 6.	Perfil de ácidos graxos do tecido encefálico	61
Tabela 7.	Parâmetros bioquímicos plasmáticos	62
Tabela 8.	Concentrações plasmáticas de adipocinas	64
Tabela 9.	Concentrações hepáticas de adipocinas	64
Tabela 10.	Concentrações encefálicas de adipocinas	65
Tabela 11.	Concentrações plasmáticas de citocinas	66
Tabela 12.	Concentrações hepáticas de citocinas	66
Tabela 13.	Concentrações encefálicas de citocinas	68

LISTA DE QUADROS

Descrição		Página
Quadro 1.	Consumo dos ácidos graxos alfa-linolênico (ALA) e linoleico (AL) em diferentes países, para homens e mulheres	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIOVE	Associação Brasileira dos Produtores de Óleos Vegetais
AG	ácido graxo
AGMI	ácido graxo monoinsaturado
AGPI	ácido graxo poli-insaturado
AGPICL	ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa
AGS	ácido graxo saturado
AIN	*American Institute of Nutrition*
AL	ácido linoleico
ALA	ácido α-linolênico
AOCS	*American Oil Chemists' Society*
AA	ácido araquidônico
AUC	*Area Under the Curve*, área sob a curva
COX	cicloxigenase
DCV	doença cardiovascular
DHA	*docosahexaenoic acid*, ácido docosahexaenoico
DM2	diabetes mellitus tipo 2
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	*ethylene glycol tetraacetic acid*, ácido etileno glicol tetraacético
EPA	*eicosapentaenoic acid*, ácido eicosapentaenoico
GCh	grupo chia
GP	grupo peixe
GRM	grupo rosa mosqueta
GS	grupo soja
HDLc	*High Density Lipoprotein cholesterol*, lipoproteína de alta densidade
IKK	*IκB kinase*, complexo quinase IkB

IL	interleucina
IRAK	*Interleukin receptor-associated kinase*, quinase associada ao receptor de interleucinas
IRS	*Insulin Receptor Substrate,* substrato do receptor de insulina
LDLc	*Low Density Lipoprotein cholesterol,* lipoproteína de baixa densidade
LOX	lipoxigenase
LPS	lipopolissacarídeo
MC	massa corporal
MEKK	*Mammalian mitogen-activated protein kinase kinase kinase*, proteína quinase ativada por mitógenos
MYD 88	*Myeloid Differentiation Primary Response gene 88,* molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88
NF-Kb	*Nuclear Factor Kappa B,* fator nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial de Saúde
PMSF	*phenylmethane sulfonyl fluoride*, fluoreto de fenilmetanosulfonil
RI	resistência à insulina
TAG	triacilglicerois
TBS-T	*tris-buffered saline,* solução salina tamponada com Tris mais Tween 20
Tollip	*Toll interacting protein,* proteína de interação com Toll
TLR-4	*Toll-Like Receptor-4,* receptor do tipo Toll-4
TNF-α	*Tumor Necrosis Factor Alpha,* fator de necrose tumoral alfa
TRAF	*TNF Receptor Associated Factor,* fator associado ao receptor de TNF

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

2 REFERENCIAL TEÓRICO 22

2.1 Definições e metabolismo de ácidos graxos 22

2.2 Razão n-6:n-3 25

2.3 Ácido alfa-linolênico 26

2.4 Lipídios e processos inflamatórios 28

2.5 Lipídios no metabolismo da insulina 34

2.6 Adipocinas na regulação do metabolismo e processos inflamatórios 36

2.7 Fontes alternativas de ácidos graxos n-3: óleos de chia e de rosa mosqueta ... 40

3 JUSTIFICATIVA 43

4 OBJETIVOS 44

4.1 Objetivo geral 44

4.2 Objetivos específicos 44

5 MÉTODOS 45

5.1 Animais e condições experimentais 45

5.2 Formulação das rações 46

5.3 Avaliação da massa corporal e do consumo alimentar 49

5.4 Teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTIG) 50

5.5 Eutanásia e coleta de tecidos 50

5.6 Análise de ácidos graxos das rações experimentais e tecidos 50

5.7 Análise de parâmetros bioquímicos em plasma 52

5.8 Quantificação de adipocinas e citocinas 52

5.9 Avaliação da via inflamatória modulada por TLR4 e NF-kB 52

5.10 Análise estatística 53

6 RESULTADOS 54

6.1 Consumo alimentar e evolução da massa corporal 54

6.2 Composição de ácidos graxos dos tecidos 55

6.2.1 Plasma 55
6.2.2 Tecido hepático 57
6.2.3 Tecido encefálico 59
6.3 Parâmetros bioquímicos plasmáticos 61
6.4 Teste de tolerância intraperitoneal à glicose 62
6.5 Concentrações de adipocinas 63
6.5.1 Perfil de adipocinas no plasma 63
6.5.2 Perfil de adipocinas no tecido hepático 64
6.5.3 Perfil de adipocinas no tecido encefálico 64
6.6 Concentrações de citocinas inflamatórias 65
6.6.1 Perfil de citocinas inflamatórias no plasma 65
6.6.2 Perfil de citocinas inflamatórias no tecido hepático 66
6.6.3 Perfil de citocinas inflamatórias no tecido encefálico 67
6.7 Avaliação da via inflamatória modulada por TLR-4 e NF-kB nos tecidos hepático e encefálico 68
7 DISCUSSÃO 73
8 CONCLUSÕES 82
REFERÊNCIAS 83
ANEXOS 101

1 INTRODUÇÃO

O consumo de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) da família ômega-3 (n-3), especialmente os ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA), está associado a benefícios à saúde. Dentre os efeitos positivos atribuídos a estes ácidos graxos (AG) destacam-se, redução de risco para doença cardiovascular (DCV), promoção do desenvolvimento visual e neurológico bem como recurso terapêutico no tratamento da esteatose hepática e resistência à insulina (RI), induzidas por obesidade (GONZÁLEZ-PÉRIZ et al., 2009) e de doenças inflamatórias, como artrite e asma (BAKER et al., 2016).

Todavia, já foram detectadas concentrações séricas muito reduzidas de EPA e DHA nas populações das Américas do Norte, Central e do Sul, Oriente Médio, Sudeste Asiático e África (IAN GIVENS; GIBBS, 2008). As principais fontes dietéticas destes AGPI são peixes marinhos e outros frutos do mar (IAN GIVENS; GIBBS, 2008). A prática da aquicultura vem aumentando nas últimas décadas, quando comparada à pesca em ambiente marinho, cuja contribuição para o consumo humano encontra-se estagnada desde 1990. As espécies cultivadas em aquicultura, entretanto, dependem da suplementação de óleo de peixes de vida livre para fornecer EPA e DHA. Estima-se que a produção atual de pescados seja capaz de suprir apenas 6% da população mundial com quantidades suficientes de EPA e DHA, capazes de proporcionar teores séricos elevados destes AG, associados à incorporação em eritrócitos acima de 8% (STARK et al., 2016).

As recomendações de ingestão de AG n-3 vigentes não são consensuais. O Instituto de Medicina (*Institute of Medicine*, IOM) sugere que o consumo adequado para o AG alfa-linolênico (ALA) seria 1,6 g/dia para homens e 1,1 g/dia para mulheres, de 19 a 70 anos, mas não propõe recomendações de ingestão para EPA e DHA (IOM, 2005). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que a ingestão de AG n-3 seja equivalente a 0,5 a 2 % do total de energia consumido no dia, fornecendo no mínimo 250 mg de EPA e DHA, podendo chegar a 2 g ao dia, no caso de prevenção secundária de DCV (OMS, 2008). Já a *International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids* (ISSFAL) sugere consumo diário de pelo menos 500 mg/dia destes AG (ISSFAL, 2004). Quanto às orientações de órgãos brasileiros, a Sociedade Brasileira de Cardiologia recomenda suplementação de cápsulas com 1g de ômega-3 (EPA+DHA) ao dia ou a ingestão de pelo menos duas refeições a base de peixe por semana, para diminuir o risco cardiovascular de indivíduos com risco baixo a moderado (SANTOS et al., 2013).

A Organização Mundial de Saúde, em 2011, classificou a DCV como a principal causa de óbito no mundo, sendo responsável por 30% das mortes globais, e também no Brasil (SANTOS et al., 2013). A aterosclerose é a base fisiopatológica para eventos cardiovasculares, e caracteriza-se por processo inflamatório crônico na parede vascular, acompanhado de elevação de marcadores inflamatórios séricos. A Sociedade Brasileira de Cardiologia recomenda rigoroso controle de fatores de risco cardiovascular, tanto para indivíduos que já apresentaram evento cardiovascular quanto para aqueles assintomáticos (SANTOS et al., 2013). A razão dietética ômega-6/ômega-3 é discutida no contexto da patogênese das doenças inflamatórias e cardiovasculares e evidências sugerem que, para promoção da saúde geral, esta razão deveria ser menor do que a atualmente consumida pela população ocidental (CANDELA; LÓPEZ; KOHEN, 2011).

Em contrapartida às recomendações atuais de ingestão de AG, na população brasileira, já foi constatada tendência para redução do consumo de alimentos fontes de AGPI n-3 e predomínio da utilização do óleo de soja, fonte de AGPI n-6, além de aumento na ingestão de gorduras totais e ácidos graxos saturados (AGS) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE, 2010). Paralelamente, observa-se prevalência de doenças crônicas não transmissíveis no perfil nacional de morbimortalidade, incluindo a obesidade e suas comorbidades (IBGE, 2015). O ácido linoleico (AL) é comumente encontrado na alimentação ocidental (WHELAN, 2013), e está, assim como o seu derivado de cadeia longa, ácido araquidônico (AA), associado ao maior risco de doenças crônicas, particularmente DCV, esteatose hepática e doenças neurológicas (SANTOS et al., 2013; SCORLETTI; BYRNE, 2013; COLE; MA; FRAUTSCHY, 2010).

Os óleos vegetais extraídos das sementes de chia e rosa mosqueta se apresentam como possíveis alternativas ao consumo de EPA e DHA, uma vez que são fontes de ALA (VUKSAN et al., 2007; NOWAK, 2005). Mamíferos dispõem de enzimas capazes de converter ALA em EPA e DHA, adicionando mais carbonos e insaturações à cadeia carbonada daquele AG essencial (BRENNA et al., 2009). Ademais, o próprio ALA apresenta, dentre outras, propriedades anti-inflamatórias (ERDINEST et al., 2012; REN; CHUNG, 2007), podendo contribuir para redução da inflamação e risco de DCV.

Frente às preocupações quanto à sustentabilidade da pesca, aos limitados estoques de peixes selvagens e cultivados em aquicultura e ao reconhecimento da importância dos AGPI n-3 para a saúde, faz-se necessária alternativa para o fornecimento destes AGPI na

alimentação. Neste contexto, a presença de ALA, em alimentos de origem vegetal, tem suscitado interesse, na medida em que pode constituir alternativa à ingestão de EPA e DHA pré-formados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Definições e metabolismo de ácidos graxos

Ácidos graxos são componentes dietéticos com funções metabólicas, estruturais e funcionais no organismo, integrando membranas celulares, atuando como precursores de moléculas sinalizadoras e reguladores de respostas celulares, além de fornecerem energia (CALDER, 2012). Os ácidos graxos que compõem os triacilglicerois (TAG) dos óleos comestíveis podem ser saturados ou insaturados. As estruturas insaturadas possuem uma ou mais duplas ligações ao longo da sua cadeia carbônica, existindo na natureza três famílias desses compostos, designados pela letra "n" ou "ômega (ω)", indicando a posição da primeira dupla ligação a partir do grupamento metil terminal (CONNOR, 2000). São denominados AGPI aqueles que contêm duas ou mais duplas ligações na configuração *cis*. As famílias ômega-3 (n-3) e ômega-6 (n-6) apresentam funções bioquímicas distintas, e não são permutáveis no organismo humano. Os principais constituintes da família n-3 são os ácidos alfa-linolênico (ALA; C18:3 n-3), eicosapentaenoico (EPA; C20:5 n-3) e docosaexaenoico (DHA; C22:6 n-3), enquanto na família n-6, incluem-se os ácidos linoleico (AL; C18:2 n-6) e araquidônico (AA; C20:4 n-6) (ARBEX et al., 2015).

Os óleos vegetais comercialmente disponíveis, extraídos do milho, da soja e das sementes de girassol contêm AGPI n-6, predominantemente, o AL. De outro modo, o conteúdo de AG da família n-3 entre estes óleos é bastante reduzido (ou inexistente). Constituem exceções os óleos obtidos da canola e da semente de linhaça, que são ricos em ALA (MARTIN et al., 2006). O organismo humano não é capaz de sintetizar endogenamente tanto o ALA quanto o AL, que são, por isso, denominados ácidos graxos essenciais, devendo ser obtidos por meio da ingestão de alimentos (VALENZUELA et al., 2014).

Tanto o AL quanto o ALA podem ser dessaturados e alongados, por meio de enzimas dessaturases (delta (Δ) 5 e Δ6) e elongases, expressas em vários tecidos, com maior atividade no tecido hepático, formando AG mais insaturados e de cadeia mais longa, denominados ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPICL) (BENATTI et al., 2004). A partir destas reações, o AL tem como produto principal o AGPICL araquidônico, e o ALA, EPA e DHA (VALENZUELA et al., 2014).

A fonte dietética de AGPICL pré-formado são os alimentos de origem animal. Ácido araquidônico é encontrado nas carnes, enquanto EPA e DHA, nos óleos ou

gorduras provenientes de animais marinhos, particularmente de peixes de elevado conteúdo lipídico, como salmão e atum (MARTIN et al., 2006).

Contudo, estudos sugerem que consumo elevado de AL interfere na dessaturação de ALA devido à competição destes AG pela enzima Δ6-dessaturase, colaborando com maiores teores de AA, em detrimento de EPA e DHA (SMINK et al., 2012; WIEN et al., 2010). Com isso, destaca-se a importância de recomendações que levem em consideração a razão n-6:n-3 mais favorável à formação de EPA e DHA (SANTOS et al., 2013).

Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa com 20 carbonos, como o AA, após incorporação nas membranas fosfolipídicas celulares, servem de precursores para a síntese de eicosanoides (LORENTE-CEBRIAN et al., 2013), moléculas geradas pela ação das enzimas cicloxigenase (COX) e lipoxigenases (LOX) (CALDER, 2010). Estes compostos, denominados prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, agem como mediadores, modulando a intensidade e duração das respostas inflamatórias (CALDER, 2010). Eicosanoides também podem ser produzidos pela COX e LOX a partir do EPA, e são diferentes daqueles produzidos a partir do AA, pois possuem menor potência e atividade biológica (CALDER, 2010). De forma geral, os eicosanoides derivados do AA agem como pró-inflamatórios, enquanto que os derivados de AGPICL da família n-3 apresentam menor atividade inflamatória (LORENTE-CEBRIAN et al., 2013). Ademais, eicosanoides derivados de EPA podem antagonizar a ação dos gerados pelo AA (CALDER, 2010) (Figura 1).

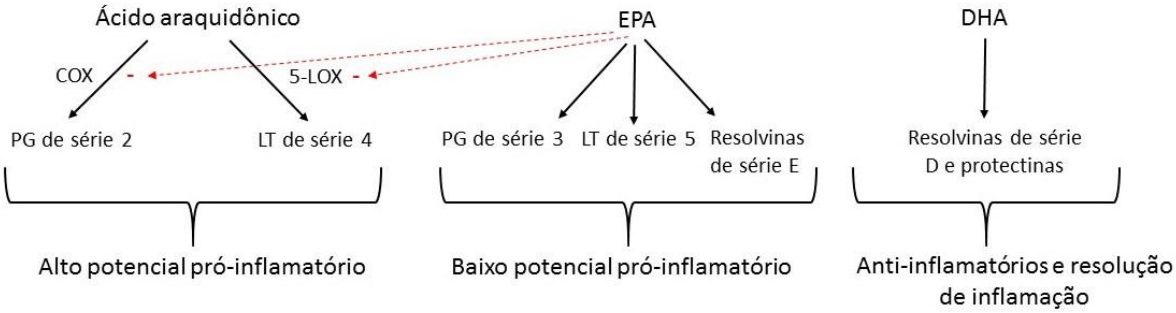


Figura 1. Síntese e ação de mediadores lipídicos produzidos a partir de ácido araquidônico, EPA e DHA. EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico; COX: cicloxigenase; LOX: lipoxigenase; PG: prostaglandinas
Fonte: adaptado de Calder (2010).

Atualmente são descritos diversos mecanismos pelos quais EPA antagoniza os efeitos pró-inflamatórios do AA. O consumo de EPA reduzir o conteúdo de AA na membrana fosfolipídica, reduzindo a disponibilidade deste AGPICL para síntese de

eicosanoides. Também ocorre inibição, mediada por EPA, da hidrólise de AA presente na membrana de células do sistema imune. Após liberação da membrana celular, induzida pela enzima fosfolipase A2, EPA também compete com AA para conversão em eicosanoides, por meio das enzimas COX e LOX. Adicionalmente, os eicosanoides derivados do EPA competem com aqueles derivados do AA por ligação a sítios celulares, alterando a resposta subsequente (HINTZE; TAWZER; WARD, 2016).

Com o aumento da ingestão de EPA, e consequente redução do conteúdo de AA nos fosfolipídios de membranas, a disponibilidade deste AGPICL n-6 para a síntese de eicosanoides potencialmente inflamatórios, notadamente prostaglandinas de série 2 e leucotrienos de série 4, também se reduz. Desta forma, é favorecida a produção de outros eicosanoides, com menor atividade inflamatória, derivados da família n-3, incluindo prostaglandinas de série 3, leucotrienos de série 5, resolvinas de série E e D e protectinas (Figura 2) (CALDER, 2012). Estes mediadores apresentam atividade potencialmente capaz de reverter inflamação, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, dentre outros mecanismos de ação (CALDER, 2010). Devido a este potencial, resolvinas e protectinas são consideradas protetoras, em modelos animais, para diversas condições patológicas, dentre elas RI e aterosclerose (WEYLANDT et al., 2012).

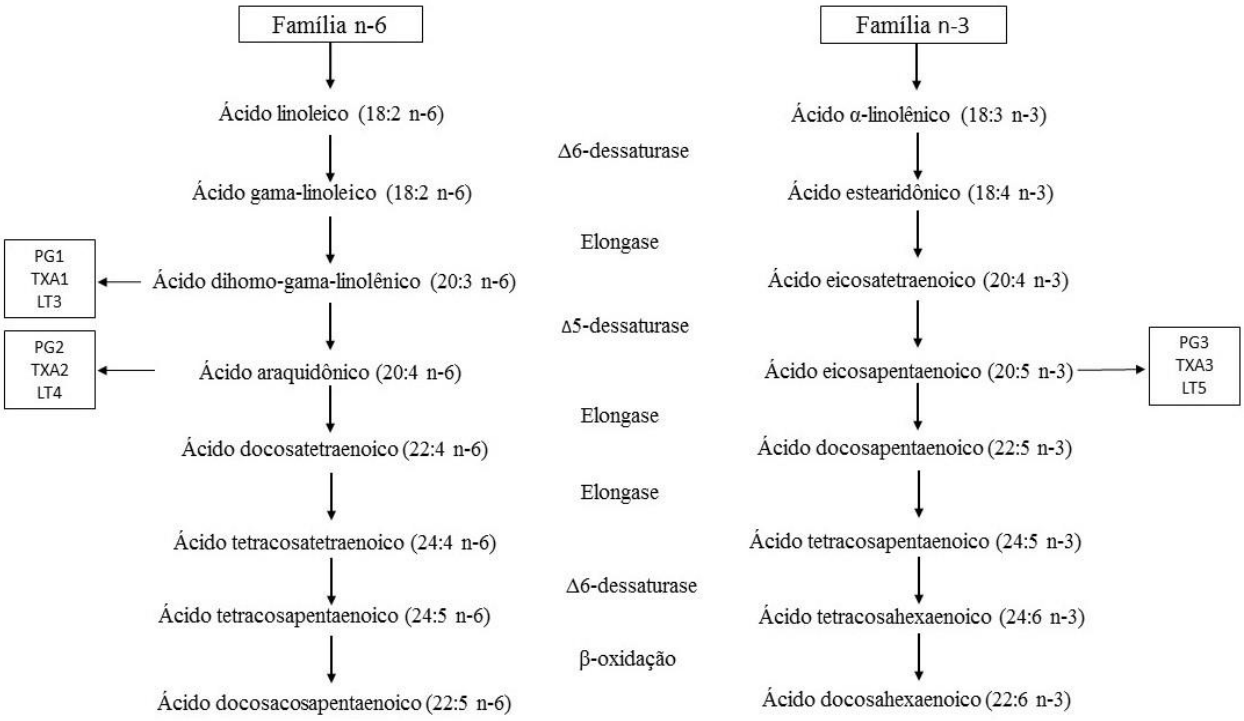


Figura 2. Metabolismo dos ácidos graxos das famílias n-6 e n-3. PG: prostaglandinas; TXA: tromboxanos; LT: leucotrienos; Δ: delta.
Fonte: adaptado de Nakamura e Nara (2004).

Tanto EPA quanto DHA são capazes de reduzir a liberação de AA de fosfolipídios de membrana, inibindo a ação da enzima fosfolipase A2 (RUSSELL; BÜRGIN-MAUNDER, 2012). Desta forma, a ingestão e incorporação tecidual de AGPICL n-3 podem neutralizar os efeitos de eicosanoides provenientes dos AGPICL n-6 (LORENTE-CEBRIAN et al., 2013).

2.2 Razão n-6:n-3

A dieta ocidental atual caracteriza-se por ingestão aumentada de AG da família n-6, acompanhada de redução no consumo de AG da família n-3, quando comparada à dieta padrão do homem primitivo. Postula-se que durante a evolução da espécie humana, a razão dietética n-6:n-3 era 1:1. Consideradas as características vigentes da dieta ocidental, esta razão tem alcançado valor igual ou superior a 20:1(SIMOPOULOS, 2016; YANG et al., 2016; CANDELA; LÓPEZ; KOHEN, 2011). Aumento na prevalência de sobrepeso e obesidade vem sendo associado a esta alteração na proporção dietética de ácidos graxos (SIMOPOULOS, 2016).

Recomendações vigentes, relacionadas ao consumo de óleos e gorduras, sugerem evitar alimentos com quantidades elevadas de AGS, AG *trans* e colesterol, destacando-se a indicação para que se dê preferência aos alimentos fontes de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e AGPI n-3, diminuindo o consumo de AG n-6 (BRASIL, 2011). Assim, busca-se reduzir a elevada razão n-6:n-3 da dietas ocidentais típicas (SIMOPOULOS, 2006).

O *Institute of Medicine* considera satisfatória razão n-6:n-3 entre 10:1 e 5:1 (IOM, 2002). Dados obtidos por meio de experimentação animal indicam 1:1 como proporção ideal (HINTZE; TAWZER; WARD, 2016; FÜRST, 2002), no entanto, ainda existe controvérsia envolvendo esta questão, cuja importância reside no reconhecimento de que o consumo excessivo de AG de uma família pode inibir a dessaturação de quantidades menores de AG da outra. Ambas as famílias de AG compartilham as enzimas envolvidas nesta etapa metabólica (dessaturases Δ5 e Δ6), justificando o mecanismo de competição (SMINK et al., 2012; WIEN et al., 2010; PAWLOSKY et al., 2003). Ademais, esses AG desempenham ações moleculares distintas, podendo exibir características funcionais antagônicas, de modo que o elevado conteúdo dietético de AG n-6, em relação ao de n-3,

pode contribuir para alterações no estado de saúde (VALENZUELA et al., 2011; RUSSO, 2009).

