



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS

ALEXANDRE MOURA ASSIS

**ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 NA MODULAÇÃO DO FENÔMENO
INFLAMATÓRIO E DE ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO
NA AORTA DE ANIMAIS OBESOS: AÇÃO DO RECEPTOR GPR120**

**LIMEIRA
2016**

ALEXANDRE MOURA ASSIS

ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 NA MODULAÇÃO DO FENÔMENO
INFLAMATÓRIO E DE ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO
NA AORTA DE ANIMAIS OBESOS: AÇÃO DO RECEPTOR GPR120

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo na Área de concentração em Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Dennys Esper Corrêa Cintra

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL

DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO

ALEXANDRE MOURA ASSIS, E ORIENTADA PELO

PROF. DR. DENNYS ESPER CORRÊA CINTRA

LIMEIRA

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/25742-0

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

Assis, Alexandre Moura, 1989-
As76a Ácidos graxos ômega-3 na modulação do fenômeno inflamatório e de estresse de retículo endoplasmático na aorta de animais obesos : ação do receptor GPR120 / Alexandre Moura Assis. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Dennys Esper Corrêa Cintra.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Obesidade. 2. Inflamação. 3. Ácidos graxos Omega-3. I. Cintra, Dennys Esper, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Omega 3 unsaturated fatty acids in the modulation of inflammatory phenomenon and endoplasmatic reticulum stress in aorta of obese animals : role of GPR120 receptor

Palavras-chave em inglês:

Obesity

Inflammation

Fatty Acids Omega-3

Área de concentração: Nutrição

Titulação: Mestre em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Dennys Esper Corrêa Cintra [Orientador]

Márcia Regina Nagaoka

Eliana Pereira de Araújo

Data de defesa: 22-01-2016

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Autor(a): Alexandre Moura Assis

Título: Ácidos Graxos Insaturados Ômega-3 na Modulação do Fenômeno Inflamatório e de Estresse de Retículo Endoplasmático na Aorta de Animais Obesos e Diabéticos: Ação do Receptor GPR120

Natureza: Pesquisa na Área Básica em Nutrição

Instituição: Universidade Estadual de Campinas

Data da Defesa: 22/01/2016 Limeira, 2016

BANCA EXAMINADORA

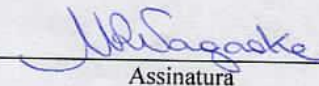
Prof(a). Dr(a). Dennys Esper Corrêa Cintra (Orientador(a))


Assinatura

Prof(a). Dr(a). Eliane Pereira de Mello


Assinatura

Prof(a). Dr(a). MARCIA R. NAGAOKA


Assinatura

*Aos que exercem a função materna e paterna com
maestria: D. Neide e Sr. Sidney, obrigado pelo
apoio incondicional.*

Agradecimentos

Da minha fé condizente com minha atual condição de se acreditar em alguma coisa e de todo o meu livre-arbítrio condizente com minha percepção para fazer escolhas, fui direcionado a fazer da minha vida o melhor que ela pode ser e será! A isso devo e agradeço a Deus e meu guia espiritual.

Da imprescindível proteção aos conselhos mais valiosos, do conforto de um colo aos constantes incentivos, do calor de um abraço apertado a um confiante aperto de mãos: mãe, pai...sem vocês tudo seria extremamente mais difícil. Obrigado por cada gesto e cada palavra, eu amo vocês!

Recordo-me de sua foto em seu currículo Lattes e me subir à cabeça uma única pergunta: será que vai dar certo? Bastou nossa primeira reunião para a resposta: vai! Guardarei com o meu melhor carinho todas as histórias protagonizadas por você e também o quão prazeroso é notar alguém que sente paixão genuína pelo que faz. Dispensio, por ora, relatar tudo o que eu aprendi com você porque vou continuar insistindo nesta aprendizagem. Muito obrigado por tudo, Dennys.

Agradeço a Vanessa de Oliveira, que não poupou esforços ao me ensinar como os experimentos deveriam ser conduzidos, do que sei hoje devo muito a você. Ao Rodolfo Marinho que me sugeriu atalhos e estes certamente simplificaram minha jornada até aqui.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Lício Velloso por abrir as portas de seu laboratório e permitir que utilizasse de sua estrutura para realizar minhas atividades diárias. Permita-me também agradecer-lo por me oferecer a oportunidade de dar continuidade à carreira acadêmica sob uma nova perspectiva.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Pauli pelas considerações nas reuniões de grupo e, em especial, por ter me dado a inscrição no congresso em que conquistei meu primeiro prêmio pelo trabalho apresentado. Sua humildade é um rastro a ser perseguido.

Aos companheiros do laboratório de genômica nutricional (LabGeN) e biologia molecular do exercício (LabMEx): Guilherme, Marcella's, Paty Brito (fundamental em me auxiliar com o tratamento dos animais), Camilla Bertuzzo, Vitão, Arthur e Rafa...enxergo um futuro brilhante em todos vocês, fui atento em perceber que passávamos pouco tempo juntos e por isso teria de redobrar minha atenção para aprender com cada um no curto período que eu tinha disponível para isso. Muito obrigado!

Aos colegas do laboratório de sinalização celular (LabSinCel) por proporcionarem um ótimo ambiente para executar os trabalhos de altíssima complexidade realizados no Núcleo, sem restringir apoio quando necessário. Agradeço em especial a Dani Razolli (pelo auxílio diário e pelas considerações na qualificação); Gabi, Lucas e Zeca (pesquisadores natos, humanos em excelência); Rodrigo Carraro (pelas aventuras nos congressos Brasil afora e por me acolher em seu apartamento em Campinas quando os experimentos atravessavam a noite); Jose Morari (pelos inúmeros PCRs e discussões enquanto a “placa rodava”); Ju Contim (inteligente e espontânea, persona peculiar); Erika Anne, Gerson Ferraz e Márcio Cruz (a propulsão que não deixa este gigantesco navio parar).

Milessa Afonso, agradeço por sua colaboração e por me mostrar que os passos firmes em direção ao que se acredita são mais importantes que as conquistas provenientes do trabalho suado. Sua simplicidade é sua maior força! De Palestina/SP para o mundo: sucesso!

Possibilitando uma verdadeira aventura docente, também conhecida como estágio docente (PED), agradeço ao Prof. Dr. Augusto Ducati Luchessi pela oportunidade de me aprofundar na Biologia Celular e Molecular, exercitar minhas habilidades didáticas e poder compartilhar isto semanalmente com 120 alunos. Agradeço também ao Prof. Dr. Odair Aguiar Jr. (UNIFESP) por escrever uma carta de recomendação essencialmente carinhosa que fora fundamental para eu conquistar a vaga no PED.

Minha gratidão às professoras Joyce Maria Annichino-Bizzacchi (UNICAMP) e Maria do Carmo Gouveia Peluzio (UFV) pela doação dos animais ApoE ^{-/-}.

Meu respeito aos animais de laboratório utilizados durante este trabalho, sendo parte fundamental no processo de pesquisa e abertura de novos caminhos ao conhecimento humano sobre cura e prevenção de doenças.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-Processo 2013/25742-0), pelo financiamento do trabalho e concessão de bolsa de estudo, agradeço o apoio financeiro.

De saída da FCA/UNICAMP, eis que você me surge aos 45 minutos do 2º tempo. Não existe presente melhor do que a oportunidade de conhecer uma pessoa com semblante de boas virtudes, nós vamos longe Bruna.

“Crê e trabalha.

Esforça-te no bem e espera com paciência.

Tudo passa e se renova na Terra, mas o que vem do céu permanecerá.

Eleva, pois, o teu olhar e caminha”

(Francisco Cândido Xavier)

RESUMO

A obesidade representa um dos maiores problemas de saúde no Brasil e no mundo, e constitui o pilar para o desenvolvimento de diversas outras doenças correlatas como diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensão e aterosclerose. Produto de um balanço energético positivo, a obesidade vai muito além do peso. Reconhecer que o excesso de adiposidade inicia e propaga um estado de inflamação crônica e de baixo-grau estendeu a compreensão de como a obesidade é capaz de deflagrar comorbidades associadas.

Através de mecanismos distintos, mas com interações entre suas respectivas vias de sinalização, a ativação do receptor TLR4 e o estresse de retículo endoplasmático parecem compor o alicerce que sustenta o início do desenvolvimento de doenças cardiovasculares associadas à obesidade. O disparo e integração destas vias que, em última análise, corroboram na gênese dos distúrbios metabólicos característicos dessa doença e do processo aterosclerótico tornaram-se alvo terapêutico. Hoje sabe-se que a patogênese da obesidade repousa sobre um assoalho inflamatório que atua como causa e consequência de anormalidades do metabolismo glicídico e lipídico.

Apontados há muitos anos como adjuvantes ao tratamento de dislipidemias e doenças cardiovasculares, os ácidos graxos ômega-3 (ω 3) ainda não apresentam seus mecanismos de ação totalmente definidos. A recente descrição de receptores de membrana, como o GPR120 (FFAR4) e GPR40 (FFAR1), capazes de reconhecer e serem ativados por estes ácidos graxos, identificou uma nova rota anti-inflamatória deflagrada por estes lipídeos. Em condições de obesidade, foram demonstrados no sistema nervoso central auxiliando a recuperação do controle da fome exercido pelo hipotálamo e em tecidos periféricos no resgate da homeostase metabólica. No âmbito do sistema cardiovascular, o projeto em questão apresenta resultados que demonstram a remissão, em parte, da inflamação e do estresse de retículo endoplasmático na aorta de camundongos *Swiss* obesos alimentados com dieta hiperlipídica com parcial substituição da banha por óleo de linhaça (fonte de ω 3). Evidenciou-se agonismo do receptor GPR120 neste tecido, contudo, não houve atenuação significativa na redução do acoplamento entre TAB1 e TAK1, pertencentes à cascata de sinalização do TLR4. No entanto, foram observadas reduções significativas na expressão proteica de proteínas pró-inflamatórias e de estresse de retículo endoplasmático. Ainda, demonstrou-se a recuperação da sinalização da insulina e melhora significativa no perfil de lipídeos séricos, ambos com ações hemodinâmicas de particular interesse nas doenças cardiovasculares. A espectrometria de massa detectou a incorporação do ácido graxo α -linolênico na aorta dos animais que receberam dieta enriquecida com óleo de linhaça e atestou melhora no

padrão do perfil dos ácidos graxos componentes deste tecido. Em camundongos LDLr *knockout*, a ativação do receptor GPR120 não demonstrou ser a principal via pelo qual os ácidos graxos ω 3 promovem sinais de remissão da inflamação e de estresse de retículo endoplasmático. Assim como observado nos animais *Swiss*, houve melhora significativa no padrão de lípides séricos nos animais que receberam maior oferta destes ácidos graxos insaturados, indicando que seus efeitos cardioprotetores parecem ter íntima associação com a melhora destes parâmetros metabólicos.

ABSTRACT

Obesity is one of the most important health issue worldwide and many obesity-related disorders such as type 2 diabetes mellitus, hypertension and atherosclerosis exarcebates the problem. Many studies have suggested the chronic and low-grade inflammatory status of obesity as the major factor to development of metabolic disorders.

The synergism between the activation of TLR4 and endoplasmatic reticulum stress pathways has been showed to be key process in the progress and development of obesity-associated cardiovascular diseases, mainly during the first steps of atherogenesis, becoming upstream pathogenic targets in cardiometabolic diseases.

The cardiovascular benefits of omega-3 consumption are attributed to it's hypotriclyceridemic and antiinflammatory effects, but the celular mechanisms of action of this lipids are not fully understood. Recently, several membrane receptors such as GPR120 and GPR40 were reported as free fatty acid receptors and it's activation are able to trigger antiinflammatory signaling. Experimental studies showed expression and activation of GPR120 by omega-3 in central nervous system and peripheric tissues of obese mice and this stimulation abolishes inflammation, restoring the control of food intake, leptin and insulin sensitivity.

In this study, the activation of GPR120 in aorta did not attenuates TAB1 and TAK1 interaction, but was observed significantly decreasing of inflammatory and endoplasmatic reticulum stress markers in aorta of obese Swiss mice with flaxseed oil-enriched hyperlipidic diet (FS). The FS group improved insulin signaling in this tissue and ameliorates the serum lipid profile. The mass spectrometry detected the incorporation of ALA in FS group and showed enhanced lipid content in aorta, with higher prevalence of unsaturated fatty acids than high fat diet group. In LDLr knockout mice, the GPR120 activation did not seems to be fundamental to decrease inflammation and endoplasmatic reticulum stress, and the results also showed improved serum lipids in FS group. In short, the cardioprotection effects exercised by omega-3 appear to be attributed to decreasing in inflammatory pathways and improvement in metabolic parameters, without direct dependence of GPR120.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1: Via de sinalização do *Toll-like Receptor 4*

Ilustração 2: Vias de sinalização inflamatória ativadas pelas proteínas de Estresse de Retículo Endoplasmático

Ilustração 3: Bloqueio da sinalização do TLR4 através da via de sinalização do receptor GPR120

LISTA DE ABREVIATURAS

Siglas

TLR4	<i>Toll-Like Receptor 4</i>
GPR120 (FFAR4)	<i>G Protein-coupled Receptor 120 (Free Fatty Acid Receptor 4)</i>
GPR40 (FFAR1)	<i>G Protein-coupled Receptor 40 (Free Fatty Acid Receptor 1)</i>
IRAK4	Quinase 4 associada ao receptor de IL-1
IRAK1	Quinase 1 associada ao receptor IL-1
TRAF6	Fator 6 associado ao receptor de TNF
TAK1	Quinase 1 ativada por fator de crescimento transformador β
TAB1,2 e 3	Proteína 1,2 e 3 ligadora da TAK1
IKK β	Quinase β do inibidor do NF- κ B
I κ B	Inibidor κ B
NF- κ B	Fator nuclear κ B
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 β
JNK	<i>Kinase c-jun N-terminal kinase</i>
RI	Receptor de insulina
IRS1	Substrato 1 do receptor de insulina
ERE	Estresse de retículo endoplasmático
GRP 78	Proteína relacionada à glicose 78
PERK	<i>PKR-like eukaryotic initiation factor 2 α kinase</i>
IRE1	<i>Inositol-requiring enzyme-1</i>
ATF6	<i>Activating transcription factor-6</i>
eIF2 α	<i>Eukaryotic initiation factor 2 α</i>
XBP1s	<i>spliced x box protein 1</i>

HSPA5	<i>Heat shock protein 5</i>
<i>HSP90B1</i>	<i>Heat shock protein 90, beta (GRP94), member 1</i>
CHOP	Fator de transcrição homólogo ao C/EBP
DHA	Ácido docosahexanóico
EPA	Ácido eicosapentanóico
ALA	Ácido alfa-linolênico
HF	<i>High-fat</i>
FS	<i>Flaxseed</i>

SUMÁRIO

1. Introdução	17
1.0 A natureza da resposta inflamatória.....	18
1.1 “ <i>Crosstalk</i> ” entre vias inflamatórias e sinalização da insulina	20
1.2 Do estresse metabólico à aterosclerose.....	22
1.3 Novos cenários aos ácidos graxos – potencialidade insaturada	25
2. Objetivos.....	28
3. Capítulo I – Artigo.....	29
1. Introduction.....	31
2. Materials and Methods.....	32
3. Results.....	34
4. Discussion	35
5. Conclusions.....	37
References.....	38
Figure Legends.....	42
Figures.....	46
Supplements (Detailed Methods).....	55
4. Discussão e Conclusão	59
5. Referências Bibliográficas	68

INTRODUÇÃO

O panorama da obesidade há tempos já ocupa as principais pautas das discussões das organizações de saúde em todo o mundo, o constante revés na promoção do declínio de sua carga epidemiológica fica evidenciado pelos números referentes à prevalência mundial e nacional desta doença: 11% dos homens e 14% das mulheres adultas estão obesos e estima-se que 42 milhões de crianças com menos de 5 anos estejam com sobrepeso (WHO, 2014). Em pouco mais de 30 anos, a proporção de adultos com sobrepeso ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) aumentou de 28,8% para 36,9% em homens e de 29,8% para 38% em mulheres, entre 1980 e 2013 (Ng et al., 2014). A reversão desse panorama tornar-se-á cada vez mais difícil de acordo com as projeções, cuja estimativa é de que até 2030 o número de indivíduos no mundo com sobrepeso poderá chegar a 2,16 bilhões e 1,12 bilhões estarão obesos (Kelly et al., 2008). No Brasil, considerando-se os resultados obtidos pelo VIGITEL em 2014, 54,7% dos homens e 47,4% das mulheres maiores de 18 anos apresentavam $\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$, isto é, com sobrepeso; enquanto o diagnóstico de obesidade ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) foi detectado em 17,5% dos homens e também 17,5% nas mulheres.

O ajuntamento entre algumas das doenças crônicas não transmissíveis abastece os principais algarismos contemporâneos que mensuram os fatores de risco para mortalidade. Dentre elas, as doenças cardiovasculares são as responsáveis pelo maior número de mortes anuais em todo o mundo e, segundo dados recentes da OMS, foram responsáveis por 17,5 milhões de mortes em 2012 e projeta-se que esse número atinja 25 milhões em 2030 (WHO, 2012). Apesar de apresentar tendência de queda nos últimos anos, as doenças cardiovasculares ainda representam a principal causa de morte e geram também o maior custo referente a internações hospitalares no sistema de saúde no Brasil (Schmidt et al., 2011).

Embora antiga e corriqueira, a associação do fenótipo obeso com outras comorbidades tem sido explorada em nicho molecular somente nos últimos anos. Fundamentado no reflexo entre as interações dos fenômenos inflamatórios com as sinalizações que orquestram o metabolismo, emergiu o termo “*metaflammation*” para designar os desarranjos homeostáticos que, sustentados de forma crônica, culminam em resistência à insulina, certos tipos de câncer e doenças cardiovasculares (Hotamisligil, 2006).

Os sistemas homeostáticos que mantêm o ambiente interno em constância relativa, mesmo diante das variações do ambiente externo, são coletivamente coordenados por variáveis fisiológicas reguladas, isto é, aquelas que se referem às variáveis fisiológicas mantidas em nível estável por circuitos homeostáticos (ex.: glicemia); e pelas variáveis fisiológicas controladas,

cujos processos são manipulados objetivando-se a manutenção destas em um nível desejado (ex.: glicólise, glicogênese, glicogenólise, gliconeogênese) (Kotas e Medzhitov, 2015). Existem, ainda, componentes dos sistemas homeostáticos que, hierarquicamente, monitoram os valores das variáveis reguladas (ex.: células α e β - pancreáticas) e os responsáveis pela alteração destes valores, atuando como efetores dos circuitos homeostáticos (ex.: fígado, músculo, tecido adiposo) (Kotas e Medzhitov, 2015). Neste espectro, o fisiologista do século XIX – e para sempre atual - Claude Bernard, designou o termo *milieu interieur* para estabelecer a necessidade de manutenção da estabilidade do ambiente interno (Bernard, 1878).