Tendo em vista que as enzimas responsáveis pela conversão de ALA em seus AGPICL são as mesmas que metabolizam AL, é importante a adequação da razão n-6:n-3, pois a ingestão excessiva de AL ou ALA resulta em aumento de conversão do AG mais abundante em seus AGPICL (ARTERBURN; HALL; OKEN, 2006). A enzima Δ6-dessaturase converte AL e ALA, respectivamente, nos ácidos gama-linolênico e estearidônico. Estes AG são convertidos em AA e EPA, por ação da Δ5-dessaturase. Posteriormente, podem sofrer uma série de reações catalisadas pelas enzimas elongase e Δ6-dessaturase, além de β-oxidação, levando, então, à formação de ácido docosapentaenoico (DPA, C22:5 n-6) e DHA (Figura 2) (HARRIS, 2006). Assim, o consumo elevado de AL pode interferir no metabolismo do ALA, reduzindo sua conversão em EPA e DHA. Neste contexto, dietas com elevadas razões n-6:n-3 podem promover maior incorporação de AA, em detrimento de EPA e DHA, nas membranas celulares, favorecendo, assim, maior produção de mediadores pró-inflamatórios (ARTERBURN; HALL; OKEN, 2006).

Modificações na composição de AG incorporados à membrana celular, decorrentes de alterações dietéticas, podem afetar a fluidez desta estrutura bem como seu padrão de produção de mediadores lipídicos e peptídeos moduladores da inflamação, como moléculas de adesão e citocinas, entre outras. Ademais, os mecanismos de sinalização das membranas também podem ser modificados, levando a alterações na expressão gênica. Conteúdo mais elevado de EPA e DHA, e menor de AA, nas membranas celulares, altera o padrão de produção de eicosanoides, resolvinas e mediadores inflamatórios. Em razão disso, os AGPICL n-3 são reconhecidos como agentes terapêuticos importantes em desordens nas quais há participação de componentes inflamatórios (CALDER, 2012).

2.3 Ácido alfa-linolênico

Ácido alfa-linolênico está presente em alimentos como nozes e óleos vegetais, incluindo, canola, soja, linhaça, rosa mosqueta e chia, em diferentes proporções (BAKER et al., 2016; NOWAK, 2005). O adequado consumo de ALA é considerado importante fator para manutenção de concentrações orgânicas suficientes de DHA, uma vez que mamíferos dispõem das enzimas envolvidas na bioconversão destes AG (BARCELÓ-

COBLIJN et al., 2005). Neste sentido, o IOM estabelece ingestão dietética de referência (DRI, *dietary reference intake*), em gramas por dia, para o ALA, de acordo com o sexo e as diferentes etapas do ciclo vital (IOM, 2005). Outros organismos internacionais também apresentam recomendações para este AGPI. A *European Food Safety Authority* (EFSA) propõe que o consumo de ALA deve alcançar 0,5 %, e o de AL, 4 %, do total de energia da dieta, e recomenda, ainda, ingestão diária de 250 mg de EPA e DHA (ESFA, 2010). Já a ISSFAL sugere que 2 % do consumo de energia diário seja proveniente de AL, enquanto 0,7 %, de ALA (ISSFAL, 2004).

A adequação dietética da proporção entre AL e ALA é importante uma vez que estes AG competem pela utilização da enzima Δ6-dessaturase (Figura 2). A razão AL:ALA é considerada, por isso, crucial para determinar as taxas de conversão dos precursores em seus AG de cadeia mais longa e insaturada (EPA, AA e DHA). Elevado consumo de AL parece inibir a conversão de ALA em EPA, porém, ainda não está determinada a razão AL:ALA a partir da qual esta inibição ocorre (BAKER et al., 2016). O quadro 1 apresenta dados recentes, referentes ao consumo de AL e ALA, bem como a sua razão, em diferentes países.

Quadro 1. Consumo dos ácidos graxos alfa-linolênico (ALA) e linoleico (AL) em diferentes países, por homens e mulheres.

País	ALA (g/dia)		AL (g/dia)		Razão AL:ALA	
	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres
Austrália/Nova Zelândia	1,4	0,9	12,8	9,1	9,1	10,1
Áustria	1,5	1,3	13,6	12,4	9,1	9,5
Bélgica	1,7	1,4	16,6	12,8	9,8	9,1
Dinamarca	2,2	2,1	14,3	10,9	6,5	5,2
Finlândia	1,8	1,3	8,1	5,8	4,5	4,5
Alemanha	1,59	1,32	9,3	8,0	5,8	6,1
Grécia	0,6	0,7	9,3	9,9	15,5	14,1
Itália	0,8*		14,5*		18,1*	
Holanda	1,95	1,26	17,8	12,0	9,1	9,5
Noruega	1,6	1,0	12,2	7,8	7,6	7,8
Portugal	0,7*		12,1*		17,3*	
Espanha	0,8*		21,6*		27*	

EUA[1]	1,7	1,3	16,8	14	9,9	10,8

* Refere-se a dados conjuntos para homens e mulheres. [1] Estados Unidos da América.
Fonte: adaptado de Baker et al. (2016).

O consumo de AGPICL n-3 na América Latina é descrito como baixo e postula-se que a maior parte do conteúdo orgânico destes lipídios seja proveniente da síntese endógena, a partir da ingestão dietética de ALA (VALENZUELA et al., 2012). Em condições fisiológicas, o fígado é o tecido responsável por sintetizar a maioria dos AGPICL a partir de seus precursores, havendo também contribuição, em menor quantidade, de outros tecidos, como testículos e cérebro. A eficiência desta conversão, em humanos, depende de diversos fatores, incluindo os genéticos, estado fisiológico, idade, hábitos dietéticos, entre outros (GORMAZ et al., 2010). Sabe-se que também camundongos e ratos são capazes de absorver com eficácia ALA dietético, incorporando-o a diferentes tecidos (LI et al., 2017a; VALENZUELA et al., 2014).

O acúmulo tecidual de AG parece atender as suas respectivas especificidades metabólicas (BARCELÓ-COBLIJN et al., 2005). Existe tendência de maior acúmulo de ALA nos tecidos, de um modo geral, conforme a ingestão dietética deste AGPI n-3 aumenta. Nesta situação, também ocorre elevação do conteúdo tecidual de EPA, mas não de DHA, exceto no cérebro, que tende a incorporar menos ALA, e apresenta maior propensão para armazenar DHA (VALENZUELA et al., 2014). A habilidade para maior retenção de DHA no tecido cerebral parece se justificar pelo fato de que a presença deste AGPICL nos fosfolipídios de membranas neuronais modula a atividade de diversas vias de sinalização neste tecido, além de ser crucial para a função da retina. A maior disponibilidade de DHA para incorporação no tecido encefálico e retina pode se dar mesmo em casos de deficiência de ALA (DYALL; MICHAEL-TITUS, 2015; ASTORG et al., 2004; SINCLAIR; ATTAR-BASHI; LI, 2002; JEFFREY et al., 2001).

2.4 Lipídios e processos inflamatórios

A inflamação desempenha importante papel em diversas condições patológicas, dentre elas obesidade, doenças neurodegenerativas (CALDER, 2010) e na iniciação e desenvolvimento da RI, considerada situação estreitamente relacionada à síndrome metabólica (CHEN et al., 2015; SCHENK; SABERI; OLEFSKY, 2008). Ácidos graxos podem influenciar a inflamação, atuando desde a membrana da célula até seu núcleo, controlando a sinalização e expressão de genes relacionados ao estado inflamatório.

Conforme ressaltado anteriormente, alterações na composição de AG das membranas celulares são capazes de alterar a fluidez destas estruturas, bem como a sinalização celular, modificando a expressão de genes e o padrão de produção de mediadores inflamatórios, afetando, assim, os processos inflamatórios (CALDER, 2012).

Os efeitos anti-inflamatórios atribuídos aos AGPI n-3 são justificados por complexa rede de interação, entre diferentes vias moleculares, incluindo inibição da via das COX, bem como redução da expressão de citocinas inflamatórias, envolvendo inibição da sinalização celular por meio de receptores específicos (TLR4, *toll-like receptor*-4) (LIU, 2015; KANG; WEYLANDT, 2008).

Receptores tipo *toll* (TLR) são proteínas transmembranas envolvidas na detecção e reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), dentre eles, patógenos microbianos, conhecidos como lipopolissacarídeos (LPS) (HWANG; KIM; LEE, 2016). Estes receptores são responsáveis por sinalizar a produção de citocinas pró-inflamatórias, ativando as imunidades inata e adquirida (FERRAZ et al., 2011).

Originalmente reconhecido por sua capacidade de detectar LPS de bactérias gram-negativas, o TLR4 apresenta-se expresso em adipócitos, entre outras células. Acredita-se que o envolvimento deste receptor no aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias seja decorrente da sua capacidade de ativar fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF-κB), que regula a expressão dessas moléculas sinalizadoras (KALUPAHANA; CLAYCOMBE; MOUSTAID-MOUSSA, 2011; LAWRENCE, 2009; MEDZHITOV; JANEWAY, 2000).

Atribui-se ao TLR4 capacidade de reconhecimento de lipídios endógenos, sendo esta molécula a responsável por associar AG livres à inflamação, além de contribuir para a patogênese da RI induzida por lipídios (SHI et al., 2006). A ativação destes receptores pode ser promovida por AGS plasmáticos e inibida por AGPI n-3, particularmente, DHA, que inibe vias de sinalização pró-inflamatórias. Com isso, sugere-se a existência de agonistas e antagonistas do TLR4, de origem dietética, além dos patógenos microbianos (HWANG; KIM; LEE, 2016).

A ligação de agonistas ao TLR4 ativa a via do NF-κB, que regula a expressão de citocinas (FRESNO; ALVAREZ; CUESTA, 2011; MEDZHITOV; JANEWAY, 2000). A família de fatores de transcrição NF-κB inclui cinco membros conhecidos como: RelA (p65); RelB; C-Rel; p105 (NF-kB1, precursor da p50) e p100 (NF-kB2, precursor da p52). Todos apresentam amplo espectro de ação, em diferentes tipos celulares, e estão

implicados na regulação da transcrição do DNA de inúmeros genes (HOESEL; SCHMID, 2013; GILMORE, 2006).

Tais fatores estão presentes nas células sob a forma de homo ou heterodímeros. O heterodímero p65-p50 é o mais abundante. Estes complexos apresentam-se ligados à família de proteínas IkB em células não estimuladas. A ligação ao IkB impede a translocação do NF-kB para o núcleo, mantendo-o inativo. Na via clássica de ativação do NF-kB, o estímulo inflamatório ativa a subunidade beta do complexo quinase IkB (IKK), fosforilando as proteínas IkB, que são, então, submetidas a ubiquitinação e degradação. Assim, os dímeros de NF-kB são liberados e translocados para o núcleo, onde se ligam a sequências específicas em regiões promotoras de genes alvo (HAYDEN; GHOSH, 2004) (Figura 3).

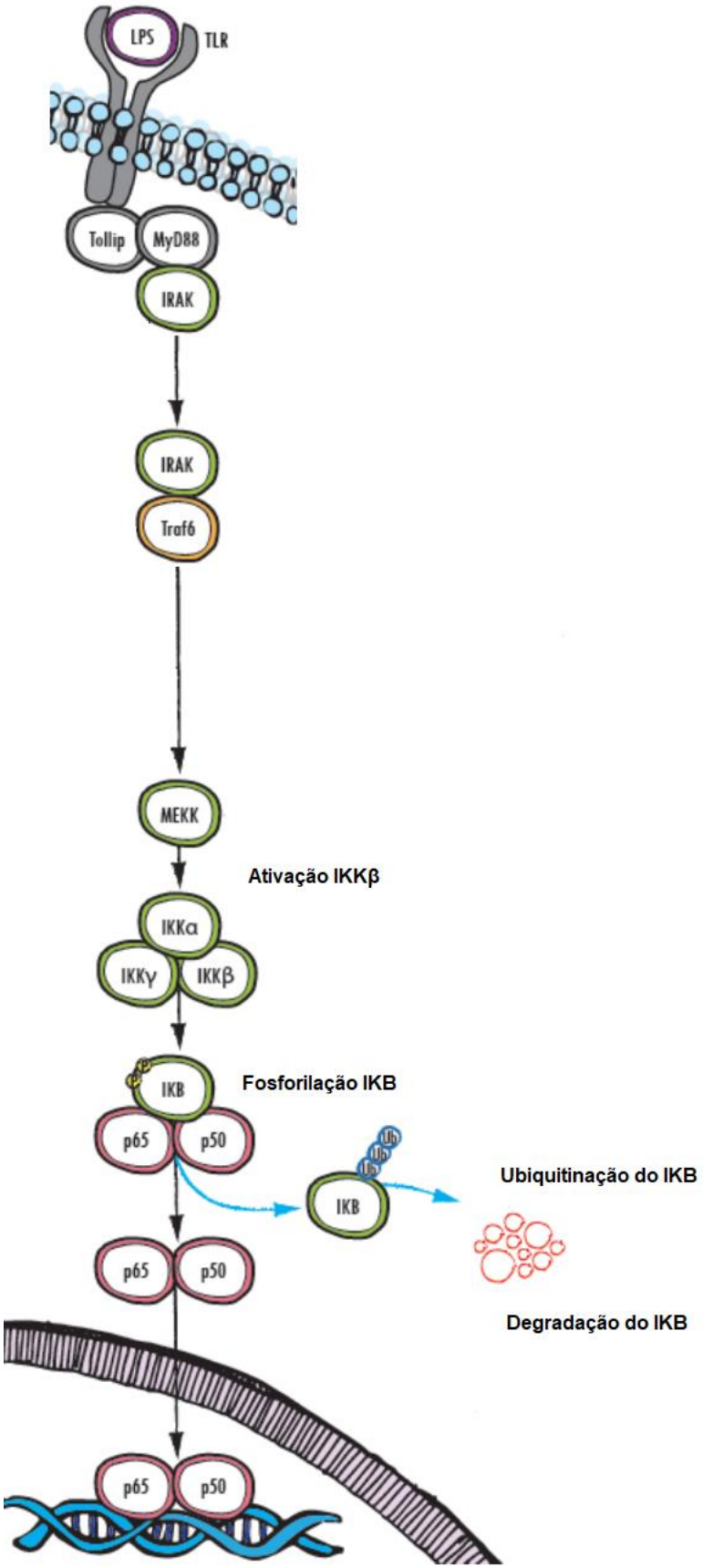

LPS
TLR
Tollip
MyD88
IRAK
IRAK
Traf6
MEKK
Ativação IKKβ
IKKα
IKKγ
IKKβ
IKB
Fosforilação IKB
p65
p50
IKB
Ubiquitinação do IKB
p65
p50
Degradação do IKB
p65
p50

Figura 3. Via inflamatória modulada por TLR-4 e NF-kB. LPS: lipopolissacarídeos; TLR: receptor tipo Toll (*Toll like receptor*); Tollip: proteína de interação com Toll (*Toll interacting protein*); MyD88: molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88 (*myeloid differentiation primary response* 88); IRAK: quinase associada ao receptor de interleucinas (*interleukin receptor-associated kinase*); Traf: fator associado ao receptor de TNF (*TNF receptor associated fator*); MEKK: proteína quinase ativada por mitógenos (*Mammalian mitogen-activated protein kinase kinase kinase)*; IKK: complexo quinase IkB (*IκB kinase*).
Fonte: adaptação; disponível em: <https://go.biossusa.com/pathway-maps-download-page>. Acesso em: 30 de novembro de 2017.

Dentre os estímulos inflamatórios que desencadeiam a ativação do TLR4 incluem-se LPS, citocinas inflamatórias, radiação ultravioleta (CALDER, 2012) e AG livres plasmáticos, como o palmítico (REYNA et al., 2008). Na regulação da expressão de citocinas, a via NF-κB/TLR4 envolve distintas moléculas sinalizadores, entre elas, o MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88,* molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88) e TRAF (*TNF receptor-associated factor 1*, fator associado ao receptor TNF), que conduzem ao aumento das citocinas pró-inflamatórias, em resposta à ativação da referida via (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; AKIRA; TAKEDA, 2004).

A ligação do LPS ao TLR4 ativa o recrutamento da MyD88, cujo domínio Toll/IL-1R (TIR) interage com o TLR4, iniciando a cascata de sinalização intracelular. A MyD88 recruta quinases associadas a IL-1R (IRAK), que são, então, fosforiladas, dissociando-se do complexo MyD88-TLR4 e interagindo com o fator associado ao receptor 6 do fator de necrose tumoral (TRAF6). O TRAF6 então fosforila IkB, ativando a IKK, a qual, por sua vez, degrada o IkB, permitindo a ativação do NF-κB e seu transporte para o núcleo, iniciando a transcrição de genes (WILLIAMS, 2012).

O NF-κB inativo localiza-se no citosol e é ativado por diversos estímulos inflamatórios extracelulares, que desencadeiam sua cascata de sinalização. A ativação desta cascata envolve a fosforilação de uma subunidade inibitória do NF-κB (IκB), que, então, dissocia-se, permitindo a translocação do dímero NF-κB para o núcleo celular, onde exercerá sua função como regulador da transcrição de genes (CALDER, 2012). O complexo proteico NF-κB controla a transcrição do DNA, regulando a produção de citocinas, como TNF-α (*tumor necrosis fator-alpha,* fator de necrose tumoral-alfa) e interleucina (IL)-6 e IL-1 (HOESEL; SCHMID, 2013; LAWRENCE, 2009; BLANCO; NETO, 2003). A ativação da via NF-κB, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias, também está associada ao desenvolvimento de RI e obesidade (REYNA et

al., 2008), por induzir a fosforilação em serina do IRS, comprometendo, assim, a ação da insulina (SIRIWARDHANA et al., 2012).

Em contrapartida, a modulação do NF-κB, com efeito anti-inflamatório, pode ocorrer em função do aumento de EPA e redução de AA, tanto sistêmico quanto em regiões específicas, como nos adipócitos (KANG; WEYLANDT, 2008). O NF-κB é um importante mediador da inflamação induzida por AA, que pode ser suprimida por AGPI n-3 (SIRIWARDHANA et al., 2012). Já foi demonstrado, em modelo *in vitro*, que os AGPICL n-3 têm capacidade de reduzir a produção de COX-2 induzida por LPS, além de atenuar a síntese de IL-1, IL-6 e de TNF-α, dentre outras citocinas pró-inflamatórias, em células endoteliais, monócitos, macrófagos e células dendríticas (Figura 4). Estas observações foram corroboradas por trabalhos envolvendo animais e humanos, em que a oferta de óleo de peixe, fonte de EPA e DHA, resultou em redução de citocinas inflamatórias. Sugere-se, também, que haja diminuição da fosforilação do IκB, restringindo a ativação da via do NF-κB, em função do uso de AGPI n-3 (CALDER, 2012). Em sua maioria, os estudos que avaliaram o potencial inflamatório dos AGPI constituem intervenções com AGPICL n-3, sendo mais escassa a literatura acerca dos efeitos dos AGPI de origem vegetal (HINTZE; TAWZER; WARD, 2016).

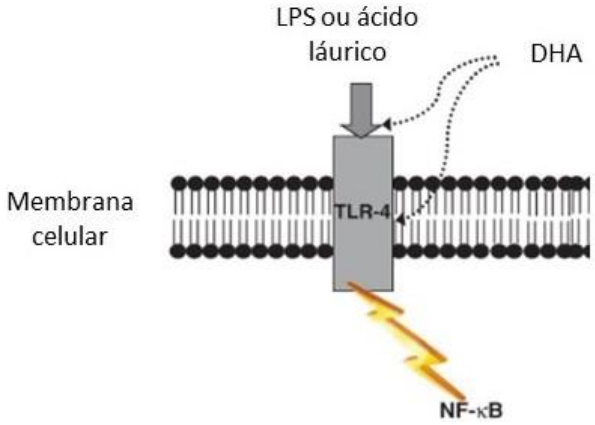


Figura 4. Esquema representativo da interação entre estímulos pró-inflamatórios e o ácido docosahexaenoico (DHA) na regulação da sinalização do fator nuclear kappa B (NF-κB). Lipopolissacarídeos (LPS) e ácido láurico são capazes de iniciar a sinalização do NF-κB pela ligação ao receptor tipo toll (TLR)4. O DHA inibe a resposta induzida por LPS e ácido láurico, reduzindo a ativação do NF-κB.
Fonte: adaptado de Calder (2012).

Apesar de as citocinas serem reconhecidas como os principais reguladores da imunidade, os eicosanoides também podem afetar células do sistema imune, modulando a liberação de citocinas, a diferenciação, sobrevivência celular e migração celular, e

ainda, a apresentação de antígenos e apoptose (DENNIS; NORRIS, 2015; HARIZI; GUALDE, 2005). Entre os mecanismos moleculares já descritos, que relacionam os eicosanoides à modulação da atividade inflamatória tecidual, são citados processos de sinalização das vias envolvidas com a expressão de citocinas. Este extenso grupo de moléculas está implicado na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento da resposta imune e inclui as IL e o TNF-α (DENNIS; NORRIS, 2015; KIM et al., 2011). Ao agir em várias etapas das reações imunes e inflamatórias, esses mediadores lipídicos são importantes reguladores da interação entre as imunidades inata e adquirida (HARIZI; GUALDE, 2005).

2.5 Lipídios no metabolismo da insulina

A insulina é um hormônio liberado por células β-pancreáticas em decorrência, principalmente, de concentrações aumentadas de glicose plasmática. Esta resposta hormonal permite a redução da glicemia, uma vez que a captação da glicose circulante, por diversos tecidos, é induzida por meio de transportadores celulares específicos, denominados GLUT (*glucose transporter*, transportador de glicose), que são translocados para a membrana celular, estimulados pelo hormônio (RORSMAN; BRAUN, 2013).

Resistência à insulina (RI) é atualmente considerada a principal característica patológica associada à síndrome metabólica, obesidade e diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Identificada por reduzida responsividade à ação da insulina em tecidos metabolicamente ativos, como o fígado, músculo esquelético e tecidos adiposos, a RI também se destaca pelo caráter multifatorial do seu estabelecimento (ZHANG; ZHENG; YUAN, 2016).

Em células cardíacas de ratos *Wistar* dislipidêmicos e com RI, sob estímulo da insulina, a adição de sementes de chia à dieta rica em sacarose foi capaz de normalizar a translocação de GLUT-4 (*glucose transporter type-4*, transportador de glicose tipo-4) para a membrana plasmática e melhorar o conteúdo de substrato do receptor de insulina (IRS), possivelmente contribuindo para melhora da RI neste tecido (CREUS et al., 2017).

A inflamação constitui importante fator envolvido na iniciação e progressão da RI (GLASS; OLEFSKY, 2012; REYNA et al., 2008). Citocinas inflamatórias contribuem para o desenvolvimento da RI, pois a ligação de agonistas ao TLR leva à ativação de quinases, como c-jun N-terminal quinase (JNK, *c-Jun N-terminal kinases*) e inibidor da quinase κ (IKK, *inhibitor of I kappa B kinase*), na resposta intracelular desencadeada por este receptor. Estas quinases induzem a fosforilação do IRS em serina, determinando a

degradação deste substrato, impedindo a cascata intracelular de sinalização da insulina, conduzindo à resistência ao hormônio. Ativação de JNK e IKK também é capaz de promover inflamação por meio da ativação de fatores de transcrição, como NF-κB, estimulando a transcrição de genes responsáveis pela resposta inflamatória. A subsequente produção de citocinas inflamatórias exacerba a ativação do receptor, amplificando a inflamação (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011). Concentrações plasmáticas elevadas das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-6 são observadas em casos de DM2 e obesidade (SCHENK; SABERI; OLEFSKY, 2008).

Investigações, tanto em roedores quanto em humanos, têm sugerido que DHA e EPA estão implicados na redução da produção de mediadores inflamatórios, apresentando, portanto, potencial atenuador do processo inflamatório, possivelmente contribuindo para a melhora da sensibilidade à insulina (TORTOSA-CAPARRÓS et al., 2017; MARTÍNEZ-FERNANDES et al., 2015). Por outro lado, AGPI n-6 são associados ao estado pró-inflamatório e à sinalização prejudicada da insulina (KALUPAHANA; CLAYCOMBE; MOUSTAID-MOUSSA, 2011). Diferentes mecanismos moleculares, por meio dos quais estes AG promoveriam os efeitos encontrados, também são apontados (LUDWIG et al., 2013; GONZÁLEZ-PÉRIZ; CLÀRIA, 2010). Para os AGPICL n-3, há descrição, por exemplo, de ação inibitória direta sobre as vias de sinalização intracelular associadas com a ativação de fatores de transcrição NF-kB (HUANG et al., 2011; KALUPAHANA; CLAYCOMBE; MOUSTAID-MOUSSA, 2011), que regulam a expressão de genes cujos produtos são pró-inflamatórios (SAMPATH; NTAMBI, 2005).

Essencialmente, os efeitos benéficos associados aos AGPICL n-3 foram observados em condições clínicas que apresentam inflamação e/ou RI associadas, incluindo as DCV, obesidade, DM2, entre outras, nas quais é esperado padrão secretório alterado de citocinas e adipocinas (MARTÍNEZ-FERNANDES et al., 2015; GONZÁLEZ-PÉRIZ; CLÀRIA, 2010). Em indivíduos não obesos, a patogênese da RI ainda é pouco descrita na literatura. É reconhecido, entretanto, que a sensibilidade à insulina apresenta correlação negativa com o tamanho de adipócitos e distribuição do tecido adiposo. Neste sentido, indivíduos com adiposidade abdominal aumentada, e maior tamanho de adipócitos nesta região, apresentam sensibilidade à insulina sistêmica mais reduzida (RODRIGUEZ-LEYVA et al., 2010). Estado de RI também é capaz de predizer risco aumentado para DM2 em indivíduos não obesos (OWEI et al., 2017), justificando a necessidade do controle e reversão deste quadro.

2.6 Adipocinas na regulação do metabolismo e processos inflamatórios

O tecido adiposo é atualmente reconhecido não apenas por sua propriedade de armazenar energia, mas também como importante órgão endócrino, capaz de regular a homeostase metabólica, em resposta à condição nutricional do organismo. Desta maneira, ele é capaz de suprir as demandas metabólicas do balanço energético positivo ou negativo, cujos mecanismos regulatórios são modulados por citocinas produzidas e secretadas pelo próprio tecido, denominadas adipocinas (STERN; RUTKOWSKI; SCHERER, 2016).

Além de regularem o próprio tecido adiposo, as adipocinas intermedeiam a comunicação deste tecido com o cérebro, fígado, sistema cardiovascular e músculo. Estas proteínas sinalizadoras podem ser classificadas como pró ou anti-inflamatórias, e seu equilíbrio é crucial para a manutenção da homeostase sistêmica. Produção desproporcional destas citocinas leva à inflamação crônica de baixo grau, característica dos quadros de obesidade (CONDE et al., 2011), contribuindo para o desenvolvimento desta e outras doenças metabólicas (NAKAMURA; FUSTER; WALSH, 2014). Assim, o tecido adiposo é, atualmente, também considerado órgão endócrino, parácrino e autócrino, com importante envolvimento na fisiopatologia de diversas doenças inflamatórias (CONDE et al., 2011).

A leptina, adipocina identificada há pouco mais de duas décadas, é um hormônio relacionado à regulação da homeostase energética (COLES, 2016), capaz de modular o apetite bem como a massa corporal, por meio de sua ação no hipotálamo, sinalizando mecanismos que promovem saciedade, suprimindo o consumo alimentar e estimulando o gasto energético (ATHYROS et al., 2010). Leptina circulante atravessa a barreira hematoencefálica e liga-se a seus receptores hipotalâmicos, influenciando a expressão de neuropeptídios orexígenos e anorexígenos (KLOK; JAKOBSDOTTIR; DRENT, 2007). Assim, este hormônio, cujos teores circulantes são proporcionais à adiposidade corporal (COLES, 2016; SUNDARAM et al., 2016), é capaz de regular o comportamento alimentar e controlar os estoques corporais de gordura, o sistema nervoso autônomo e o balanço energético corporal (PARASKEVAS; LIAPIS; MIKHAILIDIS, 2006). Já em células musculares esqueléticas, a leptina favorece aumento da captação de glicose e oxidação de AG (COLES, 2016).

Na obesidade, o excesso de massa de tecido adiposo acumulado determina aumento na expressão de leptina, nos próprios adipócitos, e correspondente elevação das concentrações plasmáticas do hormônio. Nesta situação, observa-se resistência à ação da

leptina (NAKAMURA; FUSTER; WALSH, 2014), de modo que, mesmo com teores circulantes mais elevados, não ocorre a resposta anorexígena esperada (SUNDARAM et al., 2016; GUERRE-MILLO, 2004; FRIEDMAN, 1998). Ademais, a resistência à leptina também está relacionada a RI (GUERRE-MILLO, 2004), e a homeostase glicêmica é regulada não somente por insulina, mas também por leptina (PAZ-FILHO et al., 2012).

A leptina pode afetar a homeostase glicêmica e insulinêmica de maneira central, no hipotálamo, ou de maneira periférica, por meio de sua ação nos tecidos pancreático, muscular e hepático. A glicemia, insulinemia e RI são reduzidas por esta adipocina (PAZ-FILHO et al., 2012), capaz de inibir vias metabólicas que antagonizam a sinalização intracelular da insulina (LIM; KOLA; KORBONITS, 2010).

A leptina tem sido considerada adipocina pró-inflamatória (NAKAMURA; FUSTER; WALSH, 2014), envolvida na modulação do sistema imune, por meio de seus efeitos sobre o desenvolvimento, proliferação, maturação e ativação de neutrófilos, monócitos e linfócitos. Citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IL-6, têm sua produção mediada, dentre outros fatores, pela ação estimulante da leptina em macrófagos e linfócitos T (OTERO et al., 2006), e concentrações elevadas de IL-6 podem regular a expressão de leptina (TRUJILLO et al., 2004; FAGGIONI; FEINGOLD; GRUNFELD, 2001).

A resistina é uma adipocina inicialmente descrita como importante fator no desenvolvimento de RI e DM2 em humanos. Mais recentemente tem sido relacionada à esteatose hepática não alcoólica, doença inflamatória intestinal, doença renal crônica, disfunção endotelial, aterosclerose e é considerada fator preditivo de mortalidade por DCV. Além disso, já foi demonstrada correlação positiva entre obesidade, RI e teores séricos elevados de resistina em humanos (JAMALUDDIN et al., 2012), e tanto leptina quanto resistina representam adipocinas implicadas em ações promotoras de inflamação e RI (KANG et al., 2016; STEPPAN et al., 2001).

Apesar de o reconhecimento de que a resistina participa na modulação de reações inflamatórias por meio de diferentes vias, ainda não foi identificado receptor específico para esta citocina, de modo que os mecanismos moleculares da sua ação ainda não são completamente conhecidos (REN; ZUO; WAN, 2016). Entretanto, há referência acerca da sua atividade pró-inflamatória, possivelmente por meio da ativação da via NF-κB, promovendo aumento da expressão dos genes TLR-2, IL-1, IL-6 e TNF-α (TILG;

MOSCHEN, 2006). Recentemente, foi demonstrado antagonismo entre secreção de resistina e leptina em adipócitos de camundongos (DISILVESTRO et al., 2016).

Outra importante adipocina é a adiponectina, envolvida no metabolismo glicídico, estimulando a utilização de glicose, bem como a oxidação de AG pelo tecido muscular, além de reduzir a gliconeogênese hepática (YAMAUCHI et al., 2002). Concentrações séricas deste hormônio apresentam correlação negativa com obesidade (CAVUSOGLU et al., 2006), e positiva com a sensibilidade à insulina (YANG et al., 2001). De outro modo, a redução da adiponectina está associada a RI, aterosclerose, dislipidemia (YADAV et al., 2013), maior risco de morte, enfarto do miocárdio (KIZER et al., 2013; CAVUSOGLU et al., 2006), DM2 (LINDBERG et al., 2014) e doença arterial coronariana (SATTAR et al., 2006).

Evidências sugerem que EPA e DHA podem estimular a liberação de adiponectina em modelo animal e em humanos (GRAY et al., 2013; FLACHS et al., 2006). Em indivíduos obesos, o aumento de concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e proteína C reativa, está correlacionado à redução na concentração de adiponectina e, a redução da massa corporal resultou em reversão deste quadro (ESPOSITO; PONTILLO; GIUGLIANO, 2003). Ácidos graxos saturados e TNF-α, derivados de adipócitos e macrófagos, respectivamente, estimulam a secreção de adipocinas pró-inflamatórias, como o próprio TNF-α, e inibem a liberação de adiponectina (SUGANAMI; NISHIDA; OGAWA, 2005). O tratamento de células adiposas e macrófagos com EPA reverteu a redução de adiponectina, parcialmente devido aos seus efeitos inibitórios sobre a secreção de TNF- α por macrófagos (SUGANAMI; NISHIDA; OGAWA, 2005).

Os efeitos de ALA sobre teores de adiponectina ainda são controversos. No tecido adiposo subcutâneo de pacientes com DM2, a suplementação com ALA foi capaz de aumentar a expressão gênica de adiponectina, mas não alterou suas concentrações (DE HOLANDA MIRANDA et al., 2015). Contudo, segundo Rodriguez-Leyva et al. (2010), a adiponectina parece aumentar com a suplementação de ALA em pacientes com DM2, associada a melhor sensibilidade à insulina. Por outro lado, o estudo de Paschos e Griffin (2007) não demonstrou alterações na concentração plasmática de adiponectina em homens dislipidêmicos com a utilização de óleo de linhaça (fonte de ALA). De outro modo, Duan et al. (2014) submeteram suínos à dietas isoenergéticas, com alterações nas razões n-6:n-3, obtidas pela substituição de diferentes quantidades de óleo de linhaça pelo

óleo de soja na ração. Os autores encontraram, no grupo alimentado com razão n-6:n-3correspondente a 1:1, redução da adiponectina, em comparação aos animais que consumiram dietas com razões 5:1 e 10:1. No estudo de Sekine et al. (2008), a adição de óleo de linhaça à dieta de ratos machos foi capaz de induzir aumento nas concentrações de adiponectina no plasma e no tecido adiposo perirenal.

A literatura abordando os efeitos do consumo de chia sobre a liberação de adiponectina ainda é escassa. Em pacientes com DM2 e sobrepeso ou obesidade, a adição de chia à dieta hipoenergética foi capaz de reduzir as concentrações plasmáticas desta adipocina (SEKINE et al., 2008). Não foram encontrados estudos avaliando os efeitos das sementes ou óleos de chia ou de rosa mosqueta sobre concentrações de adipocinas em modelo animal.

A produção de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo contribui para inflamação sistêmica de baixo grau, e é importante na patogênese da obesidade e comorbidades. Evidências crescentes sugerem que o tipo de lipídio dietético pode influenciar o desenvolvimento de obesidade bem como regular a produção de adipocinas e a razão n-6:n-3 dietética parece estar envolvida neste processo, sendo importante no desenvolvimento de doenças, como DCV e câncer, em modelo animal (SUNDARAM et al., 2016).

Sundaram et al. (2016) avaliaram se diferenças no conteúdo de AGPICL n-3 dietético são capazes de afetar a produção de citocinas em camundongos. Os autores concluíram que, em animais alimentados com dieta rica em lipídios, o óleo de peixe foi capaz de reduzir em 27% a leptina plasmática, quando comparado ao óleo de milho (rico em AGPICL n-6). Neste mesmo estudo, os animais que receberam óleo de peixe na dieta hiperlipídica não apresentaram alteração na insulinemia, quando comparados ao grupo que recebeu dieta hipolipídica. De outro modo, todos os outros grupos em dieta hiperlipídica (que receberam óleos de girassol, rico em ácido oleico, óleo de soja, de milho e de linhaça) apresentaram aumento na insulinemia. Estes resultados indicam que o óleo de peixe ou seus componentes podem atenuar desordens metabólicas decorrentes das dietas hiperlipídicas e melhorar a sensibilidade à insulina.

O efeito da adição de EPA e DHA a dietas hiperlipídicas também foi estudado por Flachs et al. (2006), que alimentaram camundongos C57BL/6 com dieta pobre em AGPICL n-3 ou enriquecida com EPA e DHA. Os teores de leptina plasmáticos não foram afetados pela adição de EPA e DHA. Contudo, nestes animais, as concentrações de

insulina foram menores, e as de adiponectina, que contribui para sensibilidade à insulina, maiores. Hariri et al. (2015), em revisão sistemática e meta-análise, concluíram que a suplementação com AGPICL n-3 pode reduzir moderadamente os teores circulantes de leptina em adultos não obesos, sugerindo que, mesmo na ausência dos processos metabólicos característicos da obesidade, estes AG ainda poderiam conferir benefícios à saúde.

2.7 Fontes alternativas de ácidos graxos n-3: óleos de chia e de rosa mosqueta

A chia (*Salvia hispanica* L.) (Figura 5) é uma planta originária do México e da Guatemala, tendo constituído alimento essencial da dieta de civilizações pré-colombianas, fazendo parte da alimentação humana há 5.500 anos. Além do consumo dietético, populações astecas também utilizavam suas sementes e seu óleo no preparo de medicamentos, cosméticos e em rituais pré-históricos. Nos rituais religiosos, a chia era ofertada às divindades, demonstrando a importância que esta civilização conferia ao produto. Em 2004, o parlamento Europeu aprovou a introdução da semente de chia como novo alimento, assegurando sua inocuidade toxicológica, assim como a ausência de fatores antinutricionais e alergênicos, possibilitando o uso em preparações como biscoitos, massas, barras de cereais, iogurtes, entre outras (CRAIG, 2004).

Figura 5. Ilustração da *Salvia hispanica* L. – planta com flores roxas e folhas largas. Fonte: disponível em: <http://alimentosnaturaisesaudaveis.blogspot.com.br/2010/07/chia-o-super-alimento.html> Acesso em: 10 de agosto de 2017.

Considerado o alimento vegetal com maior teor de ALA conhecido, ao menos até 2007 (VUKSAN et al., 2007), a utilização da chia na ração de animais permite aumentar o conteúdo de AG n-3 em produtos como ovos (ANTRUEJO et al., 2011; AYERZA;

COATES, 2001) e frango, consumidos pelo homem (AYERZA; COATES, 2002). Adicionalmente, quando ingerido por nutrizes, eleva o conteúdo destes AG do leite materno (VALENZUELA et al., 2015).

O consumo de óleo de chia está associado a diversos benefícios à saúde. Marineli et al. (2015) submeteram ratos obesos à dieta hiperlipídica e rica em frutose, ou com esta mesma dieta, suplementada com óleo de chia ou sementes de chia. A dieta contendo chia, apesar de não reduzir o ganho de massa corporal, o acúmulo adiposo abdominal, tampouco a ingestão dietética, foi capaz de melhorar a tolerância à insulina e à glicose em testes de tolerância intraperitoneal (MARINELI et al., 2015).

Valenzuela et al. (2014) observaram aumento do conteúdo de ALA nos fosfolipídios eritrocitários de ratos, proporcional ao conteúdo de ALA das rações ofertadas, suplementadas com óleos de girassol, canola, *Rosa canina*, *sacha inchi* e chia. Apesar de o óleo de chia apresentar maior teor de ALA que os demais, o conteúdo eritrocitário deste AG nos animais não apresentou diferença estatística, quando comparado aos animais que receberam óleo de s*acha inchi*, sugerindo haver capacidade máxima de incorporação de ALA pelos fosfolipídios destas células. Os fosfolipídios eritrocitários também apresentaram maior acúmulo de AA e EPA e maior conteúdo dietético de seus precursores AL e ALA. Os teores de DHA, entretanto, não foram alterados em função do fornecimento dietético de ALA. Os autores sugeriram que o aumento de EPA, mas não de DHA, reflete a possibilidade das células eritrocitárias não serem alvos para acúmulo de AGPICL n-3. No fígado, também foi observado aumento do conteúdo de EPA, em decorrência de maiores ingestões de ALA, acompanhado de maior acúmulo de DHA, porém, sem diferença entre os grupos chia e *sacha inchi*. Com isso, foi proposto existir regulação metabólica na bioconversão hepática de ALA a DHA, com possível inibição enzimática, em casos de excesso de ALA.

A rosa mosqueta (*Rosa affins rubiginosa*) (Figura 6) é uma planta pertencente à família das Rosáceas, originária da área do Mediterrâneo e da Europa Central e foi trazida para a América do Sul pelos colonizadores espanhóis, crescendo na região sul e central do Chile, como uma planta silvestre dos Andes Chilenos, em solos secos de baixo valor agrícola (DOURADO et al., 2000). É das sementes da rosa mosqueta que é extraído seu óleo.

Figura 6. Ilustração da *Rosa affins rubiginosa* - frutos e sementes.
Fonte: Disponível em: <https://www.mindenpictures.com/search/preview/sweet-briar-rosa-rubiginosa-close-up-of-hips-one-open-showing-seeds/0_80052057.html> Acesso em: 29 de setembro de 2017.

A adição dos óleos de chia e/ou rosa mosqueta à dieta de ratos resultou em aumento significativo nos teores hepáticos de ALA, EPA e DHA, alcançando menor razão n-6:n-3, sem associação a efeitos adversos no tecido hepático (VALENZUELA et al., 2012). Foi sugerido que a elevada concentração de ALA nesses óleos estimula as vias de elongação e dessaturação deste AG, elevando o conteúdo de seus derivados de cadeia longa, favorecendo principalmente a biotransformação para EPA. Outros estudos também apontam para os benefícios do consumo de chia (semente e óleo) na diminuição da RI em ratos obesos dislipidêmicos (CHICCO et al., 2009), ação cardioprotetora e hepatoprotetora em ratos obesos (POUDYAL et al., 2012) e efeitos antitumorais em camundongos (ESPADA et al., 2007). Evidências sugerem que os AGPI n-3 podem reduzir doença coronariana e outras DCV (ZHAO et al.,2004).

Ressalta-se, entretanto, a necessidade de estudos adicionais, destinados a ampliar o conhecimento acerca dos efeitos dos óleos de chia e rosa mosqueta sobre o metabolismo, buscando, adicionalmente, identificar os possíveis mecanismos biomoleculares envolvidos.

3 JUSTIFICATIVA

Frutos do mar constituem a principal fonte alimentar de EPA e DHA. O consumo destes AGPICL, associados a benefícios à saúde humana, num futuro próximo, será ainda mais restrito, devido à crescente escassez de pescados, destacando-se a necessidade da identificação de fontes sustentáveis de AGPI n-3 biologicamente ativo. Neste contexto, profissionais de saúde vêm buscando novas fontes destes AG, particularmente de ALA, potencialmente capaz de ser convertido endogenamente em EPA e DHA, compensando, assim, o reduzido consumo de AGPICL n-3. A biodiversidade de sementes ricas em ALA, como as da chia e rosa mosqueta, ainda é pouco explorada bem como permanece tema controverso a eficiência da bioconversão deste AG em seus derivados de cadeia longa. A variabilidade nos achados acerca deste tema está relacionada à existência de diversos fatores capazes de influenciar a biossíntese e ação dos AGPICL, incluindo a razão n-6:n-3 da dieta. Portanto, são exigidas maiores evidências científicas de que o consumo dietético de óleos extraídos destas sementes, fontes de ALA, de fato, se traduz na produção dos benefícios à saúde, amplamente atribuídos aos AGPI n-3, particularmente os seus derivados de cadeia longa. Nesse sentido, pretende-se investigar os efeitos do consumo dos óleos de chia e rosa mosqueta sobre a composição tecidual de AG, capaz de, potencialmente, influenciar a quantidade local e sistêmica de marcadores inflamatórios e, ainda, a concentração de lipídios circulantes e a homeostase glicêmica. Considerada a reduzida razão n-6:n-3 destes óleos, postula-se que a sua ingestão, como fonte lipídica dietética, mesmo na ausência de enfermidades metabólicas, deve resultar em aumento na incorporação de AGPICL n-3 nos tecidos e perfil glicêmico e anti-inflamatório mais favorável, frente ao consumo de óleo de soja, fonte de AGPI n-6.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar se a origem do AGPI n-3 dietético produz efeitos distintos sobre a modulação do metabolismo lipídico e de mediadores da atividade inflamatória tecidual.

4.2 Objetivos específicos

Em camundongos machos adultos, alimentados com dietas isoenergéticas e normolipídicas, contendo óleo de chia, óleo de rosa mosqueta, óleo de peixe ou óleo de soja, desde os 42 dias de vida até o final do sexto mês de vida, realizar caracterização metabólica por meio da determinação dos seguintes parâmetros:

i. Evolução da massa corporal e ingestão alimentar;

ii. Sensibilidade periférica à insulina;

iii. Perfil de ácidos graxos plasmáticos e incorporados ao fígado e cérebro;

iv. Conteúdo de triacilglicerois, colesterol total e HDL-colesterol no plasma;

v. Teores de adipocinas (leptina e resistina), insulina e citocinas (IL-6, IL-10 e TNF-α) no plasma, fígado e cérebro;

vi. Conteúdo de proteínas envolvidas na resposta inflamatória mediada por TLR-4 e NF-kB: TLR4, Myd 88, e as frações fosforiladas e totais de NF-kB p50 e p65, no fígado e cérebro.

5 MÉTODOS

5.1 Animais e condições experimentais

Foram utilizados camundongos C57BL/6, provenientes do biotério de roedores do Instituto de Nutrição da Universidade Federal do Rio de Janeiro, mantidos sob condições controladas de luz (claro das 7h às 19h) e temperatura (24 ± 2 °C), com livre acesso à ração comercial e água (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, CONCEA, 2013).

A manipulação e eutanásia dos camundongos respeitaram as normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de pesquisa científica e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro em 13 de maio de 2013, obtendo o código de referência INJC016 (ANEXO A).

Os camundongos machos foram desmamados no vigésimo primeiro dia de vida, a partir do qual receberam ração comercial (AIN-G) até o quadragésimo segundo dia de vida, a partir do qual os animais são considerados adolescentes (DUTTA; SENGUPTA, 2016). A partir de então, foram aleatoriamente distribuídos e mantidos até o sexto mês em quatro grupos experimentais, cujas características descritas a seguir dizem respeito às rações isoenergéticas e normolipídicas, manipuladas à base de caseína, contendo diferentes bases lipídicas: Grupo óleo de soja (GS), constituído por animais que receberam ração contendo 7 (4) % de óleo de soja, fonte de ácido graxo linoleico; Grupo óleo de chia (GCh), constituído por animais que receberam ração contendo 7 (4) % de óleo de chia; Grupo óleo de rosa mosqueta (GRM), constituído por animais que receberam ração contendo 7 (4) % de óleo de rosa mosqueta; Grupo óleo de Peixe (GP), constituído por animais que receberam ração contendo 6 (3,4) % de óleo de peixe, fonte de DHA e EPA e 1 (0,6) % de óleo de milho.