Alguns circuitos homeostáticos que regem o organismo são capazes de serem modulados por uma variedade de fatores ambientais e prioridades fisiológicas, o que os torna vulneráveis a desregulações. Neste sentido, a homeostase do metabolismo glicêmico e lipídico, caracterizado por ajustes múltiplos e dinâmicos, são suscetíveis a mudanças em muitos estados fisiológicos alterados, dentre eles, no transcorrer do processo inflamatório (Chovatiya e Medzhitov, 2014). A principal característica da inflamação é pautada na contenção e eliminação de infecções, lesões e/ou estresse metabólico que eventualmente possam perturbar o estado homeostático. Baseado nisso, os sinais inflamatórios empregam uma miríade de comandos que alteram variáveis homeostáticas, almejando a supressão dos fatores agressores e resgate das condições basais precedentes ao início da inflamação. Contudo, estudos recentes têm demonstrado que vias metabólicas e inflamatórias convergem em muitos pontos, e que sinais inflamatórios são antagonistas e dominantes sobre o fluxo de vários sistemas homeostáticos (Hotamisligil e Erbay, 2008).

A exploração das intersecções entre metabolismo e inflamação iniciou a solidez na compreensão da fisiopatogênese de muitas das doenças metabólicas que hoje acometem milhares de pessoas, sobretudo, a obesidade, o diabetes *mellitus* tipo 2 e a aterosclerose (Gregor e Hotamisligil, 2011). Dessa forma, no intuito de descrever a problematização das vias celulares envolvidas e, eventualmente, comprometidas na conjuntura da “*metaflammation*”, segue descrição abaixo.

1.0 - A natureza da resposta inflamatória

A análise funcional dos TLRs demonstrou que esses receptores são responsáveis pelo reconhecimento de padrões específicos de componentes microbianos conservados entre os microorganismos. O lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede de bactérias Gram negativas, por exemplo, desencadeia resposta imunológica, pró-inflamatória. Alguns ácidos graxos

saturados que constituem o LPS são encontrados difundidos, de forma natural, na alimentação humana. Desta forma, o consumo destes ácidos graxos saturados presentes nos alimentos pode ativar o receptor TLR4, o qual dispara resposta imunológica inata. Os ácidos graxos láurico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) estão difundidos na alimentação e são reconhecidos pelos TLRs (Caroff e Karibian, 2003).

O TLR4 utiliza principalmente a via do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), que se liga ao domínio citoplasmático dos TLRs facilitando a associação da quinase 4 de IL-1 (IRAK4) ao receptor. Na sequência ocorre a fosforilação de resíduos da quinase 1 associada de IL-1 (IRAK1), estimulando sua atividade quinase intrínseca. A IRAK1 então se autofosforila e possibilita a ligação do fator 6 associado ao TNF (TRAF6) ao complexo (Akira et al., 2001). Neste momento, ocorre interação com outro complexo pré-formado que inclui a quinase 1 ativada por fator de crescimento transformador β (TAK1) com a proteína 1 ligadora da TAK1 (TAB1), TAB2 ou 3. Após integração deste complexo, TAK1 é ativada e possibilita a ativação da kinase β do inibidor do NF- κ B (IKK β), fosforilando e inibindo a proteína subsequente, o I κ B. Quando fosforilado, o I κ B permite a liberação no citoplasma das porções catalíticas p50 e p65 do fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) (Akira et al., 2006), culminando em sua via de sinalização pró-inflamatória clássica, que inclui o controle da expressão de importantes genes reguladores da inflamação, desencadeando aumento da expressão de TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Ilustração 1) (Shoelson et al., 2006). A ativação da TAK1 também favorece a ativação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), incluindo a kinase c-jun N-terminal kinase (JNK) (Akira e Takeda, 2004).

Proteínas com atividade serina-kinase, oriundas das vias do NF- κ B ou das MAPKs, são capazes de interferir na sinalização de circuitos homeostáticos de forma sistêmica, como na via da insulina, predispondo órgãos e sistemas ao desenvolvimento das comorbidades associadas à obesidade (Febbraio, 2014).

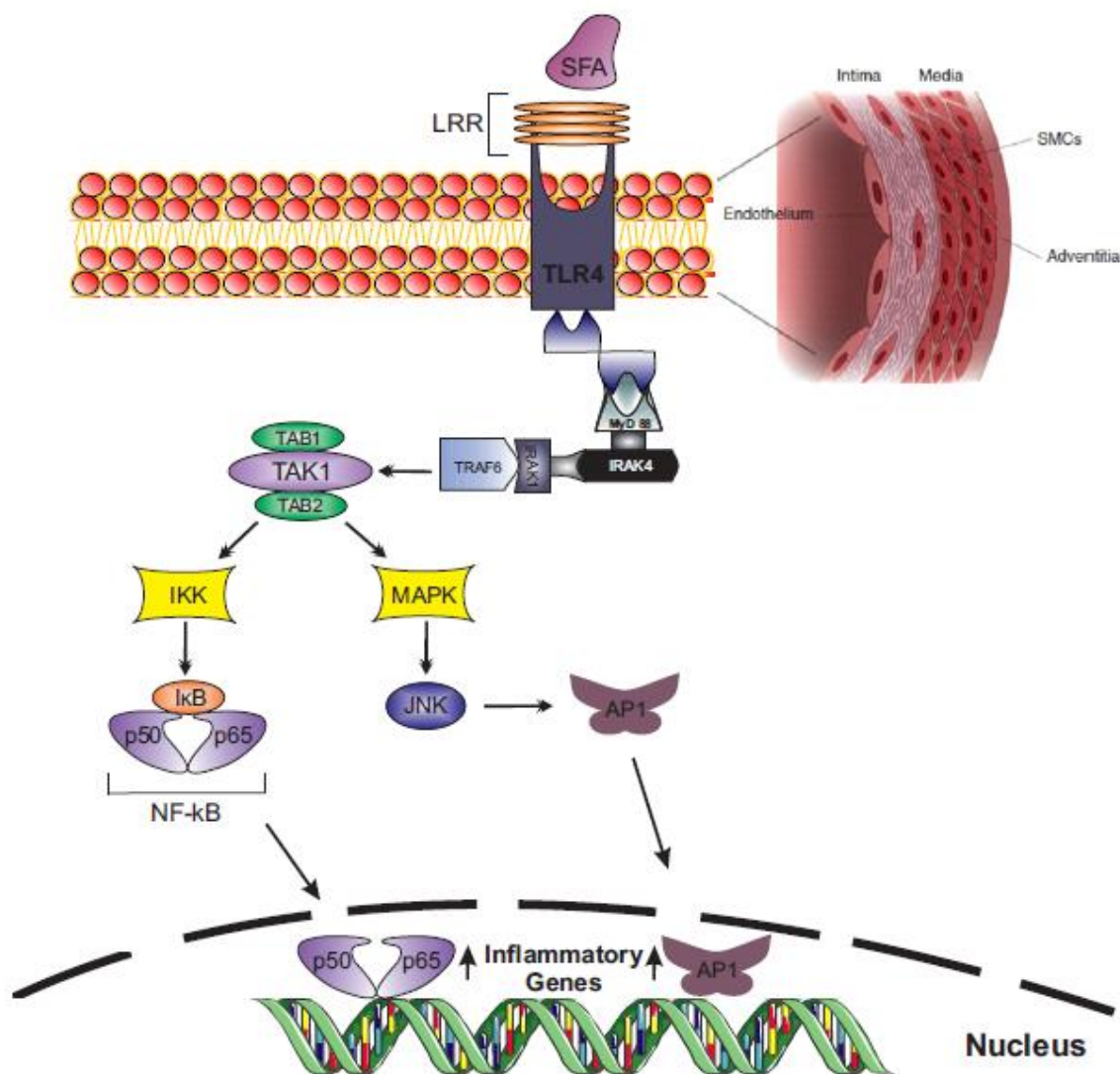


Ilustração 1: Via de sinalização do TLR4 e ativação dos fatores de transcrição nuclear NF-κB e AP1. (Figura do autor)

1.1 – “Crosstalk” entre Vias Inflamatórias e Sinalização da Insulina

1.1.1- Defluência fisiológica da sinalização da insulina

A sinalização intracelular da insulina em tecidos insulino-sensíveis, por exemplo, músculo, tecido adiposo e endotélio, inicia-se com a ligação do hormônio a um receptor específico de membrana, o receptor de insulina (RI). O RI é uma proteína heterotetramérica com atividade tirosina-quinase intrínseca, composta por duas subunidades α extracelulares, onde se localiza o sítio de ligação da insulina, e duas subunidades β intracelulares, que incluem o sítio

catalítico. A ligação da insulina às subunidades α leva à alteração conformacional nas subunidades β e consequente auto-fosforilação, ativando sua capacidade tirosina quinase (Czech, 1985).

Posteriormente, o receptor fosforila substratos adaptadores em tirosina, principalmente IRS-1/2. A subunidade regulatória p85 da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) se acopla a sítios fosforilados em tirosina do IRS1/2 para ativar a porção catalítica p110. Posteriormente, fosfoinosítídeos de membrana são fosforilados e ativam a proteína quinase 3-fosfoinosítídeo-dependente (PDK1), fosforilando a AKT em treonina (Rhodes et al., 2013). Uma vez ativada, a AKT é capaz de fosforilar diversos substratos presentes no citoplasma e no núcleo, a exemplo da FoxO1, além de atuar em vias de sinalização com efeito anti-apoptótico, anti-lipolítico, de crescimento e diferenciação celular (Guo, 2014).

Após satisfazer as necessidades celulares, os efeitos fisiológicos da insulina não são sustentados de forma crônica. Sinais negativos de sensibilização contribuem para a dissociação do receptor da insulina e degradação de IRS1/2. Esse processo pode ser resultado da ativação da proteína quinase C (PKC), ativada pela PDK1, pela própria sinalização em serina de IRS1/2 pela AKT (Rhodes et al., 2013) ou, ainda, no cenário dos distúrbios metabólicos derivados da obesidade, através das proteínas serina-quinases ativadas pelo processo inflamatório (Hirosumi et al., 2002; Hotamisligil, 2010).

1.1.2- Defluência da Inflamação sobre a Sinalização da Insulina: a Resistência

O *crosstalk* entre a via inflamatória do TLR 4 e da insulina sustentado cronicamente promove quebra da homeostase hormonal. A proteína IKK promove fosforilação em resíduos de serina do receptor da insulina e de proteínas da família dos substratos deste receptor reduzindo a capacidade de se associarem ao RI, prejudicando a transdução de seu sinal (Aguirre et al., 2002). A ativação do complexo IKK pode atuar sobre a via de sinalização da insulina principalmente através da fosforilação do resíduo Serina 307 do IRS-1, ablando a ação do receptor, como descrito anteriormente, assim como ativando vias inflamatórias via NF- κ B (Beg et al., 1993; Palombella et al., 1998).

Protagonizando mediações intracelulares centrais de resistência à insulina, a JNK é capaz de inibir a sinalização deste hormônio através da fosforilação do IRS1 em serina. Além disso, a ativação do fator de transcrição AP-1 induz expressão gênica de proteínas envolvidas na

inflamação, também antagonistas à ação molecular da insulina (Aguirre et al., 2000; Vallerie e Hotamisligil, 2010).

O conjunto dos mediadores inflamatórios intermediários supracitados atuam em consonância com outras manifestações da resistência à insulina, tais quais hiperglicemia e dislipidemia, e parecem contribuir de forma substancial e elementar à disfunção endotelial.

1.2 – Do Estresse Metabólico à Aterosclerose

Receptores de insulina são também encontrados no endotélio e em células musculares lisas. A ação desse hormônio foi inicialmente relacionada com a modulação do tônus vascular e fluxo sanguíneo (Baron, 1994). Diante das diferentes ações hemodinâmicas realizadas por sua sinalização íntegra, diversas evidências suportam haver estreita relação entre resistência à insulina e doença vascular. O fenótipo pró-aterogênico é frequentemente observado nesses casos, resultado de uma conjuntura clínica e molecular que favorece o desenvolvimento de lesões endoteliais que marcam o início da formação da aterosclerose (Muniyappa e Sowers, 2013; Rask-Madsen e Kahn, 2012; Bornfeldt e Tabas, 2011).

Estudos pioneiros reportam que a insulina é capaz de induzir vasodilatação através de efeito mediado pelo óxido nítrico (NO) derivado do endotélio (Laakso et al., 1990), assim como nas células musculares lisas, o estímulo ao receptor de insulina e ao seu homólogo, o IGF-1, também é capaz de provocar rápido aumento na liberação de NO (Muniyappa et al., 1997).

O metabolismo anormal da glicose, em decorrência do comprometimento da sinalização da insulina, pode acarretar aumento nos níveis circulantes de ácidos graxos livres devido comprometimento da supressão da lipólise, gerando constante exposição e lipotoxicidade à vasculatura (Semenkovich, 2006) e ativação do NF- κ B (Boden et al., 2005). Além disso, a exposição crônica aos ácidos graxos livres aumenta os níveis celulares de diacilglicerol e ceramidas. A partir desses, alguns metabólitos gerados são envolvidos na ativação de serinas quinase, como a proteína quinase C (PKC) e o IKK β (Itani et al., 2002).

A maquinaria do sistema imunológico envolvida nas doenças metabólicas é a mesma que gera lesão vascular e sua exploração no ambiente das placas de aterosclerose aponta o macrófago como peça-chave na evolução das lesões endoteliais. Além disso, sua relação com a patogênese da aterosclerose se dá, em grande parte, por meio de mecanismos envolvendo o estresse de retículo endoplasmático.

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela com extensa rede tubular responsável pela síntese, transporte e enovelamento das proteínas em sua conformação tridimensional.

Mediante condições de estresse metabólico que superam a capacidade de controle de qualidade da síntese proteica pela maquinaria do RE, esta organela falha em acomodar a carga de proteínas mal-enoveladas, havendo rompimento de sua homeostase e eclosão do estresse de retículo endoplasmático (ERE) (Xu et al., 2005). Em células eucarióticas, três proteínas associadas ao ERE são cruciais: “*PKR-like eukaryotic initiation factor 2 α kinase*” (PERK), “*inositol-requiring enzyme-1*” (IRE1) e “*activating transcription factor-6*” (ATF6). Na ausência de estresse, essas três proteínas transmembrana estão acopladas à chaperona – estrutura associada aos ribossomos que suportam os eventos de correto enovelamento protéico - GRP 78 (também conhecida como BiP), não fosforiladas e inativas (Ron e Walter, 2007; Todd et al., 2008).

No ERE, a IRE1 se autofosforila, ativando sua porção RNase, promovendo o splicing do RNAm da “*x box protein 1*” XBP1 que, em sua forma ativa (pós-splicing), torna-se potente fator de transcrição, aumentando a produção de chaperonas (Ron e Walter, 2007; Schroder e Kaufman, 2005). A IRE1 também possui atividade RNase não específica, que degrada RNAm localizados na membrana do RE, reduzindo a importação de proteínas para o lúmen do RE (Hollien e Weissman, 2006).

Em paralelo, o ATF6 liberado da GRP 78 se transloca ao Golgi onde 2 sucessivas clivagens proteolíticas o torna funcional no citoplasma para, posteriormente, atuar como fator de transcrição no núcleo (Haze et al., 1999; Ye et al., 2000). O ATF6 clivado e a XBP1 ativados induzem a transcrição de genes que codificam chaperonas no RE e enzimas que promovem o enovelamento, maturação e secreção de proteínas, bem como sua degradação (Yamamoto et al., 2007; Wu et al., 2007).

A PERK, por sua vez, através da fosforilação do “*eucariotic translation initiation factor 2- α* ” (eIF2- α), promove redução global da síntese proteica, evitando aumento e acúmulo anormal de proteínas mal-enoveladas (Harding et al., 2000).

Se o RE não obtiver sucesso em restabelecer a homeostase intracelular através do estresse, pode haver indução da apoptose através da proteína *C/EBP homologous protein* (CHOP), um fator de transcrição homólogo ao C/EBP, que reduz a transcrição da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Scull e Tabas, 2011). Não obstante, pode ativar a “*ER oxidase 1 α* ” (ERO1 α) estimulando a liberação de cálcio do RE pela ativação do canal IP3R1. Uma vez no citoplasma, o cálcio ativa uma série de sinais apoptóticos, incluindo a indução do receptor de morte FAS, ativação da JNK e liberação de apoptógenos pela mitocôndria, como o citocromo c (Timmins et al., 2009).

Embora o ERE seja um programa direcionado à recomposição do equilíbrio intracelular, sobretudo, da proteostase alterada durante o estresse metabólico associado à obesidade, ele pode se articular e exacerbar vias inflamatórias. Por meio de múltiplos e distintos mecanismos, tanto

IRE1 e PERK são capazes de levar à ativação da via NF- κ B/IKK (Deng et al., 2004; Hu et al., 2006). Recentemente, o ATF6 também foi associado à sinalização do NF- κ B/IKK, sugerindo que alvos que desencadeiam a inflamação podem ser atingidos por diferentes proteínas do ERE (Yamazaki et al., 2009). Adicionalmente, o estresse de RE é fator agregado à ação anormal da insulina e promove hiperglicemia através da supressão da sua sinalização, resultado da ativação da JNK e subsequente fosforilação em serina 307 do substrato IRS-1 (Ozcan et al., 2004).