Os percentuais descritos, maiores e menores, dos óleos dizem respeito, respectivamente, ao teor de lipídios recomendável para roedores na fase de crescimento (21-59 dias de vida) e manutenção (a partir dos 60 dias de vida) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

5.2 Formulação das rações

Todas as rações experimentais foram confeccionadas no Laboratório de Bioquímica Nutricional, de acordo com a *American Institute of Nutrition* (AIN) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) (Tabelas 1 e 2), para crescimento e manutenção, contendo modificações relativas apenas às fontes lipídicas utilizadas. A adição do óleo de milho à ração a base de óleo de peixe tem por objetivo prevenir possível deficiência de ácidos graxos n-6.

Tabela 1. Composição modificada das rações AIN-93G de crescimento (g/100g)

	AIN-93G[1]	GS	GCh	GRM	GP
Amido de milho	39,746	39,746	39,746	39,746	39,746
Caseína	20	20	20	20	20
Dextrina	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2
Sacarose	10	8	8	8	8
Fibra	5	5	5	5	5
Mix de minerais G [a]	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mix de vitaminas [b]	1	1	1	1	1
L-cistina	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de Colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
BHT	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014
Óleo de soja	7	7	-	-	-
Óleo de chia	-	-	7	-	-
Óleo de rosa mosqueta	-	-	-	7	-
Óleo de peixe	-	-	-	-	6
Óleo de milho	-	-	-	-	1

GS = grupo soja; GCh = grupo chia; GRM = grupo rosa mosqueta; GP = grupo peixe; BHT: butilidroxitolueno; [1] G = *growth* (crescimento); [a] Mistura de minerais G (mg/kg dieta), incluindo: cálcio 5.000; fósforo 1.992; potássio 3.600; enxofre 300; sódio 1.019; cloro 1.571; magnésio 507; ferro 35; zinco 30; cobre 6; iodo 0,2; molibdênio 0,15; selênio 0,15; silício 5; cromo 1; fluoreto 1; níquel 0,5; boro 0,5; lítio 0,1; vanádio 0,1 (AIN-93G – mineral mixPrag Soluções Biociências, Jaú, São Paulo). [b] Mistura de vitaminas (U/kg dieta), incluindo: ácido nicotínico 30 mg; pantotenato 15 mg; piridoxina 6 mg; tiamina 5 mg; riboflavina 6 mg; ácido fólico 2 mg; vitamina K 750 µg; D-biotina 200 µg; vitamina B12 25 µg; vitamina A 4.000 UI; vitamina D3 1000 UI; vitamina E 75 UI (AIN-93G, mineral mixPrag Soluções Biociências, Jaú, São Paulo).

Os óleos de chia (*Salvia hispanica* L.) e de rosa mosqueta (*Rosa affins rubiginosa*) foram fornecidos pelas Empresas chilenas Benexia e Coesam, respectivamente. Os óleos de soja, peixe e milho foram disponibilizados pela Empresa Triângulo/Brasil®. Os ingredientes das rações foram homogeneizados em batedeira planetária 12L 1⁄4 CV BP-12SL (Gastromaq, Brasil), adicionados de água em quantidade suficiente para a aquisição de textura adequada para a formação de *pellets* e acondicionados em sacos plásticos vedados, cuja atmosfera foi substituída por nitrogênio a fim de evitar a oxidação dos AG. As rações foram mantidas a -22 °C e oferecidas em porções diárias aos animais.

Tabela 2. Composição modificada das rações AIN-93M de manutenção (g/100g)

	AIN-93M[1]	GS	GCh	GRM	GP
Amido de milho	46,569	46,569	46,569	46,569	46,569
Caseína	14	14	14	14	14
Dextrina	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5
Sacarose	10	10	10	10	10
Fibra	5	5	5	5	5
Mix de minerais G [a]	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mix de vitaminas [b]	1	1	1	1	1
L-cistina	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Bitartarato de Colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
BHT	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008
Óleo de soja	4	4	-	-	-
Óleo de chia	-	-	4	-	-
Óleo de rosa mosqueta	-	-	-	4	-
Óleo de peixe	-	-	-	-	3,4
Óleo de milho	-	-	-	-	0,6

GS = grupo soja; GCh = grupo chia; GRM = grupo rosa mosqueta; GP = grupo peixe; BHT: butilidroxitolueno; [1] M = *maintenance* (manutenção); [a] Mistura de minerais M (mg/kg dieta), incluindo, cálcio 5.000; fósforo 1.992; potássio 3.600; enxofre 300; sódio 1.019; cloro 1.571; magnésio 507; ferro 35; zinco 30; cobre 6; iodo 0,2; molibdênio 0,15; selênio 0,15; silício 5; cromo 1; fluoreto 1; níquel 0,5; boro 0,5; lítio 0,1; vanádio 0,1 (AIN-93M – mineral mixPrag Soluções Biociências, Jaú, São Paulo). [b] Mistura de vitaminas (U/kg dieta), incluindo, ácido nicotínico 30 mg; pantotenato 15 mg; piridoxina 6 mg; tiamina 5 mg; riboflavina 6 mg; ácido fólico 2 mg; vitamina K 750 µg; D-biotina 200 µg; vitamina B12 25 µg; vitamina A 4.000 UI; vitamina D3 1.000 UI; vitamina E 75 UI (AIN-93M – mineral mixPrag Soluções Biociências, Jaú, São Paulo).

A composição de AG das rações experimentais foi determinada por cromatografia gasosa. Evidenciam-se valores significativamente elevados para o total de AGPI n-3 assim como razões n-6/n-3 expressivamente reduzidas nas rações contendo os óleos de chia, rosa mosqueta e peixe, frente àquela manipulada com o óleo de soja, corroborando o reconhecimento de que as rações oferecidas aos animais experimentais mantêm as características que lhes foram teoricamente atribuídas (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição percentual de ácidos graxos nas rações experimentais

Ácidos graxos (%)	GS	GCh	GRM	GP
C 16:0 Palmítico	13,12	8,83	5,86	5,86
C 18:0 Esteárico	4,52	3,93	2,89	2,89
AGS total	19,77	14,10	10,65	32,88
C 18:1 n-9 Oleico	25,64	7,24	15,15	1,25
AGMI total	28,13	9,11	16,38	25,25
18:2, n-6 AL	46,39	19,35	25,31	1,43
22:4, n-6 AA	ND	ND	ND	6,64
AGPI n-6 total	47,39	19,35	25,31	15,50
18:3, n-3 ALA	0,37	57,44	41,53	1,64
20:5, n3 EPA	ND	ND	ND	1,94
22:5, n-3 DPA	ND	ND	ND	0,51
22:6, n-3 DHA	ND	ND	ND	8,95
AGPI n-3 total	4,71	57,44	41,53	26,36
AGPI total	52,10	76,79	66,84	41,86
Razão n-6:n-3	10,07	0,34	0,61	0,59

GS = grupo soja; GCh = grupo chia; GRM = grupo rosa mosqueta; GP = grupo peixe. AGS =ácido graxo saturado; AGMI= ácido graxo monoinsaturado; AL = ácido linoleico; AA = ácido araquidônico; AGPI= ácido graxo poli-insaturado; ALA = ácido linolênico; EPA = ácido eicosapentaenoico; DPA = ácido docosapentaenoico; DHA = ácido docosahexaenoico. ND = não detectado. Valores expressos como média.

5.3 Avaliação da massa corporal e do consumo alimentar

Para a avaliação da evolução da massa corporal, foram considerados os valores correspondentes às massas corporais medidas semanalmente. O consumo de ração foi monitorado diariamente (dias úteis) no turno da manhã, ao longo de todo o período experimental. Para a medida foi considerada a diferença entre a quantidade de ração disponibilizada para o animal e o resto do dia seguinte e o resultado ajustado para 100g de massa corporal do roedor. Todas as medidas foram realizadas utilizando-se balança digital Bioprecisa® com capacidade para 5.500g e precisão de 0,01g.

5.4 Teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTIG)

Aos 180 dias de idade os animais foram submetidos a jejum de 8h. Inicialmente foi analisada a glicemia de jejum, utilizando-se glicosímetro (OneTuch-Ultra – Johnson & Johnson Medical), em amostra de sangue obtida da veia caudal dos camundongos, sendo considerada o ponto zero da curva glicêmica. Em seguida, os roedores receberam infusão intraperitoneal de solução de glicose (2 g/kg massa corporal) e foram realizadas dosagens de glicemia aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a sobrecarga de glicose. Os resultados foram expressos como área sob a curva (AUC, *área under the curve*), de acordo com o método trapezoidal, de forma a possibilitar comparação entre os grupos experimentais (SOUZA; MAZUCHELI; MARTINEZ, 2010).

5.5 Eutanásia e coleta de tecidos

Transcorridos 20 dias após a realização do TTIG, os animais foram submetidos a jejum de 4h, pesados no próprio biotério, sedados e anestesiados com ketamina e xilazina (67/13 mg/kg de massa corporal), via intraperitoneal, e foi realizada coleta de sangue por punção cardíaca. Para realização dos ensaios bioquímicos, amostras de sangue dos animais foram recolhidas em microtubos contendo EDTA 0,2 M (1:5, v/v), submetidas à centrifugação a 3.000 rpm por 15 minutos a 4 °C para separação do plasma, que foi aliquotado e estocado a -80 °C até a ocasião das análises. Imediatamente após a eutanásia, o cérebro e o fígado foram retirados, pesados, resfriados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C, até as análises correspondentes.

5.6 Análise de ácidos graxos das rações experimentais e tecidos

Os teores relativos de AG dos lipídios nas rações oferecidas aos animais e incorporados a seus tecidos foram determinados por cromatografia gás-líquido, utilizando equipamento Agilent Technologies 7890A CG System, equipado com detector de chama ionizável (FID), acoplado ao software EZChrom Elite CDS (Agilent Technologies, Inc., CA, USA). A extração de lipídios, saponificação e metilação dos AG foram realizadas por metilação direta alcalina, conforme método Ce 2b-11 (AOCS, 2011). Alíquotas de 100 mg de amostra de cada óleo, pesadas em balança digital analítica SHIMADZU, modelo AUY220, foram transferidas para tubos Pirex® e homogeneizadas em 5 mL de NaOH/metanol 0,5 M com o auxílio de bastões de vidro. Posteriormente foi adicionado 1 mL de padrão interno (C13:0 em hexano; 5,0 mg/mL) e a mistura foi aquecida a 100 ºC

por 15 minutos. Após este período, os tubos foram imediatamente imersos em gelo por aproximadamente 5 minutos e receberam 5 mL de trifluoreto de boro 14 %/metanol sob leve agitação, aquecidos à mesma temperatura anterior, por 2 minutos, e novamente resfriados em gelo. Em seguida, foram adicionados 3 mL de NaCL saturado e 4 mL de hexano a cada tubo, sob agitação suave. Os tubos foram mantidos em repouso por 1 hora para a separação das fases. Os ésteres metílicos formados na parte superior do tubo foram filtrados com algodão desengordurado e acondicionados em *vials* de 1 mL, próprios para amostrador automático de cromatógrafo a gás, contendo 50 mg de sulfato de sódio anidro, e estocados em freezer -20 ºC até análise do perfil de AG no cromatógrafo. As soluções de ésteres metílicos foram inseridas no equipamento por meio de injetor automático, no volume de 1 µL/amostra. As amostras de plasma e cérebro foram integralmente corridas no aparelho (método *splitless*). As amostras de fígado foram corridas no equipamento com razão de divisão (*split*) de 1:4. A separação dos ésteres metílicos foi feita em coluna capilar de sílica fundida SP-2560 de bis-cianopropil polisiloxano (Supelco Inc., P.A.,U.S.) com 100 m de comprimento x 0,25 mm x 0,2µm de diâmetro interno, cuja programação de temperatura foi estabelecida para 100 °C por 5 minutos, com taxa de aumento de 3 °C/minuto, alcançando a temperatura de 140 °C, e permanecendo nessa temperatura durante 15 minutos. A taxa de aumento da temperatura foi de 0,5 °C/minuto até alcançar 170 °C e, posteriormente, 3,2 °C/minuto até 220 °C, permanecendo nessa temperatura por 35 minutos. O tempo total de análise foi de aproximadamente 124 minutos e as temperaturas do injetor e do detector foram de 250 ºC. Os fluxos de gases (Linde Gases, RJ, BR) foram correspondentes a 0,75 mL/minuto para o gás de arraste (H2, hidrogênio); 25 mL/minuto para o gás auxiliar (N2, nitrogênio); 30 mL/ minuto para o H2 e 400 mL/ minuto para o ar sintético da chama. O tempo de retenção relativo dos picos do padrão de mistura de ésteres metílicos 463 (Nu-Chek Prep. Inc.) foi usado como referência para a identificação dos AG, e o padrão interno, para a quantificação destes lipídios (MUCCI et al., 2015; AOAC, 2009).

5.7 Análise de parâmetros bioquímicos em plasma

Os teores plasmáticos de glicose, TAG, colesterol total e fração HDL foram determinados por meio de ensaios enzimáticos colorimétricos, após jejum de 4h (ANDRIKOPOULOS et al., 2008), seguindo as instruções do fabricante dos kits comerciais utilizados (Bioclin®).

5.8 Quantificação de adipocinas e citocinas

Os teores plasmáticos e teciduais de adiponectina, leptina, resistina, insulina, IL-6, IL-10 e TNF-α foram determinados por meio de ensaio imunológico multiplex (Bio-Plex, BioRad®), utilizando o equipamento MAGPIX Luminex® para quantificação por citometria de fluxo, de acordo com as instruções do fabricante.

5.9 Avaliação da via inflamatória modulada por TLR4 e NF-kB

Para quantificação, por *Western Blotting*, das proteínas de interesse (TLR4, Myd 88, TRAF6 e as frações totais e fosforiladas de NF-kB p50 e p65), os tecidos coletados por ocasião da eutanásia, e mantidos a -80 ºC, foram transferidos para homogeneizador e macerados em recipiente imerso em gelo contendo 100 µL de tampão de extração pH 7,4 [Tris base 20 mM, MgCl2 10 mM, CaCl2 0,06 mM, EGTA (*ethylene glycol tetraacetic acid*, ácido etileno glicol tetraacético), 0,5 mM e Triton X-100 0,5 %], inibidores de proteases [aprotinina, leupeptina, ortovanadato, pepstatina, PMSF (*phenylmethane sulfonyl fluoride*, fluoreto de fenilmetanosulfonil) e fluoreto de sódio] e o agente desnaturante (DTT, ditiotreitol). A dosagem de proteínas foi realizada logo após o preparo das amostras pelo método descrito por Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão. Em seguida foi adicionado azul de bromofenol 0,2 %, sendo 5 % do volume total da amostra. Após normalização do conteúdo de proteínas/amostra, o material foi armazenado a -80 ^{0}C, para posterior submissão à separação eletroforética.

No dia da separação, as amostras foram fervidas por cerca de 5-8 minutos. Foram utilizados 40-60 µg de proteína para corrida em gel SDS/PAGE 8-10 %, sob amperagem constante (20 mA). Após finalização da corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, em equipamento semi-dryBio-Rad®, por 1 hora com voltagem fixada em 10 V. Em seguida, sítios inespecíficos, presentes na membrana, foram bloqueados em TBS-T (*Tris-buffered saline*, solução salina tamponada com Tris

mais Tween 20, composta de Tris 2 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,5, Tween 20 0,5 %), adicionado de albumina bovina a 1 % por duas horas. Logo após, as membranas foram incubadas com anticorpos específicos, de um dia para o outro (período "*overnight*") e, então, lavadas três vezes por 10 minutos com TBS-T. Posteriormente, foram incubadas com anticorpo secundário específico, na respectiva diluição, por 1 hora e, em seguida, reveladas em fotodocumentador (Uvitec Alliance 4.7), após exposição ao reagente quimioluminescente (ECL plus - Amersham Bioscience).

O controle de carregamento das proteínas no gel de eletroforese foi realizado utilizando a proteína alfa-tubulina. Após a revelação, as membranas foram lavadas em solução TBS e, em seguida, incubadas com solução (Tris 2 mM, SDS 10 %, β-mercaptoetanol, e água Milli-Q) a 48 ºC, por 30 minutos em agitação orbital. Após o procedimento, as membranas foram novamente submetidas ao bloqueio dos sítios inespecíficos e, assim, expostas a novo protocolo de *Western Blotting*. A análise densitométrica das bandas de interesse foi efetuada após processamento em *software* de análise *Scion Image* versão beta 4.03 (Scion Corporation) e os resultados foram expressos em percentual relativo ao grupo tratado com ração rica em AGPI n-6 (GS), considerado controle.

5.10 Análise estatística

Para as comparações entre os dados, após verificação do seu padrão de distribuição, utilizando-se o teste de *Kolmogorov-Smirnov*, foi aplicada estatística paramétrica por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*, utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 5.0. O nível de significância foi fixado em 5 % ($p < 0,05$) e os resultados expressos como média e erro padrão da média.

6 RESULTADOS

6.1 Consumo alimentar e evolução da massa corporal

A análise dos resultados relativos ao consumo de ração, ajustado para a massa corporal, entre os camundongos pertencentes aos quatro grupos experimentais revelou ausência de diferenças significativas (Figura 7A). Do mesmo modo, as diferenças referentes à evolução de massa corporal entre os grupos tratados e acompanhados até o final do sexto mês de vida não alcançaram significância estatística (Figura 7B). Estes achados sugerem que o consumo dos óleos de chia, rosa mosqueta ou peixe, fontes de AGPI n-3, influencia o crescimento dos animais de maneira semelhante ao perfil obtido com o consumo de fonte de AGPI n-6.

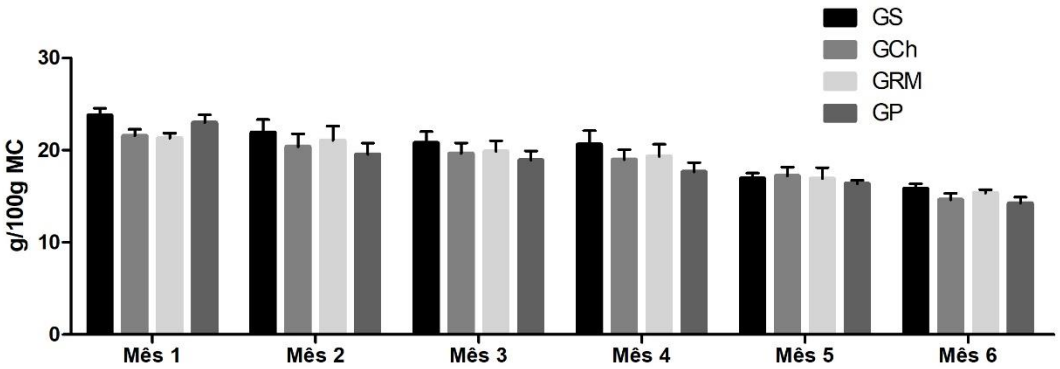


Figura 7A. Consumo de ração, ajustado por 100g de massa corporal (MC), de camundongos C57BL/6 tratados com ração normolipídica contendo óleo de soja (GS), óleo de chia (GCh), óleo de rosa mosqueta (GRM) ou óleo de peixe (GP), do quadragésimo segundo dia ao sexto mês de vida. Dados expressos como média e erro padrão da média, considerando oito animais em cada grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos após teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

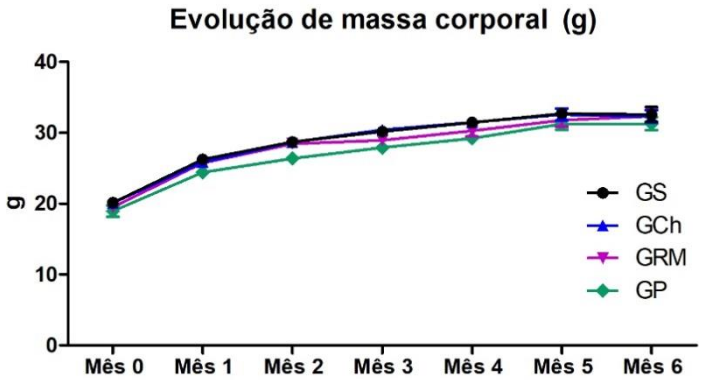


Figura 7B. Evolução da massa corporal (g) de camundongos C57BL/6 tratados com ração normolipídica contendo óleo de soja (GS), óleo de chia (GCh), óleo de rosa mosqueta (GRM) ou óleo de peixe (GP), do quadragésimo segundo dia ao sexto mês de vida. Dados expressos como média e erro padrão da média, considerando oito animais em cada grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos após teste de Newman-Keuls ($p<0,05$).

6.2 Composição de ácidos graxos dos tecidos

6.2.1 Plasma

A Tabela 4 apresenta a composição de AG no plasma dos animais tratados com as quatro rações experimentais. As maiores concentrações de AL foram identificadas nos GS e GRM. Destaca-se o conteúdo expressivamente mais reduzido deste AG no GP em relação aos demais. Os teores plasmáticos mais elevados de ALA foram observados nos grupos que consumiram as fontes deste AGPI n-3, sendo maior em GCh do que em GRM. Os animais tratados com os óleos de soja e peixe apresentaram, sem diferenças entre si, concentrações significativamente mais reduzidas deste AG, em relação aos dois outros grupos.

Os grupos GRM, GP e GCh apresentaram valores para o AA respectivamente decrescentes, significativamente diferentes entre si, e mais reduzidos do que o referente aos animais tratados com óleo de soja. Por outro lado, as maiores concentrações plasmáticas de DHA e EPA foram apontadas no grupo tratado com óleo de peixe, fonte destes representantes de cadeia longa da família n-3. Os demais grupos mostraram valores significativamente mais reduzidos. Para o DHA, os animais GRM e GCh apresentaram teores semelhantes entre si, embora o GS somente tenha diferido de GRM. Enquanto para o EPA, o conteúdo foi decrescente entre os animais GCh, GRM e GS, respectivamente. Para o DPA, o GS foi o que apresentou conteúdo mais reduzido, enquanto os animais GCh e GP, os teores mais elevados.

O conteúdo total de AGPICL n-6 foi igualmente mais elevado nos animais GS e GRM, em relação aos grupos GCh e GP, cujos teores também foram diferentes entre si, com as menores concentrações observadas em GP. Considerada a quantidade total de AGPICL n-3, os teores foram decrescentes e significativamente diferentes entre todos os grupos GP, GCh, GRM e GS respectivamente.

As razões n-6:n-3 encontradas no GCh são semelhantes àquelas encontradas no GP, e a razão mais elevada é observada no GS. Em relação às razões entre produto/precursor, tanto para AA/AL quanto para DHA/ALA, o grupo que apresentou as maiores relações foi o GP, seguido de GS, e as menores foram observadas nos GCh e GRM, sem diferença estatística.

Tabela 4. Perfil de ácidos graxos do plasma

Ácidos graxos (mg/100 mg AG totais)	Grupos			
	GS	GCh	GRM	GP
16:0	21,43±0,76	21,55±0,86	22,45±1,05	25,10±1,86
18:0	10,11±0,65	10,76±0,60	11,22±0,86	9,22±0,92
18:1 n-9	10,30±0,50	10,97±0,80	10,71±0,75	12,56±0,70
18:2, n-6 (AL)	27,20±1,75 [a]	21,54±1,04 [b]	28,14±0,94 [a]	4,32±0,36 [c]
18:3, n-3 (ALA)	0,86±0,04 [a]	5,92±0,35 [b]	3,03±0,35 [c]	0,62±0,08 [a]
20:3, n-6	0,19±0,05	0,16±0,04	0,22±0,03	0,07±0,07
20:4, n-6 (AA)	14,67±0,55 [a]	3,05±0,16 [b]	8,51±0,71 [c]	5,95±0,09 [d]
20:5, n-3 (EPA)	0,64±0,12 [a]	9,78±0,38 [b]	4,78±0,36 [c]	14,93±0,33[d]
22:5, n-3 (DPA)	0,37±0,06 [a]	1,12±0,08 [b]	0,84±0,05 [c]	1,22±0,06 [b]
22:6, n-3 (DHA)	4,46±0,32 [a]	5,00±0,11 [ab]	5,56±0,16 [b]	11,27±0,39 [c]
AGS total	34,85±0,69	35,71±0,70	35,08±0,78	37,99±1,55
AGMI total	14,61±0,88	16,23±1,47	15,19±1,04	19,23±1,08
AGPICL total	50,54±0,42 [a]	48,07±1,97 [ab]	53,82±2,01 [a]	42,79±2,55[b]
AGPICL n-6 total	40,74±1,84 [a]	25,71±0,99 [b]	37,27±1,28 [a]	10,64±0,23 [c]
AGPICL n-3 total	8,32±0,55 [a]	25,61±1,50 [b]	16,55±0,92 [c]	29,20±0,65[d]
Razão n-6:n-3	5,19±0,45 [a]	1,07±0,06 [b]	2,28±0,11 [c]	0,36±0,00 [b]
Razão AA/AL	0,64±0,10 [a]	0,14±0,01 [b]	0,29±0,03[b]	1,39±0,01 [c]
Razão DHA/ALA	5,24±0,54 [a]	0,85±0,06 [b]	1,85±0,28 [b]	19,03±3,04 [c]

GS = grupo soja; GCh = grupo chia; GRM = grupo rosa mosqueta; GP = grupo peixe. AG = ácido graxo; AL = ácido linoleico; ALA = ácido alfa-linolênico; AA = ácido araquidônico; EPA = ácido eicosapentaenoico; DPA = ácido docosapentaenoico; DHA = ácido docosahexaenoico; AGS = ácidos graxos saturados; AGMI = ácidos graxos monoinsaturados; AGPICL = ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa. n = 4 a 6 em cada grupo. Valores expressos como média ± erro padrão da média. Letras diferentes representam valores significantemente diferentes após teste de Newman-Keuls ($p<0,05$).

6.2.2 Tecido hepático

A composição de AG no tecido hepático dos animais tratados com os quatro diferentes tipos de óleos está descrita na Tabela 5. Os maiores conteúdos de AL são observados nos animais GS e GRM. Os teores deste AGPI n-6 no grupo GCh são ligeiramente, embora significativamente, inferiores aos verificados entre os camundongos

GS e GRM, enquanto que os valores referentes ao grupo GP são expressivamente menores. Os animais alimentados com os óleos fontes de ALA, GCh e GRM apresentaram conteúdos hepáticos deste AGPI n-3 expressivamente superiores aos dos grupos GS e GP, que foram semelhantes. Ressalta-se que o teor deste AG em GCh foi quase duas vezes superior ao do grupo GRM. O ácido graxo derivado de cadeia longa da família n-6, AA, foi encontrado em maiores quantidades no fígado do grupo tratado com óleo de soja e em quantidades mais reduzidas naqueles que consumiram o óleo de chia. Os animais GRM E GP apresentaram conteúdo intermediário similar deste AG, comparados aos camundongos GS e GCh. As maiores quantidades de EPA, DPA e DHA incorporadas ao tecido foram verificadas para o grupo tratado com óleo de peixe. No caso do EPA, os animais GCh apresentaram incorporação similar a do grupo GP. A incorparação destes AGPICL n-3 no grupo tratado com óleo de soja foi a menor entre todos os grupos, exceto para o DHA, cujos valores, expressivamente inferiores ao do GP, foram similares entre GS, GCh e GRM. Os conteúdos totais de AGPICL n-6 diferiram entre todos os grupos, com valores decrescentes para GS, GRM, GP e GCh. Os teores totais de AGPICL n-3 também foram diferentes entre os grupos, com valores crescentes para GS, GRM, GCH e GP. Maior razão n-6:n-3 foi identificada no grupo GS, enquanto nos animais GCh e GP, assim como entre GCh e GRM, a proporção mais reduzida destas famílias de AG no tecido hepático foi semelhante. Razões AA/AL assim como DHA/ALA bem mais elevadas, em relaçao aos demais grupos, estão presentes no GP.

Tabela 5. Perfil de ácidos graxos do tecido hepático

Ácidos graxos (mg/100 mg AG totais)	Grupos			
	GS	GCh	GRM	GP
16:0	23,96±0,33 [a]	20,98±0,35 [b]	22,62±0,84 [a b]	27,36±0,57 [c]
18:0	6,80 ± 0,79 [a]	11,12 ± 1,22 [b]	9,90 ± 0,35 [ab]	10,62 ± 1,42 [ab]
18:1 n-9	25,53±0,89 [a]	11,74±0,97 [b]	16,27±1,04 [b]	15,32±0,60 [b]
18:2, n-6 (AL)	19,90±1,07 [a]	15,20±0,92 [b]	22,03±0,88 [a]	2,57±0,11 [c]
18:3, n-3 (ALA)	1,09±0,09 [a]	11,92±0,70 [b]	6,09±0,28 [c]	0,49±0,04 [a]
20:3, n-6	0,96±0,07 [a]	0,84±0,04 [b]	1,14±0,10 [c]	0,34±0,03 [b]
20:4, n-6 (AA)	9,83±0,98 [a]	3,31±0,18 [b]	6,30±0,47 [c]	5,33±0,27 [c]
20:5, n-3 (EPA)	0,22±0,01 [a]	8,90±0,40 [b]	2,74±0,12 [c]	9,48±0,43 [b]
22:5, n-3 (DPA)	0,23±0,04 [a]	1,69±0,06 [b]	1,44±0,05 [b]	2,45±0,16 [c]
22:6, n-3 (DHA)	4,70±0,66 [a]	8,81±0,44 [a]	8,56±0,69 [a]	23,53±0,74 [b]
AGS total	32,35±1,00 [a]	32,46±1,25 [a]	33,45±0,60 [a]	38,39±1,23 [b]
AGMI total	28,16±3,66 [a]	17,63±1,13 [b]	19,12±1,38 [a b]	19,65±1,57 [b]
AGPI total	39,30±2,50 [a]	51,16±1,02 [b]	47,25±1,62 [a b]	42,90±0,55 [a b]
AGPICL total	14,17±1,27 [a]	21,83±0,34 [b]	19,35±0,53 [a]	41,11±0,75 [c]
AGPICL n-6 total	10,79±0,96 [a]	3,87±0,18 [b]	7,67±0,43 [c]	5,56±0,28 [d]
AGPICL n-3 total	7,07±1,04 [a]	31,16±0,65 [b]	18,06±0,99 [c]	34,97±1,20 [d]
Razão n-6:n-3	4,02±0,66 [a]	0,61±0,02 [b c]	1,45±0,22 [c]	0,21±0,02 [b]
Razão AA/AL	0,52±0,05 [a]	0,22±0,01 [b]	0,28±0,03 [a b]	2,06±0,21 [c]
Razão DHA/ALA	5,04±0,59 [a]	0,71±0,06 [a]	1,43±0,16 [a]	47,93±6,48 [b]

GS = grupo soja; GCh = grupo chia; GRM = grupo rosa mosqueta; GP = grupo peixe. AG = ácido graxo; AL = ácido linoleico; ALA = ácido alfa-linolênico; AA = ácido araquidônico; EPA = ácido eicosapentaenoico; DPA = ácido docosapentaenoico; DHA = ácido docosahexaenoico; AGS = ácidos graxos saturados; AGMI = ácidos graxos monoinsaturados; AGPICL = ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa. n = 4 a 6 em cada grupo. Valores expressos como média ± erro padrão da média. Letras diferentes representam valores significantemente diferentes após teste de Newman-Keuls ($p<0,05$).

6.2.3 Tecido encefálico

Na Tabela 6 estão descritos os teores de ácidos graxos avaliados no tecido encefálico. Àcido linoleico não foi detectado no GP e a incorporação deste AGPI n-6 ao tecido foi similar entre todos os demais grupos. O conteúdo de ALA, DHA e totais de

AGPICL n-3 também foram similares entre os grupos, assim como a razão DHA/ALA. Apenas o GP apresentou menor conteúdo de AA, assim como menor conteúdo total de AGPICL n-6, em relação aos demais grupos. Como não foi detectado AL no cérebro do GP, não foi possível calcular a razão AA/AL para este grupo, entretanto, entre os demais grupos, esta proporção também não diferiu. Foram identificadas pequenas, porém significativas variações nos teores de EPA, mais elevados nos animais GP do que naqueles do grupo GCh, em relação aos valores igualmente mais reduzidos de GS e GRM. O conteúdo encefálico de DPA, por sua vez, se apresentou igualmente mais elevado em GP e GCh, em relação ao do GS, mais reduzido entre todos, e GRM. As razões n-6:n-3 diferiram entre todos os grupos com valores decrescentes para GS, GRM, GCh e GP.

Tabela 6. Perfil de ácidos graxos do tecido encefálico

Ácidos graxos (mg/100 mg AG totais)	Grupos			
	GS	GCh	GRM	GP
16:0	1,53±0,13	1,70±0,09	1,62±0,17	1,79±0,23
18:0	1,11±0,16	1,34±0,04	1,36±0,15	1,14±0,11
18:1 n-9	1,06±0,18	1,31±0,06	1,17±0,14	1,42±0,21
18:2, n-6 (AL)	0,04±0,01	0,03±0,01	0,02±0,01	ND
18:3, n-3 (ALA)	0,10±0,02	0,08±0,01	0,09±0,01	0,09±0,02
20:3, n-6	0,03±0,01 [a]	0,05±0,00 [b]	0,04±0,00 [ab]	ND
20:4, n-6 (AA)	0,74±0,07 [a]	0,66±0,03 [a]	0,71±0,06 [a]	0,45±0,04 [b]
20:5, n-3 (EPA)	0,01±0,00 [a]	0,03±0,00 [b]	0,01±0,00 [a]	0,06±0,01 [c]
22:5, n-3 (DPA)	0,01±0,00 [a]	0,06±0,00 [b]	0,02±0,00 [c]	0,06±0,01 [b]
22:6, n-3 (DHA)	1,01±0,13	1,17±0,06	1,16±0,10	1,40±0,15
AGS total	2,15±0,27	3,04±0,18	2,97±0,33	3,23±0,48
AGMI total	1,52±0,25	1,79±0,06	1,62±0,20	1,94±0,29
AGPICL total	2,22±0,22	2,25±0,10	2,23±0,20	2,30±0,26
AGPICL n-6 total	1,00±0,09 [a]	0,85±0,04 [a]	0,91±0,08 [a]	0,57±0,08 [b]
AGPICL n-3 total	1,22±0,14	1,40±0,07	1,32±0,12	1,32±0,12
Razão n-6:n-3	0,84±0,04 [a]	0,61±0,02 [b]	0,70±0,02 [c]	0,36±0,02 [d]
Razão AA/AL	21,61±4,51	23,11 ± 2,61	22,81 ± 1,78	ND
Razão DHA/ALA	11,96±2,03	13,76±0,67	13,99±0,86	17,99±3,48

GS = grupo soja; GCh = grupo chia; GRM = grupo rosa mosqueta; GP = grupo peixe. AG = ácido graxo; AL = ácido linoleico; ALA = ácido alfa-linolênico; AA = ácido araquidônico; EPA = ácido eicosapentaenoico; DPA = ácido docosapentaenoico; DHA = ácido docosahexaenoico; AGS = ácidos graxos saturados; AGMI = ácidos graxos monoinsaturados; AGPICL = ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa; ND = não detectado. n = 5 a 6 em cada grupo. Valores expressos como média ± erro padrão da média. Letras diferentes representam valores significantemente diferentes após teste de Newman-Keuls ($p<0,05$).

6.3 Parâmetros bioquímicos plasmáticos

A Tabela 7 exibe as concentrações de glicose, TAG, colesterol total e fração HDL analisadas no plasma dos animais investigados. As diferenças nas concentrações de glicose e TAG entre todos os grupos não alcançaram significância estatística. Maiores teores de colesterol total foram identificados no plasma dos animais GS, comparado aos demais, exceto que o GRM apresentou teores similares tanto ao GS quanto aos grupos

GCh e GP. A fração HDL-colesterol mais elevada foi verificada no GCh, todavia, sem diferença estatística para os animais GS e GRM, que também não diferiram do GP, com os menores teores deste lipídeo.

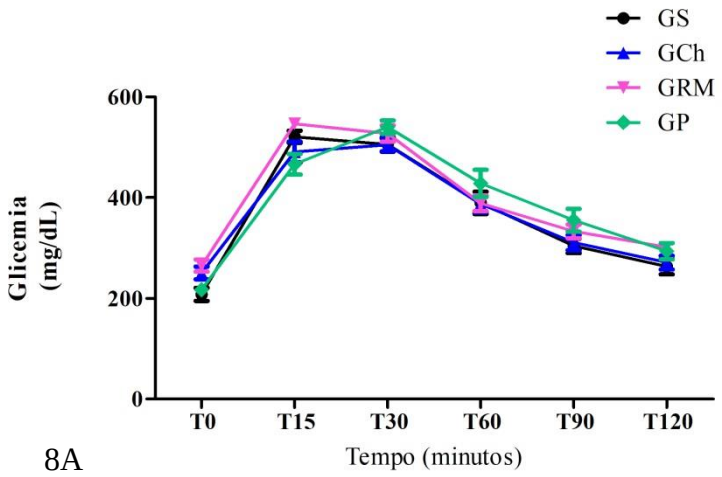
Tabela 7. Parâmetros bioquímicos plasmáticos

Parâmetros (mg/dL)	Grupos			
	GS	GCh	GRM	GP
Glicose	209,6 ± 21,6	119,5 ± 9,4	134,4 ± 17,1	117,7 ± 7,8
Triacilglicerois	74,3 ± 10,2	85,3 ± 9,6	70,8 ± 6,9	55,8 ± 6,1
Colesterol total	89,1 ± 4,7 [a]	70,7 ± 3,2 [b]	75,2 ± 4,9 [ab]	56,2 ± 6,0 [b]
Fração HDL-colesterol	60,5 ± 10,1 [ab]	85,0 ± 8,5 [a]	61,5 ± 3,7 [ab]	51,0 ± 2,1 [b]

GS = grupo soja; GCh = grupo chia; GRM = grupo rosa mosqueta; GP = grupo peixe. n= 4 a 6 em cada grupo. Letras diferentes representam valores significantemente diferentes após teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). Valores expressos como média e erro padrão da média.

6.4 Teste de tolerância intraperitoneal à glicose

Após administração intraperitoneal de glicose, foi calculada a área sob a curva das glicemias, obtidas em diferentes tempos ao longo das duas horas de duração do teste (Figuras 8A e 8B). A resposta à sobrecarga glicêmica nestes animais não foi diferente entre todos os grupos (GS = 45.712 ± 2.105; GCh = 41.793 ± 1.674; GRM = 44.483 ± 2.051; GP = 49.013 ± 3.139).



8A

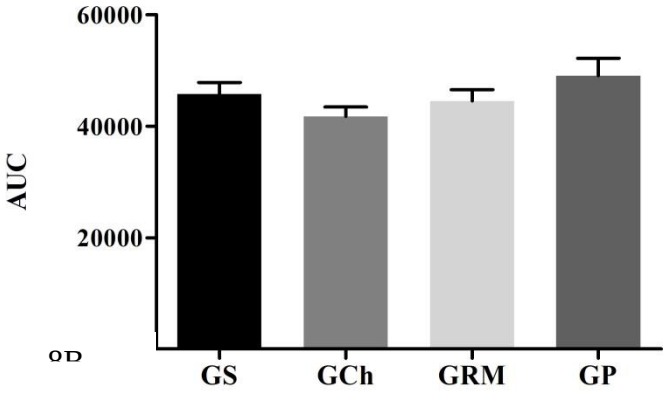


Figura 8. Gráfico representativo das curvas glicêmicas dos diferentes grupos experimentais, obtidas no teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTIG) (A) e área sob a curva glicêmica (AUC) (B) calculada no TTIG aos 180 dias de vida de camundongos C57BL/6 alimentados com ração normolipídica contendo óleo de soja (GS, n = 12), óleo de chia (GCh, n = 7), óleo de rosa mosqueta (GRM, n = 8) ou óleo de peixe (GP, n = 8), do quadragésimo segundo dia ao sexto mês de vida. Valores expressos como média e erro padrão da média. Não foram identificadas diferenças estatísticas com teste de Newman-Keuls entre os grupos ($p < 0,05$).

6.5 Concentrações de adipocinas

6.5.1 Perfil de adipocinas no plasma

As concentrações plasmáticas de adipocinas estão descritas na Tabela 8. Foram identificados teores mais elevados de resistina, entre os animais GRM, e de leptina, nos camundongos GCh, em relação a todos os demais grupos. Para a insulina, o GP

apresentou o menor conteúdo circulante, dentre todos os animais tratados. Não foram verificadas diferenças nos valores de adiponectina.

Tabela 8. Concentrações plasmáticas de adipocinas

Adipocinas (pg/mL)	Grupos			
	GS	GCh	GRM	GP
Resistina	176.705 ± 44.050 [a]	267.584 ± 62.066 [a]	505.706 ± 23.053 [b]	158.904 ± 24.553 [a]
Leptina	1.004,0 ± 186,9 [a]	8.523,0 ± 1109 [b]	786,2 ± 100,5 [a]	567,0 ± 61,7 [a]
Insulina	3.594 ± 110,8 [a]	3.669 ± 404,4 [a]	4.511 ± 124,4 [a]	2.287 ± 276,4 [b]
Adiponectina	10,7 ± 0,2	10,87 ± 0,1	10,82 ± 0,2	11,12 ± 0,1

GS = grupo soja; GCh = grupo chia; GRM = grupo rosa mosqueta; GP = grupo peixe. n = 5 a 6 em cada grupo. Valores expressos como média ± erro padrão da média. Letras diferentes representam valores significantemente diferentes após teste de Newman-Keuls ($p<0,05$).

6.5.2 Perfil de adipocinas no tecido hepático

Os teores hepáticos de resistina se mostraram mais elevados nos animais que receberam óleo de peixe, enquanto aqueles que consumiram ração contendo óleo de soja apresentaram o maior conteúdo de leptina. As concentrações de insulina neste tecido diferiram, igualmente, entre os animais GRM e GP, com valores mais elevados do que os camundongos GS e GCh (Tabela 9)

Tabela 9. Concentrações hepáticas de adipocinas

Adipocinas (pg/mL)	Grupos			
	GS	GCh	GRM	GP
Resistina	4.655 ± 825,9[a]	7.290 ± 1054 [a]	10.328 ± 2701 [a]	19.633 ± 982,3 [b]
Leptina	398,3 ± 27,7 [a]	93,5 ± 20,4 [b]	168,4 ± 50,7 [b]	184 ± 42,9 [b]
Insulina	1.166 ± 77,6 [a]	1.077 ± 29,9 [a]	1.490 ± 99,7 [b]	1.487 ± 49,8 [b]

GS = grupo soja; GCh = grupo chia; GRM = grupo rosa mosqueta; GP = grupo peixe. n = 5 em cada grupo.Valores expressos como média ± erro padrão da média. Letras diferentes representam valores significantemente diferentes após teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

6.5.3 Perfil de adipocinas no tecido encefálico

Conforme demonstrado na Tabela 10, quando comparados todos os grupos, também foi verificado, no tecido encefálico, conteúdo mais elevado de resistina no GP. Os animais

que consumiram óleo de rosa mosqueta, comparados aos demais, evidenciaram teores aumentados de leptina. Nenhuma diferença significativa foi verificada para a insulina.

Tabela 10. Concentrações encefálicas de adipocinas

Adipocinas (pg/mL)	Grupos			
	GS	GCh	GRM	GP
Resistina	631,3 ± 108,1 [a]	525,3 ± 29,3 [a]	641,8 ± 65,2 [a]	1251,0 ± 170,2 [b]
Leptina	14,1 ± 3,2 [a]	16,3 ± 3,3 [a]	53,1 ± 1,2 [b]	22,6 ± 3,8 [a]
Insulina	417,5 ± 47,1	391,5 ± 21,0	424,0 ± 0,0	449,0 ± 25,0

GS = grupo soja; GCh = grupo chia; GRM = grupo rosa mosqueta; GP = grupo peixe. n = 4 a 5 em cada grupo. Valores expressos como média ± erro padrão da média. Letras diferentes representam valores significantemente diferentes após teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

6.6 Concentrações de citocinas inflamatórias

6.6.1 Perfil de citocinas inflamatórias no plasma

Consideradas as concentrações plasmáticas das citocinas inflamatórias analisadas no plasma (Tabela 11), verifica-se que os animais GP, entre todos os demais, apresentaram as menores concentrações de TNF-α. O conteúdo circulante de IL-6 deste grupo também foi o mais reduzido, embora semelhante ao dos camundongos GRM. As concentrações de IL-10 diferiram, igualmente, entre os animais GS e GCh, com valores mais elevados do que os camundongos GRM e GP.

Tabela 11. Concentrações plasmáticas de citocinas

Citocinas (pg/mL)	Grupos			
	GS	GCh	GRM	GP
TNF-α	1.122,00 ± 154,6[a]	765,3 ± 121,7[a]	766,5 ± 50,7[a]	320 ± 116,9[b]
IL-6	38,2 ± 3,6[a]	34,9 ± 6,8[a]	28,5 ± 1,8[ab]	16,1 ± 1,7[b]
IL-10	197,7 ± 18,8[a]	259,0 ± 56,0[a]	118,1 ± 12,1[b]	83,8 ± 13,12[b]

GS = grupo soja; GCh = grupo chia; GRM = grupo rosa mosqueta; GP = grupo peixe. n = 4 a 5 em cada grupo. TNF-α = fator de necrose tumoral alfa; IL-6 = interleucina 6; IL-10 = interleucina 10. Valores expressos como média ± erro padrão da média. Letras diferentes representam valores significantemente diferentes após teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

6.6.2 Perfil de citocinas inflamatórias no tecido hepático

O conteúdo hepático de TNF-α e IL-6 foi semelhante entre os grupos GCh e GP e, para a IL-10, a semelhança também verificada entre os valores destes dois grupos, se estendeu aos grupos GS e GRM. Os valores mais elevados de TNF-α e IL-6 foram observados nos grupos GS, GRM e GP. As diferenças nos teores de IL-10 entre animais GRM (mais elevados) e GP (mais reduzidos) alcançou significância estatística. Nos grupos GS e GCh, o conteúdo destas citocinas foi similar entre si e entre GRM e GP (Tabela 12).