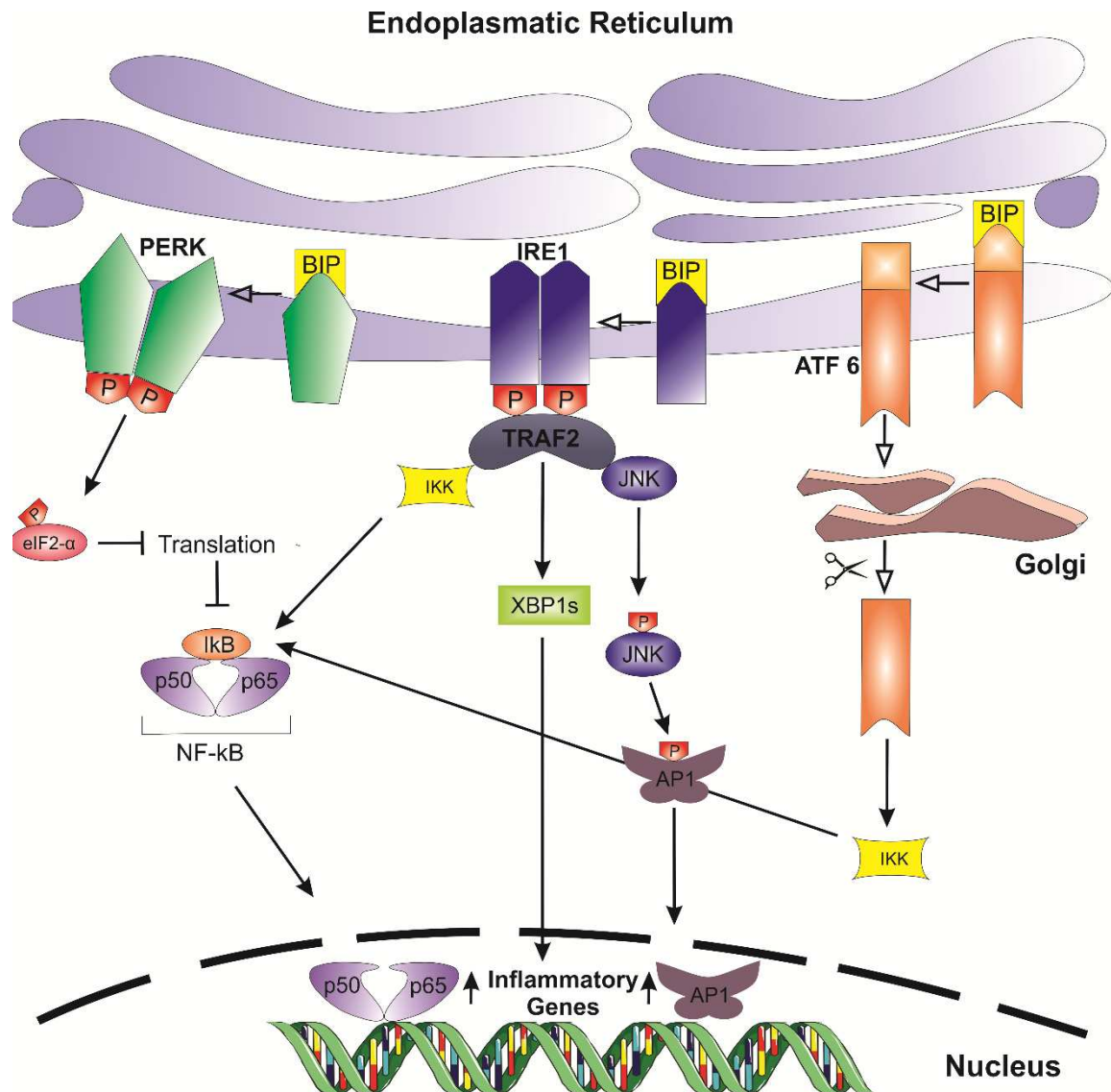


Ilustração 2. *Crosstalk* entre vias inflamatórias e proteínas do Estresse de Retículo Endoplasmático. (Figura do autor)

1.3- Novos Cenários aos Ácidos Graxos – Potencialidade Insaturada

Diante tal cenário inflamatório e de caos metabólico, estratégias terapêuticas são incentivadas. Na década de 1970 foram feitas as primeiras observações sobre o potencial anti-inflamatório que ácidos graxos insaturados, da classe dos ômega-3 (ω 3), poderiam exercer. As baixas incidências de doenças cardiovasculares entre os esquimós da Groelândia foram observadas nas expedições de Dyerberg e Bang e atribuídas à dieta Inuit, extremamente enriquecida com ω 3 (Dyerberg et al., 1975; Dyerberg e Bang, 1979). Evidências de que o ácido docosahexanóico (DHA) e o ácido eicosapentanóico (EPA), ambos membros da família do ômega-3, previnem doenças cardiovasculares são particularmente fortes, incluindo seu derivado de origem vegetal, o ácido alfa-linolênico (ALA). Diversos estudos apontam que características e sintomas da hipertensão, trombose, hipertrigliceridemia, reatividade vascular e inflamação são abrandados por esses ácidos graxos (Weintraub, 2013; De Caterina, 2011; Glick e Fischer, 2013).

1.3.1- Receptor GPR120

Receptores acoplados à proteína G foram descritos entre as décadas de 1990 e 2000, e permaneceram por muito tempo como de receptores órfãos. Em 2003 houve a descrição que um destes receptores, o GPR40, poderia ser ativado por ácidos graxos de cadeia média e longa (Briscoe et al., 2003; Itoh et al., 2003), assim como GPR41 e GPR43, por ácidos graxos de cadeia curta (Le Poul et al., 2003; Nilsson et al., 2003). O GPR119 e GPR120 foram identificados em 2003 também, em conjunto com outros 5 eGPCRs como novos membros da superfamília rodopsina (Fredriksson et al., 2003). Mas apenas em 2005 observou-se que o GPR120 poderia ser ativado por ácidos graxos insaturados, principalmente os de cadeia longa (Hirasawa et al., 2005).

A penumbra mecanística foi desnudada quando em 2010, Oh e colaboradores descreveram que os ácidos graxos ω 3 eram os maiores e mais potentes ativadores do receptor GPR120. Atuando como agonistas deste GPCR, os ácidos graxos ω 3 estimulam a translocação da proteína intracelular β -arrestina-2 à membrana plasmática, onde se co-localiza com o GPR120, isto é, promove acoplamento intracelular entre o receptor (GPR120) e sua proteína adaptadora/efetora (β -arrestina-2). Durante a dinâmica de junção receptor-proteína adaptadora/efetora, a β -arrestina-2 atua impelindo a associação das proteínas a TAB1/2 e 3 à TAK quinase, desarticulando a cascata inflamatória e repercutindo melhora na sensibilidade à insulina (Oh et al., 2010; Cintra et al., 2012; Oliveira et al., 2015).

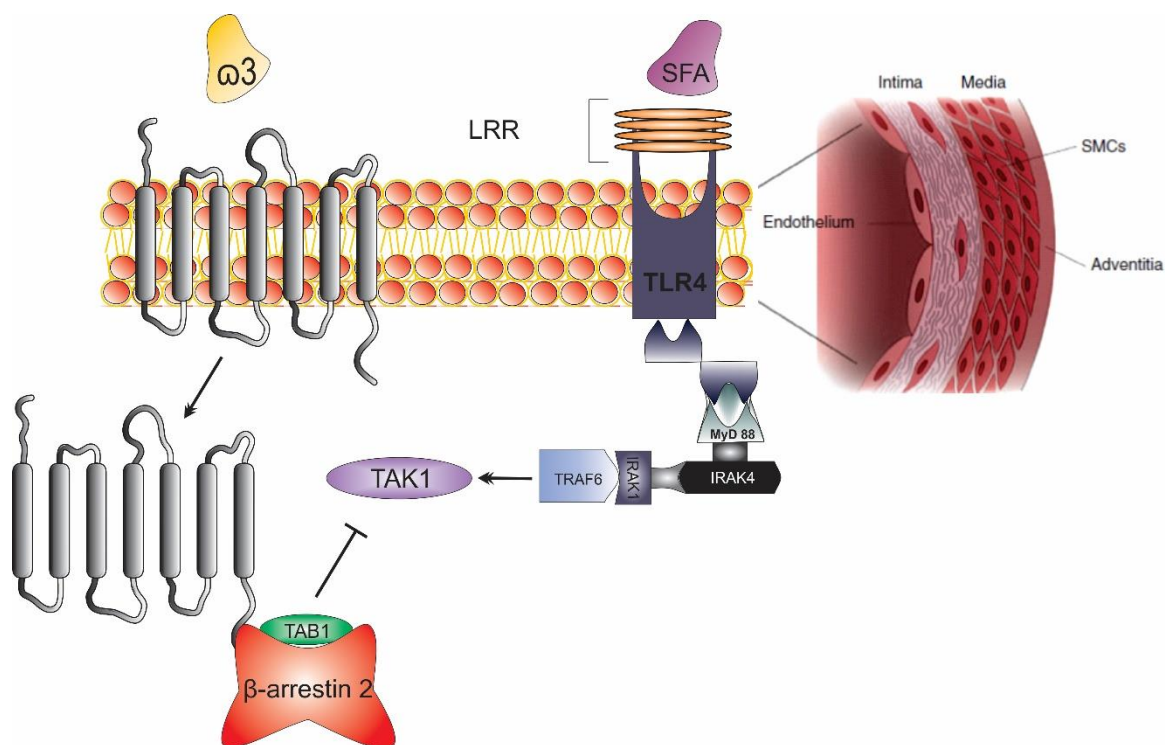


Ilustração 3. Via de sinalização do receptor GPR120 e bloqueio da via de sinalização do TLR4. (Figura do autor)

Em estudo conduzido por Ichimura et al., (2012), o sequenciamento do GPR120 em sujeitos obesos revelou que uma mutação deletéria (p.R270H) poderia inibir a atividade do GPR120 através de sua sinalização. Os autores identificaram aproximadamente 700 genes expressos de forma diferente entre os camundongos deficientes em GPR120 alimentados com dieta hiperlipídica e camundongos controles. A conectividade do mapeamento desses genes mostrou que vias relacionadas à sinalização da insulina e diferenciação dos adipócitos foram deprimidas, enquanto aquelas relacionadas à inflamação foram aprimoradas em camundongos deficientes em GPR120 alimentados com dieta hiperlipídica. A análise por PCR em tempo real confirmou a regulação negativa de genes relacionados ao controle da sinalização da insulina (IR, IRS1 e IRS2).

A influência da ativação do GPR120 vai além do impacto na reconstituição da ação da insulina em tecidos periféricos. Nosso grupo demonstrou que o ômega-3 foi capaz de reverter a inflamação e a apoptose no sistema nervoso central, cujos efeitos preservaram a integridade dos neurônios controladores da fome e, conseqüentemente, no mantimento do peso (Cintra et al., 2012). Periféricamente, fígado, músculo e tecido adiposo restabeleceram a sensibilidade à

insulina e reduziram de forma significativa a expressão de proteínas pró-inflamatórias, provendo restabelecimento da harmonia metabólica (Oliveira et al., 2015).

Outro trabalho realizado em nosso laboratório propôs, ainda, num mecanismo adjacente aos apresentados, aumento na expressão da IL-10 em cultura primária de hepatócitos de roedores após estímulo com ácidos graxos insaturados, onde o coativador-1 α do proliferador de peroxissomos gama (PGC-1 α) ativa a proteína c-MAF, um proto-oncogene, que migra até o núcleo e aumenta a transcrição específica do gene da IL-10 (Morari et al., 2010).

Acredita-se que a combinação das diferentes ações dos ácidos graxos insaturados em diferentes tecidos, conflui para a remissão da inflamação e para o resgate da homeostase metabólica. Assim, a hipótese deste trabalho pautou-se em verificar a modulação do fenômeno inflamatório e de estresse de retículo endoplasmático na aorta de animais obesos e resistentes à insulina, com enfoque na expressão e ativação do receptor GPR120, ativado por ácidos graxos ω 3.

OBJETIVOS

Geral

Descrever a participação do receptor GPR120, ativado por ácidos graxos ômega-3, na inflamação e no estresse de retículo endoplasmático na aorta de camundongos *Swiss* e LDLr^{-/-} obesos e resistentes à insulina.

Específicos

Caracterização do Modelo Experimental

A – Induzir obesidade e resistência à insulina nos animais experimentais, através da dieta rica em gordura saturada (DIO).

B – Avaliar a expressão de proteínas pró e anti-inflamatórias e das proteínas de estresse de retículo na aorta.

C – Avaliar a presença do receptor GPR120 ou homólogos na aorta.

Avaliação da Modulação do Receptor via Dietas Experimentais

D – Avaliar o perfil de ácidos graxos da aorta após consumo de dieta contendo ômega-3. **E** – Avaliar a modulação da expressão do receptor GPR120 mediante o consumo de dietas experimentais.

Fase 3 – Descrições Mecanísticas

F – Avaliar a expressão das proteínas da via da insulina na aorta.

G – Avaliar o estado da inflamação na aorta de animais tratados oralmente com ácidos graxos ômega-3.

H – Avaliar se o mecanismo pelo qual os ácidos graxos ômega-3 executam suas ações é mediado pelas proteínas GPR120, β -arrestina-2 e TAK-1.

Capítulo I - ARTIGO

Omega-3 Sources Does Not Require GPR120 to Protect Aorta Against Inflammation and Reticulum Stress from Obese Mice

Authors: Assis AM¹, Afonso MS², Morari J³, Oliveira V¹, Santos GA⁴, Lottenberg AM², Catharino R⁴, De Souza CT⁵, Velloso LA³, da Silva AS⁶, Ropelle ER⁷, Pauli JR⁷, Cintra DE^{1,8 *}

¹Laboratory of Nutritional Genomics – School of Applied Sciences of University of Campinas

²Lipids Laboratory (LIM10) – Faculty of Medical Sciences of University of São Paulo

³Laboratory of Cell Signaling – Faculty of Medical Sciences of University of Campinas

⁴INNOVARE Biomarkers Laboratory – Faculty of Medical Sciences of University of Campinas

⁵Exercise Biochemistry and Physiology Laboratory – University of Extreme South of Santa Catarina

⁶School of Physical Education and Sport of Ribeirão Preto, University of São Paulo

⁷Laboratory of Molecular Biology of Exercise – School of Applied Sciences of University of Campinas

⁸Nutrigenomics and Lipids Center – School of Applied Sciences of University of Campinas

* Corresponding author: Prof. Dr. Dennys Esper Cintra, Laboratory of Nutritional Genomics – Faculty of Applied Sciences of University of Campinas, R. Pedro Zaccaria 1300, Limeira/SP, Brasil. Tel: +055 019 3701-6715, e-mail address: dcintra@yahoo.com

Objective: Several researches have reported the n-3 unsaturated fatty acid anti-inflammatory effects on obesity, insulin resistance and cardiovascular system, but the obesity-associated inflammation and ER stress modulation in mice aorta by these lipids are not fully defined. This prompted us to investigate if these pathways are modulated by activation of the n-3 fatty acid receptor GPR120 in mice aorta with a flaxseed oil-enriched hyperlipidic diet.

Methods and Results: To test this hypothesis, we fed Swiss and LDLr-KO mice with chow (CT), high-fat (HF) and flaxseed oil (FS) substituted on 10% of lard of high-fat diet composition. There were no difference in body weight and food intake in both Swiss and LDLr-KO mice, however glucose tolerance test and cholesterol levels was improved ($P<0.05$) in FS group of both mice models. Lipidomics shown an increase on n-3 content on endothelial tissue from FS group, instead stearic fatty acid (C18:0) on HF group. FS markedly decreased pro-inflammatory and UPR markers (IL-1 β , TNF- α , P-I κ B α , SOCS-3, pPERK, IRE1 α , ATF6 and GRP78) in aorta ($P<0.05$). GPR120 was partially involved at anti-inflammatory activity developed by n-3, but not in LDLr-KO model. Insulin signaling was partially restored on Swiss mice FS group, but not in LDLr-KO aorta.

Conclusions: The partial replacement of saturated by unsaturated n-3 fatty acids sources seems contribute, at least in part, to reduction of cardiovascular risk markers and effectively to decrease pro-inflammatory cytokines and UPR stress sensors and effectors in aorta. However these mechanisms were not due the arterial GPR120 activation.

Keywords: Obesity, Inflammation, ER stress, n-3 fatty acids, GPR120

1. Introduction

Obesity is associated with several metabolic disorders, including insulin resistance and dyslipidemia, which are risk factors for development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases (1).

Hotamisligil made the first robust evidence linking inflammation to obesity in 1993, when he and colleagues identified increased levels of TNF- α in adipose tissue of obese mice (2). After, the metabolic overload was associated with a stress insult that interferes in ER proper function, culminating in ER stress (3). Nevertheless, the acute response to overnutrition was linked with TLR-4 activation by saturated fatty acids (4). Currently several reports indicate the TLR-4 and ER stress acting as triggers of wide metabolic inflammation, which predisposes the organism to harmful cardiometabolic consequences. Still, direct effects of inflammation and ER stress has being shown on arterial wall, characterizing the “first hit” of atherogenesis (5,6,7,8).

One of the most common dietary approach to provide protection against obesity-associated diseases is the increase in dietary intake of n-3 polyunsaturated fatty acids (12,13). Since Bang and Dyeberg’s findings of low prevalence of coronary heart disease among Eskimos (Inuits) probaly due the high marine n-3 intake, many basic researches and clinical trials focuses on the cardioprotective effects of fish oils (9–12). The mechanisms underlying the cardioprotection indicates that n-3 fatty acids acts in a plethora of signaling pathways, including inflammation, proresolving lipid mediators and modulation of genes involved in fatty acid synthesis and oxidation (13).

In 2010 a new mechanism by which n-3 fatty acids exercts anti-inflammatory effects was proposed. Through EPA and DHA binding and activation of the receptor GPR120, the TLR4 and TNFR signaling is inhibited (16). Recently our group demonstrate that n-3-rich diets reduced inflammation in hypothalamus, liver, skeletal muscle and white adipose tissue and these observed phenomenons was abolished under GRP120 inhibition (17, 18). Based on this studies, we evaluated inflammatory and ER stress markers mice and the activation of GPR120 in aorta of Swiss and LDLrKO. Our data demonstrate that the n-3-rich diets abrogated pro-inflammatory cytokine production and reduced ER stress proteins, mainly in Swiss mice and improved the plasma lipid profiles of both mouse models.

2. Materials and Methods

Detailed methods are available as Supplemental materials

2.1. Experimental animals

All experiments were conducted in accordance with the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals and the University of Campinas Ethical Committee approved all procedures (protocol 3812-1). Swiss and LDLr-KO male mice, 4 wk old were obtained from the UNICAMP Breeding Center. All animals received food and water *ad libitum* and were maintained in cages at 21 ± 2 °C with a 12-hour dark/12-hour light cycle. They were fed with standard rodent chow (CT) or a high-fat diet (HF) for eight weeks. After, control animals remained with standard chow, while mice on HF were subdivided into two groups: one of them maintained on HF and the other (FS) with flaxseed oil in a replacement of 10% of total lard amount from HF, as described in Table 1. The general protocol is presented in Figure S1. The diets were prepared in accordance with the AIN-93G (19). Mice received fresh diet every third day and food intake and body mass were evaluated twice a week.

2.2. Intraperitoneal Glucose Tolerance Test (GTT)

Following 4 hours of fasting, we re-fed the animals for 1 hour. After another 3 hours of fasting we collected the first blood sample from tail vein ($t=0$). Thereafter, a solution of 20% of glucose (2.0 g/kg body weight) was administered i.p. and the blood samples were collected from 0, 30, 60, 90 and 120 minutes for determination of serum glucose with Accutrend Plus equipment (Roche, Switzerland). Results are presented as the area under curve.

2.3. Intraperitoneal Insulin Tolerance Test (ITT)

Similar to GTT fasting, we collected the first blood sample from tail vein ($t=0$). Thereafter, 1 U/kg body weight⁻¹ of insulin were injected i.p. and blood samples were collected from 0, 5, 10, 15 and 20 minutes for determination of serum glucose. The constant for the rate of serum glucose disappearance was calculated using the formula $0.693/t_{1/2}$. The half-life plasma glucose was calculated from the slope of last square analysis of the plasma glucose concentration during the linear phase of decline.

2.4. Serum lipids

Total cholesterol, triglyceride, LDL-c and HDL-c in blood serum were measured using enzymatic reagents to colorimetric assays from Laborlab (São Paulo, Brazil).

2.5. Antibodies, chemicals and buffers

The reagents for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting were from Bio-Rad (Richmond, USA). The reagents for chemoluminescence labeling of proteins in blot were from Amersham (Aylesbury, UK). The antibodies used are detailed in Supplements.

2.6. Analysis of gene expression by real-time quantitative RT-PCR

The mRNA of SCD1 Mm00772290_m1, MCP-1 Mm99999056_m1, GPR 120 Mm00725193_m1 and GPR40 Mm00809442_s1 in aorta was analysed using an ABI Prism 7700 sequence detection system (Applied Biosystem). Each sample was assayed in triplicate. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH # 4352338E) gene was used as a housekeeping gene to normalize levels of the transcripts.

2.7. Western Blotting and Immunoprecipitation

Aorta samples containing 110 µg of protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes using a Trans-blot Semi-dry transfer from Bio-Rad (Richmond, USA). The bands were labeled by chemiluminescence and its visualization was performed by ImageQuant LAS 4000 from GE Healthcare Life Sciences (Uppsala, Sweden).

2.8. Lipidomics for detection of fatty acids contents in aorta

The mice aorta samples were submitted to a customized lipid extraction, as described by Catharino *et al.* (2005) (20). Lipid extracts were resuspended in 50 µL of H₂O milliQ, and 10 µL of the latter was diluted in 990 µL of methanol. This solution was added 0.1% ammonium hydroxide to assist ionization in the negative mode. Data acquisition was performed in an ESI-LTQ-XL instrument (Thermo Scientific, Bremen, Germany). Spectra were acquired over 60 seconds in the negative ion modes, at the *m/z* range of 150 to 600.

2.9. Immunofluorescence assay

After perfusion with phosphate-buffered saline (PBS), the hearts were embedded in OCT compound (Sakura Finetek, Torance, CA) and frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Cryostat sections (8µm) of the aortic root were obtained and were blocked and incubated with polyclonal anti-goat GPR120 1:200 (sc-48203). After washing, the sections were incubated with secondary antibody conjugated with FITC 1:100 (sc-2024) and covered and mounted with Vectashield Mounting Medium with DAPI (#H-1200 Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA). The images were acquired by a confocal laser microscope LEICA TCS SP5 II (Wetzlar, Germany)

Statistical analysis

The bands of western blotting were quantified by digital densitometry (UN-SCAN-IT gel 6.1.). For variables with normal distribution, Student's t test was used to compare two independent samples (CT vs HF and HF vs FS groups). The significance level was chosen as $P < 0.05$.

3. Results

3.1 FS does not reduce food intake and body mass in Swiss and LDLrKO

Swiss and LDLrKO were fed an HF diet for 8 weeks and then divided into two groups for another 8 weeks on the same HF diet or HF diet with partial isocaloric substitution (10%) of diet lard by FS. The FS did not alter food intake when compared to HF and body mass during last 8 weeks of treatment, as showed in Figure 1.

3.2 FS change aorta lipid composition

The tecidual incorporation of fatty acids predisposes the generation of many different biological mediators, in accordance with the chemistry structure of the lipids. The FS resulted in a modification of the aorta fatty acid composition as compared to HF (Figure 2), with a peculiar decrease of 18:0 (saturated stearic acid).

3.3 FS improve glucose homeostasis in Swiss but not in LDLrKO mice

The first 8 weeks with HF diet leads to insulin resistance in experimental animals. To determine the efficacy of the FS on glucose homeostasis, Swiss mice were submitted to glucose (GTT) and insulin tolerance test (ITT) and LDLrKO to glucose tolerance test. As

depicted in Figure 3, FS reduced area under the curve during GTT (Figure A1) and significantly increased the phosphorylation of IR and IRS-1 upon insulin stimulation (Figure C), but no significant reductions in K_{it} have been observed in Swiss mice among CT, HF and FS (Figure B). In LDLrKO model, FS did not improve GTT, as observed in Figure D.

3.4 Positive effects on plasma lipids and lipoprotein profile in FS group

There is an indubitable positive correlation between plasma cholesterol and cardiometabolic risk. In order to evaluate this criteria, we found a greater atherogenic lipid profile in FS compared to the HF (Figure 4) either in Swiss or LDLrKO experimental animals.

3.5 FS reduce inflammatory and ER stress markers in aorta

Mice fed HF presented increased levels of inflammatory and ER stress protein expression levels in aorta and FS produced significant reductions in this proinflammatory and stress markers, mostly in Swiss mice. As observed in Figure A, there were reduction in IL-1 β , TNF- α and SOCS-3 in Swiss and P-IkBa in LDLrKO (Figure C). On the other hand, FS showed highest protein amount of the anti-inflammatory IL-10 in both experimental models. In addition, the ER stress protein markers pPERK, IRE1 α , ATF-6, p α IF2 α , XBP-1s and GRP 78 were decreased in aorta of FS Swiss mice (Figure B) and the GRP 78 protein level was reduced in LDLrKO too (Figure D).

3.6 FS produces different GPR 120 activation responses in Swiss and LDLrKO and do not alter TAK1 and TAB1 association from TLR pathway

To investigate if the long-chain fatty acid receptor GPR120 is expressed in aorta, a PCR-RT was performed and detected high mRNA expression of this receptor in both HF and FS (Figure S2 - C). Upon FS, which have more EPA and DHA contents than HF, GPR120 undergoes a significant association with the scaffolding protein β -arrestin 2 (Figure A) in Swiss mice but not in LDLrKO (Figure C). However, this was not accompanied by TAK1 and TAB1 dissociation in both experimental models (Figures B and D).

4. Discussion

There is an increase in global burden of obesity and the cardiovascular mortality risks associated are present in many obese people (21). Body fat distribution, particularly

ectopic fat deposition, seems to be preponderant to determine incidence of cardiovascular disease in obese adults (22–24).

Recent studies have established the molecular mechanisms that driven the systemic chronic and low-grade inflammation in obesity and the elevated inflammatory status appears to play a pivotal role in insulin resistance, type 2 diabetes and cardiovascular diseases (25,26). HFD feeding promotes several alterations in genes associated with inflammatory responses through an upstream activation of TLR 4 by saturated fatty acids and ER stress engagement (27,28).

It has recently been suggested that long chain fatty acids are able to activates several GPCRs and the GPR120 emerged as an mediator of anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects of n-3 unsaturated fatty acids in hypothalamus, liver, adipose tissue and muscle (17,18,29).

In the current study, we hypothesized whether a partial replacement of lard by flaxseed oil, rich in n-3 PUFAs, is capable of reducing inflammatory and ER stress proteins expression in aorta of obese Swiss and LDLrKO mice and asked if these effects are mediated by GPR120. First, we evaluated the effect of fatty acid substitution on whole body glucose homeostasis and insulin action and we observed a restoration of glucose homeostasis in Swiss mice, indepedently of body weight and caloric intake, but no in LDLrKO, and the insulin action was not improved. Despite the unchanged ITT with FS, the effect on glucose homeostasis by these unsaturated fatty acids probaly was due several mechanisms: (1) reduction of inflammatory cytokines and stress kinases (30); (2) activation of gut GPR120 that regulates the release of incretin glucagon-like peptide-1 (GLP-1) (31); (3) through the $G_{\alpha q/11}$, a subunit of G protein of GPR120 that acts directly activating PI3K (32).

Next, we performed a lipidomic assay in aorta of Swiss mice and detected the dietary fatty acids incorporated into plasma membranes. Interestingly, FS reduced stearic acid (18:0) of the aorta, elevated oleic acid (18:1) contents and this was not dependent of SCD-1. Addionally, there was an increase in relative amount of linolenic acid (18:3) in FS group.

To verify the effects of n-3 on plasma lipoproteins, we measured the cholesterol fractions and testify the lowest plasma concentrations of LDL-c in both experimental models. Moreover, the FS increases the HDL-c in Swiss mice and decreased TG levels of LDLrKO. The improvement in the lipid profile due fatty acid substitution probaly was due the well-known hypotriglyceridemic effects of n-3 (33), by reducing SREBP-1c levels (34),

upregulating fatty acid oxidation through PPAR- α activation (35) and modulating LXR α in order to decrease the activity of lipogenic enzymes like ACC and FAS (36).

Dietary fatty acids modulate inflammatory pathways and the anti-inflammatory properties of n-3 has been showed since 70's decade with the classic Eskimos study conducted by Dyeberg and Bang (11). Here, mice fed FS had markedly reduction in inflammatory markers in aorta, mainly in Swiss. This was accompanied by increased expression of the anti-inflammatory IL-10. Despite FS LDLrKO not showed an overall remission in the inflammatory proteins, reduced phosphorylation of I κ B α and elevated IL-10 are indicatives of less inflammatory injury in aorta of these mice. Additionally, FS was effective disrupting ER stress proteins, providing an additional benefits of n-3. Our present findings showed a remission of inflammation and stress responses, with modulation of these pathways at several levels by n-3.

Finally, we showed that GPR120 is expressed and activated in aorta of Swiss mice in response to FS diet, but this was not able to inhibit TAK1 and TAB1 association in both experimental models. Although n-3 exerted many positive effects on inflammatory and ER stress proteins, these modulations seems to occur indepedently of GPR120 and future studies are needed to determine whether ingestion of these fatty acids can attenuates the inflammation and the ER stress through another pathway.

5. Conclusions

In conclusion, this work reinforces that n-3 fatty acids play a crucial role in the prevention of atherogenesis, even in a high-fat consumption, through the remission of vascular abnormalities in an early-stage, targeting inflammatory and ER stress markers.

Funding

This study was supported by a grant from São Paulo Research Foundation (FAPESP Process 2012/07129-6).

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Erika Anne, Marcio Cruz, and Gerson Ferraz for technical assistance.

Conflicts of interest

None.

References

1. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:415–45.
2. Hotamisligil G, Shargill N, Spiegelman B. Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor α : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Science.* 1993;259(5091):87–91.
3. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee A-H, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* 2004;306(5695):457–61.
4. Shi H, Kokoeva M V, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116(11):3015–25.
5. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol.* Nature Publishing Group; 2011;12(3):204–12.
6. Tabas I. The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis. *Circ Res.* 2010;107(7):839–50.
7. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis. *Nat Med.* 2010;16(4):396–9.
8. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):900–17.
9. White PJ, Marette A. Potential role of omega-3-derived resolution mediators in metabolic inflammation. *Immunol Cell Biol.* 2014;92(4):324–30.
10. Ulven T, Christiansen E. Dietary Fatty Acids and Their Potential for Controlling Metabolic Diseases Through Activation of FFA4/GPR120. *Annu Rev Nutr.* 2015;35(1):239–63.
11. Dyerberg J, Bang HO. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet.* 1979;2(8140):433–5.
12. Adkins Y, Kelley DS. Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem. Elsevier B.V.;* 2010;21(9):781–92.

13. De Caterina R. N-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2011;364(25):2439–50.
14. Weintraub H. Update on marine omega-3 fatty acids: Management of dyslipidemia and current omega-3 treatment options. *Atherosclerosis*. Elsevier Ltd; 2013;230(2):381–9.
15. Davidson MH. Mechanisms for the Hypotriglyceridemic Effect of Marine Omega-3 Fatty Acids. *Am J Cardiol*. 2006;98(4 SUPPL. 1):27–33.
16. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, et al. GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell*. 2010;142(5):687–98.
17. Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, Pauli JR, Morari J, de Souza CT, et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One*. 2012;7(1).
18. Oliveira V, Marinho R, Vitorino D, Santos G, Moraes J, Dragano N, et al. Diets containing alpha-linolenic (omega 3) or oleic (omega 9) fatty acids rescues obese mice from insulin resistance. *Endocrinology*. 2015. 1880.
19. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. 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*. 1993;123(11):1939–51.
20. Catharino RR, Haddad R, Cabrini LG, Cunha IBS, Sawaya ACHF, Eberlin MN. Characterization of vegetable oils by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting: Classification, quality, adulteration, and aging. *Anal Chem*. 2005;77(22):7429–33.
21. Skinner AC, Perrin EM, Moss L a., Skelton J a. Cardiometabolic Risks and Severity of Obesity in Children and Young Adults. *N Engl J Med*. 2015;373(14):1307–17.
22. Tchernof A, Després J-P. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev*. 2013;93(1):359–404.
23. Després J-P, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, et al. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(6):1039–49.
24. Lee HY, Després JP, Koh KK. Perivascular adipose tissue in the pathogenesis of

- cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2013;230(2):177–84.
25. Hotamisligil GS, Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):923–34.
 26. Febbraio M a. Role of interleukins in obesity: Implications for metabolic disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(6):312–9.
 27. Cnop M, Foufelle F, Velloso L a. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med*. 2012;18(1):59–68.
 28. Velloso L a, Folli F, Saad MJ. TLR4 at the crossroads of nutrients, gut microbiota and metabolic inflammation. *Endocr Rev*. 2015;36(3):245–71.
 29. Cornall LM, Mathai ML, Hryciw DH, McAinch AJ. GPR120 agonism as a countermeasure against metabolic diseases. *Drug Discov Today*. Elsevier Ltd; 2014;19(5):670–9.
 30. Zhang D, Leung PS. Potential roles of GPR120 and its agonists in the management of diabetes. *Drug Des Devel Ther*. 2014;8:1013–27.
 31. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med*. 2005;11(1):90–4.
 32. Imamura T. Endothelin-1-induced GLUT4 Translocation Is Mediated via Galpha q/11 Protein and Phosphatidylinositol 3-Kinase in 3T3-L1 Adipocytes. *J Biol Chem*. 1999;274(47):33691–5.
 33. Lottenberg AM, Afonso MDS, Lavrador MSF, Machado RM, Nakandakare ER. The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. *J Nutr Biochem*. Elsevier Inc.; 2012;23(9):1027–40.
 34. Kim H, Takahashi M, Ezaki O, Chem JB. CELL BIOLOGY AND METABOLISM : Fish Oil Feeding Decreases Mature Sterol Regulatory Element-binding Protein 1 SREBP-1c mRNA in Mouse Liver : A DOWN-REGULATION OF LIPOGENIC ENZYME mRNAs Fish Oil Feeding Decreases Mature Sterol Regulatory Element-binding Prot. 1999;1(36):25892–8.
 35. Sampath H, Ntambi JM. Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Genes of Lipid Metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2005;25(1):317–40.
 36. Yoshikawa T, Shimano H, Yahagi N, Ide T, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, et al.

- Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J Biol Chem.* 2002;277(3):1705–11.
37. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.

Figure Legends

1 FS does not reduce food intake and body mass in Swiss and LDLrKO

(A)- Food Intake of swiss mice - Mean daily *ad libitum* food intake (Kcal) of Swiss mice fed on regular chow- (CT), high-fat diet- (HF), flaxseed- (FS) substituted (10%) diets for eight weeks; results are depicted as daily food intake calories along the time.

(B)- Body Weight of swiss mice - Body mass gain for each group during the 8 last weeks under experimental diets.

(C)- Body Weight of LDLrKO mice - Body mass gain for each group during the 8 last weeks under experimental diets.

(D)- Epididymal Adipose Tissue of LDLrKO mice – Epididymal fat mass (g) at the end of the experimental period.

2 FS change aorta lipid composition

Mass Spectrum of Fatty Acid Fingerprint on Aorta of Swiss mice - The metabolic fingerprint analyses emphasize the overall distribution of lipid molecular species obtained directly from aorta of swiss mice fed with CT (A), HF (B) or FS diets (C). As depicted, the A, B and C panels shows fatty acids abundance defined by MALDI-MS in the sample. The conditions for lipid analysis were described in Methods.

3 FS improve glucose homeostasis in Swiss but not in LDLrKO mice

(A)- Glucose Tolerance Test of swiss mice – Blood glucose levels of Swiss mice fed with regular chow (CT), high-fat diet (HF) or flaxseed (FS)-substituted (10%) diets at the end of an eight-week experimental period and (A1) the area under curve (AUC) during the intraperitoneal GTT.

(B)- Insulin Tolerance Test of swiss mice – Blood glucose levels and the (B1) constant for glucose decay (K_{itt}) during the intraperitoneal ITT.

(C)- Phosphorylation of IR and IRS1 in aorta of swiss mice – Insulin-induced phosphorylation of IR (Tyr 1162/1163) and IRS1 (Tyr 989) was determined using an immunoblot of total aorta protein extracts that were obtained from swiss mice treated with a single intravenous (portal vein) bolus injection of saline (-) or insulin (+).

(D)- Glucose Tolerance Test of LDLrKO mice - Blood glucose levels of LDLrKO mice fed with regular chow (CT), high-fat diet (HF) or flaxseed (FS)-substituted (10%) diets at the end of an eight-week experimental period and (D1) the area under curve (AUC) during the intraperitoneal GTT.

4 Positive effects on plasma lipids and lipoprotein profile in FS group

Plasma analyses carried out at the end of the eight-week experimental treatment for evaluation of: (A)- Total Cholesterol of swiss mice; (B)- Triglycerides of swiss mice; (C)- LDL-c of swiss mice; (D)- HDL-c of swiss mice; (A1)- Total Cholesterol of LDLrKO mice; (B1)- Triglycerides of LDLrKO mice; (C1)- LDL-c of LDLrKO mice and (D1)- HDL-c of LDLrKO mice.

5 FS reduce inflammatory and ER stress markers in aorta

Extracts obtained from aorta of swiss and LDLrKO mice fed on regular chow (CT), high-fat diet (HF) and flaxseed (FS)-substituted (10%) diets at the end of an eight-week experimental period were used in immunoblotting experiments to evaluate protein contents of (A)- Inflammatory markers in aorta of swiss mice; (B)- UPR markers in aorta of swiss mice; (C)- Inflammatory markers in aorta of LDLrKO mice and (D)- UPR marker in aorta of LDLrKO mice.

(Abbreviations: IL-1 β – interleukin-1 beta; TNF- α – tumor necrosis factor-alpha; SOCS- suppressor of cytokine signalin-3; IL-10 – interleukin-10; pJNK – phospho c-Jun N-terminal kinase; pI κ B α – phospho inhibitor kinase B alpha; pPERK – phospho protein kinase RNA-like endopasmic reticulum kinase; IRE1 α – inositol requiring enzyme 1 alpha; ATF 6 – activating transcription fator 6; peIF2 α – phospho eukaryotic initiation fator 2; XBP-1s – spliced X-box binding protein-1; GRP 78 – glucose-regulated protein-78).