Tabela 12. Concentrações hepáticas de citocinas

Citocinas (pg/mL)	Grupos			
	GS	GCh	GRM	GP
TNF-α	1.750 ± 107,2[a]	1.341 ± 8,5[b]	1.790 ± 44,1[a]	1.529 ± 108,3[ab]
IL-6	88,8 ± 5,8[a]	67,9 ± 2,4[b]	92,4 ±3,1[a]	81,9 ± 6,6[ab]
IL-10	24,7 ± 2,4[ab]	24,1 ± 1,9[ab]	30,1 ± 1,4[a]	21,2 ± 1,7[b]

GS = grupo soja; GCh = grupo chia; GRM = grupo rosa mosqueta; GP = grupo peixe. n = 4 a 5 em cada grupo. TNF-α = fator de necrose tumoral alfa; IL-6 = interleucina 6; IL-10 = interleucina 10. Valores expressos como média ± erro padrão da média. Letras diferentes representam valores significantemente diferentes após teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

6.6.3 Perfil de citocinas inflamatórias no tecido encefálico

Os animais tratados com o óleo de rosa mosqueta apresentaram as menores concentrações de TNF-α no tecido encefálico, juntamente com aqueles tratados com óleo de peixe, não sendo observada diferença significativa em relação aos teores do grupo que consumiu óleo de soja. Os teores de IL-6 foram menores entre os animais que receberam dieta fonte de ALA (GCh e GRM), comparados ao grupo que recebeu óleo de soja, entretanto, o conteúdo desta citocina, também mais reduzido no grupo GP, foi similar ao dos animais GS. Nenhuma diferença significativa foi verificada para a IL-10 (Tabela 13).

Tabela 13. Concentrações encefálicas de citocinas

Citocinas pg/mL)	Grupos			
	GS	GCh	GRM	GP
TNF-α	16,4 ± 2,7[ab]	21,2 ± 2,9[b]	14,0 ± 1,1[a]	13,8 ± 0,9[a]
IL-6	5,3 ± 0,1[a]	4,1 ± 0,3[b]	3,9 ± 0,3[b]	4,8 ± 0,4[ab]
IL-10	4,9 ± 0,0	4,3 ± 0,3	4,2 ± 0,3	4,1 ± 0,3

GS = grupo soja; GCh = grupo chia; GRM = grupo rosa mosqueta; GP = grupo peixe. n = 4 a 5 em cada grupo. TNF-α = fator de necrose tumoral alfa; IL-6 = interleucina 6; IL-10 = interleucina 10. Valores expressos como média ± erro padrão da média. Letras diferentes representam valores significantemente diferentes após teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

6.7 Avaliação da via inflamatória modulada por TLR-4 e NF-kB nos tecidos hepático e encefálico

A avaliação dos efeitos do consumo de diferentes fontes lipídicas na atividade inflamatória modulada pela via TLR-4-NF-κB, permitiu identificar que, no tecido hepático, entre todos os grupos, o conteúdo de TLR-4 foi significativamente maior naquele cujos animais receberam ração contendo óleo de rosa mosqueta. Os animais que consumiram óleo de chia e peixe mostraram valores similares mais reduzidos, enquanto o grupo GS exibiu o menor teor da proteína, embora similar ao de GP (Figura 9).

O conteúdo de Myd88, quando comparado entre todos os grupos, também foi mais elevado entre os animais GRM, seguido do grupo GCh. Os camundongos GS e GP apresentaram, igualmente, os menores teores da proteína nesse tecido (Figura 10).

As diferenças no conteúdo de NF-κB p50 total no tecido dos animais tratados com os distintos óleos não alcançaram significância estatística (Figura 11). No entanto, os teores da forma fosforilada da subunidade p50 deste fator de transcrição foram igualmente mais elevados nos grupos GCh e GRM, quando comparados ao GP, e semelhantes ao grupo GS (Figura 12), enquanto as concentrações da forma fosforilada da subunidade p65, também se mostraram significativamente mais elevadas em GCh e GRM, entretanto, neste caso, quando comparados ao GS, e semelhantes ao grupo GP (Figura 13).

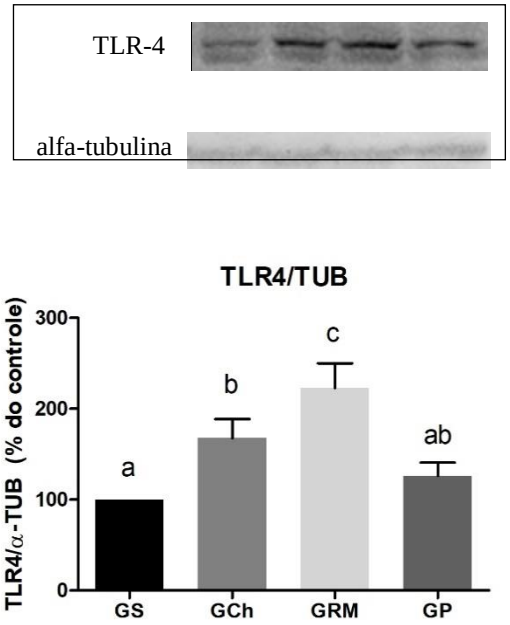


Figura 9. Conteúdo hepático de TLR-4 (% de GS) de camundongos C57BL/6 alimentados com ração normolipídica contendo óleo de soja (GS, n = 6), óleo de chia (GCh, n = 4), óleo de rosa mosqueta (GRM, n = 4) ou óleo de peixe (GP, n = 4), do quadragésimo segundo dia ao sexto mês de vida. Valores expressos como média e erro padrão da média. Letras diferentes significam diferença estatística após teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

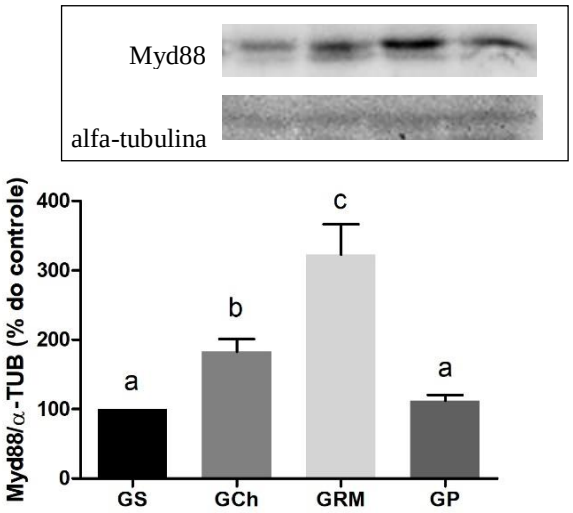


Figura 10. Conteúdo hepático de Myd88 (% de GS) de camundongos C57BL/6 alimentados com ração normolipídica contendo óleo de soja (GS, n = 6), óleo de chia (GCh, n = 4), óleo de rosa mosqueta (GRM, n = 4) ou óleo de peixe (GP, n = 4), do quadragésimo segundo dia ao sexto mês de vida. Valores expressos como média e erro padrão da média. Letras diferentes significam diferença estatística após teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

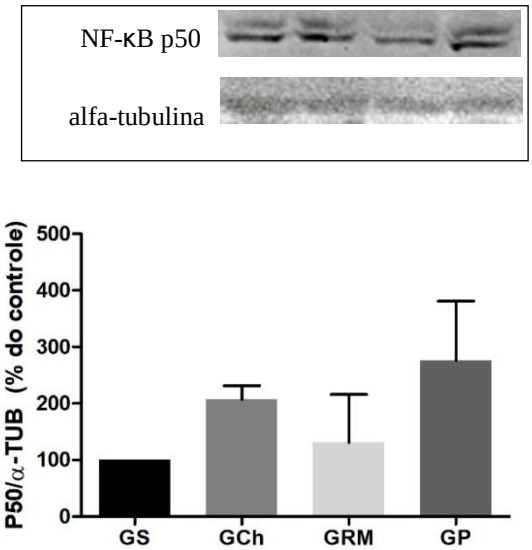


Figura 11. Conteúdo hepático de NF-κB p50 (% de GS) de camundongos C57BL/6 alimentados com ração normolipídica contendo óleo de soja (GS, n = 6), óleo de chia (GCh, n = 4), óleo de rosa mosqueta (GRM, n = 4) ou óleo de peixe (GP, n = 4), do quadragésimo segundo dia ao sexto mês de vida. Valores expressos como média e erro padrão da média. Não foram observadas diferença estatística após teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

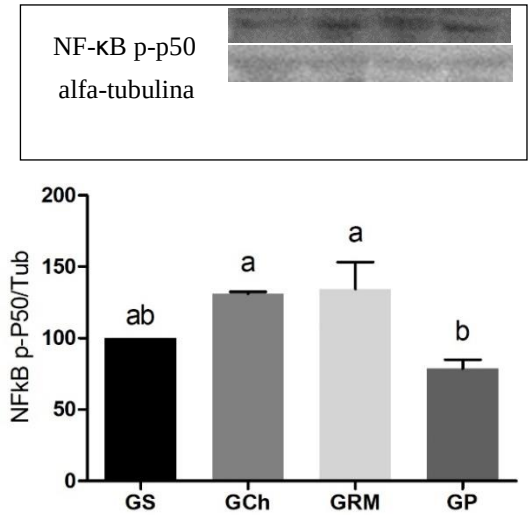


Figura 12. Conteúdo hepático de NF-κB p50 fosforilada (% de GS) de camundongos C57BL/6 alimentados com ração normolipídica contendo óleo de soja (GS, n = 5), óleo de chia (GCh, n = 4), óleo de rosa mosqueta (GRM, n = 4) ou óleo de peixe (GP, n = 4), do quadragésimo segundo dia ao sexto mês de vida. Valores expressos como média e erro padrão da média. Letras diferentes significam diferença estatística após teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

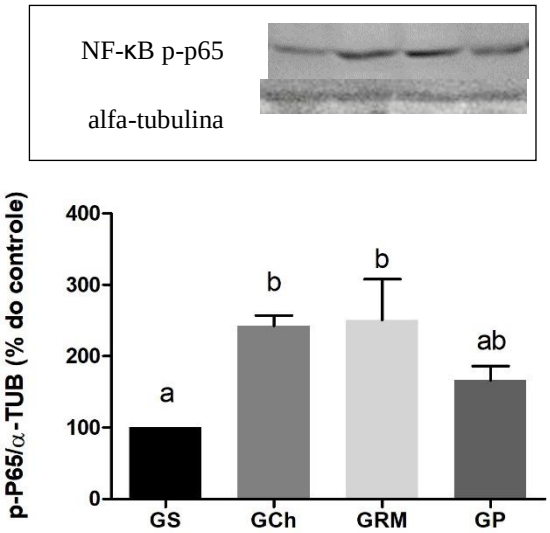


Figura 13. Conteúdo hepático de NF-κB p65 fosforilada (% de GS) de camundongos C57BL/6 alimentados com ração normolipídica contendo óleo de soja (GS), óleo de chia (GCh), óleo de rosa mosqueta (GRM) ou óleo de peixe (GP), do quadragésimo segundo dia ao sexto mês de vida. Valores expressos como média e erro padrão da média. Letras diferentes significam diferença estatística após teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Considerado o tecido encefálico, somente foi possível quantificar as proteínas TLR-4 e NF-κB p65 total dos animais tratados com os diferentes óleos. O grupo que consumiu óleo de soja apresentou os valores mais elevados de TLR-4, enquanto os menores valores corresponderam ao grupo alimentado com óleo de peixe. Os animais que receberam os óleos de chia ou de rosa mosqueta apresentaram conteúdo similar desta proteína, tanto entre si, quanto entre os grupos GS e GP (Figura 14). As diferenças no conteúdo de NF-κB p65 total, entre todos os grupos, não alcançaram significância estatística (Figura 15).

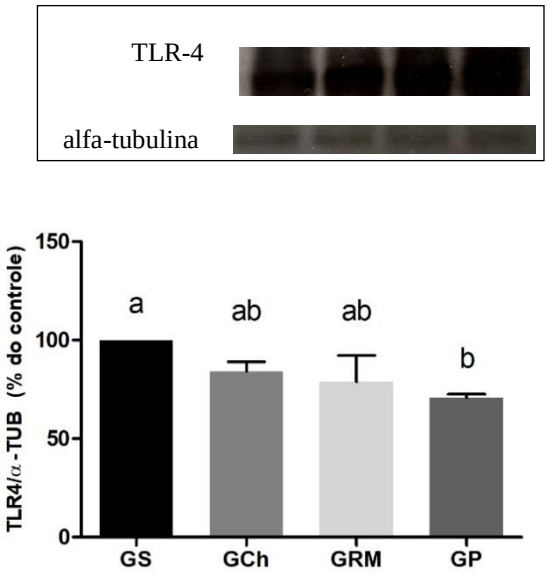


Figura 14. Conteúdo encefálico de TLR-4 (% de GS) de camundongos C57BL/6 alimentados com ração normolipídica contendo óleo de soja (GS), óleo de chia (GCh), óleo de rosa mosqueta (GRM) ou óleo de peixe (GP), do quadragésimo segundo dia ao sexto mês de vida. Valores expressos como média e erro padrão da média. Letras diferentes significam diferença estatística após teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

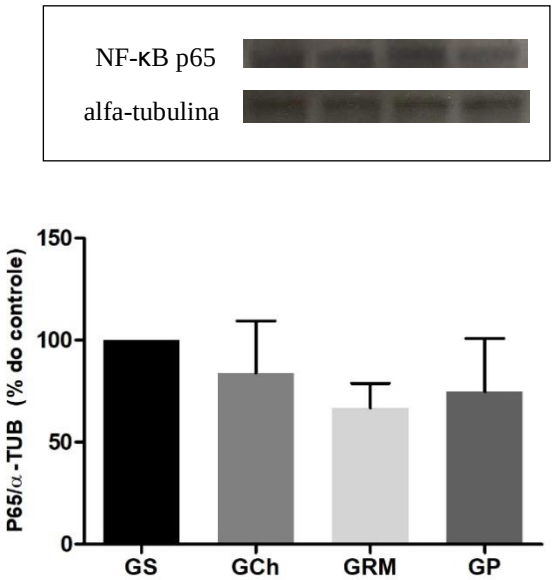


Figura 15. Conteúdo encefálico de NF-κB p65 (% de GS) de camundongos C57BL/6 alimentados n = 4), óleo de chia (GCh, n = 4), óleo de rosa mosqueta (GRM, n = 4) ou óleo de peixe (GP, n = 4), do quadragésimo segundo dia ao sexto mês de vida. Valores expressos como média e erro padrão da média. Não foram observadas diferenças estatísticas após teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

7 DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos se fontes não convencionais do ácido graxo alfa-linolênico (óleos de chia e de rosa mosqueta), veiculadas em dietas normocalóricas e isoenergéticas, resultam em diferente incorporação de AG nos tecidos hepático e encefálico e afetam o metabolismo lipídico e inflamatório de camundongos C57BL/6 adultos saudáveis.

Não foram encontradas diferenças significativas relativas à evolução de massa corporal tampouco ao consumo alimentar entre os grupos. Por outro lado, foi verificado conteúdo plasmático de leptina mais elevado entre os animais que consumiram dieta contendo óleo de chia (GCh), enquanto no tecido encefálico, o grupo tratado com óleo de rosa mosqueta (GRM) apresentou o teor mais elevado do hormônio.

Schipper et al. (2013) descreveram que camundongos tratados com dietas normolipídicas, com conteúdo reduzido de AG n-6 ou aumentado de AG n-3, durante períodos críticos de desenvolvimento, não apresentaram diferenças na massa corporal e no conteúdo plasmático de leptina, quando comparados ao grupo controle. No entanto, estes autores observaram que as alterações no conteúdo de AG n-3 na dieta modularam negativamente a densidade de neurônios orexígenos e anorexígenos no núcleo paraventricular do hipotálamo. O tratamento de animais adultos, com essas mesmas dietas, também não promoveu efeitos sobre a massa corporal, entretanto, interferiu na composição corporal (OOSTING et al., 2010).

A leptina constitui hormônio produzido e secretado pelo tecido adiposo, capaz de estimular, no hipotálamo, mecanismos promotores de saciedade bem como de aumento do gasto energético, além de estar envolvida com a distribuição da gordura corporal (BILLES; SIMONDS; COWLEY, 2012; ATHYROS et al., 2010; MISTRY; SWICK; ROMSOS, 1997). Conforme sugerido por Schipper et al. (2013) a qualidade dos AG dietéticos pode afetar os circuitos neuronais de controle do balanço energético, produzindo alterações que não se refletem sobre a massa corporal. Sabe-se, ainda, que em animais com defeitos no receptor de leptina, o aumento da concentração deste hormônio é incapaz de regular o consumo alimentar (LUHESHI et al., 1999). A possibilidade de existência de resistência à ação da leptina, relacionada às alterações na redistribuição da gordura corporal já foi descrita por Carter et al. (2013). Em nosso estudo, os teores aumentados de leptina no plasma do grupo GCh e no cérebro do GRM não foram capazes de refletir diferenças no consumo alimentar ou na massa corporal destes animais. Uma vez que a composição corporal não foi avaliada, somente é possível especular existir

diferenças desta natureza entre os animais tratados com as dietas ricas em AG n-3, que não repercutiram em variações na sua massa corporal.

O conteúdo plasmático de AL, ALA bem como o relativo aos totais de AGPI n-3 e n-6 refletiu o perfil destes AG nas rações experimentais oferecidas aos animais. A ingestão mais elevada de AL, entre os animais tratados com óleo de soja, parece inibir a conversão de ALA em DHA, conforme observado na maior razão DHA/ALA no plasma do GS, comparada a de animais que consumiram dietas com conteúdo mais reduzido deste AGPI n-6 e sem quantidades detectáveis de DHA (GCh e GRM). Este achado corrobora com a literatura, que sustenta a existência de competição entre AL e ALA pela utilização da enzima Δ-6-dessaturase, importante para a conversão destes AG em seus derivados de cadeia mais longa e insaturada (EMERY et al., 2013). Wien et al. (2010) sugerem que a redução da razão AL:ALA favoreça aumento de EPA em eritrócitos. Em nosso estudo, a redução desta razão no plasma dos animais GCh e GRM também parece favorecer concentrações circulantes mais elevadas de EPA nestes mesmos animais.

A incorporação hepática de ALA também refletiu o consumo dietético deste AG em todos os grupos, e favoreceu a formação endógena de EPA e DHA na mesma proporção, considerando que os animais GS, GCh e GRM não consumiram estes AGPICL n-3. Camundongos GCh e GP incorporaram concentrações semelhantes de EPA no tecido hepático, sugerindo que o conteúdo mais elevado de ALA na ração contendo óleo de chia, juntamente com sua maior retenção hepática, favoreceu a formação daquele AGPICL n-3. A reduzida incorporação de AL no fígado do GCh, quando comparado aos GRM e GS, também pode ter favorecido maior síntese de EPA neste grupo, devido à competição destes AG pela enzima Δ6-dessaturase, conforme relatada na literatura e anteriormente referido (BAKER et al., 2016).

Conforme esperado, as concentrações hepáticas de DHA foram expressivamente mais elevadas no GP, cuja dieta forneceu este AGPICL n-3 pré-formado. Apesar de as diferenças no conteúdo deste AG para os demais grupos não ter alcançado significância estatística, os valores relativos aos animais GCh e GRM foram cerca de 85% maiores do que àqueles correspondentes ao grupo GS. É possível supor que a maior ingestão de ALA dos camundongos alimentados com as fontes não convencionais deste AGPI n-3 tenha favorecido produção e incorporação mais elevada de DHA no fígado daqueles animais. Sabe-se que a expressão das enzimas dessaturases e elongases, envolvidas na síntese de AGPICL a partir de seus precursores, é maior no tecido hepático. Por esta razão, a maior

taxa de síntese de DHA ocorre neste tecido. O DHA pode, então, sofrer esterificação e empacotamento em lipoproteínas, para finalmente ser secretado na corrente sanguínea (DOMENICHIELLO; KITSON; BAZINET, 2015).

Valenzuela et al. (2012) relatam resultados semelhantes aos nossos. Estes autores encontraram maior incorporação hepática de DHA em ratos alimentados com óleos de chia e rosa mosqueta, em comparação ao grupo que recebeu óleo de canola, fonte de AGPI n-6. Adicionalmente, os investigadores também identificaram maior acréscimo de ALA e EPA no fígado dos animais que consumiram os óleos de chia e rosa mosqueta, concluindo que representam boas alternativas dietéticas para suprimento de ALA, considerando a capacidade hepática da sua bioconversão em EPA e DHA.

O tecido encefálico também expressa as enzimas dessaturases e elongases, apresentando capacidade de converter AL em AA bem como ALA em EPA e DHA. Contudo, a síntese de DHA é cerca de cem vezes menor que sua captação e consumo neste tecido, o que indica que a homeostase deste AGPICL n-3 no cérebro não depende apenas de sua síntese local (DOMENICHIELLO; KITSON; BAZINET, 2015). O DHA, normalmente encontrado em expressivas concentrações no cérebro, é de vital importância para o sistema nervoso central, participando na neurogênese, neurotransmissão e proteção contra o estresse oxidativo local. Sua deficiência está associada a prejuízos cognitivos e comportamentais (INNIS, 2007). Frente à importância para o tecido cerebral, sugere-se a existência de mecanismo capaz de priorizar a captação e incorporação de quantidades de DHA adequadas ao adequado funcionamento do tecido (DYALL, 2015).

No presente estudo, as concentrações encefálicas de DHA foram similares entre todos os grupos, apesar de as variações no conteúdo de AGPI n-6 e n-3 nas rações experimentais consumidas. Estes resultados estão de acordo com aqueles descritos por Barceló-Coblijn et al. (2005), que também não encontraram diferenças no conteúdo de DHA no cérebro de animias tratados com dietas enriquecidas com óleos fontes de ALA, AL e EPA/DHA (linhaça, cártamo e peixe, respectivamente). Em nosso estudo, as diferenças nos conteúdos encefálicos de AL e ALA também não foram significativas entre os quatro grupos investigados, apesar da ampla variação no conteúdo destes AG nas dietas ofertadas. Estes achados sugerem que este tecido apresenta incorporação peculiar de AG, que não reflete, necessariamente, o consumo dietético.

A hipertrigliceridemia é considerada fator de risco independente para aterosclerose (GAO et al., 2010). Fortino et al. (2017) relataram que a adição de sementes de chia à

ração de camundongos expostos à dieta rica em sacarose desde o desenvolvimento intrauterino foi capaz de prevenir o excesso de TAG circulante. Kim, Choi e Choi (2004) observaram redução nos TAG plasmáticos de ratos alimentados com óleo de perilla (rico em ALA), bem como naqueles alimentados com óleo de peixe, quando comparados aos animais que receberam óleo de milho e sebo de carne bovina (ricos em AGPI n-6 e AGS, respectivamente). Em ratos dislipidêmicos, a incorporação de sementes de chia à dieta também demonstrou ser favorável à normalização de hipertrigliceridemia (CHICCO et al., 2009). Em nosso estudo, não foram verificadas diferenças nas concentrações plasmáticas de TAG, sugerindo que, em animais sem alterações metabólicas prévias, o incremento no consumo de ALA parece não favorecer este parâmetro bioquímico.

Concentrações séricas elevadas de colesterol total, associadas ao reduzido HDL-colesterol, são considerados fatores de risco para DCV (LEWINGTON et al., 2007; WOODWARD et al., 2007). Nossos resultados apontam tendência do GS para valores mais elevados de colesterol total em relação aos grupos que apresentaram maiores concentrações plasmáticas de AGPI n-3 (GCh e GP), porém sem diferença significativa para GRM. Este resultado sugere que o consumo mais elevado de AGPI n-6 pelos animais tratados com óleo de soja contribuiu para tendência ao aumento dos teores de colesterol, o que poderia predispor outras alterações em parâmetros relacionados a distúrbios metabólicos. A hipercolesterolemia pode induzir acúmulo de colesterol em macrófagos e outras células do sistema imune, promovendo resposta inflamatória, dentre outros fatores, devido ao estímulo dos receptores tipo *toll* (TALL; YVAN-CHARVET, 2015). Em nosso estudo, apesar de o maior conteúdo plasmático de colesterol total, os animais GS não apresentaram teores de citocinas plasmáticas, produzidas a partir da ativação de TLR, diferentes daqueles identificados para os demais grupos, tampouco evidenciaram maior quantidade de proteínas da via inflamatória modulada por TLR-4. Ainda que outros e diferentes mecanismos possam estar implicados na indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, inclusive por meio da via TLR-4 (HWANG; KIM; LEE, 2016), cabe relativizar o significado metabólico relacionado aos teores mais elevados para o colesterol plasmático, identificados no grupo GS, na medida em que permanecem dentro da faixa de valores de referência para camundongos C57BL/6, não caracterizando quadro de hipercolesterolemia (SANTOS et al., 2016).