6 FS produces different GPR 120 activation responses in Swiss and LDLrKO and do not alter TAK1 and TAB1 association from TLR pathway

By targeting and immunoprecipitation (IP) of β -arrestin 2 with specific antibody, the intact protein complexes with immunoblot (IB) GPR120 was evaluated for analyse the GPR120 activation by the different experimental diets and by targeting (IP) TAK 1 and (IB) TAB1 was evaluated the pro-inflammatory step of TLR and TNFR signaling in aorta. For this technique, 1000 μ g of total protein aorta extracts were utilized.

(A)- Immunoprecipitation for detection of GPR120 and β -arrestin 2 association in aorta of swiss mice; (B)- Immunoprecipitation for detection of TAK1 and TAB1 association in aorta of swiss mice; (C)- Immunoprecipitation for detection of GPR120 and β -arrestin 2 association in aorta of LDLrKO mice and (D)- Immunoprecipitation for detection of TAK1 and TAB1 association in aorta of LDLrKO mice.

Table 1. Composition of the diets

Ingredients	Control Diet (CT)	High Fat Diet (HFD)	Flaxseed oil substituted (FS)
	(1000 g)	(1000 g)	(1000 g)
Corn Starch	427,5	115,5	115,5
Casein	200	200	200
Dextrinated Starch	132	132	132
Sucrose	100	100	100
Soybean oil	40	40	40
Flax Seed oil	0	0	104
Lard	0	312	208
Cellulose	50	50	50
Mineral Mix	35	35	35
Vitamin Mix	10	10	10
L-Cystein	3	3	3
Choline	2,5	2,5	2,5
Total	1000	1000	1000

Figure S1. Experimental Design

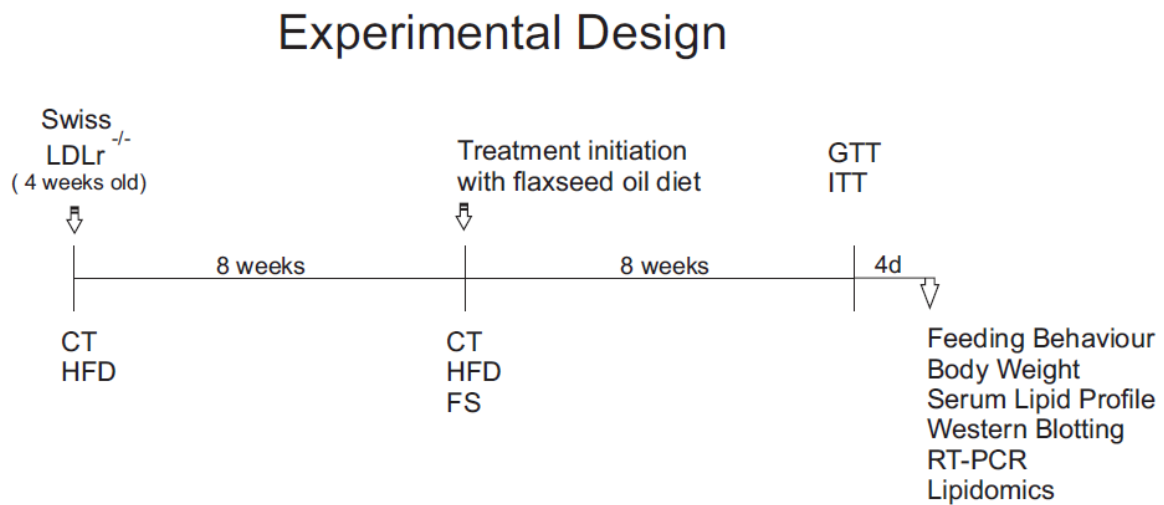


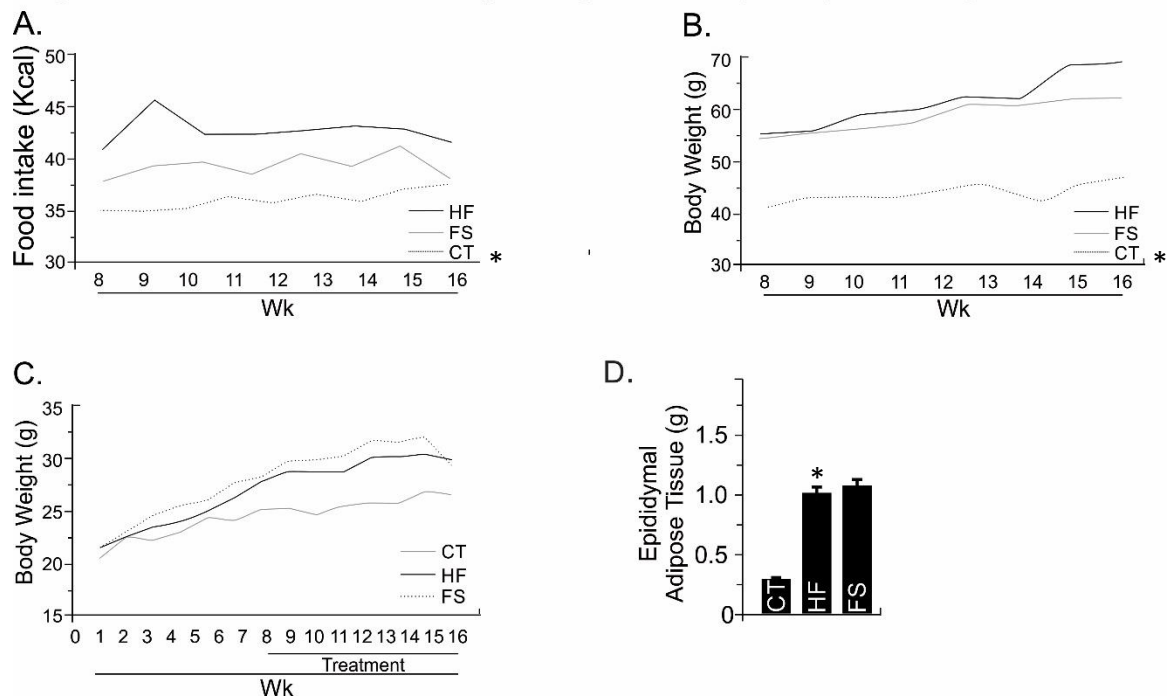
Figure S1. Four-week old male Swiss and LDLrKO were fed with regular chow (CT) or high-fat diet (HFD) for eight weeks and then randomly divided into 3 another groups: CT mice were maintained for another eight weeks with regular chow; HFD mice were maintained with HFD or transferred to diets containing 10% substitution of lard by flaxseed oil and both were maintained for another eight weeks with its respective diets. At the end of the experimental period (16 weeks), the mice were submitted to glucose and insulin tolerance test (GTT and ITT) and four days later were sacrificed, blood samples were collected and the aorta was removed to Western Blotting, RT-PCR and Lipidomics analysis. During last 8 weeks the feeding behaviour and body weight were monitored twice per week.

Figure S2. mRNA analysed by RT-PCR

Total mRNA obtained from aorta was amplified to detect (A)- mRNA expression levels of SCD-1 in aorta of Swiss mice; (B)- mRNA expression levels of MCP-1 in aorta of Swiss mice; (C)- mRNA expression levels of HSP90B1 and HSPA5 in aorta of Swiss mice; (D)- mRNA expression levels of GPR120 in aorta of Swiss mice

Figures

Figure 1 - Food Intake, Body Weight and Epididymal Adipose Tissue



* $p < 0.05$ CT vs HF

Figure 2 - Lipidomics from swiss aorta

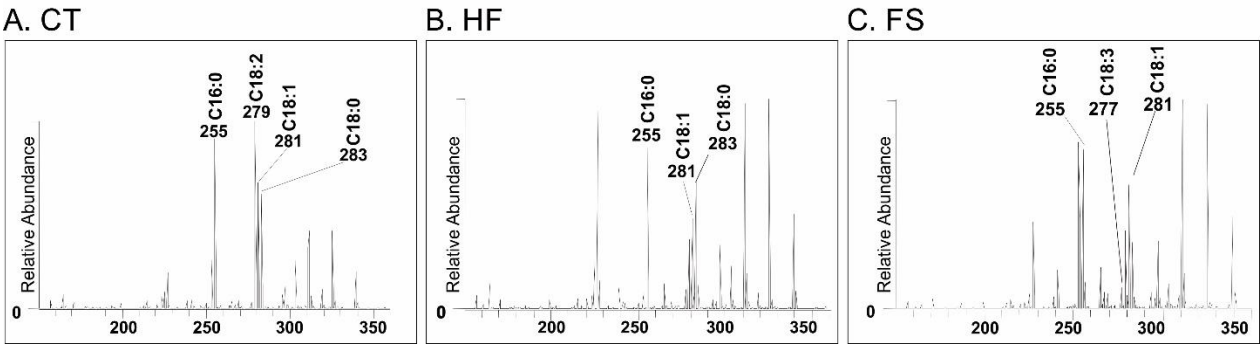
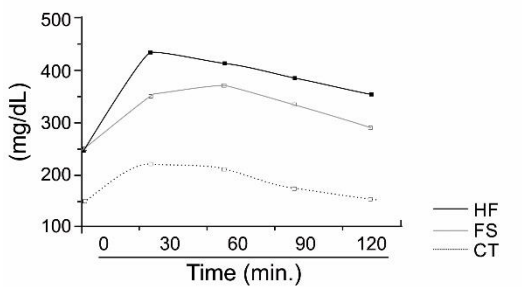
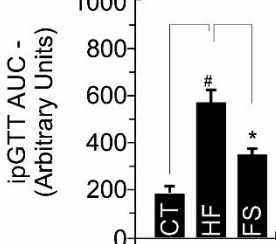


Figure 3 - Glucose Homeostasis

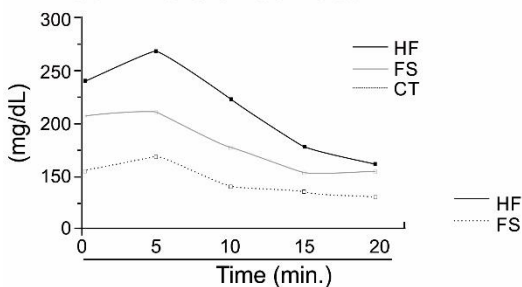
A. Glucose Tolerance Test



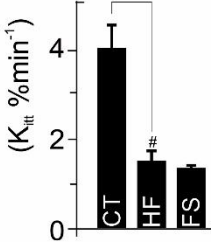
A1.



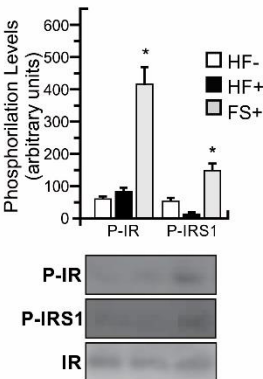
B. Insulin Tolerance Test



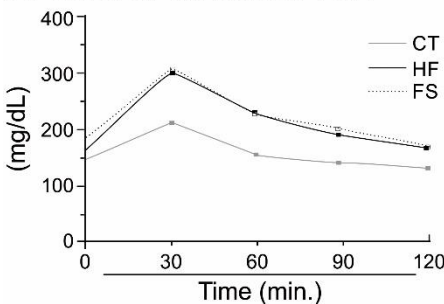
B1.



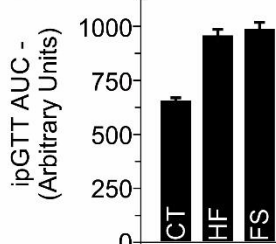
C. IR and IRS1 phosphorylation



D. Glucose Tolerance Test



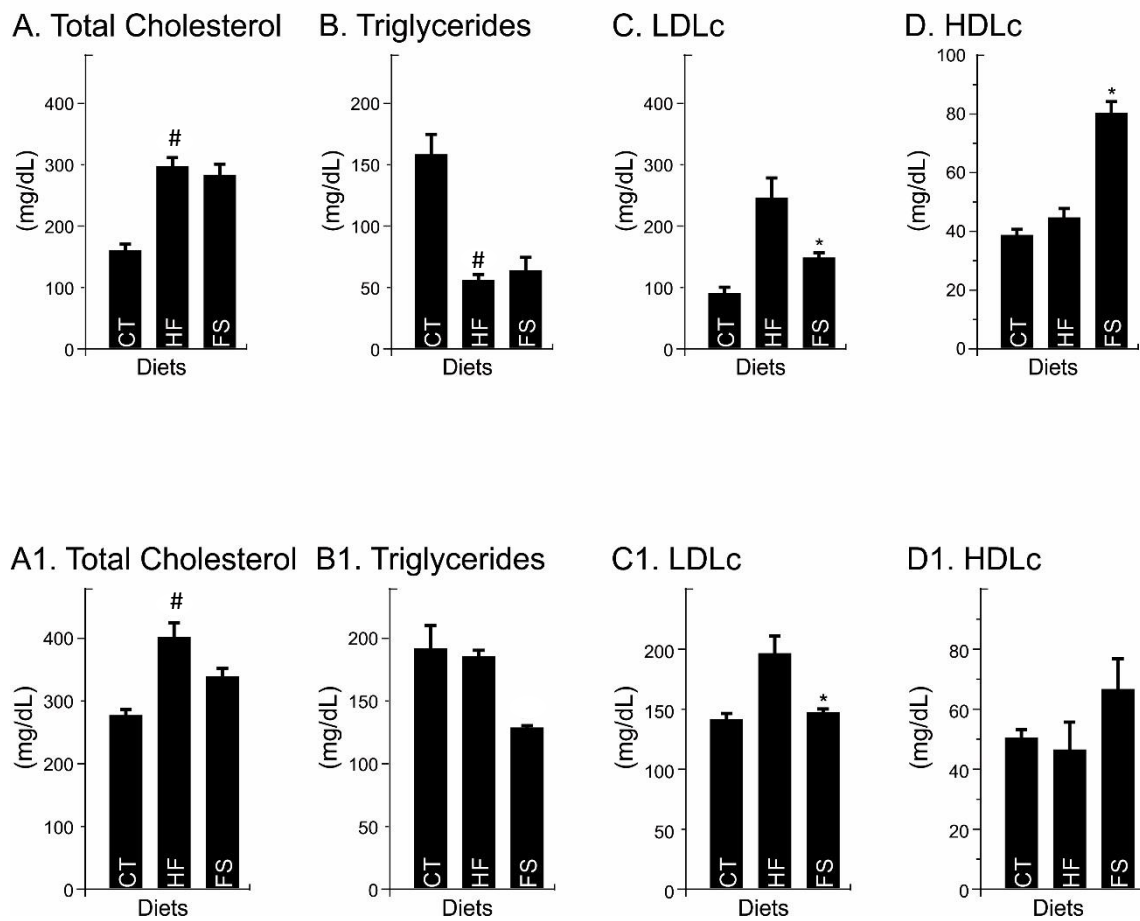
D1.



p<0,05 CT vs HF

* p<0,05 FS vs HF

Figure 4 - Plasma lipids and lipoprotein profile

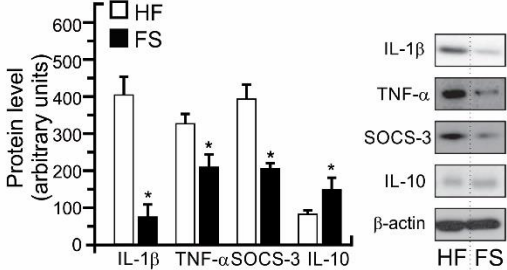


$p < 0,05$ CT vs HF

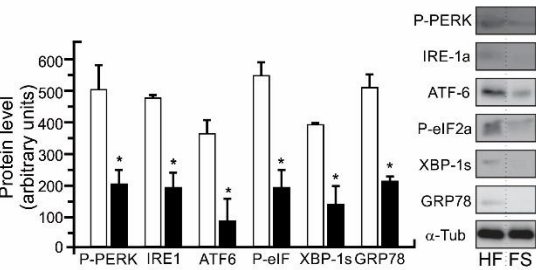
* $p < 0,05$ HF vs FS

Figure 5. Inflammatory and ER stress proteins expression in aorta

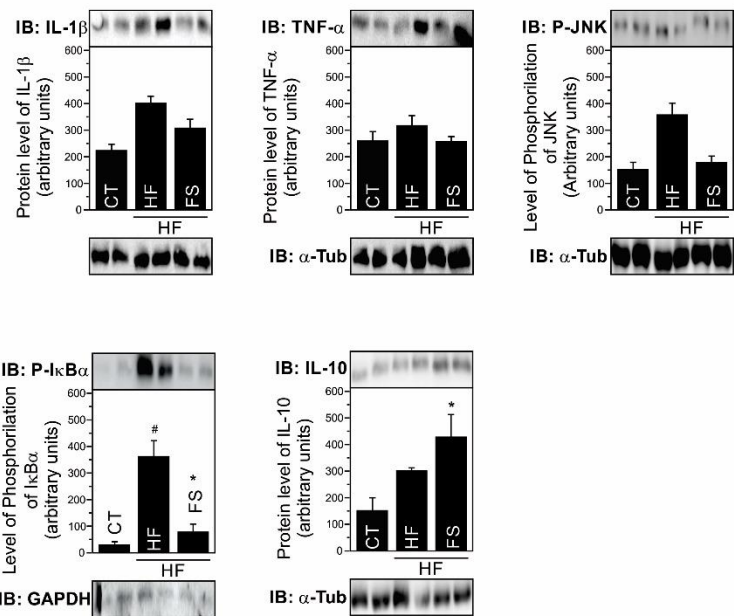
A. Inflammatory proteins expression in aorta



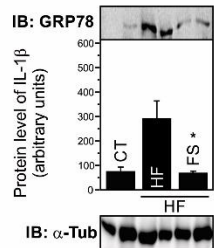
B. ER stress proteins expression in aorta



C. Inflammatory proteins expression in aorta



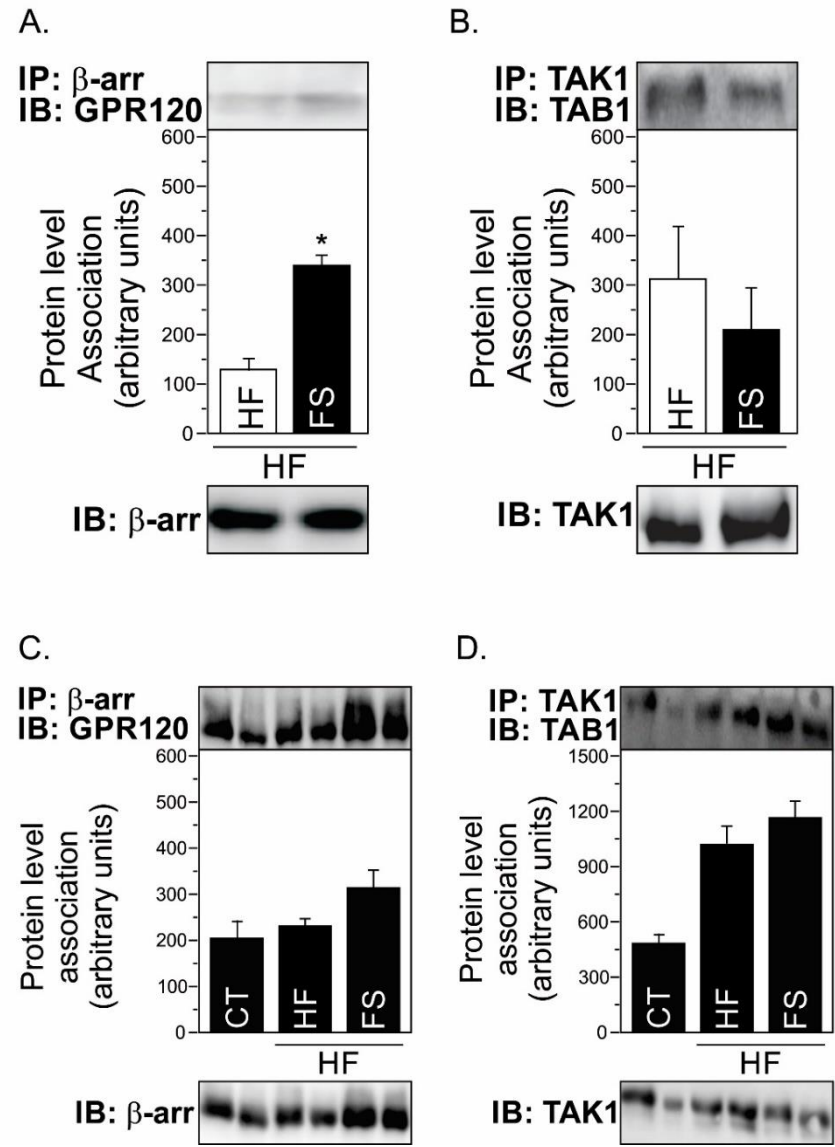
D. ER stress protein expression in aorta



p<0,05 CT vs HF

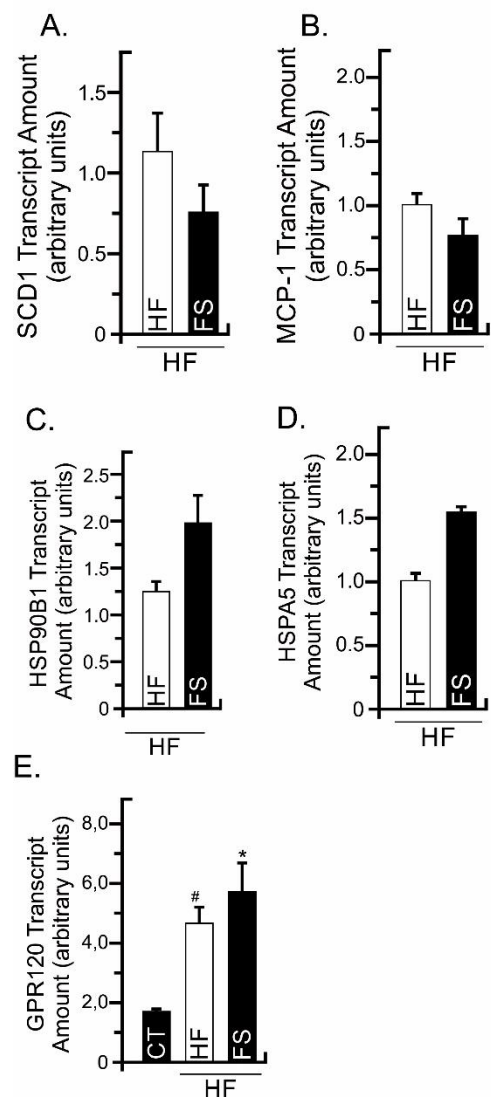
* p<0,05 HF vs FS

Figure 6. GPR120 activation and TAK1 and TAB1 association



* $p < 0,05$ HF vs FS

Figure S2. mRNA expression levels in aorta



p<0,05 CT vs HF

* p<0,05 HF vs FS

Figure S3. Immunofluorescence detection of GPR120 in aortic root of swiss mice

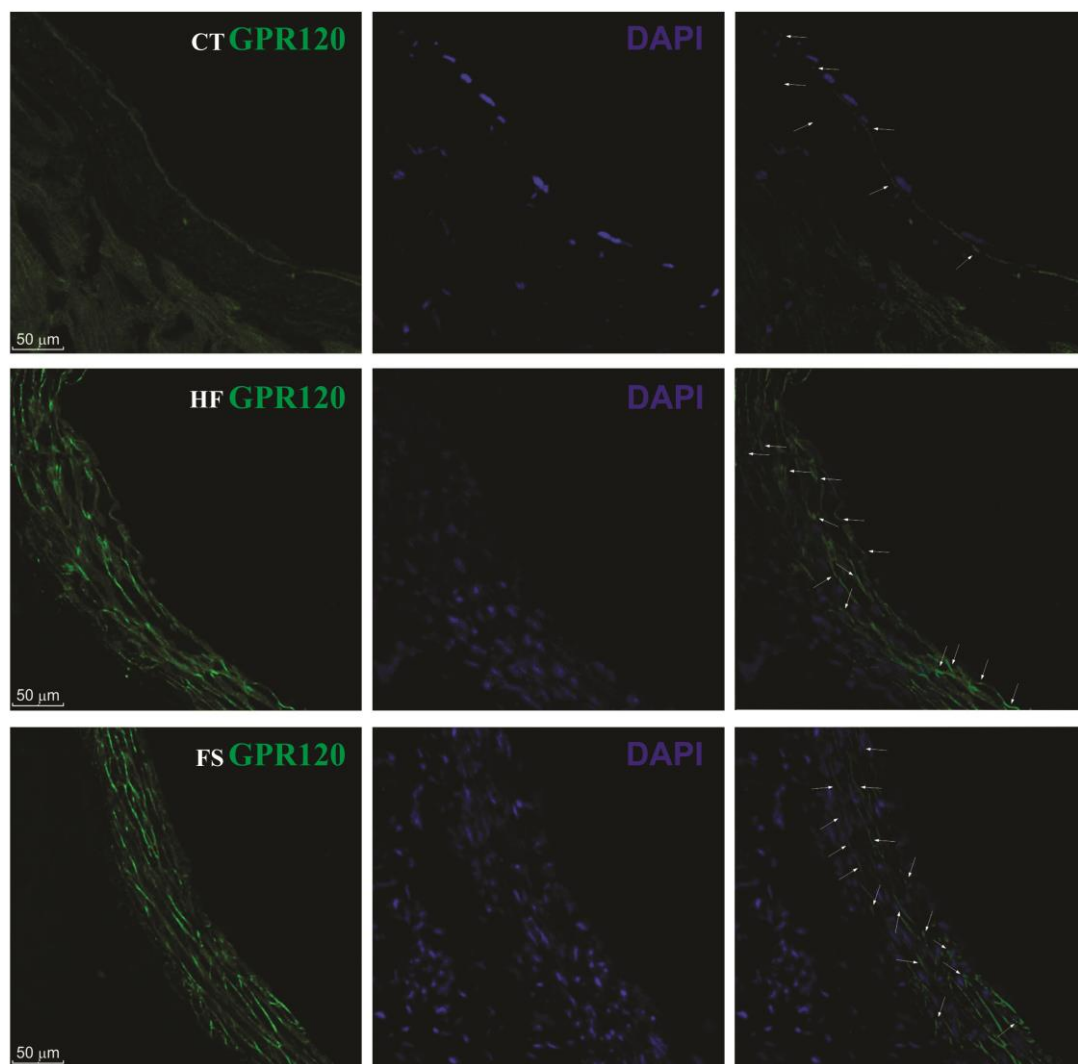
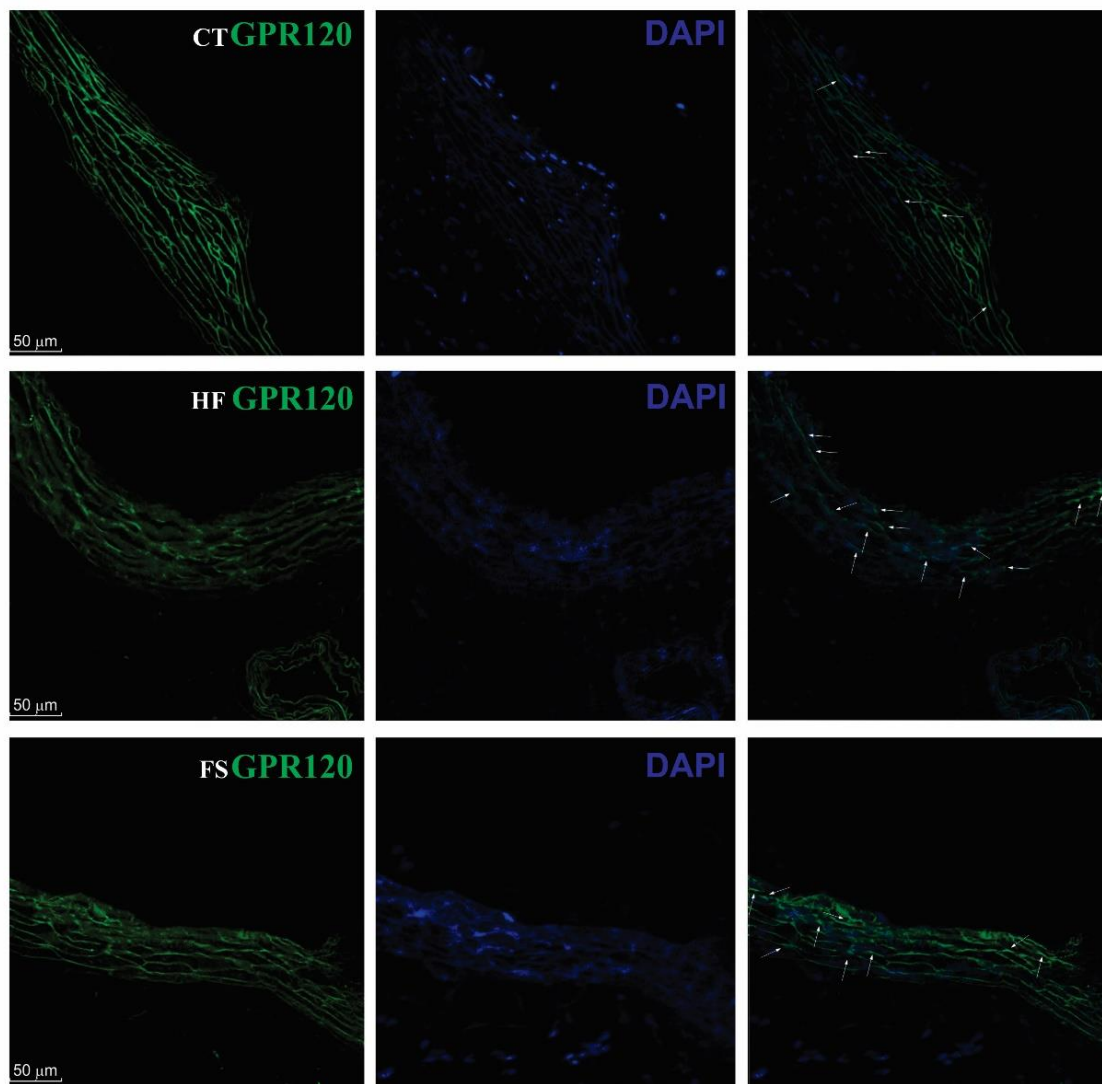


Figure S3. Immunofluorescence detection of GPR120 in aortic root of LDLrKO mice



Supplements (Detailed Methods)

Antibodies, Chemicals and Buffers

The reagents for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting were from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). HEPES, phenylmethylsulfonyl fluoride, aprotinin, dithiothreitol, Triton X-100, Tween 20, glycerol, bovine serum albumin (fraction V) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The reagents for chemoluminescence labeling of proteins in blots were from Amersham (Aylesbury, UK). Human recombinant insulin (Humulin R) were from Lilly (Indianapolis, IN, USA).

Table 2. Antibodies

Antibody	Manufacturer	Code	Dilution
IL-1β	BioLegend	503 502	(1:1000)
TNF-α	BioLegend	506 102	(1:1000)
XBP1s	BioLegend	619502	(1:1000)
ATF-6	Novus Biologicals	Imgenex: IMG-273	(1:1000)
TAB1	Cell Signalling	#3225	(1:1000)
pIκBα	Cell Signalling	9246	(1:1000)
pJNK	Santa Cruz Biotechnology	sc 6254	(1:1000)
SOCS-3	Santa Cruz Biotechnology	sc 9023	(1:1000)
IL-10	Santa Cruz Biotechnology	sc 1783	(1:1000)
pPERK	Santa Cruz Biotechnology	sc 32577	(1:1000)
IRE1α	Santa Cruz Biotechnology	sc 20790	(1:1000)
pϵIF2α	Santa Cruz Biotechnology	sc 101670	(1:1000)
GRP78	Santa Cruz Biotechnology	sc 13968	(1:1000)
β-arrestin 2	Santa Cruz Biotechnology	sc 13140	(1:1000)
GPR 120	Santa Cruz Biotechnology	sc 48203	(1:1000)
TAK1	Santa Cruz Biotechnology	sc 7967	(1:1000)

IR-β	Santa Cruz Biotechnology	sc 711	(1:1000)
pIR	Santa Cruz Biotechnology	sc 25103	(1:1000)
pIRS1	Santa Cruz Biotechnology	Sc 17200	(1:1000)
pJNK	Santa Cruz Biotechnology	sc 6254	(1:1000)
α-tubulin	Santa Cruz Biotechnology	sc 398103	(1:5000)
β-actin	Santa Cruz Biotechnology	sc 7210	(1:5000)

Intraperitoneal Glucose Tolerance Test

After 4 h of fasting the mice were 1 h refed and then submitted to more 3 h of fasting, we started the glucose tolerance test. After collection of an unchallenged sample (time 0), a solution of 20% glucose (2.0 g/kg body weight) was administered into the peritoneal cavity. Blood samples were collected from the tail vein at 0, 30, 60, 90 and 120 min for determination of glucose concentrations. Results are presented as the area under glucose curves. Blood glucose of both i.p.ITT ori.p.GTT were determined using Accutrend Plus equipment (Roche Diagnostic, Rotkreuze, Switzerland). In both cases, the blood sample was obtained from the tails of mice.

Intraperitoneal Insulin Tolerance Test

After 4 h of fasting the mice were 1 h refed and then submitted to more 3 h of fasting, we started the insulin tolerance test (1 U/kg body weight-1 of insulin). Mice were injected with insulin and blood samples were collected at 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min from the tail vein for serum glucose determination. The constant for the rate of serum glucose disappearance was calculated using the formula $0.693/\text{biological half-life (t}_{1/2})$. The plasma glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of last square analysis of the plasma glucose concentration during the linear phase of decline ($n=9$)

Serum lipids

After 16 weeks of treatment with CT, HF and FS, mice were fasted for 8 h and the blood samples were collected from inferior vena cava and then centrifuged at 3.500 g for 15 min

in a Eppendorf 5810R Refrigerated Centrifuge with A-4-62 Swing-Bucket Rotor (Hamburg, Germany) to remove the serum. To determine total cholesterol, the colorimetric method was used. Briefly, the cholesterol esters are hydrolyzed to free cholesterol by cholesterol ester hydrolase (EC 3.1.1.13). The free cholesterol produced is oxidized by cholesterol oxidase to cholest-4-en-3-one with the simultaneous production of hydrogen peroxide, which oxidatively couples with 4-aminoantipyrine and phenol in the presence of peroxidase to yield a chromogen with maximum absorption at 500 nm. The serum triglycerides were determined with colorimetric procedure containing lipase, after the released glycerol was assayed in a reaction catalyzed by glycerol kinase and L-alpha-glycerol-phosphate oxidase in a system that generates hydrogen peroxide. The hydrogen peroxide was monitored in the presence of horseradish peroxidase with 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone as the chromogenic system. The high absorbance of this chromogen system at 510 nm. The HDL cholesterol was measured with a colorimetric method, in the first step the cholesterol was solubilized to after reacts with cholesterol esterase, cholesterol oxidase and N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-m-toluidine sodium salt (TOOS) and the LDL cholesterol was measured with a colorimetric method, using solubilizing agents and N,N-bis-(4-sulfobutyl)-m-toluidina (DSBmT) with a chromogenic agent.

Analysis of gene expression by real-time quantitative RT-PCR

The primers were: SCD1 Mm00772290_m1, MCP-1 Mm99999056_m1, GPR 120 Mm00725193_m1 and GPR40 Mm00809442_s1. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH # 4352338E) gene was used as a housekeeping gene to normalize levels of the transcripts. The optimal concentration of cDNA and primers, as well as the maximum efficiency of amplification, were obtained through five-point, two-fold dilution curve analysis for each gene. Each PCR contained 3.0 ng of reverse-transcribed RNA, 200 nM of each specific primer, SYBR SAFE PCR master mix, and RNase free water added to a 20 µL final volume. Real-time data were analyzed using the Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems). Results were expressed as relative transcript amount.

Western Blotting and Immunoprecipitation

As soon as anaesthesia (i.p. injection of ketamine (200 mg/Kg body weight-1) and xylazine (15 mg/Kg body weight-1) was assured by the loss of pedal and corneal reflexes, the abdominal cavities were opened and the aorta were gently removed and immediately

homogenized. After pooled, 110 µg of protein was used as a whole tissue extract. For evaluation of insulin signal transduction, the animals received an injection of insulin (1U) or saline (100 µL) through the portal vein. After 5 minutes, the aorta were pooled, minced coarsely and homogenized immediately in extraction buffer (1% Triton X-100, 100 mM Tris, pH 7.4, containing 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mMphenylmethanesulphonylfluoride (PMSF) and 0.1 mg/mL-laprotinin) at 4 °C with a Polytron PTA 20S generator (Brinkmann Instruments model PT 10/35) operated at maximum speed for 15'. The extracts were centrifuged at 11.000 g and 4 °C in Eppendorf 5810R Refrigerated Centrifuge with A-4-62 Swing-Bucket Rotor (Hamburg, Germany) for 40 min to remove insoluble material, and the supernatants were used for protein quantification, using the Bradford method (37). Proteins were denatured by boiling in Laemmli sample buffer. Samples containing 110 µg of protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with the mentioned antibodies. Specific bands were labeled by chemiluminescence and visualization was performed by exposure of the membranes to ImageQuant LAS 4000 from GE Healthcare Life Sciences (Uppsala, Sweden). For the evaluation of GPR120 signal transduction through β -arrestin 2 association and for evaluation of TAK1 and TAB 1 association, 1000 µg protein was used for immunoprecipitation with β -arrestin 2 and TAK1 antibodies, respectively.