Isoladamente, HDL-colesterol é considerado fator protetor contra aterosclerose (BEITZ; BEITZ, 2017; BANDEALI; FARMER, 2012). No presente estudo, o consumo

do óleo de chia favoreceu aumento desta lipoproteína. Este resultado está de acordo com a literatura, uma vez que outros autores já sugeriram que ALA dietético é capaz de melhorar as concentrações de HDL-colesterol (SIOEN et al., 2009; BARCELÓ-COBLIJN et al., 2008; BLOEDON et al., 2008). De outro modo, o menor conteúdo plasmático da lipoproteína foi identificado nos animais que consumiram ração contendo óleo de peixe. É possível que o maior conteúdo de AGS, verificado na ração destes animias, justifique o efeito observado, uma vez que já foi demonstrado que a substituição de AGS por AGPI n-6 ou AGMI favorece melhora neste parâmetro lipoproteico plasmático (HODSON; SKEAFF; CHISHOLM, 2001).

O fígado é considerado importante órgão na regulação da glicemia, mantendo sua homeostase por meio da coordenação das reações de gliconeogênese e glicólise. O quadro de RI induz depósitos de lipídios no fígado, culminando em esteatose hepática não alcoólica, que pode ser observada em animais submetidos à dieta hiperlipídica (SAMUEL; SHULMAN, 2012).

A hiperglicemia é considerada fator de risco para DCV, mesmo entre indivíduos saudáveis e na ausência de DM2 (LEVITAN et al., 2004). Sabe-se que citocinas inflamatórias, como TNF-α, podem contribuir para fosforilação do IRS em serina, levando a RI e DM2 (SCHENK; SABERI; OLEFSKY, 2008). De outro modo, AGPI n-3 são capazes de atenuar a inflamação, pois têm capacidade de inibir a ativação da via modulada por NF-κB, e, assim, previnem o desenvolvimento de RI e DM2 (SIRIWARDHANA et al., 2012; FEDOR; KELLEY, 2009).

No estudo de Shomonov-Wagner, Raz e Leikin-Frenkel (2015) a adição de ALA à dieta de camundongos C57BL/6 foi capaz de reduzir a glicose plasmática em comparação aos animais que receberam dieta com AGS, EPA e DHA. Já a glicemia, medida após jejum de 4h, demonstrou que as dietas ricas em AGPICL n-3 podem conferir benefícios frente à dieta rica em AGPICL n-6. No presente estudo, a glicemia em jejum não apresentou diferença entre os grupos que receberam diferentes fontes de ALA (GCh e GRM) ou fonte de EPA e DHA (GP), porém, apresentou-se maior no GS, sugerindo que todos estes AGPI n-3 são capazes de melhorar este parâmetro, frente aos AGPI n-6. Também no GS foi encontrada concentração plasmática de TNF-α mais elevada que nos demais grupos. Apesar de a diferença da concentração desta citocina no GS não ter alcançado significância estatística, em relação aos GCh e GRM, é possível que este aumento já tenha influenciado a glicemia em jejum nestes animais.

O consumo de chia já foi associado a melhorias no metabolismo glicídico. Em ratos *Wistar* alimentados com dieta rica em sacarose, a adição desta semente à ração, como fonte lipídica, preveniu o surgimento de RI, bem como a hiperinsulinemia (CHICCO et al., 2009). A ingestão desta fonte de ALA também já foi associada a efeitos positivos sobre a homeostase glicêmica, normalizando a glicemia e a remoção de glicose sanguínea durante teste de tolerância à insulina (FORTINO et al., 2017), sendo estes efeitos atribuídos ao consumo de ALA (FORTINO et al., 2017; CHICCO et al., 2009). A utilização de outros óleos vegetais ricos em ALA também foi correlacionada à melhoria da sensibilidade à insulina, em ratos com dieta rica em sacarose, na investigação de Ghafoorunissa e Natarajan (2005).

Contudo, em nosso estudo, não foi possível identificar diferenças significativas entre os grupos, relativas à tolerância à glicose, avaliada pela AUC, após administração intraperitoneal de glicose. É possível supor que a oferta de ALA, quando associada ao consumo de dietas normocalóricas e normoglicídicas, promova efeitos similares sobre a sensibilidade à insulina àqueles obtidos com o consumo de fontes de AGPI n-6.

Os valores encontrados para insulina hepática no presente estudo não parecem variar de acordo com as diferentes razões n-6:n-3 ou mesmo com o conteúdo de AGPI n-3 neste mesmo tecido. Apesar de a literatura atribuir aos AGPI n-3 efeitos positivos sobre a sensibilidade à insulina (FEDOR; KELLEY, 2009), estes AG não demonstram capacidade de estimular a secreção de insulina (MOSTAD et al., 2009). Devido ao fato da tolerância à glicose não ter variado entre os grupos, sugerimos que estas variações hepáticas de insulina não sejam suficientes para alterar a resposta glicêmica destes animais.

Não foram identificadas diferenças significativas para as concentrações de insulina no cérebro entre os grupos, possivelmente em decorrência da ausência de variação nas concentrações de AGPI n-3, importantes no metabolismo deste hormônio (GLASS; OLEFSKY, 2012).

A adiponectina também está relacionada à melhor sensibilidade à insulina, e tem sido considerada fator preditivo de risco para DM2 (LI et al., 2009). A semente de chia já foi associada ao aumento de concentrações plasmáticas de adiponectina, contribuindo no tratamento de indivíduos com sobrepeso ou obesidade e DM2 (VUKSAN et al., 2017). Camundongos com deficiência desta adipocina apresentaram maior RI quando submetidos à dieta hipercalórica (NAWROCKI et al., 2006). Em nosso estudo, é possível

que a ausência de diferenças significativas no conteúdo plasmático de adiponectina entre os quatro grupos investigados tenha contribuído para os resultados que também não evidenciaram diferenças na tolerância à glicose, avaliada pela AUC, entre estes grupos.

No artigo de Zhu et al. (2017), a administração intraperitoneal de resistina a camundongos apontou efeito protetor desta adipocina, capaz de reduzir os danos causados por infarto induzido por oclusão da artéria cerebral e, ainda, melhorar déficits neurológicos após isquemia/reperfusão. Estes efeitos foram atribuídos ao fato de que o aumento de resistina, nestes casos, aumenta os teores de Akt fosforilada. A Akt é uma proteína envolvida em mecanismos de apoptose em neurônios e, quando fosforilada, é capaz de suprimir a função pró-apoptótica do NF-κB (BARKETT; GILMORE, 1999). Em nosso estudo, o cérebro dos camundongos do GP apresentou maiores teores de resistina e, também, reduzido conteúdo de TLR-4, indicando que o óleo de peixe poderia apresentar efeitos neuroprotetores nestes animais.

Porém, a ingestão de AGPI n-3 parece reduzir as concentrações plasmáticas de resistina em pacientes com doença arterial coronariana (MOSTOWIK et al., 2013), e *in vitro* reduzir a expressão do gene responsável por sua produção (HAUGEN et al., 2005). Concentrações plasmáticas elevadas de resistina são observadas em modelos de obesidade em camundongos (JAMALUDDIN et al., 2012). Nestes animais, a administração de resistina prejudica a captação de glicose induzida por insulina, ao passo que a utilização de anticorpos anti-resistina é capaz de aumentar a sensibilidade à insulina (JAMALUDDIN et al., 2012). Em nosso estudo, a resistina plasmática se apresentou mais elevada apenas no GRM, porém, sem refletir em alterações na sensibilidade à insulina, estimada pela AUC. Os teores plasmáticos de insulina também não foram mais elevados neste grupo. Tomados juntos, estes resultados sugerem que, em animais saudáveis, elevações plasmáticas de resistina não são capazes de influenciar o metabolismo glicídico.

As concentrações hepáticas de resistina apresentaram grande variação entre os grupos, porém, somente o GP apresentou conteúdo significativamente maior desta adipocina. A literatura sugere que a resistina seja capaz de ativar a via NF-κB, aumentando a expressão dos genes responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF-α (TILG; MOSCHEN, 2006). Todavia, os maiores teores de resistina encontrados no GP não refletiram em maior produção destas citocinas no tecido hepático deste grupo, nem em maior conteúdo das proteínas envolvidas nesta via

inflamatória. Estes resultados sugerem que, em animais saudáveis, recebendo dietas sem modificações na quantidade de macronutrientes e com boas fontes lipídicas, alterações na resistina não são capazes de influenciar a resposta inflamatória mediada por NF-κB.

Sabe-se que EPA é precursor de prostaglandinas e leucotrienos com baixo potencial inflamatório, além de inibir a formação destes eicosanoides a partir de AA e reduzir a ativação da via do TLR4/NF-kB (CALDER, 2012; SIRIWARDHANA et al, 2012). No presente estudo, identificamos, concomitantemente aos teores hepáticos de EPA mais elevados nos animais tratados com óleo de chia, redução no conteúdo de TNF-α neste tecido. As concentrações das citocinas hepáticas neste grupo foram similares às correspondentes aos animais tratados com óleo de peixe, para os quais é esperada reduzida produção destes sinalizadores de inflamação (CALDER, 2010). Apesar de a IL-10 ser descrita como citocina potencialmente anti-inflamatória, também pode estar aumentada em situações caracterizadas por inflamação, como mecanismo de controle deste processo (ENOS et al., 2014). Em nosso estudo, este padrão parece se reproduzir no plasma, onde concentrações mais elevadas das moléculas inflamatórias TNF-α e IL-6 nos GS, GCh e GRM são observadas, juntamente com concentrações também mais elevadas de IL-10, ao contrário do GP, cujas citocinas tenderam para valores mais reduzidos.

Razão n-6:n-3 mais reduzida, identificada no tecido hepático dos animais tratados com óleo de chia ou óleo de peixe, poderia justificar a tendência observada para as menores concentraçãoes de citocinas inflamatórias, também observada nos grupos GCh e GP. Conforme já sugerido, menores proporções de AG n-6 e n-3 estão associadas à redução na produção destes sinalizadores da inflamação (HINTZE; TAWZER; WARD, 2016; LIU et al., 2013). Zhang et al. (2010) encontraram expressão hepática das citocinas pró-inflamatória, proteína C reativa e IL-6, em camundongos consumindo dietas com razões n-6:n-3 mais elevadas, corroborando nossos resultados.

Nossos resultados relativos aos conteúdos hepáticos de TLR-4 e Myd88 sugerem maior ativação desta via no GRM. Este grupo apresentou maiores concentrações hepáticas de TNF-α e IL-6, citocinas que são produtos, e também agonistas, do TLR-4. Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas no conteúdo destas citocinas entre os animais GRM e GS, é possível que este aumento já tenha sido suficiente para maior ativação deste receptor.

Os AGPICL n-3 presentes no óleo de peixe (EPA e DHA) são associados à menor ativação de NF-κB (LI et al., 2017b; TAI et al., 2010). No presente estudo, os teores da forma fosforilada da subunidade p50 do fator de transcrição NF-κB foram igualmente mais elevados nos grupos GCh e GRM, quando comparados ao GP, e semelhantes ao grupo GS, enquanto as concentrações da forma fosforilada da subunidade p65, em GCh, GRM e GP foram similares.

8 CONCLUSÕES

- O consumo de dietas experimentais normocalóricas, isoenergéticas e normolipídicas, contendo óleos de soja, chia, rosa mosqueta e peixe, promoveu similar consumo alimentar e evolução da massa corporal dos camundongos.

- O plasma, fígado e cérebro dos animais pertencentes ao mesmo grupo incorporam diferentes concentrações de AG, demonstrando que cada tecido apresenta peculiaridades metabólicas, que favorecem maior ou menor incorporação de AG específicos.

- Valores plasmáticos de colesterol total foram reduzidos em razão da maior ingestão de AGPI n-3.

- Em animais adultos saudáveis, a manipulação das razões n-6:n-3 dietéticas não alterou as concentrações plasmáticas de glicose, TAG, adiponectina e, tampouco, a tolerância à glicose.

- O maior consumo de EPA e DHA parece favorecer menor secreção e circulação das citocinas inflamatórias TNF-α e IL-6, bem como menor concentração plasmática de insulina.

- A ingestão de maiores quantidades de AGPI n-6 não resultou em maior conteúdo das proteínas da via inflamatória modulada pelo TLR-4/NF-κB.

- O óleo de chia, nos parâmetros estudados, mostrou resultados mais positivos do que o óleo de rosa mosqueta, apesar de não chegar a se igualar aos efeitos positivos atribuídos ao óleo de peixe.

- Tomados juntos, nossos resultados permitem inferir que a utilização de fontes dietéticas de AGPI n-3 de origem vegetal, com diferentes razões n-6:n-3, representa opção para manutenção de parâmetros metabólicos saudáveis, como alternativa frente ao consumo de peixe e óleo de peixe, ao qual são atribuídos benefícios como regulação de mecanismos inflamatórios e prevenção de doenças crônicas não transmissíveis.

REFERÊNCIAS

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, v.4, n.7, p.499-511, 2004.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell,** v.24, n.124, p.783-801, 2006.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (AOCS). 2011. **Official method Ce 2b-11. Direct methylation of lipids in foods by alkali hydrolysis**. Disponível em: <https://www.aocs.org/attain-lab-services/methods/methods/method-detail?productId=112493>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

ANDRIKOPOULOS, S. et al. Evaluating the glucose tolerance test in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.295, n.6, p.30-39, 2008.

ANTRUEJO, A. et al. Omega-3 enriched egg production: the effect of α -linolenic ω -3 fatty acid sources on laying hen performance and yolk lipid content and fatty acid composition. **Br Poult Sci**, v.52, n.6, p.750-760, 2011.

ARBEX, A.K. et al. The impact of the essential fatty acids (EFA) in human health. **Open J Endocr Metab Dis**, v.5, n.7, p.98-104, 2015.

ARTERBURN, L.M.; HALL, E.B.; OKEN, H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. **Am J Clin Nutr**, v.83, suppl.6, p.1467S-1476S, 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS (AOAC). 2009. **Official method Ce 1j-07. Determination of *cis-*, *trans-*, saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids in extracted fats by capillary GLC**. Official methods and recommended practices of the AOCS. Disponível em: < http://aocs.files.cms-plus.com/TechnicalPDF/271_Trans%20Fats%20Replacement%20Solutions_Sample.pdf>. Acesso em: 10 de agosto de 2017.

ASTORG, P. et al. Dietary intakes and food sources of n-6 and n-3 PUFA in French adult men and women. **Lipids**, v.39, n.6, p.527-535, 2004.

ATHYROS, V.G. et al. Should adipokines be considered in the choice of the treatment of obesity-related health problems? **Curr Drug Targets**, v.11, n.1, p.122-135, 2010.

AYERZA, R.; COATES, W. Chia seed (*Salvia hispanica L.*) as an ω-3 fatty acid source for broilers: influence on fatty acid composition, cholesterol and fat content of white and dark meats, growth performance, and sensory characteristics. **Poult Sci**, v.81, n.6, p.826-837, 2002.

AYERZA, R.; COATES, W. Omega-3 enriched eggs: the influence of dietary α-linolenic fatty acid source on egg production and composition. **Can J Anim Sci**, v.81, n.3, p.355-362, 2001.

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

BANDEALI, S.; FARMER, J. High-density lipoprotein and atherosclerosis: the role of antioxidant activity. **Curr Atheroscler Rep**, v.14, n.2, p.101-107, 2012.

BARCELÓ-COBLIJN, G. et al. Dietary alpha-linolenic acid increases brain but not heart and liver docosahexaenoic acid levels. **Lipids**, v.40, n.8, p.787-798, 2005.

BARCELÓ-COBLIJN, G. et al. Flaxseed oil and fish-oil capsule consumption alters human red blood cell n-3 fatty acid composition: a multiple-dosing trial comparing 2 sources of n-3 fatty acid. **Am J Clin Nutr**, v.88, n.3, p.801-809, 2008.
BARKETT M, GILMORE TD. Control of apoptosis by Rel / NF- k B transcription factors. Oncogene**, v.18, n.49, p.6910–24, 1999.**
BEITZ, A.; BEITZ, J. Antiatherosclerotic potency of high density lipoprotein of different origins: a review and some new findings. **Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids**, v.58, n.3, p.221-230, 2017.

BENATTI, P. et al. Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. **J Am Coll Nutr**, v.23, n.4, p.281-302, 2004.

BILLES, S.K.; SIMONDS, S.E.; COWLEY, M.A. Leptin reduces food intake via a dopamine D2 receptor-dependent mechanism. **Mol Metab**, v.1, n.1-2, p.86-93, 2012.

BLANCO, M.L.; NETO, A.C. O fator nuclear kappa B: uma nova perspectiva para o estudo de drogas anti-inflamatórias. **Rev Cienc Med,** v12, p.341-349, 2003.

BLOEDON, L.T. et al. Flaxseed and cardiovascular risk factors: results from a double blind, randomized, controlled clinical trial. **J Am Coll Nutr**, v.27, n.1, p.65-74, 2008.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p.248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Atenção Básica**. Departamento de Atenção Básica. Brasília. Cadernos de Atenção Básica 14. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2011. 56 p.

BRENNA, J.T. et al. A-linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans**. Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids**, v.80, n.2-3, p.85-91, 2009.

CALDER, P.C. Long-chain fatty acids and inflammation. **Proc Nutr Soc**, v.71, n.2, p.284-289, 2012.

CALDER, P.C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. **Nutrients**, v.2, n.3, p.355-374, 2010.

CANDELA, C.G.; LÓPEZ, B.; KOHEN, V.L. Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health. Nutritional recommendations. **Nutr Hosp**, v.26, n.2, p.323-329, 2011.

CAVUSOGLU, E. et al. Adiponectin is an independent predictor of all-cause mortality, cardiac mortality, and myocardial infarction in patients presenting with chest pain. **Eur Heart J**, v.27, n.19, p.2300-2309, 2006.

CHEN, L. et al. Mechanisms linking inflammation to insulin resistance. **Int J Endocrinol**, v.2015, p.508409, 2015.

CHICCO, A. et al. Dietary chia seed (*Salvia hispanica L.*) rich in α-linolenic acid improves adiposity and normalises hypertriacylglycerolaemia and insulin resistance in dyslipaemic rats. **Br J Nutr**, v.101, n.1, p.41-50, 2009.

COLE, G.M.; MA, Q.L; FRAUTSCHY, S.A. Dietary fatty acids and the aging brain. **Nutr Rev**, v.68, suppl.2, p.S102-S111, 2010.

COLES, C.A. Adipokines in healthy skeletal muscle and metabolic disease. **Adv Exp Med Biol**, v.900, p.133-160, 2016.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). **Resolução Normativa nº 15, de 16 de dezembro de 2013**. Disponível em < http://www.mct.gov.br/upd_blob/0240/240230.pdf>. Acesso em: 10 de agosto de 2017.

CONDE, J. et al. Adipokines: biofactors from white adipose tissue. A complex hub among inflammation, metabolism, and immunity. **Biofactors**, v.37, n.6, p.413-420, 2011.

CONNOR, W.E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. **Am J Clin Nutr**, v.71, suppl.1, p.171S-175S, 2000.

CRAIG, R. **Application for approval of whole chia (*Salvia hispanica L.*) seed and ground whole seed as novel food ingredient**. 2004. Disponível em: <http://www. food.gov.uk/multimedia/pdfs/chiaapplication.pdf>. Acesso em: 29 de julho de 2016.

CREUS, A. et al. Dietary Salba (*Salvia hispanica L*) improves the altered metabolic fate of glucose and reduces increased collagen deposition in the heart of insulin-resistant rats. **Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids**, v.121, p.30-39, 2017.

DE HOLANDA MIRANDA, W. et al. Alpha-linolenic acid supplementation effect in endoplasmic reticulum stress and adiponectin in abdominal subcutaneous adipose tissue in patients with type 2 diabetes mellitus. **Diabetol Metab Syndr**, v.7, suppl.1, p.A211, 2015.

DENNIS, E.A.; NORRIS, P.C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v.15, n.8, p.511-523, 2015.

DISILVESTRO, D.J. et al. Leptin production by encapsulated adipocytes increases brown fat, decreases resistin, and improves glucose intolerance in obese mice. **PLoS One**, v.11, n.4, p.e0153198, 2016.

DOMENICHIELLO, A.F.; KITSON, A.P.; BAZINET, R.P. Is docosahexaenoic acid synthesis from α-linolenic acid sufficient to supply the adult brain? **Prog Lipid Res**, v.59, p.54-66, 2015.

DOURADO, F. et al. Characterization of Rosa Mosqueta seeds: cell wall polysaccharide composition and light microscopy observations. **J Sci Food Agric**, v.80, p.185-186, 2000.

DUAN, Y. et al. n-6:n-3 PUFA ratio is involved in regulating lipid metabolism and inflammation in pigs. **Br J Nutr**, v.111, n.3, p.445-451, 2014.

DUTTA, S.; SENGUPTA, P. Men and mice: Relating their ages. **Life Sci,** v. 152, n.1, p. 244-248, 2016.

DYALL SC. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: A review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. **Front Aging Neurosci,** v. 7, n. 52, p.1–15, 2015.

DYALL, S.C.; MICHAEL-TITUS, A.T. Neurological benefits of omega-3 fatty acids. **Neuro Molecular Med**, v.10, n.4, p.219-235, 2008.

EMERY, J.A. et al. Δ-6 desaturase substrate competition: dietary linoleic acid (18:2n-6) has only trivial effects on α-linolenic acid (18:3n-3) bioconversion in the teleost rainbow trout. **PLoS One**, v.8, n.2, p.e57463, 2013.

ENOS, R.T. et al. Reducing the dietary omega-6:omega-3 utilizing α-linolenic acid; not a sufficient therapy for attenuating high-fat-diet-induced obesity development nor related detrimental metabolic and adipose tissue inflammatory outcomes. **PLoS One**, v.9, n.4, p.e94897, 2014.

ERDINEST, N. et al. Anti-inflammatory effects of alpha-linolenic acid on human corneal epithelial cells. **Investig Ophthalmol Vis Sci**, v.53, n.8, p.4396-4406, 2012.

ESPADA, C.E. et al. Effect of Chia oil (*Salvia Hispanica*) rich in ω-3 fatty acids on the eicosanoid release, apoptosis and T-lymphocyte tumor infiltration in a murine mammary gland adenocarcinoma. **Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids**, v.77, n.1, p.21-28, 2007.

ESPOSITO, K.; PONTILLO, A.; GIUGLIANO, G. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women. **JAMA**, v.289, n.14, p.1799-1804, 2003.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Panel on dietetic products, nutrition, and allergies (NDA) scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, *trans* fatty acids, and cholesterol. **EFSA J**, v.8, n.3, p.1641, 2010.

FAGGIONI, R.; FEINGOLD, K.R.; GRUNFELD, C. Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. **FASEB J**, v.15, n.14, p.2565-2571, 2001.

FEDOR, D.; KELLEY, D.S. Prevention of insulin resistance by n-3 polyunsaturated fatty acids. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.12, n.12, p.138-146, 2009.

FERRAZ, E.G. et al. Receptores Toll-like: ativação e regulação da resposta imune. **Rev Gaucha Odontol**, v.59, p.483-490, 2011.

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.

FORTINO, M.A. et al. Could post-weaning dietary chia seed mitigate the development of dyslipidemia, liver steatosis and altered glucose homeostasis in offspring exposed to a sucrose-rich diet from utero to adulthood? **Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids**, v.116, p.19-26, 2017.

FRESNO, M.; ALVAREZ, R.; CUESTA, N. Toll-like receptors, inflammation, metabolism and obesity. **Arch Physiol Biochem**, v.117, n.3, p.151-164, 2011.

FRIEDMAN, J.M. Leptin, leptin receptors, and the control of body weight. **Nutr Rev**, v.56, pt.2, p.s38-46, discussion 54-75, 1998.

FÜRST, P. The striking diet of the island of Crete: lipid nutrition from the palaeolithic to the affluent modern society. **Clin Nutr**, v.21, p.9-14, 2002.

GAO, S. et al. Mechanisms underlying different responses of plasma triglyceride to high-fat diets in hamsters and mice: roles of hepatic MTP and triglyceride secretion. **Biochem Biophys Res Commun**, v.398, n.4, p.619-626, 2010.

GHAFOORUNISSA, I.A.; NATARAJAN, S. Substituting dietary linoleic acid with α-linolenic acid improves insulin sensitivity in sucrose fed rats. **Biochim Biophys Acta**, v.1733, n.1, p.67-75, 2005.

GILMORE, T.D. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. **Oncogene**, v.25, n.51, p.6680-6684, 2006.

GLASS, C.K.; OLEFSKY, J.M. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. **Cell Metab**, v.15, n.5, p.635-645, 2012.

GONZÁLEZ-PÉRIZ, A.; CLÀRIA, J. Resolution of adipose tissue inflammation. **Scientific World Journal,** v.10, p.832-856, 2010.

GONZÁLEZ-PÉRIZ, A. et al. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by ω-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. **FASEB J**, v.23, n.6, p.1946-1957, 2009.

GORMAZ, J.G. et al. Biosynthesis and bioavailability of long-chain polyunsaturated fatty acids in non-alcoholic fatty liver disease. **Prog Lipid Res**, v.49, n.4, p.407-419, 2010.

GRAY, B. et al. Omega-3 fatty acids: a review of the effects on adiponectin and leptin and potential implications for obesity management. **Eur J Clin Nutr**, v.67, n.12, p.1234-1242, 2013.

GREGOR, M.F.; HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annu Rev Immunol**, v.29, p.415-445, 2011.

GUERRE-MILLO, M. Adipose tissue and adipokines:for better orworse. **Diabetes Metab**, v.30, n.1, p.13-19, 2004.

HARIRI, M. et al. Does omega-3 fatty acids supplementation affect circulating leptin levels? A systematic review and meta-analysis on randomized controlled clinical trials. **Clin Endocrinol**, v.82, n.2, p.221-228, 2015.

HARIZI, H.; GUALDE, N. The impact of eicosanoids on the crosstalk between innate and adaptive immunity: The key roles of dendritic cells. **Tissue Antigens**, v.65, n.6, p.507-514, 2005.

HARRIS, W.S. The Omega-6/Omega-3 ratio and cardiovascular disease risk: uses and abuses. **Curr Atheroscler Rep**, v.8, n.6, p.453-459, 2006.

HAUGEN, F. et al. Resistin expression in 3T3-L1 adipocytes is reduced by arachidonic acid. **J Lipid Res**, v.46, n.1, p.143-153, 2005.

HINTZE, K.J.; TAWZER, J.; WARD, R.E. Concentration and ratio of essential fatty acids influences the inflammatory response in lipopolysaccharide challenged mice. **Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids**, v.111, p.37-44, 2016.

HAYDEN, M.; GHOSH, S. Signaling to NF-Kb. **Genes & Dev,** v.18, p.2195-2224, 2004.

HODSON, L.; SKEAFF, C.M.; CHISHOLM, W.A. The effect of replacing dietary saturated fat with polyunsaturated or monounsaturated fat on plasma lipids in free-living young adults. **Eur J Clin Nutr**, v.55, n.10, p.908-915, 2001.

HOESEL, B.; SCHMID, J.A. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. **Mol Cancer**, v.12, p.86, 2013.

HUANG, F. et al. EPA inhibits the inhibitor of κBα (IκBα)/NF-κB/muscle RING finger 1 pathway in C2C12 myotubes in a PPARγ-dependent manner. **Br J Nutr**, v.105, n.3, p.348-356, 2011.

HWANG, D.H.; KIM, J.A.; LEE, J.Y. Mechanisms for the activation of Toll-like receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosahexaenoic acid. **Eur J Pharmacol**, v.785, p.24-35, 2016.

IAN GIVENS, D.; GIBBS, R.A. Current intakes of EPA and DHA in European populations and the potential of animal-derived foods to increase them: Symposium on "How can the n-3 content of the diet be improved?" **Proc Nutr Soc**, v.67, n.3, p.273-280, 2008.

INNIS, S.M. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. **J Nutr**, v.137, n.4, p.855-859, 2007.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM), **Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (macronutrients)**. Washington (DC): National Academy Press. 2005.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). **Dietary reference intakes (DRIs) for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Part 1**. Washington (DC): National Academy Press. 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2010**. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv45419.pdf>. Acesso em: 25 de março de 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Nacional de Saúde: 2013. Ciclos de vida: Brasil e grandes regiões, Coordenação de**

Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro: IBGE, 2015. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94522.pdf>. Acesso: em 25 de março de 2016.

INTERNATIONAL SOCIETY FOR THE STUDY OF FATTY ACIDS AND LIPIDS (ISSFAL). **Report of the sub-committee on recommendations for intake of polyunsaturated fatty acids in healthy adults. Brighton: ISSFAL, 2004**. Disponível em: <http://www.issfal.org/news-links/resources/publications/PUFAIntakeReccomdFinalReport.pdf>. Acesso em: 30 junho de 2016.

JAMALUDDIN, M.S. et al. Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. **Br J Pharmacol**, v.165, n.3, p.622-632, 2012.

JEFFREY, B.G. et al. The role of docosahexaenoic acid in retinal function. **Lipids**, v.36, n.9, p.859-871, 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO)/WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Expert consultation on the risks and benefits of fish consumption. Report 978, FAO Fisheries and Aquaculture, 2011**. Disponível em < http://www.fao.org/docrep/015/ba0136e/ba0136e00.htm>. Acesso em: 22 de março de 2016.

KALUPAHANA, N.S.; CLAYCOMBE, K.J.; MOUSTAID-MOUSSA, N. (N-3) Fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: mechanistic insights. **Adv Nutr**, v.2, n.4, p.304-316, 2011.

KANG, J.X.; WEYLANDT, K.H. Modulation of inflammatory cytokines by omega-3 fatty acids. **Subcell Biochem**, v.49, p.133-143, 2008.

KANG, Y.E. et al. The roles of adipokines, proinflammatory cytokines, and adipose tissue macrophages in obesity-associated insulin resistance in modest obesity and early metabolic dysfunction. **PLoS One**, v.11, n.4, p.e0154003, 2016.

KIM, H.K.; CHOI, S.; CHOI, H. Suppression of hepatic fatty acid synthase by feeding a-linolenic acid rich perilla oil lowers plasma triacylglycerol level in rats. **J Nutr Biochem**, v.15, n.8, p.485-492, 2004.

KIM, S.H. et al. Distinct protein kinase A anchoring proteins direct prostaglandin E2 modulation of Toll-like receptor signaling in alveolar macrophages. **J Biol Chem**, v.286, n.11, p.8875-8883, 2011.

KIZER, J.R. et al. Total and high-molecular-weight adiponectin and risk of coronary heart disease and ischemic stroke in older adults. **J Clin Endocrinol Metab**, v.98, n.1, p.255-263, 2013.

KLOK, M.D.; JAKOBSDOTTIR, S.; DRENT, M.L. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: A review. **Obes Rev**, v.8, n.1, p.21-34, 2007.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v.1, n.6, p.a001651, 2009.

LEVITAN, E.B. et al. Is nondiabetic hyperglycemia a risk factor for cardiovascular disease?a meta-analysis of prospective studies. **Arch Intern Med**, v.164, n.19, p.2147-2155, 2004.

LEWINGTON, S. et al. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55 000 vascular deaths. **Lancet,** v.370, n.9602, p.1829-1839, 2007.

LI, J. et al. Dietary supplementation of α-linolenic acid induced conversion of n-3 LCPUFAs and reduced prostate cancer growth in a mouse model. **Lipids Health Dis**, v.16, n.1, p.136, 2017a

LI, S. et al. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes a systematic review and meta-analysis. **JAMA**, v.302, n.2, p.179-188, 2009.

LI, Y. et al. Fish oil diet may reduce inflammatory levels in the liver of middle-aged rats. **Sci Rep**, v.7, n.1, p.6241, 2017b

LIM, C.T.; KOLA, B.; KORBONITS, M. AMPK as a mediator of hormonal signalling. **J Mol Endocrinol**, v.44, n.2, p.87-97, 2010.

LINDBERG, S. et al. Low adiponectin levels and increased risk of type 2 diabetes in patients with myocardial infarction. **Diabetes Care**, v.37, n.11, p.3003-3008, 2014.
LIU, H.Q. et al. A high ratio of dietary n-3/n-6 polyunsaturated fatty acids improves obesity-linked inflammation and insulin resistance through suppressing activation of TLR4 in SD rats. **Nutr Res**, v.33, n.10, p.849-858, 2013.

LIU, Y.H. Omega-3 fatty acid intervention suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation and weight loss in mice. **Mar Drugs**, v.13, n.2, p.1026-1036, 2015.

LORENTE-CEBRIAN, S. et al. Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular dis- eases: a review of the evidence. **J Physiol Biochem**, v.69, n.3, p.633-651, 2013.

LUDWIG, T. et al. Metabolic and immunomodulatory effects of n-3 fatty acids are different in mesenteric and epididymal adipose tissue of diet-induced obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.304, n.11, p.E1140-56, 2013.

LUHESHI, G.N. et al. Leptin actions on food intake and body temperature are mediated by IL-1. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.96, n.12, p.7047-7052, 1999.

MARINELI, R.S. et al. Chia (*Salvia hispanica L.*) enhances HSP, PGC-1α expressions and improves glucose tolerance in diet-induced obese rats. **Nutrition**, v.31, n.5, p.740-748, 2015.

MARTIN, C.A. et al. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods. **Rev Nutr,** v.19, n.6, p.761-770, 2006.

MARTÍNEZ-FERNANDES, L. et al. Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome. Prostaglandins and Other Lipid Mediat**, v.121, pt.A, p.24-41, 2015.**

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. Immunol Rev, v.173, p.89-97, 2000.

MISTRY, A.M.; SWICK, A.G.; ROMSOS, D.R. Leptin rapidly lowers food intake and elevates metabolic rates in lean and ob/ob mice**. J Nutr**, v.127, n.10, p.2065-2072, 1997.

MOSTAD, I.L. et al. Addition of n-3 fatty acids to a 4-hour lipid infusion does not affect insulin sensitivity, insulin secretion, or markers of oxidative stress in subjects with type 2 diabetes mellitus. **Metabolism**, v.58, n.12, p.1753-1761, 2009.
MOSTOWIK, M. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids increase plasma adiponectin to leptin ratio in stable coronary artery disease. **Cardiovasc Drugs Ther**, v.27, n.4, p.289-295, 2013.

MUCCI, D.B. et al. Flaxseed mitigates brain mass loss, improving motor hyperactivity and spatial memory, in a rodent model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. **Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids,** v.97, p.13-19, 2015.

NAKAMURA, K.; FUSTER, J.J.; WALSH, K. Adipokines: a link between obesity and cardiovascular disease. **J Cardiol**, v.63, n.4, p.250-259, 2014.

NAKAMURA, M.T.; NARA, T.Y. Structure, function, and dietary regulation of δ6, δ5, and δ9 desaturases. **Nutrition**, v.24, p.345-376, 2004.

NAWROCKI, A.R. et al. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. **J Biol Chem**, v.281, n.5, p.2654-2660, 2006.

NOWAK, R. Fatty acids composition in fruits of wild rose species. **Acta Soc Bot Pol,** v.74, p.229-235, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Fats and fatty acids in human nutrition, Report of an expert consultation. FAO, Food and Nutrition Paper. 2008**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21812367>. Acesso em: 10 de julho de 2016.

OTERO, M. et al. Towards a pro-inflammatory and immunomodulatory emerging role of leptin. **Rheumatology**, v.45, n.8, p.944-950, 2006.

OWEI, I. et al. Insulin-sensitive and insulin-resistant obese and non-obese phenotypes: role in prediction of incident pre-diabetes in a longitudinal biracial cohort. **BMJ Open Diabetes Res Care**, v.5, n.1, p.e000415, 2017.

PARASKEVAS, K.I.; LIAPIS, C.D.; MIKHAILIDIS, D.P. Leptin: a promising therapeutic target with pleiotropic action besides body weight regulation. **Curr Drug Targets**, v.7, n.6, p.761-771, 2006.

PASCHOS, G.K.; GRIFFIN, B.A. Effects of flaxseed oil supplementation on plasma adiponectin levels in dyslipidemic men. **Eur J Nutr**, v.46, n.6, p.315-320, 2007.
PAWLOSKY, R.J. et al. Effects of beef- and fish-based diets on the kinetics of n-3 fatty acid metabolism in human subjects. **Am J Clin Nutr**, v.77, n.3, p.565-572, 2003.

PAZ-FILHO, G. et al. Leptin therapy, insulin sensitivity, and glucose homeostasis. **Indian J Endocrinol Metab**, v.16, suppl.3, p.S549-S555, 2012.

POUDYAL, H. et al. Lipid redistribution by α-linolenic acid-rich chia seed inhibits stearoyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. **J Nutr Biochem**, v.23, n.2, p.153-162, 2012.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76a rodent diet. **J Nutr**, v.123, p.1939-1951, 1993.

REN, J.; CHUNG, S.H. Anti-inflammatory effect of α-linolenic acid and its mode of action through the inhibition of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase gene expression via NF-κB and mitogen-activated protein kinase pathways. **J Agric Food Chem,** v.55, n.13, p.5073-5080, 2007.

REN, Y.; ZUO, Z.C.; WAN, T.M. Resistin: it's role in insulin resistance and mechanism of action. **Sheng Li Xue Bao**, v.68, n.1, p.65-74, 2016.

REYNA, S.M. et al. Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects**. Diabetes**. v.57, n.10, p.2595-2602, 2008.

RODRIGUEZ-LEYVA, D. et al. The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid , alpha-linolenic acid. **Can J Cardiol**, v.26, n.9, p.489-496, 2010.

RORSMAN, P.; BRAUN, M. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. **Annu Rev Physiol**, v.75, p.155-179, 2013.

RUSSELL, F.D.; BÜRGIN-MAUNDER, C.S. Distinguishing health benefits of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. **Mar Drugs**, v.10, n.11, p.2535-2559, 2012.

RUSSO, G.L. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. **Biochem Pharmacol**, v.77, n.6, p.937-946, 2009.

SAMPATH, H.; NTAMBI, J.M. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. **Annu Rev Nutr**, v.25, p.317-340, 2005.

SAMUEL, V.T.; SHULMAN, G.I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. **Cell**, v.148, n.5, p.852-871, 2012.

SANTOS, E.W. et al. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. **Brazilian J Vet Res Anim Sci**, v.53, n.2, p.138, 2016.

SANTOS, R.D. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arq Bras Cardiol,** v.100, n.1, suppl.3, p.1-40, 2013.

SATTAR, N. et al. Adiponectin and coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. **Circulation**, v.114, n.7, p.623-629, 2006.

SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J.M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. **J Clin Invest,** v.118, n.9, p.2992-3002, 2008.

SCORLETTI, E.; BYRNE, C.D. Omega-3 fatty acids, hepatic lipid metabolism, and nonalcoholic fatty liver disease. **Annu Rev Nutr**, v.33, p.231-248, 2013.

SEKINE, S. et al. α-Linolenic acid-rich flaxseed oil ingestion increases plasma adiponectin level in rats. **Int J Vitam Nutr Res**, v.78, n.45, p.223-229, 2008.

SHI, H. et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **J Clin Invest**, v.116, n.11, p.3015-3025, 2006.

SHOMONOV-WAGNER, L.; RAZ, A.; LEIKIN-FRENKEL, A. Alpha linolenic acid in maternal diet halts the lipid disarray due to saturated fatty acids in the liver of mice offspring at weaning. **Lipids Health Dis**, v.14, p.14, 2015.

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. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases**. Biomed Pharmacother**, v.60, n.9, p.502-507, 2006.

SINCLAIR, A.J.; ATTAR-BASHI, N.M.; LI, D. What is the role of alpha-linolenic acid for mammals? **Lipids**, v.37, n.12, p.1113-1123, 2002.

SIOEN, I. et al. Effect of ALA-enriched food supply on cardiovascular risk factors in males. **Lipids**, v.44, n.7, p.603-611, 2009.

SIRIWARDHANA, N. et al. n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids differentially regulate adipose angiotensinogen and other inflammatory adipokines in part via NF-κB-dependent mechanisms. **J Nutr Biochem**, v.23, n.12, p.1661-1667, 2012.

SMINK, W. et al. Linoleic and a -linolenic acid as precursor and inhibitor for the synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in liver and brain of growing pigs. **Animal**, v.6, n.2, p.262-270, 2012.

SOUZA, R.M.; MAZUCHELI, J.; MARTINEZ, A.L.M. **Métodos de aproximação da área sob a curva de concentração em bioequivalência. 2010**. Disponível em: <http://www.ime.unicamp.br/sinape/sites/default/files/souzarm_versao_1.pdf>. Acesso em: 19 de abril de 2016.

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. **Prog Lipid Res**, v.63, p.132-152, 2016.

STEPPAN, C.M. et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, v.409, n.6818, p.307-312, 2001.

STERN, J.H.; RUTKOWSKI, J.M.; SCHERER, P.E. Adiponectin, leptin, and fatty acids in the maintenance of metabolic homeostasis through adipose tissue crosstalk. **Cell Metab**, v.23, n.5, p.770-784, 2016.

SUGANAMI, T.; NISHIDA, J.; OGAWA Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: Role of free fatty acids and tumor necrosis factor α. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.25, n.10, p.2062-2068, 2005.

SUNDARAM, S. et al. High fat diets containing different amounts of n3 and n6 polyunsaturated fatty acids modulate inflammatory cytokine production in mice. **Lipids**, v.51, n.5, p.571-582, 2016.

TAI, C. C. & DING, S. T. N-3 polyunsaturated fatty acids regulate lipid metabolism through several inflammation mediators: mechanisms and implications for obesity prevention. J Nutr Biochem, v. 21, n.5, p. 357–363, 2010

TALL, A.R.; YVAN-CHARVET, L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v.15, n.2, p.104-116, 2015.

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

TORTOSA-CAPARRÓS, E. et al. Anti-inflammatory effects of omega 3 and omega 6 polyunsaturated fatty acids in cardiovascular disease and metabolic syndrome. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v.57, n.16, p.3421-3429, 2017.

TRUJILLO, M.E. et al. Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. **J Clin Endocrinol Metab**, v.89, n.11, p.5577-5582, 2004.

VALENZUELA, B.R. et al. Alpha linolenic acid (ALA) from rosa canina, sachainchi and chia oils may increase ALA accretion and its conversion into n-3 LCPUFA in diverse tissues of the rat. **Rev Chil Nutr**, v.5, n.3, p.356-367, 2014.

VALENZUELA, B.R. et al. Evaluation of the hepatic bioconversion of α-linolenic acid (ALA) to eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in rats fed with oils from chia (*Salvia hispánica*) or rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa*). **Grasas y Aceites**, v.63, n.1, p.61-69, 2012.

VALENZUELA, B.R. et al. Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas. **Rev Chil Nutr**, v.38, p.356-367, 2011.

VALENZUELA, R. et al. Modification of docosahexaenoic acid composition of milk from nursing women who received alpha linolenic acid from chia oil during gestation and nursing. **Nutrients**, v.7, n.8, p.6405-6424, 2015.

VUKSAN, V. et al. Salba-chia (*Salvia hispanica L.*) in the treatment of overweight and obese patients with type 2 diabetes: A double-blind randomized controlled trial. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v.27, n.2, p.138-146, 2017.

VUKSAN, V. et al. Supplementation of conventional therapy with the novel grain salba (*Salvia hispanica L.*) improves major and emerging cardiovascular risk factors in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v.30, n.11, p.2804-2810, 2007.

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

WHELAN, J. Linoleic acid. **Adv Nutr**, v.4, n.3, p.311-312, 2013.

WIEN, M. et al. Decreasing the linoleic acid to α-linolenic acid diet ratio increases eicosapentaenoic acid in erythrocytes in adults. **Lipids**, v.45, n.8, p.683-692, 2010.

WILLIAMS, A. E. **Immunology:** Mucosal and Body Surface Defences. Oxford: John Wiley & Sons, 2012.

WOODWARD, M. et al. Associations between high-density lipoprotein cholesterol and both stroke and coronary heart disease in the Asia Pacific region. **Eur Heart J**, v.28, n.21, p.2653-2660, 2007.

YADAV, A. et al. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. **Clin Chim Acta**, v.417, p.80-84, 2013.

YAMAUCHI, T. et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nat Med**, v.8, n.11, p.1288-1295, 2002.

YANG, L.G. et al. Low n-6/n-3 PUFA ratio improves lipid metabolism, inflammation, oxidative stress and endothelial function in rats using plant oils as n-3 fatty acid source. **Lipids**, v.51, n.1, p.49-59, 2016.

YANG, W.S. et al. Weight reduction increases plasma levels of an adipose- derived anti-inflammatory protein, adiponectin. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, n.8, p.3815-3819, 2001.

ZHANG, L. et al. Low ω-6/ω-3 polyunsaturated fatty acid ratios reduce hepatic C-reactive protein expression in apolipoprotein E-null mice. **Nutrition**, v.26, n.7-8, p.829-834, 2010.

ZHANG, X.; ZHENG, X.; YUAN, Y. Treatment of insulin resistance: straight from the gut. **Drug Discov Today**, v.21, n.8, p.1284-1290, 2016.

ZHAO, G. et al. Dietary alpha-linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. **J Nutr**, v.134, n.11, p.2991-2997, 2004.

ZHU, J. et al. Exogenous adipokine peptide resistin protects against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. **Neurochem Res,** 2017. [Epub ahead of print]

ANEXOS

Anexo A

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 13 de maio de 2013

Prezada Professora Márcia Soares da Mota e Silva Lopes

A Comissão de Ética com Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Cientifica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro certifica que o projeto sob sua coordenação e intitulado: **"Óleos Especiais e Seus Efeitos no Metabolismo e na Prevenção de Doenças Crônicas"**, onde é prevista a utilização de **160 camundongos**, foi aprovado por esta comissão no dia **16/01/2013**, sob o número de referência **INJC016**, este protocolo tem validade de 3 anos.

Atenciosamente;

Prof. Paulo de Assis Melo
Presidente da CEUA - CCS
Comissão de Ética com Uso de Animais em Pesquisa do CCS

Prof. Paulo de Assis Melo
Presidente da Comissão de Ética com Animais - CCS

Decania do CCS: Av.Carlos Chagas Filho, 373 Prédio do Centro de Ciências da Saúde, Bloco K, 2º andar - Cidade Universitária - CEP 21941-590 – Rio de Janeiro – Brasil
Tel: (21) 2562.6705 - Fax: (21) 2270.1749 - www.ccsdecania.ufrj.br