Lipidomics for detection of fatty acids contents in aorta

Aorta samples were submitted to STELDI-MSI (Sorpative tape-like extraction laser desorption ionization coupled with mass spectrometry imaging) with direct stamping onto a silica gel (60 Å) plate for TLC (Merck, Darmstadt, Germany), as described previously (4). The metabolic fingerprint of free fatty acids was performed using a MALDI-LTQ-XL instrument with tissue imaging feature (Thermo Fisher, San José, CA, U.S.A.). Data acquisition for survey scan was performed at the m/z range of 150–600 in the negative ion mode. Not any matrix was applied.

Table 3. M/Z and the respective fatty acid found in aorta of swiss mice.

M/Z	Molecule [M-H] ⁻
255	Palmitic Acid
277	Linolenic Acid
279	Linoleic Acid
281	Oleic Acid
283	Stearic Acid

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Doenças cardiovasculares associadas à obesidade ainda são responsáveis pelo maior número de mortes anuais em todo o mundo. Apesar do reconhecimento da magnitude do problema, as principais agências de saúde nacionais e internacionais ainda encontram muitas dificuldades em propor e colocar em prática estratégias de tratamento eficientes, e ainda hoje as principais alternativas terapêuticas formuladas e incentivadas consistem na melhora do estilo de vida e da alimentação.

Identificar um alicerce inflamatório crônico e de baixo-grau que sustenta o início e a perpetuação dos distúrbios nos fluxos metabólicos na maioria das doenças correlatas à obesidade fez da inflamação o principal alvo terapêutico para tratá-las. Neste sentido, diversos fármacos que atenuam ou bloqueiam as sinalizações inflamatórias têm sido desenvolvidos, gerando resultados atraentes em modelo animal. Contudo, do ponto de vista translacional, a inflamação em humanos não pode ser debatida como algo que dissipa uma cascata de sinalização nefasta. Ela é uma condição intrínseca de sobrevivência e sua prioridade sobre outros sistemas fica evidenciada por seu caráter dominante sobre eles (Ridker e Luscher, 2014; Tabas e Glass, 2013). Portanto, sob uma condição hierárquica, a inflamação pode ser considerada preponderante sobre as sinalizações dos circuitos homeostáticos e a abordagem terapêutica anti-inflamatória permanece paliativa na medida em que o agente agressor permanece presente. Contrabalancear componentes alimentares pró e anti-inflamatórios pode equalizar a diferença na expressão de peptídeos agonistas e antagonistas das rotas inflamatórias, no entanto, é racional cessar o problema retirando o seu fomento.

Nas civilizações ocidentais, o modo de vida sedentário e a alimentação baseada em alimentos processados e ultra-processados, com alta densidade energética e alto teor de gorduras, sobretudo do tipo saturada, deram início a uma série de doenças que hoje se encontram completamente fora de controle epidemiológico. Ainda que resistam ao tempo diante da enorme capacidade de resiliência do organismo e se iniciem de maneira assintomática, as manifestações clínicas das comorbidades associadas a obesidade conduzem deterioração sobre a qualidade de vida dos pacientes acometidos e, acentuando o péssimo prognóstico, não oferecem alternativas definitivas de cura. Em geral, os tratamentos farmacológicos para remissão do peso não atingem um grande espectro de pacientes e a resposta metabólica dos pacientes com resistência à insulina raramente prevalece de maneira favorável e homogênea (Bolen et al., 2007).

Na conjuntura das desordens metabólicas, a obesidade e a resistência à insulina representam um dos fatores mais preponderantes no desencadeamento das doenças cardiovasculares (Mottillo et al., 2010) e os mecanismos moleculares envolvidos em sua gênese têm sido intensamente explorados.

O enredo patofisiológico da aterosclerose tem sido desenhado em ritmo acelerado desde que foi reconhecida como doença inflamatória (Ross, 1999). Em meados do século XIX, o patologista Rudolph Virchow apresentou conceito inovador, relatando em suas pioneiras observações que a aterosclerose não era somente o resultado de uma deposição passiva de lipídeos na parede arterial, mas envolvia também uma resposta inflamatória. Concepção esta suplantada pelas atuais explicações de que a aterosclerose envolve complexa resposta imunológica inata e adquirida. Verifica-se em uma fase precoce das lesões o recrutamento de monócitos e ativação de receptores de reconhecimento padrão e, posterior e concomitantemente, linfócitos T ativados produzindo diferentes efeitos que favorecem ou atenuam as lesões, dependendo das suas ações biológicas (Libby et al., 2009).

O disparo e inter-relação entre diversas vias de sinalização representam a determinação das respostas celulares e, para fins terapêuticos, sua compreensão é fundamental para elencar potenciais alvos a serem alvejados. Neste campo de ação, o presente projeto almejou examinar e compreender reflexos moleculares desencadeados na aorta de animais alimentados com dietas hiperlipídicas ou dietas hiperlipídicas enriquecidas com ácidos graxos ômega-3. Para isso, elegemos a via de sinalização do *Toll-like receptor 4* (TLR4) e do Estresse de Retículo Endoplasmático (ERE) para análise, tendo em vista o caráter prevacente destas duas vias de sinalização no panorama da “*metaflammation*” e das doenças cardiometabólicas.

Após um período de 8 semanas alimentados com dieta hiperlipídica confeccionada com banha, os camundongos *Swiss* e *LDLr^{-/-}* foram aleatoriamente distribuídos para receber dieta parcialmente substituída em 10% da banha por óleo de semente de linhaça ou permaneceram com dieta hiperlipídica, onde seguiram em tratamento por mais 8 semanas. Durante este período, não observamos redução significativa no peso e na ingestão alimentar dos camundongos *Swiss* alimentados com dieta ω 3, e estes parâmetros também não se alteraram nos camundongos *LDLr^{-/-}*. Estudos prévios do nosso grupo elucidaram a deletéria influência do consumo excessivo de ácidos graxos saturados no centro regulador da fome – o hipotálamo (De Souza et al., 2005; Milanski et al., 2009). O aumento da expressão de biomarcadores pró-inflamatórios no hipotálamo de roedores com obesidade induzida por dieta tem sido associado com a ativação do TLR4 (Milanski et al., 2009) e do ERE (Zhang et al., 2008), e com a perda

do controle da fome e da homeostase energética (Thaler et al., 2013). Conferindo inesperada labilidade a este centro regulador da fome, outro estudo demonstrou que o fornecimento de dieta hiperlipídica a roedores é capaz de provocar inflamação nesta região em apenas um dia de exposição aos ácidos graxos saturados (Thaler et al., 2012). Contudo, outro estudo do nosso grupo demonstrou reversão da inflamação hipotalâmica e melhora do padrão de expressão gênica dos neuropeptídeos anorexigênicos POMC e CART em animais alimentados com dieta enriquecida em ômega-3 (Cintra et al., 2012). Ao que parece, o ganho de peso dos animais do grupo $\omega 3$ é menos acentuado em relação ao grupo obeso principalmente nos períodos finais do tratamento, o que pode ser resultado de uma longa e minuciosa compensação anti-inflamatória exercida por estes ácidos graxos insaturados.

Dada a especificidade de sinalização que cada tipo de ácido graxo consumido via dieta é capaz de estimular, atentamos à composição lipídica da aorta após o período de tratamento. Através da espectrometria de massas, foi possível observar que a aorta de camundongos *Swiss* suplementados com $\omega 3$ apresentou um perfil de ácidos graxos mais favorável que o detectado na aorta dos obesos: diminuição da abundância relativa do ácido graxo saturado esteárico (C18:0) e detecção do ácido graxo insaturado oleico (C18:1) e linolênico (C18:3). Uma vez incorporados nas membranas celulares, o metabolismo intracelular destes ácidos graxos pode gerar precursores a mediadores biológicos que modulam uma plethora de eventos e, em geral, tromboxanos e leucotrienos derivados dos ácidos graxos da família $\omega 3$ são menos potentes (De Caterina, 2011). A atividade enzimática da esteroil-CoA-desaturase 1 (SCD1) está implicada na conversão do ácido graxo C18:0 em C18:1, porém sua expressão gênica não apresentou diferença entre os grupos estudados.

Os mecanismos moleculares envolvidos na resistência à insulina associada a obesidade começaram a ser desvendados há pouco mais de 20 anos atrás, quando Hotamisligil e colaboradores identificaram aumento na expressão de TNF- α no tecido adiposo de roedores obesos e a inibição desta citocina resultou em melhora na sensibilidade à glicose e à insulina (Hotamisligil et al., 1993). Subsequentemente, altos níveis de citocinas de estresse, tais quais JNK1 e IKK β , foram detectadas em diversos tecidos de animais obesos e a atividade quinase destas proteínas foi associada à fosforilação inibitória de resíduos serina do IRS1 (Hotamisligil, 2006). Outros mecanismos de resistência adjacentes, mas não menos importantes, estão envolvidos com o aumento da produção de moléculas de diacilglicerol (DAG) provenientes dos ácidos graxos saturados com consequente ativação da PKC, capaz de diminuir a sinalização da insulina (Samuel et al., 2010); com o aumento da oligomerização e ativação das plataformas

multiproteicas dos inflamassomas, responsáveis pela clivagem da pro-caspase-1, que por sua vez está envolvida na maturação da IL-1 β (Wen et al., 2011) e com o estresse de retículo endoplasmático, que acionado cronicamente pode se conectar e exacerbar vias inflamatórias que geram prejuízo na sinalização da insulina (Flamment et al., 2012).

Em múltiplos níveis, diversas proteínas pró-inflamatórias ativadas por uma multiplicidade de vias induzem prejuízo na sinalização da insulina, que pode ser parcialmente testada experimentalmente através do teste de tolerância à glicose (GTT) e à insulina (ITT). No GTT de camundongos *Swiss*, evidenciamos melhora significativa do decremento da glicemia nos animais tratados com ω 3 quando comparados com os obesos, fato não observado em camundongos *LDLr^{-/-}*, ao passo que no ITT não houve diferença significativa entre os 2 grupos de camundongos *Swiss*. A melhora parcial na sensibilidade à insulina pode ser atribuída à uma plethora de ações dos ácidos graxos ômega-3 no metabolismo glicídico, de maneira direta através da sua influência agonista à secreção de insulina em nível pancreático e de maneira indireta, mitigando vias inflamatórias que suprimem a sinalização deste hormônio.

O receptor GPR40 é um receptor transmembrana predominantemente expresso em células β -pancreáticas capaz de reconhecer e ser ativado por ácidos graxos de cadeia média a longa (12C – 22C) (Briscoe et al., 2003) e a sua ativação por estes lipídeos potencializa a secreção de insulina estimulada por glicose (Itoh et al., 2003). Após a ligação dos ácidos graxos, a subunidade α da proteína G heterotrimérica troca o GDP por GTP em sítio específico e, posteriormente, dissocia-se das subunidades β/γ . Uma vez ativada, a subunidade α ativa a fosfolipase C, responsável pela clivagem de PIP₂ para produzir IP₃. Subsequentemente, o IP₃ promove o efluxo de Ca²⁺ do retículo endoplasmático gerando aumento da concentração intracelular deste íon, que por sua vez estimula a secreção pancreática de vesículas de insulina (Mancini e Paitout, 2013). Adicionalmente, receptores GPR120 expressos no intestino podem também ser ativados por ácidos graxos ω 3 e o seu estímulo promove a secreção de GLP-1, um importante hormônio incretínico e insulinoatrópico (Hirasawa et al., 2005). Complementando os efeitos metabólicos destes ácidos graxos insaturados, nosso grupo demonstrou que a suplementação com ω 3 é capaz de modular circuitos homeostáticos no fígado de camundongos *Swiss*, manipulando variáveis fisiológicas controladas abrindo a produção hepática de glicose através do aumento da fosforilação da GSK-3, culminando em maior produção de glicogênio hepático; da FoxO1, cujo estado fosforilado a expulsa do núcleo e consequentemente diminui sua atividade transcricional, reduzindo a expressão gênica da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e da glicose-6-fosfatase (G6Pase), ambas envolvidas com a gliconeogênese (Oliveira et al., 2015; Gross et al., 2008).

Analisando especificamente a sinalização de proteínas chave na transdução do sinal da insulina, atestamos melhora no padrão de fosforilação do IR e do IRS1 na aorta de animais *Swiss* suplementados com $\omega 3$ após estímulo com este hormônio através da veia porta-hepática. Embora os mecanismos supracitados sejam válidos para compreensão de como estes ácidos graxos insaturados auxiliaram, pelo menos parcialmente, o resgate da homeostase metabólica, é válido ressaltar que a sinalização da insulina no sistema cardiovascular contribui com efeitos hemodinâmicos, ao passo que os efeitos metabólicos previstos em tecidos de relevância metabólica ocorrem principalmente no fígado, músculo e tecido adiposo. Tais efeitos hemodinâmicos são extremamente relevantes na manutenção da fisiologia vascular e distúrbios na sinalização da insulina são responsáveis, pelo menos em parte, pelas complicações micro e macrovasculares comumente encontradas em indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 1 e 2 (Forbes e Cooper, 2013).

A conjuntura das alterações moleculares no tecido vascular que promovem o favorecimento das lesões e da disfunção endotelial podem surgir em decorrência das concentrações anormais de glicose e insulina circulantes no diabetes *mellitus* 1 e 2. Dentre elas, destaca-se a glicação de proteínas extracelulares e intracelulares, modificando sua estrutura e função, além da ligação das proteínas extracelulares modificadas a receptores (RAGEs) que induzem a expressão de moléculas de adesão (VCAM-1) em células endoteliais (Schmidt et al., 1995); menor produção de NO, em decorrência da diminuição na fosforilação da eNOS no resíduo Ser1177 pela Akt (Symons et al., 2009) e aumento do estresse oxidativo e da expressão de genes inflamatórios em macrófagos (Parathath et al., 2011). Dentre os notáveis efeitos da resistência à insulina no tecido vascular, esta configuração prejudicada promove favorecimento da sinalização mitogênica deste hormônio, via MAP quinases (MAPK), cujos efeitos *downstream* contribuem para mediar a liberação de vasoconstritores (ex.: endotelina), propiciando ambiente pró-aterogênico e pró-trombótico na parede arterial (Mather et al., 2013).

O perfil dislipidêmico é frequentemente observado nos indivíduos obesos e resistentes à insulina. Nesses casos, tanto a adiposidade quanto o prejuízo na sinalização apropriada da insulina resultam em anormalidades no metabolismo lipídico. Tipicamente, a dislipidemia associada a obesidade consiste em níveis de triglicérides séricos aumentados, diminuição de HDL-c e pouco aumento de LDL-c circulante, mas com aumento de partículas LDL-c pequenas e densas (Klop et al., 2013).

Nossos resultados mostram que a oferta de dieta enriquecida com ácidos graxos $\omega 3$ para camundongos *Swiss* não alterou os níveis de colesterol total em relação ao seu controle obeso,

mas elevou o conteúdo de HDL-c e diminuiu os níveis de LDL-c, ambos de maneira significativa. Interessantemente, os níveis de triglicérides séricos apresentaram-se significativamente maiores em camundongos magros, em relação aos obesos e ao grupo $\omega 3$. Em camundongos LDLr^{-/-}, a mesma dieta enriquecida com $\omega 3$ foi eficiente na redução da trigliceridemia e do LDL-c. Estes efeitos dos ácidos graxos $\omega 3$ podem ser resultado indireto da melhora parcial da sinalização da insulina, detectada sobretudo em camundongos *Swiss* e de efeitos diretos deste ácido graxo no metabolismo lipídico. Na primeira condição, são bem conhecidas as interferências da via PI-3-K da insulina no metabolismo de lipoproteínas, principalmente na degradação da apoB e, em situações de resistência à ação deste hormônio, na diminuição da atividade da lipoproteína lipase, diminuindo o *clearance* de VLDL, gerando maiores níveis circulantes de LDL (Semenkovich, 2006). Posteriormente, as influências diretas dos ácidos graxos $\omega 3$ no metabolismo lipídico ocorrem principalmente através da sua interferência na expressão de enzimas lipogênicas. Através da diminuição da expressão da SREBP-1c, os ácidos graxos $\omega 3$ suprimem a lipogênese hepática e regulam a oxidação lipídica positivamente através da ativação do PPAR- α . Além disso, promovem diminuição da expressão do HNF-4 α formando uma conexão de rede entre a coordenação de receptores nucleares que, em última análise, promovem efeitos hipotrigliceridêmicos de maneira simultânea (Davidson, 2006).

A oferta supra-fisiológica e crônica de nutrientes é responsável por iniciar sinalização inflamatória que tem o receptor TLR4 como principal pivô e as proteínas IKK e JNK1 induzindo seus respectivos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 como principais executantes, gerando citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e TNF- α (Febbraio, 2014). Aventando a hipótese de que os efeitos anti-inflamatórios dos ácidos graxos $\omega 3$ poderiam induzir a remissão destes marcadores inflamatórios, comprovamos através da análise da expressão proteica que em camundongos *Swiss* houve substancial redução de IL-1 β , TNF- α e SOCS-3, enquanto nos camundongos LDLr^{-/-} não houve diferença em pJNK, TNF- α e IL-1 β , porém constatamos redução significativa de pI κ B α e elevação da expressão da proteína anti-inflamatória IL-10, assim como nos camundongos *Swiss*, representando contra regulação das vias inflamatórias. Ainda neste modelo animal, a análise da expressão gênica de MCP-1 não demonstrou redução transcricional, ao passo que a expressão gênica de IL-1 β apresentou-se aumentada em camundongos suplementados com $\omega 3$. Embora paradoxal, é válido salientar que a IL-1 β transcrita gera um intermediário imaturo desta interleucina, e sua atividade está condicionada à clivagem proteolítica exercida por outro componente inflamatório denominado inflamassoma.

Infere-se, pois, que sua expressão gênica mensura de maneira pouco efetiva a sua atuação na inflamação (Robbins et al., 2014).

Em busca da especificidade mecanística pelo qual os ácidos graxos $\omega 3$ exerceram, pelo menos em parte, sua atividade anti-inflamatória, analisamos sua atuação mediada pelo seu receptor GPR120. A partir da identificação de que este receptor poderia ser ativado por ácidos graxos de cadeia longa (Hirasawa et al., 2005), Oh e colaboradores propuseram mecanismo de ação anti-inflamatório distinto dos até então apresentados: atuando como agonistas destes receptores, os ácidos graxos $\omega 3$ inibem a fosforilação da proteína Tak1 interrompendo as vias IKK β /NF- κ B e JNK/AP-1. Surpreendentemente, isto ocorre por conta da associação direta da β -arrestina 2, proteína adaptadora/efetora do GPR120, com a proteína TAB1. Esta associação interrompe o acoplamento entre TAB1 e Tak1, inibindo a sinalização pró-inflamatória mediada pelo TLR4 e pelo TNFR (Oh et al., 2010). Aventamos a hipótese de que este receptor é capaz de mediar sua sinalização não apenas nos macrófagos que se infiltram no tecido vascular, mas no próprio tecido *per se*, e verificamos através do ensaio de imunofluorescência que ele se encontra amplamente expresso e distribuído nas células endoteliais e, sobretudo, nas células musculares lisas. No intuito de verificar se estes efeitos anti-inflamatórios são capazes de serem reproduzidos na aorta de camundongos *Swiss* e LDLr^{-/-}, imunoprecipitamos as proteínas β -arrestina 2 e Tak1 para analisar sua associação com o GPR120 e TAB1, respectivamente. Em camundongos *Swiss*, houve aumento significativo da associação entre β -arrestina 2 e GPR120 e tendência de queda do acoplamento Tak1/TAB1 nos animais suplementados com $\omega 3$, contudo, na aorta de camundongos LDLr^{-/-} não foi observada diferença significativa entre estas dinâmicas de associação nos grupos estudados. Os estudos sobre os efeitos da suplementação de ácidos graxos $\omega 3$ nestes animais *knockout* são controversos e variam em relação ao tempo de tratamento e composição da dieta, no entanto, em geral, demonstram redução no tamanho das lesões de aterosclerose e estes efeitos são atribuídos à redução da inflamação e da melhora no perfil de lípides séricos (Brown et al., 2012; Wang et al., 2009; Dupasquier et al., 2007). Limita-se a análise desta via em animais LDLr^{-/-}, no trabalho em questão, por conta da não execução e análise do padrão de expressão gênica deste receptor na aorta destes roedores, sendo esta observância realizada na aorta de camundongos *Swiss*, onde constatou-se aumento da atividade transcricional do GPR120 mediante oferta de dieta enriquecida com $\omega 3$.

O desígnio de preservar a homeostase através de múltiplos sensores especializados, que monitoram constantemente as variáveis fisiológicas e as alterações em processos intracelulares, faz diversos sistemas em diversos níveis (sistêmico, tecidual ou celular) estarem aptos a gerar

uma resposta de estresse para resgatar o estado homeostático dentro de um nível aceitável, caso haja perturbação nos parâmetros vigiados. Dentro desta ótica, o estresse de retículo endoplasmático (ERE), representado pela *Unfolded Protein Response* (UPR), é capaz de minimizar os impactos negativos de uma condição de estresse através de adaptações que variam de acordo com a demanda, objetivando-se, neste caso, a proteostase. Contudo, condições de estresse crônico, como o experimentado pelo organismo obeso, agregam elementos da inflamação à expressão constitutiva de genes de adaptação e representam o extremo desvio das variáveis celulares reguladas (Chovatiya e Medzhitov, 2014). Isto posto, em estado de estresse crônico, faz saber que o ERE pode se articular com sinalizações inflamatórias, exacerbando-as.

Tendo em vista a remissão de diversas proteínas pró-inflamatórias, tais quais a IL-1 β , TNF- α e SOCS-3, postulamos que o ERE também havia sido aliviado na aorta dos animais *Swiss* que receberam dieta ω 3, o que foi comprovado pela diminuição da expressão das três proteínas canônicas do ERE; ATF-6, pPERK e IRE-1 α e pelas proteínas efetoras p ϵ IF2 α e XBP1s, além da diminuição da chaperona GRP78, que teve conteúdo proteico constatado também em animais LDLr^{-/-}. Interessantemente, a expressão gênica de duas chaperonas importantes no controle da qualidade de enovelamento proteico, Hspa5 e a Hsp90b1, tiveram sua expressão aumentada nos animais que receberam ω 3, pressupondo que parte dos efeitos de alívio do estresse podem ser mediados por estas chaperonas. Paradoxalmente, encontramos aumento dos níveis de expressão gênica de ATF6 e ϵ IF2 α , embora seja um resultado inesperado, estas duas proteínas necessitam sofrer modificações para entrarem em atividade: a primeira, para atuar como fator de transcrição, precisa sofrer duas clivagens proteolíticas no Golgi, onde é processada pelas proteases S1P e S2P e a segunda precisa ser fosforilada pela PERK para, dentre outros efeitos, atenuar a tradução proteica. (Salvadó et al., 2015).

No panorama da obesidade e das doenças cardiometabólicas, ambas as respostas de defesa e de estresse são desencadeadas. A sensibilização do TLR4 e disparo de sua via é uma resposta de defesa e o ERE é uma resposta ao estresse. A integração destes cenários é resultado da máxima união dos sistemas de defesa, porém a perturbação crônica da homeostase, representada pelo consumo excessivo e crônico de nutrientes, sensibiliza os mecanismos de defesa e de estresse de forma intensa, perpetuando e não resolvendo a inflamação, danificando maquinarias intracelulares, exacerbando o descontrole das variáveis fisiológicas reguladas e incitando a morte celular (Scull e Tabas, 2011; Tabas, 2011).

Os constantes e atuais desvendamentos mecanísticos das rotas que iniciam e perpetuam o acúmulo excessivo de adiposidade divergem fisiologicamente de maneira tecido-específica, mas convergem em aspectos comuns no cenário da obesidade, a exemplo das alterações

metabólicas intimamente relacionadas ao aumento do risco cardiometabólico e da produção de citocinas inflamatórias. As evidências mais recentes demonstram que o metabolismo e a imunidade ora interpretam um dueto, ora protagonizam um duelo. O avesso destas condições é delimitado pela eficiência da resposta efetora dos mecanismos de reparo da integridade dos sistemas biológicos outrora perturbados pelo consumo excessivo de nutrientes e, sob perspectiva nutrigenômica, pela modulação da expressão gênica e de proteínas que interseccionam com vias inflamatórias. Em suma, o tônus da inflamação pode ser conduzido e manipulado intrinsicamente e extrinsecamente, todavia, se mal resolvido, pode estenotar os fluxos metabólicos dos circuitos homeostáticos. Dessa forma, é prudente reconhecer que uma vez afetados, estes circuitos não irão retornar à sua condição basal em um breve período de tempo a partir do início de um programa de tratamento, seja ele nutricional ou farmacológico. Da mesma forma que a lipotoxicidade e glicotoxicidade crônica são capazes de deflagrar o início do estresse metabólico que culmina em distúrbios aqui amplamente discutidos, pulverizar elementos anti-inflamatórios de maneira racional, sistêmica e permanente constitui o principal roteiro para o manejo das doenças metabólicas.

À vista disso, nosso trabalho demonstrou que a substituição parcial de ácidos graxos saturados provenientes da banha na dieta por ácidos graxos insaturados provenientes do óleo de linhaça reduziu marcadores de risco cardiovasculares e diminuiu o conteúdo proteico de citocinas pró-inflamatórias e de sensores e efetores do estresse de retículo endoplasmático na aorta, contudo, estes mecanismos parecem não estar relacionados com a ativação do receptor GPR120 neste tecido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014 Aug 30;384(9945):766–81.
- Kelly T, Yang W, Chen C-S, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(9):1431–7.
- Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.
- World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases. Geneva: Switzerland; 2014.
- World Health Organization. World Health Statistics. Geneva: Switzerland; 2012.
- Schmidt. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges *Lancet* 2011; 377: 1949–61
- Kotas ME, Medzhitov R. Homeostasis, Inflammation and Disease Susceptibility. *Cell*. 2015;160(5):816–27.
- Chovatiya R, Medzhitov R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Mol Cell*. 2014;54(2):281–8.
- Hotamisligil GS, Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):923–34.
- Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res*. 2003;338(23):2431–47.
- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444:860–7.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors : critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001;2(8):675–680.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*. 2006;124(4):783–801.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1793–801.
- Rhodes CJ, White MF, Leahy JL, Kahn SE. Direct autocrine action of insulin on β -cells: Does it make physiological sense? *Diabetes*. 2013;62(7):2157–63.
- Czech MP. The nature and regulation of the insulin receptor: structure and function. *Annu Rev Physiol*. 1985;47:357–81.
- Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J Endocrinol*. 2014;220(2):T1–23.

- Hotamisligil GS. Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *Cell*. 2010;140(6):900–17.
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002;420(6913):333–6.
- Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem*. 2002;277(2):1531–7.
- Beg a a, Finco TS, Nantermet P V, Baldwin a S. Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol*. 1993;13(6):3301–10.
- Palombella VJ, Conner EM, Fuseler JW, Destree a, Davis JM, Laroux FS, et al. Role of the proteasome and NF-kappaB in streptococcal cell wall-induced polyarthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(26):15671–6.
- Vallerie SN, Hotamisligil GS. The role of JNK proteins in metabolism. *Sci Transl Med*. 2010;2(60):60rv5.
- Baron a D. Hemodynamic actions of insulin. *Am J Physiol Metab*. 1994;267:E187–202.
- Muniyappa R, Sowers JR. Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013;14(1):5–12.
- Laakso M, Edelman SV, Brechtel G, Badon AD. Decreased Effect of Insulin To Stimulate Skeletal Muscle Blood Flow in Obese Man. 1990;85(6):1844–52.
- Muniyappa R, Walsh MF, Rangi JS, Zayas RM, et al. Insulin like growth factor 1 increases vascular smooth muscle nitric oxide production. *Life Sciences*. 1997. 61 (9):925–31.
- Semenkovich CF. Insulin resistance and atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1813–22.
- Boden G, She P, Mozzoli M, Cheung P, Gumireddy K, Reddy P, et al. Free Fatty Acids Produce Insulin Resistance and Activate the Proinflammatory Nuclear Factor- B Pathway in Rat Liver. *Diabetes*. 2005;54(12):3458–65.
- Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha. *Diabetes*. 2002;51(7):2005–11.
- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed J. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest*. 2005;115(10):2656–64.
- Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(7):519–29.
- Todd DJ, Lee A-H, Glimcher LH. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):663–74.
- Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:739–89.

- Hollien J, Weissman JS. Decay of Endoplasmic Reticulum-localized mRNAs During the Unfolded Protein Response. *Science*. 2006; 313, 104–107.
- Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell*. 1999;10(11):3787–99.
- Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, et al. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell*. 2000;6(6):1355–64.
- Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, et al. Transcriptional Induction of Mammalian ER Quality Control Proteins Is Mediated by Single or Combined Action of ATF6 α and XBP1. *Dev Cell*. 2007;13(3):365–76.
- Wu J, Rutkowski DT, Dubois M, Swathirajan J, Saunders T, Wang J, et al. ATF6 α Optimizes Long-Term Endoplasmic Reticulum Function to Protect Cells from Chronic Stress. *Dev Cell*. 2007;13(3):351–64.
- Harding HP, Zhang Y, Bertolotti a, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell*. 2000;5(5):897–904.
- Scully CM, Tabas I. Mechanisms of ER stress-induced apoptosis in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(12):2792–7.
- Timmins JM, Ozcan L, Seimon T a., Li G, Malagelada C, Backs J, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. *J Clin Invest*. 2009;119(10):2925–41.
- Deng J, Lu P, Zhang Y, Scheuner D, Kaufman RJ, Sonenberg N, et al. Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Cell Biol*. 2004;24(23):10161–8.
- Hu P, Han Z, Couvillon A. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1 α -mediated NF- κ B activation and. *Mol Cell*. 2006;26(8):3071–84.
- Yamazaki H, Hiramatsu N, Hayakawa K, Tagawa Y, Okamura M, Ogata R, et al. Activation of the Akt-NF-kappaB pathway by subtilase cytotoxin through the ATF6 branch of the unfolded protein response. *J Immunol*. 2009;183(2):1480–7.
- Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee A-H, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004;306(5695):457–61.
- Dyerberg J, Bang HO. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet*. 1979;2(8140):433–5.
- Dyerberg J, Bang HO, Hjerne N. Fatty composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am J Clin Nutr*. 1975; 28: 958-966
- Weintraub H. Update on marine omega-3 fatty acids: Management of dyslipidemia and current omega-3 treatment options. *Atherosclerosis*. 2013;230(2):381–9.

De Caterina R. N-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2011;364(25):2439–50.

Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, et al. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem*. 2003;278(13):11303–11.

Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic β cells through GPR40. *Nature*. 2003;416(7000):201–4.

Glick NR, Fischer MH. The Role of Essential Fatty Acids in Human Health. *J Evid Based Complementary Altern Med*. 2013;18(4):268–89.

Nilsson NE, Kotarsky K, Owman C, Olde B. Identification of a free fatty acid receptor, FFA2R, expressed on leukocytes and activated by short-chain fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;303(4):1047–52.

Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael J-Y, Lannoy V, Decobecq M-E, et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem*. 2003;278(28):25481–9.

Fredriksson R, Höglund PJ, Gloriam DEI, Lagerström MC, Schiöth HB. Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS Lett*. 2003;554(3):381–8.

Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med*. 2005;11(1):90–4.

Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, et al. GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell*. 2010;142(5):687–98.

Oliveira V, Marinho R, Vitorino D, Santos G, Moraes J, Dragano N, et al. Diets containing alpha-linolenic (omega 3) or oleic (omega 9) fatty acids rescues obese mice from insulin resistance. *Endocrinology*. 2015;156(10):1804–1810.

Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, Bonnefond A, Hara T, Yengo L, et al. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature*. 2012;483(7389):350–4.

Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, Pauli JR, Morari J, de Souza CT, et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One*. 2012;7(1).

Morari J, Torsoni AS, Anhe GF, Roman E a., Cintra DE, Ward LS, et al. The role of proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α in the fatty-acid-dependent transcriptional control of interleukin-10 in hepatic cells of rodents. *Metabolism*. 2010;59(2):215–23.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. 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*. 1993;123(11):1939–51.

- Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman E a., Pauli JR, et al. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One*. 2009;4(4).
- Ross R. Atherosclerosis – An Inflammatory Disease. *NEJM*. 1999; 340 (2): 115-26.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in Atherosclerosis. From Pathophysiology to Practice. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(23):2129–38.
- Mottillo S, Filion KB, Genest J, Joseph L, Pilote L, Poirier P, et al. The metabolic syndrome and cardiovascular risk: A systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(14):1113–32.
- De Souza CT, Araújo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*. 2005;146:4192–9.
- Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci*. 2009;29(2):359–70.
- Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER Stress Link Overnutrition to Energy Imbalance and Obesity. *Cell*. 2008;135(1):61–73.
- Thaler JP, Guyenet SJ, Dorfman MD, Wisse BE, Schwartz MW. Hypothalamic inflammation: Marker or mechanism of obesity pathogenesis? *Diabetes*. 2013;62(8):2629–34.
- Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwanh BH, Dietrich MO, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest*. 2012; 122: 153-162.
- Hotamisligil G, Shargill N, Spiegelman B. Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor α : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Science*. 1993;259(5091):87–91.
- Samuel VT, Petersen KF, Schulman GI. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet*. 2010; 375: 2267-77.
- Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT-H, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol*. 2011;12(5):408–15.
- Flamment M, Hajduch E, Ferré P, Foulle F. New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*. 2012;23(8):381–90.
- Mancini AD, Poitout V. The fatty acid receptor FFA1/GPR40 a decade later: How much do we know? *Trends Endocrinol Metab*; 2013;24(8):398–407.
- Gross DN, van den Heuvel APJ, Birnbaum MJ. The role of FoxO in the regulation of metabolism. *Oncogene*. 2008; 27: 2320-2336.
- Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev*. 2013;93(1):137–88.
- Schmidt a M, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, et al. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest*. 1995;96(3):1395–403.

- Symons, J.D., McMillin, S.L., Riehle, C., Tanner, J., Palionyte, M., Hillas, E, et al. Contribution of insulin and Akt1 signaling to endothelial nitric oxide synthase in the regulation of endothelial function and blood pressure. *Circ. Res.* 2009. 104, 1085– 1094.
- Parathath, S., Grauer, L., Huang, L.S., Sanson, M., Distel, E., Goldberg, I.J., and Fisher, E.A. Diabetes adversely affects macrophages during atherosclerotic plaque regression in mice. *Diabetes.* 2011; 60: 1759–1769.
- Mather KJ, Steinberg HO, Baron AD. Insulin resistance in the vasculature. *J Clin Invest.* 2013;123(3):1003–4.
- Klop B, Elte JWF, Cabezas MC. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients.* 2013;5(4):1218–40.
- Davidson MH. Mechanisms for the Hypotriglyceridemic Effect of Marine Omega-3 Fatty Acids. *Am J Cardiol.* 2006;98(4 SUPPL. 1):27–33.
- Febbraio MA. Role of interleukins in obesity: Implications for metabolic disease. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(6):312–9.
- Robbins GR, Wen H, Ting JPY. Inflammasomes and metabolic disorders: Old genes in modern diseases. *Mol Cell.* 2014;54(2):297–308.
- Brown AL, Zhu X, Rong S, et al. Omega-3 fatty acids ameliorate atherosclerosis by favorably altering monocyte subsets and limiting monocyte recruitment to aortic lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2012;32:2122-2130.
- Wang S, Wu D, Matthan NR, et al., Reduction in dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid plus docosahexaenoic acid ratio minimizes atherosclerotic lesion formation and inflammatory response in the LDL receptor null mouse. *Atherosclerosis.* 2009;204:147-155.
- Dupasquier CM, Dibrov E, Kneesh AL, et al., Dietary flaxseed inhibits atherosclerosis in the LDL receptor-deficient mouse in part through antiproliferative and anti-inflammatory actions. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology.* 2007; 293: H2394-2402.
- Salvadó L, Palomer X, Barroso E, Vázquez-Carrera M. Targeting endoplasmic reticulum stress in insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;1–11.
- Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(1):36–46.
- Ridker PM, Luscher TF. Anti-inflammatory therapies for cardiovascular disease. *European Heart Journal.* 2014. 35: 1782-1791.
- Tabas I, Glass C. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science.* 2013. 339: 166-172.
- Bolen S, Feldman L, Vassy J, Wilson L, Yeh HC, et al. Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.* 2007 Sep 18;147(6):386-99.

Bernard, C. (1878). *Lecçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux* (Paris: J. B. Baillière et fils).

Gregor MF, Hotamisligil. GS. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu. Rev. Immunol.* 2011. 29:415-445.

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2004. Jul; 4(7): 499-511.

Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., and White, M.F. 2000. The c-Jun N-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J. Biol. Chem.* **275**:9047-9054.

Rask-Madsen C, Kahn CR. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:2052-2059

Bornfeldt KE, Tabas I. Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell Metab.* 2011;14(5):575-85

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

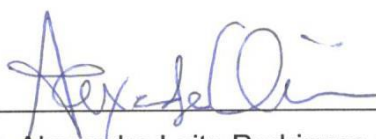
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Ácidos Graxos Insaturados na Modulação do Fenômeno Inflamatório e de Estresse de Retículo Endoplasmático na Parede Arterial de Animais (camundongos Swiss) Obesos e Diabéticos: Ação do Receptor GPR120." (protocolo nº 3812-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Dennys Esper Corrêa Cintra / Alexandre Moura Assis, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

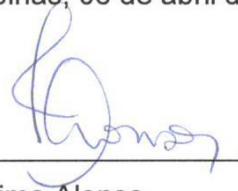
A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 06 de abril de 2015.

Campinas, 06 de abril de 2015.



Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva