VANESSA DE OLIVEIRA
Erratta: Vanessa de Oliveira Lázari

PROF. DR. MARCOS HENRIQUE DEGANI
Coordenador de Pós-Graduação
Faculdade de Ciências Aplicadas da Unicamp - Limeira
Matrícula: 296777

GPR120 COMO MEDIADOR DAS AÇÕES NUTRIGENÔMICAS DOS ÁCIDOS GRAXOS ω3 E ω9 EM TECIDOS PERIFÉRICOS: CONTROLE DA DISFUNÇÃO METABÓLICA EM ANIMAIS OBESOS E DIABÉTICOS

LIMEIRA

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Aplicadas

VANESSA DE OLIVEIRA

Errata: Vanessa de Oliveira Lázari

PROF. DR. MARCOS HENRIQUE DEGANI
Coordenador de Pós-Graduação
Faculdade de Ciências Aplicadas da Unicamp - Limeira
Matrícula: 296777

GPR120 COMO MEDIADOR DAS AÇÕES NUTRIGENÔMICAS DOS ÁCIDOS GRAXOS ω3 E ω9 EM TECIDOS PERIFÉRICOS: CONTROLE DA DISFUNÇÃO METABÓLICA EM ANIMAIS OBESOS E DIABÉTICOS

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

Orientador: DENNYS ESPER CORRÊA CINTRA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA VANESSA DE OLIVEIRA E ORIENTADA PELO PROF. DR. DENNYS ESPER CORRÊA CINTRA

LIMEIRA

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Sueli Ferreira Júlio de Oliveira - CRB 8/2380

Ol4g

Oliveira, Vanessa de, 1982-
GPR120 como mediador das ações nutrigenômicas dos ácidos graxos w3 e w9 em tecidos periféricos : controle da disfunção metabólica em animais obesos e diabéticos / Vanessa de Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

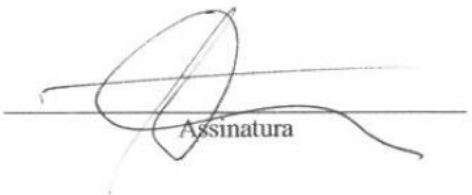
1. GPR120. 2. Ácidos graxos insaturados. 3. Obesidade. 4. Metainflamação. 5. Diabetes mellitus tipo 2. I. Cintra, Dennys Esper Corrêa. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: GPR120 as mediator of n3 and n9 fatty acids nutrigenomics actions in peripheral tissues : control of metabolic dysfunction in obese and diabetic animals.
Palavras-chave em inglês:
GPR120
Unsaturated fatty acids
Obesity
Metainflammation
Type 2 diabetes mellitus
Área de concentração: Nutrição
Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo
Banca examinadora:
Dennys Esper Corrêa Cintra [Orientador]
Eliana Pereira de Araújo
Ana Maria Pita Lottenberg
Data de defesa: 09-10-2013
Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Limeira, 09 de OUTUBRO de 2013 (aqui se coloca a data da defesa)

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). DENNIS ESPER CINTRA (Orientador(a)) 
Assinatura

Prof(a). Dr(a). ANA MARIA PITA LOTTENBERG
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Eliana Pereira de Araujo
Assinatura

RESUMO

A obesidade é uma doença metabólica absolutamente fora de controle. As condições primárias associadas são hipertensão arterial, dislipidemias, diversos tipos de câncer, resistência à insulina (RI) e principalmente o *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2). Dentre as características secundárias, esteatose hepática e síndrome do ovário policístico figuram entre as principais. Tais doenças acometem número cada vez maior de indivíduos e sobrecarregam sistemas públicos mundiais de saúde. A inflamação crônica e de baixo grau, designada "meta-inflamação", por acometer todo o organismo, parece ser o pano de fundo principal do processo obesogênico, resultando no descontrole da ingestão alimentar e na predisposição ao surgimento da RI podendo progredir para o DM2. Diante da ineficiência de terapêuticas farmacológicas atuais para o controle da obesidade, o investimento em estratégias anti-inflamatórias tem sido incentivado. Nesse intuito, ácidos graxos insaturados (AGIs), especialmente os ômega-3 (ω3) e ômega-9 (ω9) têm-se mostrado eficientes em atenuar a inflamação por meio da ativação do receptor GPR120, e em recuperar a sensibilidade à insulina em diversos tecidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar as ações e mecanismos anti-inflamatórios dos AGIs α-linolênico (ω3) e oléico (ω9), presentes em elevadas concentrações no óleo de semente de linhaça e oliva respectivamente, em tecidos periféricos metabolicamente ativos de animais obesos e diabéticos induzidos por dieta rica em gordura (HF), e suas repercussões na regulação glicêmica do organismo. O tratamento via dieta HF com substituição em 10% da fração saturada pelos respectivos óleos, foi eficiente em restabelecer o controle da fome dos animais que consequentemente ganharam menos peso em relação aos seus controles obesos. Dados fisiológicos obtidos por meio de medições de glicemia de jejum e dos testes de tolerância à insulina (ITT) e à glicose (GTT) evidenciaram melhoras na homeostase glicêmica, confirmado em nível molecular pelo aumento da atividade das principais proteínas envolvidas na via da insulina como o IR, IRS-1 e Akt. Possivelmente esses resultados deram-se em virtude da redução da expressão de peptídeos pró-inflamatórios como TNF-α, IL-6 e IL-1β, seguidos pelo aumento da expressão da IL-10, de caráter anti-inflamatório. No fígado, a melhora

na sensibilidade à insulina, resultou em inibição da enzima GSK-3 propiciando o restabelecimento do controle hepático sobre o metabolismo da glicose. Análises por hematoxilina/eosina (HE) e imunohistoquímica evidenciaram menor acumulação lipídica e redução da infiltração de macrófagos M1 no parênquima hepático, resultando em melhora do fenótipo de esteatose hepática macrovesicular e recuperação funcional deste tecido. Houve diminuição da hipertrofia dos adipócitos, fato que contribuiu com a remissão da inflamação. Foi verificada a presença do receptor GPR120 nestas células, permitindo, portanto a entrada dos AGIs. A técnica de espectrometria de massa atestou a incorporação dos AGIs de interesse no fígado, sustentando a hipótese de que os efeitos benéficos encontrados ocorreram em decorrência das ações destes nutrientes. Esses achados permitem concluir que fontes alimentares dos AGs ω3 e ω9 modulam de forma potente a resposta inflamatória no organismo. Tais ações são controladas pelo GPR120, receptor comum a esses AGs, e parecem ocorrer de maneira tecido-específica com repercussões sistêmicas, positivas para o controle glicêmico.

Palavras-chave: GPR120; Ácidos graxos insaturados; Obesidade; Metainflamação; Diabetes melito tipo 2.

ABSTRACT

Obesity is characterized as a metabolic disease absolutely out of control. The diseases associated to this comorbid as hypertension, dyslipidemia, several kinds of cancer, insulin resistance (IR), type 2 diabetes (DM2) and secondary conditions as hepatic steatosis and polycystic ovary syndrome affect a large number of people, burdening the public health system. The low grade chronic inflammation, called “meta-inflammation” by affecting the entire body, seems to be the main cause of the obesogenic processes, resulting in an uncontrolled food intake and the predisposition for IR, which can lead to DM2. Once there is no effective pharmacological therapy to treat obesity so far, the investment in anti-inflammatory approaches has been encouraged. In this regard, unsaturated fatty acids (AGIs), mostly 3-omega (ω3) and 9-omega (ω9) have been shown effective in decreasing the inflammatory process by activating the GPR120 receptor, thus recuperating the insulin sensibility in several tissues. The purpose of this study was to evaluate the mechanism and potential anti-inflammatory effects of the fatty acids α-linolenic (ω3) and oleic (ω9), found in high concentrations in flaxseed and olive oil respectively on active metabolic tissue as liver, skeletal muscle and white adipose tissue of obese and diabetic animals induced by high fat diet, as well as its effects on insulin signaling and glycemic regulation. The high fat treatment with 10% replacement of the saturated portion by ω3 or ω9 oil was effective in restoring the control of food intake in the animals, which consequently gained less weight compared to the obese group. Physiological data from fasting glycemic measure, insulin and glucose tolerance test (ITT and GTT) have showed improvements in the glycemic homeostasis, which was molecularly confirmed by the increase in the activity of the main proteins involved in the insulin signaling pathway as IR, IRS-1 and Akt. We believe that these results are due to the decrease in pro-inflammatory peptides expression as TNF-α, IL-6 and IL-1β and increase in the IL-10 expression, known by its anti-inflammatory effects. Improvements in insulin sensitivity in liver resulted in GSK-3 inhibition, culminating in hepatic control reestablishing of the glucose metabolism. Hematoxilin/Eosin (HE) and Immunohistochemistry analysis showed lower lipid accumulation and decreased

macrophage infiltration in hepatic parenchyma corroborating the reducing in macrovesicular steatosis and functional recovering of this tissue. There was reduction in adipocyte size, which contributed to inflammation remission. We could note the presence of GPR120 receptor in membrane of these cells probably allowing the ω3 and ω9 entry. Mass spectrometry technique attested high incorporation of these fatty acids in liver suggesting the beneficial effects found were due to these nutrients actions. These findings allow us to conclude that alimentary sources of ω3 and ω9 fattty acids modulate effectively the systemic inflammatory response. Such actions are controlled by GPR120, common receptor for these fats, and seem to occur in tissue-specific manner with systemic, positive impact on glycemic control.

Key-words: GPR120; Unsaturated fatty acids; Obesity; Metainflammation; Type 2 diabetes mellitus.

SUMÁRIO

ÍTEM	PÁGINA
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	23
OBJETIVOS	42
CAPÍTULO I – ARTIGO	43
DISCUSSÃO	93
CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

DEDICO

Ao meu pai, Walter, por me ensinar os valores essenciais à vida que fazem do ser humano um ser melhor. Por sua amizade gostosa, por me educar com carinho em tom sereno, por me trazer paz, tranqüilidade e conforto em meus momentos de tormenta. Sua paciência, honestidade, simplicidade, humildade e imensa sensibilidade (a qual herdei ao menos parte) são incomparáveis dons divinos que servem de exemplo não só a mim, tua única filha, mas a todos que o cercam. Os laços de amor e cumplicidade e a força que nos une extrapolam os limites do Universo. Amo-te incondicionalmente, e assim será por muitas e muitas vidas se houver, e por toda eternidade. A ti, meu pai, toda minha gratidão, admiração, respeito e essência.

À minha mãe, Rosângela, por seu amor, devoção, carinho e enorme dedicação em cuidar de mim. Por sua imensa (e muitas vezes exagerada! Rsrs) preocupação com meu bem-estar. Por ter lutado bravamente para garantir-me educação de qualidade que me formasse enquanto cidadã em todos os aspectos. Obrigada por tudo!

A Deus, por me dar forças e coragem pra lutar, por iluminar meu caminho e mostrar-me, nos mais simples acontecimentos do dia-a-dia, que a vida vale muito à pena e que nada acontece por acaso, tudo tem um sentido de ser! Creio no Senhor, agradeço por sua benção e proteção e peço que me faças instrumento de Sua vontade.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) que com toda sua excelência em educação, pesquisa e extensão me abriga desde meu ingresso na vida universitária, me ensinando valores, me abrindo portas e possibilitando meu desbravar do caminho do conhecimento científico digno e honesto, à qual devo toda minha formação acadêmica e em grande parte, enquanto ser-humano social e íntegro. Meu orgulho em relação a ti é imensurável e eterno. Muito obrigada!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por acreditarem que é por meio do incentivo à educação e às pesquisas científicas de qualidade que se faz um país melhor e mais próspero. É imensa a satisfação de poder contar com a credibilidade de instituições tão sérias, comprometidas e competentes. Obrigada pelo auxílio, sem o qual, este trabalho não se realizaria.

Aos animais experimentais, sem os quais jamais seria possível o progresso científico: todo o meu respeito e gratidão.

Partindo da premissa de que nada acontece por acaso, assim eu digo que se deu meu encontro com aquele que se dispôs a me ouvir e me proporcionou o desbravar de um mundo incrível e o desabrochar de uma grande paixão. Lembro-me como se fosse hoje do nosso primeiro “bate-papo” na cantina da FCA e de como minha vida mudou a partir daquele momento: um universo surpreendente repleto de possibilidades se abrira diante de mim. Dennys, você é o grande responsável por isso! Seu amor pela Ciência e pela Nutrição é altamente contagiante! Sua paixão pelo que faz e sua entrega cativa não só a mim, mas a todos aqueles que tiveram, têm, ou terão o privilégio de desfrutar de seus ensinamentos. Considero-me talvez a maior privilegiada, por ter sido sua primeira

aluna de pós-graduação e assim ter podido aprender diretamente contigo as teorias e práticas laboratoriais, desde as mais simples até as mais sofisticadas. Conte comigo na tarefa de passá-las adiante! Obrigada por acreditar e confiar em mim. Por me propor e orientar no desenvolvimento de um projeto tão apaixonante, instigante e complexo como este! Obrigada pela paciência, persistência, “puxões de orelha”, e principalmente, por sua amizade! Você, mestre, tem um enorme brilho que ilumina a vida de todos que o cercam! Muito obrigada por tudo! Que venham os próximos 4 anos! Avante!

Ao Professor Lício Velloso, nosso grande e genial líder! Obrigada por ceder espaço em seu laboratório, um verdadeiro berço de ouro para que pudéssemos desenvolver esta pesquisa. Sem seu apoio e orientação não teríamos chegado até aqui. Seu comprometimento com a Ciência, sua educação, generosidade e a maneira com que nos acolhe faz de ti exemplo de liderança e de ser-humano sem igual! Seus ensinamentos são para a vida inteira. A ti toda minha admiração, respeito e gratidão!

Aos meus pais, simplesmente fundamentais! Por doarem o melhor de si a cada dia para garantir o meu futuro e minha felicidade. Pelo amor inexplicável, insuperável, incondicional, sou eternamente grata!

Àquele que tanto me ouviu falar sobre obesidade, inflamação, ômegas, linhaça, azeite de oliva, e aquela “sopa de letrinhas” que mais parece um alfabeto secreto! Que me apoiou nessa jornada e esteve ao meu lado em tantos melhores e piores momentos: Evandro, muito obrigada! Tens um lugar muito especial em meu coração!

Ao querido professor e amigo Rodrigo Pauli, exemplo de humildade e parceria. Obrigada pela companhia e apoio em nossos longos experimentos! Tanto na prática quanto na teoria, você foi e sempre será fundamental!Estaremos juntos por longa data. Obrigada!

Ao professor Eduardo Ropelle, que contribuiu com brilhantismo para com nosso trabalho. Sua serenidade e competência são indispensáveis ao nosso grupo! Muito obrigada!

Ao professor Cláudio Teodoro de Souza, ou simplesmente, o Cafú! Embora não tenhamos convivido com proximidade, a construção deste estudo não teria sido a mesma sem seu brilho. Obrigada por seu apoio.

Aos professores Marcio Alberto Torsoni e Patrícia Prada. Agradeço a rica participação de vocês, indispensável nos preciosos ajustes finais deste trabalho.

À Erika Anne e ao Gerson, dupla essencial! Sem vocês o LabSinCel jamais seria o que é! O sucesso de nossas pesquisas depende da dedicação e empenho de vocês! Obrigada por todo respaldo, colaboração e carinho!

Ao nosso indispensável e querido bioterista Márcio Cruz. Difícil encontrar palavras que expressam o quanto seu trabalho é importante em nossa rotina de experimentos. Além de um profissional comprometido com o que faz, é uma pessoa admirável! Muito obrigada Márcio!

À minha querida amiga e grande companheira, Dani Vitorino! Fia! Quem realmente fez tudo acontecer ao meu lado neste projeto! Obrigada pela parceria, por me auxiliar desde as coisas mais simples às mais complexas. Você faz parte da minha vida dentro e fora do laboratório. Sua amizade foi um imenso presente que o ingresso na pós-graduação me proporcionou. A ti, minha admiração, respeito e amizade! Estaremos sempre juntas, por mais que você insista em ir pra longe!

À minha grande parceira e fiel amiga, Jú Contin! Simplesmente excepcional! Dona de uma inteligência sem igual, competência é seu sobrenome. Existem

pessoas que entram em nossa vida e nos dão força, nos colocam de pé quando aparentemente não conseguiríamos levantar. Amigo não é aquele que enxuga as lágrimas, mas que te faz engolir o choro e parar com “frescuras”! Essa é você Juliana! Obrigada por tornar mais simples os meus maiores desafios no desenvolvimento deste projeto. És um grande exemplo que procuro seguir dentro e fora dos limites do laboratório. Amo-te como minha irmã mais velha! Estarei sempre ao teu lado, amiga! A ti todo meu respeito e admiração.

Aos amigos Leandro, Rodolfo, Nathália e Gustavo e Alê Moura, grandes parcerias! Cada um, à sua maneira, participou ativamente na construção desta obra! A colaboração de vocês foi de fundamental importância no desvendar de novos conhecimentos científicos! Muito obrigada!

À Joseane e Dani Razzoli, as senhoras do PCR e Histologia! Obrigada pela colaboração e paciência em nos ensinar essas técnicas tão minuciosas! Admiro a dedicação e o cuidado com o que fazem. Vocês são especiais! Muito obrigada pelo apoio e carinho.

Aos amigos do LabSinCel: Mariana, Gabriela, Rodrigo, Lucas, Lorena, Bruna, Carina, obrigada pelos momentos de troca de informações, de construção de conhecimento e de pura descontração! É uma delícia fazer ciência e se divertir ao mesmo tempo! Estamos juntos!

Aos amigos do Laboratório de Investigação da Resistência à Insulina, Carlos, Vagner e outros que direta ou indiretamente colaboraram com o desenvolvimento deste complexo e apaixonante projeto: Muito obrigada!

"Deixe o alimento ser o teu medicamento e deixe o medicamento ser o teu alimento. Apenas a natureza cura, desde que seja dada a oportunidade."

Hippocrates

LISTA DE ABREVIATURAS

SIGLAS

AGs	Ácidos graxos
AGIs	Ácidos graxos insaturados
AGSs	Ácidos graxos saturados
Akt	Proteína quinase B
ALA	Ácido alfa-linolênico
AO	Ácido Oleico
DHA	Ácido Docosahexaenóico
DM2	*Diabetes mellitus* tipo 2
FS	Flaxseed (Semente de linhaça)
GPR120	Receptor 120 acoplado à proteína G
GPR40	Receptor 40 acoplado à proteína G
GSK-3	Glicogen sintase kinase-3 (Glicogênio sintase quinase-3)
GTT	Glucose tolerance test (Teste de tolerância à glicose)
HF	High fat (hiperlipídica)
IkBα	Inibidor do fator kappa B
IkK	Inibidor kappa kinase
IL-1β	Interleucina1 beta
IL-6	Interleucina6
IL-10	Interleucina 10
IR	Receptor de insulina
IRS1/2	Substratos do receptor de insulina ½
ITT	Insulin tolerance test (Teste de tolerância à insulina)
JNK	Jun n terminal kinase
NF-kB	Fator nuclear kappa B
OL	Olive (Oliva)
RI	Resistência à insulina
SCD1	Stearoyl-CoA desaturase-1 (Estearoil-CoA dessaturase-1)
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

ω3	Ômega-3
ω9	Ômega-9
ω6	Ômega-6

INTRODUÇÃO

A Revolução Industrial e a criação da máquina a vapor induziram profundas transformações no modo de vida da população mundial. Este advento, aliado ao desenvolvimento econômico-tecnológico, propiciou aumento na produção e consumo de alimentos industrializados, ricos em conservantes, sódio, refinados e gorduras *trans* e saturadas, bem como surgimento de instrumentos facilitadores da rotina diária, corroborando o ambiente "obesogênico" (Swinburn et al, 2011). Nesse ínterim, diversos países do mundo, incluindo os emergentes, têm experimentado o fenômeno da transição nutricional moderna, na qual o estado deplorável da fome foi substituído pela soberba da obesidade (Popkin, 1998). A obesidade pode ser definida por excessivo e anormal acúmulo de gordura no tecido adiposo branco capaz de causar danos à saúde (Kopelman, 2000). Decorre do desequilíbrio entre a ingestão e gasto energético, além de ser considerada um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade, elevando a doença em níveis pandêmicos (Velloso, 2006; Gluckman et al., 2011; Swinburn et al., 2011).

Para fins epidemiológicos, o sobrepeso é classificado pelo índice de massa corporal (IMC) igual ou superior a 25 kg/m^2 e a obesidade, pelo IMC igual ou superior a 30 kg/m^2 (WHO, 2013). Números revelados por diversos estudos que abordam diferentes facetas epidemiológicas desta doença surpreendem a cada ano. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2008 havia, ao menos, 1,4 bilhão de adultos com sobrepeso e, dentre estes, 500 milhões já apresentavam o fenótipo de obesidade. Projeções para as próximas décadas apontam para mais de 50% da população norte-americana obesa e mais de 25% da população brasileira na mesma condição até o ano de 2025 (WHO, 2013). Esse quadro sobrecarrega os sistemas de saúde pública mundiais, com demanda crescente de atendimentos por doenças crônicas não transmissíveis relacionadas à obesidade, como cardiopatias, hipertensão arterial sistêmica, diversos tipos de câncer e o diabetes tipo 2 (DM2) (Wang et al., 2011).

Variável determinante do IMC e foco de intervenção no panorama da obesidade, o peso corporal é determinado por uma série de componentes que interagem entre si como a genética e fatores ambientais e psicossociais, que

atuam por meio de mediadores fisiológicos inerentes à ingestão e ao gasto energético (Wang et al., 2011). Assim, a obesidade deve ser vista como processo de interação multifatorial, capaz de desencadear uma série de desordens metabólicas, as quais possuem como pano de fundo comum a inflamação crônica e de baixo grau agindo como iniciadora ou intensificadora na gênese destes distúrbios. Da compreensão destes fenômenos, surge o termo “meta-inflamação”, o qual designa o caos metabólico multi-orgânico em resposta ao excesso de energia e nutrientes no organismo (Hotamisligil, 2006).

Tal estado inflamatório difere da inflamação clássica evidenciada por sinais como dor, calor, rubor e tumor. Estas manifestações estão associadas ao aumento da taxa metabólica basal em detrimento da resposta rápida e direta do sistema imune à determinada agressão ou infecção local, sendo neutralizadas assim que tais distúrbios são cessados. Contudo, a resposta inflamatória encontrada na obesidade é de natureza diferente (Hotamisligil, 2006; Medzhitov, 2008). O gatilho inflamatório desta doença é metabólico, causado pelo excesso do consumo de nutrientes e desencadeado por células especializadas como macrófagos e adipócitos, capazes de produzir peptídeos pró-inflamatórios que atuam na orquestração molecular que culmina em danos homeostáticos (Gregor, 2011). Em nível sub-clínico, a expressão aumentada destes peptídeos interfere em pontos específicos da transdução de vias de sinalização como a dos hormônios leptina e insulina. A resistência à ação desses hormônios é tida como passo inicial para a gênese de doenças metabólicas, tanto no sistema nervoso central (SNC), quanto em órgãos periféricos, uma vez que são responsáveis pelo controle de inúmeras funções em todo o organismo (Dandona, 2004; Velloso, 2006).

Em tecidos metabolicamente ativos como o hepático, muscular esquelético e adiposo branco, ocorre desequilíbrio na homeostase glicêmica, o que pode ser observado pelo aumento na síntese hepática de glicose, captação muscular ineficiente de glicose e captação compensatória deste nutriente pelo tecido adiposo branco, estimulando a adipogênese (Hotamisligil, 2006; Gregor, 2011). As respostas moleculares, bioquímicas e fisiológicas em cada um destes tecidos devido às interferências inflamatórias nestas vias sinalizadoras são particulares,

no entanto, a gênese do processo parece ocorrer da mesma forma: devido ao consumo excessivo de gorduras saturadas. Esse tipo de gordura é capaz de ativar receptores presentes em células do sistema imune inato, os receptores do tipo *Toll,* e desencadear respostas de defesa do organismo mesmo na ausência de um agente agressor (De Souza et al., 2005; Milanski et al., 2009; Moraes et al., 2009; Cintra et al., 2012).

1.0 O Processo Inflamatório de Baixo Grau Per Se

Receptores do tipo *Toll*, inicialmente identificados em drosófilas *(Drosophila melanogaster)*, desempenham conexão importante entre o sistema imune inato e o sistema metabólico, e até o momento, 11 membros desta família foram encontrados em mamíferos. Os TLRs são membros da superfamília do receptor de IL-1 (IL-1R) os quais apresentam homologia significante em suas regiões citoplasmáticas, como o domínio *Toll*/IL-1R (TIR) (Akira, 2004).

A inflamação associada à obesidade e resistência à insulina decorre da ativação da via de sinalização inerente ao sistema imune inato. A via do receptor tipo *Toll*, especialmente o 4 (TLR-4), culmina no aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias em diversos tipos celulares (Shi et al., 2006). Os receptores TLR-4 estão presentes na membrana celular de monócitos e macrófagos e reconhecem lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular de bactérias gram-negativas iniciando sua cascata de sinalização intracelular. Em mamíferos, o complexo TLR é formado pelo receptor *Toll* e pelas proteínas acopladas MD2 e CD14 (Schnare et al., 2001).

O LPS é um lipopolissacarídeo formado por oligossacarídeos e uma base lipídica (Miller et al., 2005). Os ácidos graxos que compõe a estrutura lipídica são dois principais: láurico (C12:0) e mirístico (C14:0) (Caroff & Karibian, 2003). Quando reconhecidos pela proteína CD14, são apresentados ao complexo TLR-4/MD2 o qual é ativado. O acionamento desta via pelos ácidos graxos C12:0 e C14:0 é conhecido e foi descrito com base em estudos em animais *knockout* para o TLR-4 (Caroff & Karibian, 2003; Takeda et al., 2003; Miller et al., 2005). Da mesma forma com que os receptores TLR-4 reconhecem estruturas lipídicas

presentes em organismos invasores, ácidos graxos oriundos do consumo dietético, especialmente os saturados, também podem ser reconhecidos. De forma análoga, o sistema imunológico é ativado, mesmo sem a presença de um microrganismo invasor (Lee et al., 2001; Shi et al., 2006), uma vez que esses ácidos graxos são amplamente difundidos em alimentos como óleo de côco, cerne de palma, leite e derivados, carnes, chocolate e manteiga (Arq. Bras. Cardiologia, 2013).

Ao serem reconhecidos pelo TLR-4, ácidos graxos saturados disparam a sinalização de sua via, a qual transduz o sinal para o interior celular. Este estímulo é capaz de recrutar moléculas que formarão o complexo protéico que culmina na ativação da via do NF-kB (fator nuclear *kappa* B). Este por sua vez, migra até o núcleo da célula e ativa a transcrição de genes que codificam moléculas pró-inflamatórias como citocinas, quimiocinas e outros efetores da resposta imune inata que, pós-traduzidos, podem realizar atividades autócrinas, parácrinas e endócrinas (Zuany-Amorim et al., 2002).A associação do receptor *Toll*-4 com a proteína de resposta primária à diferenciação mieloide 88 (MyD88), transloca para a superfície interna da membrana celular a proteína quinase-4 associada ao receptor de interleucina 1(IRAK-4), que se associa à outra quinase semelhante, a IRAK-1. Desse modo, a IRAK-4 induz à fosforilação da IRAK-1 (Dunne & Pobe, 2003; Takeda et al., 2003). Não obstante, a proteína TRAF-6 (fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral) é recrutada no intuito de compor o complexo ao se associar à IRAK-1, que a ativa. Após, a IRAK-1 fosforilada juntamente à TRAF-6 dissociam-se do receptor e formam um novo complexo junto à proteína TAK-1 (fator de crescimento transformador-β ativado por quinase) (Bradley & O´Neill, 2001). Quando unidas essas proteínas recrutam para si as proteínas citoplasmáticas TAB-1 (proteína ligadora1 TAK-1), TAB-2 e TAB-3. A IRAK-1 é desligada do complexo e degradada junto à membrana plasmática, permanecendo interligadas as proteínas TRAF-6, TAK-1 e TAB-1, 2 e 3 que unidas, são translocadas para o citosol (Wang et al., 2001). Um complexo dimérico enzimático ubiquitina - conjugase-2 (E2) composto por Ubc13 (enzima-ubiquitina conjugase 13) e Uev1A (variante 1 da enzima - ubiquitina conjugase E2) é necessário para

dar suporte à ativação da proteína IKK (quinase inibidora do fator *kappa*) pela TRAF-6. Este complexo E2 foi inicialmente identificado a catalisar a montagem da única cadeia poli Ubiquitina (poliUb) por meio da ligação em resíduo de lisina-63 (K63) de Ubiquitina (Hofmann & Pickart, 1999). A proteína TRAF-6 age como uma E3 ligase facilitando a montagem da cadeia poliUb pela ligação K63-Ubc13 e Uev1A necessária à ativação de IKK (Deng et al., 2000). Assim, no citosol, o complexo TRAF-6, TAK-1, TAB-1, 2 e 3 é associado à ubiquitina ligase Ubc13 e à Uev1A o que induz à ubiquitinação da TRAF-6 que ativa a proteína TAK-1 a qual se torna fosforilada (P-TAK). Esta por sua vez, é capaz de ativar proteínas pertencentes a diferentes vias como a do NF-κB e as das MAP-quinases (proteína quinase ativada por mitógeno). No que tange a inflamação, a P-TAK fosforila e ativa o complexo IKK, que consiste no IKK-α, IKK-β (também chamadas de IK1 e IKK2) e IKK-Y (também conhecida por modulador essencial do NF-κB, NEMO) que, do contrário, fosforilará e inibirá a proteína subsequente, o IKB, que mantinha sob seu domínio as proteínas p50 e p65 formadoras do dímero correspondente ao NF-κB (Akira &Takeda, 2004). A fosforilação do IκBα induz à sua ubiquitinação e posterior degradação pelo proteossoma, liberando no citoplasma o NF-κB, que atua como fator de transcrição ao migrar até o núcleo da célula e ligar-se a regiões específicas do DNA responsáveis por transcrever genes reguladores de moléculas pró-inflamatórias como as citocinas fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α), interleucinas1β (IL-1β) e 6 (IL-6), proteína de quimiotaxia para monócitos (MCP-1), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), dentre outras, assim como a interleucina anti-inflamatória IL-10, a qual atua contra-regulando a resposta inflamatória (Senftleben et al., 2001; Barton & Medzhitov., 2003).

Paralelamente à sua contribuição na ativação da via do NF-κB, a proteína TAK-1 pode também fosforilar outras proteínas como a MKK-6, a qual ativa as vias das proteínas JNK (c-Jun N-terminal quinase) e a p38, potencializando o processo inflamatório (Ninomiya-Tsuji et al.,1999; Wang C et al., 2001). Estas últimas tornam-se ativadas quando fosforiladas e, similarmente ao NF-κB, atuam como fator de transcrição ao migrarem até o núcleo e transcreverem genes relacionados à inflamação, diferenciação ou crescimento celular, dependendo do estímulo

inicial. A JNK ainda é capaz de controlar fenômenos de estresse de retículo e apoptose, ao aumentar a permeabilidade da membrana mitocondrial (Saltiel & Kahn, 2001).

1.1 Interação das Vias Inflamatórias com a Via de Sinalização da Insulina.

1.1.1 O Funcionamento Normal

A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico, com peso molecular de 5,8k Da com efeitos potentes e diversos. É produzida pelas células β das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento da concentração plasmática de glicose e aminoácidos após as refeições, e é essencial para o desenvolvimento adequado de vários tecidos e para a manutenção da homeostase orgânica da glicose (Eliasson et al., 2008). O hormônio promove captação de glicose no músculo e tecido adiposo e inibe a produção hepática deste nutriente, por meio da redução da neoglicogênese e glicogenólise, atuando assim, como o principal regulador da concentração plasmática de glicose (Saltiel & Kahn, 2001). A insulina também estimula o crescimento e a diferenciação celular e proporciona o estoque de substratos no fígado, músculo e tecido adiposo, por meio da estimulação da lipogênese, síntese de glicogênio e de proteínas e da inibição da lipólise, glicogenólise e proteólise (Pessin & Saltiel, 2000). A resistência à insulina ou sua deficiência resulta em profunda desregulação nesses processos levando ao aumento nos níveis sanguíneos de glicose e de lipídios no estado de jejum ou pós-prandial (Saltiel & Kahn, 2001). Além disso, a insulina tem efeito na expressão de genes, atua no aumento da produção de óxido nítrico no endotélio, na prevenção da apoptose e promoção da sobrevida celular e no importante controle da ingestão alimentar no hipotálamo, essencial para a regulação do equilíbrio energético (Schwartz et al., 1992; Velloso, 2006).

O receptor de insulina (IR) é específico de membrana, uma glicoproteína heterotetramérica pertencente à subfamília de receptores tirosina quinase, com atividade quinase intrínseca, a qual inclui o IGF-1R – *insulin growth factor*-1

receptor (receptor do fator de crescimento semelhante à insulina) - e um receptor órfão, o IR-R – *related receptor (*receptor relacionado ao IR) (Patti & Kahn, 1998). Assim, o IR possui propriedade de se auto-fosforilar após estímulo pela insulina, e de fosforilar outros substratos em aminoácidos tirosina (Pessin & Saltiel, 2000). O IR é composto por duas subunidades α e duas β, ligadas por pontes dissulfeto (S-S) que funcionam como enzima alostérica. A subunidade α é totalmente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina. A subunidade β é responsável pela transdução do sinal, sendo uma proteína de localização transmembrana. (Patti & Kahn, 1998; Pessin & Saltiel, 2000).

A ligação da insulina à subunidade α do seu receptor faz com que ocorra a fosforilação de múltiplos resíduos de tirosina (1158, 1162, 1163) da subunidade β por meio da doação de grupos fosfatos de moléculas de ATP intracelulares. Essa auto-fosforilação do IR aumenta ainda mais sua atividade quinase tornando-o apto a dar continuidade à transdução do sinal por meio da fosforilação de vários substratos protéicos em resíduos de tirosina, os chamados substratos do receptor de insulina–IRSs. A fosforilação em tirosina desses substratos cria sítios de reconhecimento para proteínas contendo domínio SH2 (homologia a Src2) com destaque para a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-q) (Okada et al, 2004).

As proteínas IRS-1 e IRS-2 são consideradas os principais substratos do receptor de insulina. Os dois outros substratos desta família, o IRS-3 e o IRS-4 foram descritos em tecidos embrionários como o adiposo e o renal, mas não em outros tecidos, o que sugere papel limitado dessas duas isoformas no metabolismo (White, 2002).

O IRS-1 possui em sua estrutura múltiplos resíduos de tirosina em localizações estratégicas. São 22 resíduos de tirosina potenciais para a fosforilação do IRS-1 que, após estimulo inicial desencadeado pela ligação da insulina ao IR, são rapidamente fosforilados resultando em uma ligação do IRS-1 com proteínas específicas. O IRS-2 por sua vez, tem por volta de 70% de homologia ao IRS-1. O IRS-1 e o IRS-2 fosforilados, associam-se à enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-q) ativando-a. Uma vez ativa, a PI3-q desencadeia a ativação de outras importantes proteínas como a proteína quinase B (PKB),

conhecida como Akt e a MAPK – *mitogen activated protein kinase* (proteína quinase ativada por mitógenos) (Saltiel & Pessin, 2002; White, 2002).

A proteína com ação enzimática PI3-q possui duas subunidades, uma catalítica, de 110 kDa e outra regulatória, de 85 kDa, a qual contém duas porções SH2 e uma SH3. A PI3-q catalisa a fosforilação dos fosfoinositídios de membrana na posição 3 do anel de inositol produzindo fosfatidilinositol-3-fosfato, fosfatidilinositol-3,4-difosfato e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato. Este último produto liga-se ao domínio PH (*pleckstrinhomology*) de várias moléculas sinalizadoras alterando suas atividades e localizações sub-celulares. Além disso, a PI3-q possui atividade serino-quinase (Thomas et al., 2013) e, como suas duas subunidades podem interagir com outras proteínas sinalizadoras, esta enzima pode ser importante na ação da insulina, independentemente da produção de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato. Este, por sua vez, pode regular a PDK-1 – *phosphoinositide-dependent kinase1* (quinase1 dependente de fosfoinositídeo) – uma serina/treonina quinase que fosforila e ativa outra serina / treonina quinase, a Akt. Esta última possui domínio PH que interage diretamente com o fosfstidilinositol-3,4,5-trifosfato, promovendo direcionamento da proteína para a membrana celular, bem como sua atividade catalítica (Alessi & Downes, 1998; Okada et al., 2004). A Akt desempenha função nodal na via da insulina ao propagar sinais deste hormônio pelas diversas vias moleculares sensíveis. Tais vias podem culminar em respostas intra-celulares e fisiológicas descritas (Tanigushi et al., 2006). As isoformas da Akt (1, 2 ou 3) ativas dão início às atividades desta proteína.

No tocante à captação de glicose em tecidos periféricos como músculo esquelético e tecido adiposo, a Akt fosforila em treonina, na posição 642, ativando a proteína AS 160 (proteína ativada por GTPase), a qual dissocia-se de vesículas de GLUT-4 (transportador de glicose 4) sensibilizando pequenas proteínas (TUG) ao redor deste transportador de glicose. Esse efeito está associado ao aumento de exocitose das vesículas de GLUT-4, aumentando sua expressão na membrana plasmática e consequentemente aumentando a captação de glicose para dentro da célula. Ressalta-se que a isoforma2 da Akt (Akt2), e não as isoformas 1 e 3

está envolvida na translocação do GLUT-4 em células adiposas e musculares, aumentando a captação de glicose nessas células. GLUT-4 é o transportador de glicose insulino-dependente presente na musculatura estriada cardíaca e esquelética e no tecido adiposo. Em células como neurônios, hemácias e hepatócitos, a glicose é capaz de se difundir para o interior destas células na ausência da insulina (Huang & Czech, 2007).

A Akt é capaz de propagar o sinal da insulina até o núcleo,fosforilando a proteína FoxO1 – *Forkhead-box containing gene, O* subfamily (fator de transcrição da família *forkhead* BOX O1). Na ausência do sinal da insulina, a FoxO1 permanece desfosforilada e ativa, localizada no núcleo da célula (Kim et al., 2006). Quando o sinal da insulina é propagado até o núcleo por meio da Akt, a FoxO1 é fosforilada em resíduo de serina 256, exportada para o citoplasma e degradada pelo proteossoma. Isso reduz sua ação em transcrever genes gliconeogênicos, como o da enzima fosfoenolpiruvato-carboxiquinase (PEPCK), a qual converte o oxaloacetato em fosfoenolpiruvato na via gliconeogênica e da enzima glicose 6-fosfatase (G-6-Pase), responsável por converter glicose-6-fosfato em glicose no fígado, possibilitando a extrusão deste nutriente para o exterior da célula. Desse modo, quando a via de sinalização da insulina está devidamente ativa, a FoxO1 é fosforilada, exportada para o citosol e degradada pelo proteassoma, encerrando as atividades gliconeogênicas (Tanigushi et al., 2006).

A insulina regula o metabolismo de glicogênio essencialmente por meio da fosforilação e controle da atividade de enzimas que catalisam a síntese ou a lise de glicogênio. A enzima glicogênio sintase (GS) pode ser desativada pela fosforilação em múltiplos resíduos. Este evento pode ser mediado por diferentes quinases como a monofosfato adenosina cíclica (cAMP), proteína quinase dependente (PKA), quinase ativada por AMP e a glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3). Esta última é a principal responsável pela desativação da enzima GS. No fígado e no músculo, a Akt fosforilaa GSK-3 em resíduo de serina9, reduzindo sua atividade catalítica. Assim, a GS deixa de ser inibida, resultando em aumento na produção de glicogênio (glicogênese). Portanto, a insulina estimula o acúmulo de glicogênio por meio do aumento do transporte de glicose no músculo (envolvendo

a proteína AS 160 e o GLUT-4) e síntese de glicogênio em fígado e músculo (Okada et al., 2004).

1.1.2 Da Interação entre as Vias

O fenômeno que surge como elo entre a obesidade e o DM2 é conhecido como resistência à insulina e possui como denominador comum a essas co-morbidades o processo inflamatório de baixo grau. Na condição de intolerância à glicose, o indivíduo pode manter valores de glicemia de jejum próximos ao normal (100 mg/dL). Todavia, com a progressão da intolerância a este hormônio, manifesta-se o DM2, caracterizado por hiperglicemia, com níveis de glicose iguais ou superiores a 126 mg/dL e hiperinsulinemia (American Diabetes Association, 2005).

Em seu estudo, Prada et al., 2005 verificaram que a resistência à insulina ocorre de maneira tecido específica. Desse modo, neurônios que expressam neuropeptídeos anorexigênicos no hipotálamo e o músculo esquelético seriam os primeiros a se tornarem resistentes à ação do hormônio. Em seguida, células hepáticas e endoteliais deixariam de responder adequadamente ao estímulo da insulina. Contudo, apenas após alguns meses é que o problema se instalaria no tecido adiposo, responsável pelo estoque de gordura corporal.

A resistência à insulina hipotalâmica ocasiona desequilíbrio no controle da fome e gasto energético, assim, é possível compreender o motivo pelo qual geralmente indivíduos resistentes à insulina tornam-se obesos, embora isso exclusivamente não explique a origem da obesidade que, como dito anteriormente, pode ter origem genética ou em distúrbios bio-psico-sociais (Schwartz et al, 1992).

A progressão da resistência à insulina interfere na captação de glicose em tecidos insulino-dependentes resultando em hiperglicemia. Elevados níveis de glicose sanguínea induzem células β-pancreáticas a produzirem e secretarem maior quantidade de insulina. No entanto, como a sensibilidade dos tecidos encontra-se reduzida, instala-se o quadro de hiperinsulinemia e hiperglicemia constante, atingindo e extrapolando o limiar de concentração plasmática de

glicose de 126mh/dL, instalando-se desse modo, o quadro de DM2. Nesse contexto, o pâncreas ao ser exaustivamente estimulado pela condição hiperglicêmica acaba por manifestar falência das células beta, agravando ainda mais o estado diabético (Pirola et al., 2003).

A principal causa do DM2 é um longo histórico de obesidade. O que fortalece essa associação é a alta capacidade dos adipócitos hipertrofiados secretarem peptídeos pró-inflamatórios que podem causar resistência à insulina, sendo os depósitos de gordura central (intra-abdominal) mais fortemente associados à resistência à insulina e doenças cardiovasculares (Hotamisligil, 2003; Marette, 2003; Yudkin, 2003).

A resistência à insulina relacionada à obesidade é caracterizada por alterações sobre a via clássica de transmissão do sinal deste hormônio. A via do TLR-4 desencadeada por LPS bem como a via do TNF-α podem interferir na transdução de sinalização da insulina por meio da fosforilação em resíduos de serina dos substratos do receptor de insulina IRS1/2 por quinases como JNK, IKKβ e PKC (proteína quinase C) (Shulman, 2000). A JNK é uma proteína pertencente à família das MAP quinases e pode ser ativada por vias inflamatórias tais como as do TNF-α, IL-1β e TLR-4 (Prada et al., 2005; Shi et al., 2006). A ativação da JNK induz fosforilação inibitória em serina 307 (Ser^{307}) do IRS-1. O resíduo de Ser^{307} localiza-se próximo ao sítio de ligação para fosforilação em tirosina do IRS-1 pelo IR. Assim, a fosforilação em Ser^{307} do IRS-1pela JNK, impede a fosforilação em tirosina desta proteína pelo IR inviabilizando o sinal da insulina (White, 2002; Hotamisligil, 2003; Prada et al., 2005). O IRS-2 possui inúmeros resíduos de serina susceptíveis à fosforilação pela JNK, porém não se encontram detalhadamente descritos (Prada et al, 2005).

Outra proteína com atividade quinase, inflamatória, crucial para o desenvolvimento da resistência à insulina é a IKK-β. Como descrito anteriormente, a ativação desta proteína leva à fosforilação do IκB, o qual é ubiquitinado e degradado pelo proteassoma. Esses eventos culminam com a translocação nuclear do NF-kB (P50-P65) o qual promove a transcrição de citocinas. Adicionalmente, o IKK-β e a PKC também podem fosforilar em resíduo Ser^{307} o

IRS-1, o que acarreta redução da atividade da PI3-q e consequente inviabilização da transdução do sinal da insulina (Hotamisligil, 2006).

No SNC, a resistência à insulina em neurônios hipotalâmicos não permite que a Akt fosforile e desative a FoxO1 no núcleo celular, impedindo sua extrusão para o citosol. A FoxO1 é o fator de transcrição responsável pela manutenção da expressão do neuropeptídio Y (NPY), principal neurotransmissor orexigênico e anti-termogênico (De Souza et al., 2005; Moraes et al., 2009). Assim, ao impedir a fosforilação e extrusão da FoxO1 do núcleo da célula, o fenômeno de resistência à insulina hipotalâmica interfere negativamente no controle do balanço energético, o que contribui com a manutenção do processo obesogênico (Velloso, 2006).

No que tange a resistência hepática à insulina, vários eventos metabólicos importantes não são desencadeados devido à redução da fosforilação e ativação da Akt. Esta proteína, como previamente descrito, controla as atividades das enzimas GSK-3, PEPCK e G-6-Pase. Por meio da fosforilação e desativação da GSK-3, induz aumento da atividade da enzima glicogênio sintase promovendo glicogênese (Saltiel & Kahn, 2001; Gregor & Hotamisligil, 2011). Além disso, há a fosforilação da FoxO1 no núcleo, a qual transcreve PEPCK e G-6-Pase, responsáveis pela produção e liberação hepática de glicose, respectivamente (Cintra et al., 2008).Portanto, a resistência hepática à insulina provocada pelo tônus inflamatório, aumenta a glicemia sanguínea, prejudicando ainda mais a homeostase glicêmica. (Shoelson, 2006; Araújo et al.; 2007; Cintra et al., 2008).

Em relação à musculatura esquelética, o prejuízo na captação de glicose também contribui com o aumento dos níveis circulantes deste composto, captado principalmente pelo tecido adiposo, o qual parece ser o último a manifestar o fenótipo de resistência à insulina (Prada et al, 2005). Com excesso de nutrientes em estoque, este tecido torna-se hipertrofiado e com vias lipogênicas ativas. Sendo este tecido um importante órgão endócrino que produz e secreta hormônios como a leptina e adiponectina, sua hipertrofia potencializa a expressão de adipocitocinas como TNF-α, IL-6, IL-1β,iNOS, e MCP-1, que prejudicam a sinalização da insulina em tecidos alvos para a sua ação. Ao sinal da quimiotaxia induzida pela MCP-1, monócitos invadem o tecido adiposo, transformam-se em

macrófagos ativados capazes de produzir tais citocinas, intensificando o processo inflamatório crônico e de baixo grau, responsável pelo desenvolvimento da obesidade, resistência à insulina e DM2 (Marette, 2003; Yudkin, 2003; Shoelson, 2006).

Portanto, os mecanismos moleculares que interferem nas vias de sinalização da insulina são capazes de contribuir de diferentes formas para a gênese de diversas doenças ou para o desequilíbrio na manutenção da homeostase orgânica. Ressalta-se que o processo inflamatório crônico e de baixo grau parece ser o responsável pelas alterações moleculares observadas. A figura a seguir ilustra a interação entre as principais vias inflamatórias na obesidade e a via de sinalização de insulina:

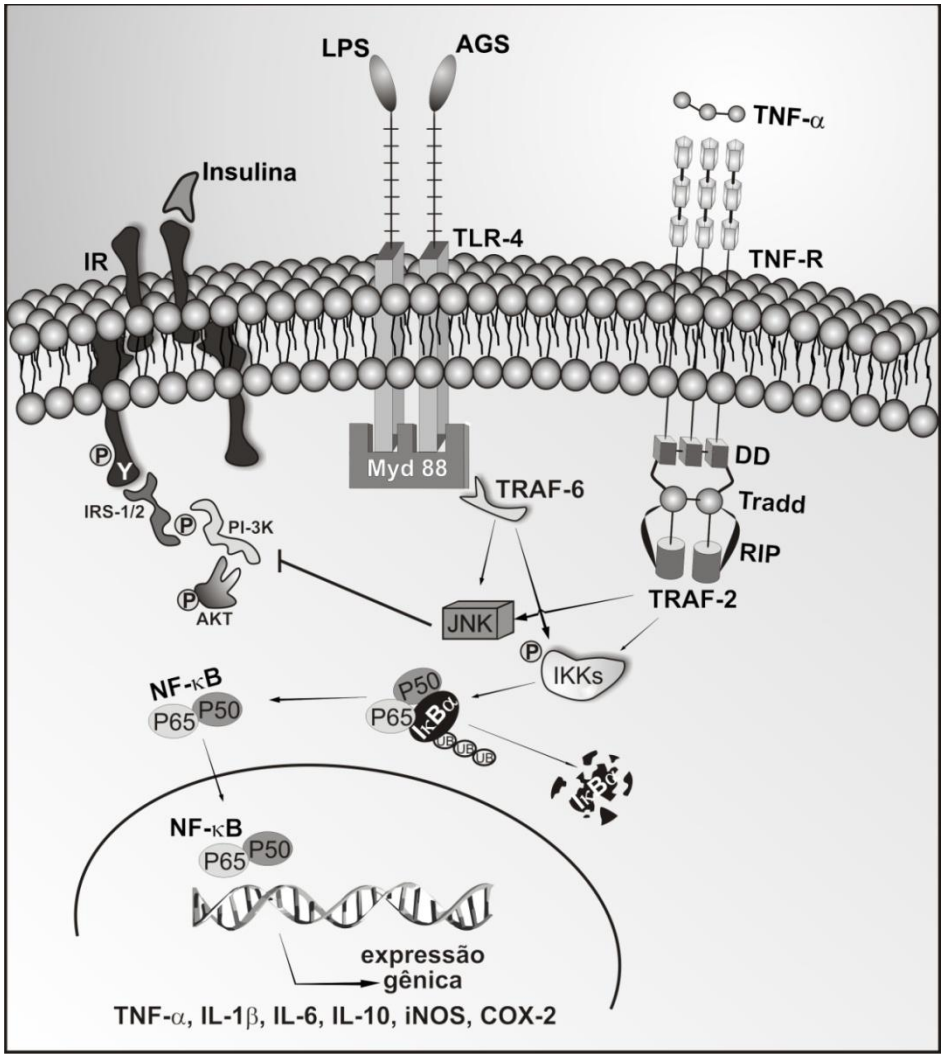


Figura 1. Mecanismo de Resistência à insulina. A ativação das serinas quinases IKKβ e JNK ressaltam a sobreposição das vias metabólicas e inflamatórias. A IKKβ pode interferir na sinalização da insulina através de pelo menos duas vias: 1-fosforilação direta dos substratos do receptor de insulina (IRS1 e IRS2) em resíduos de serina; 2-ativação direta do NF-κB, fator de transcrição que pode estimular a produção de vários mediadores pró-inflamatórios como o TNF-α, IL-1β, IL-6 e iNOS. Já a proteína JNK ativada também pode interferir negativamente na via da insulina fosforilando o IRS1 e IRS2 em serina.

1.2 Estratégias Potenciais Antiinflamatórias

No intuito de conter o processo inflamatório característico da obesidade e suas desordens metabólicas, estratégias farmacológicas de terceira geração trouxeram à tona drogas biológicas como *infliximab, etanercept, adalimumabe (bloqueiadores da ação do TNF-* α) e *tofacitinib (inibidor da enzima Janus kinase 3 – JAK3)*, as quais atenuam o fenômeno ao inibirem, por diferentes formas, potentes moléculas desencadeadoras da inflamação. Tais medicamentos ainda se encontram em fase experimental ou com custos que os inviabilizam (Araújo, 2007; Gao, 2012).

Diante de tal contexto, ampliou-se o campo das pesquisas com foco molecular, especialmente no âmbito da Nutrigenética e Nutrigenômica, no sentido de buscar alternativas nutricionais eficazes na terapêutica da obesidade e suas doenças associadas.

A partir deste universo de investigações, surgiram inúmeras pesquisas em torno de nutrientes capazes de modular a inflamação, como é o caso dos ácidos-graxos. Além de componentes estruturais de várias classes de lipídios como triacilgliceróis, ésteres de colesterol e ácidos graxos não esterificados, são integrantes de membranas celulares sob a forma de fosfolipídios. Nos seres humanos e em outros organismos, além da função estrutural, atuam como substrato energético correspondendo a 30% do total de energia ingerida pelos humanos, e podem ser estocados no tecido adiposo, especialmente quando o

consumo energético está além das necessidades individuais resultando em obesidade (Tvrzicka et al., 2011).

No tocante aos ácidos graxos insaturados, pode-se classificá-los em razão das duplas ligações em mono- ou poli-insaturados, sendo estas ligações encontradas principalmente na posição *cis* nas cadeias. A localização da primeira dupla ligação na cadeia carbônica a partir do grupamento metila, identifica a série do ácido graxo pela letra ω (Ômega), sendo principais, os pertencentes às famílias ω3, ω6, ω7 e ω9 (Arq. Bras. Cardiologia, 2013).

O principal representante dos ω6 é o ácido linoleico (LA) (C18:2), encontrado em óleos vegetais como soja, milho, girassol, cártamo e oleaginosas como o amendoim, nozes e castanhas. Em relação aos ω3, o mais simples deles é de origem vegetal, o ácido α-linolênico (ALA) (C18:3), que tem como fontes, as sementes de linhaça e chia e os óleos de soja e canola. Os outros dois principais são o ácido eicosapentaenóico (EPA) (C20:5) e o docosahexaenóico (DHA) (C22:6). Eles estão presentes nos óleos provenientes das vísceras de peixes de águas muito frias como o salmão e o arenque. São também encontrados na sardinha e no óleo de fígado de bacalhau. O ω9 é um mono-insaturado, representado essencialmente pelo ácido oleico (AO) (C18:1), sendo suas principais fontes o azeite de oliva e o óleo de canola. Assim como o ω9, o ω7 também possui uma única dupla ligação sendo representado pelo ácido palmitoleico (C16:1) encontrado na macadâmia (Garg et al., 2003; Cintra et al., 2006; Arq. Bras. Cardiologia, 2013).

1.3 Ácidos Graxos Insaturados e Seus Efeitos na Inflamação

As drásticas mudanças ocorridas no padrão alimentar da população mundial nas últimas décadas refletiram sobre a relação da ingestão ômega 6/ ômega 3 (ω6/ω3). Com a revolução agrícola, houve aumento no consumo de óleos, cereais e grãos ricos em ômega 6, em detrimento de alimentos fontes de ômega 3. A relação ω6/ω3 originalmente de 1:1 a 2:1, modificou-se para 15:1 extrapolando para 20:1 na dieta das civilizações ocidentais (Simopoulos, 2006).

Sabe-se que o organismo humano prefere destinar ácidos graxos poli-insaturados para constituírem as membranas plasmáticas das células por configurarem boa fluidez às mesmas. Assim, o ácido araquidônico (C20:4, ω6) e os ácidos eicosapentaenoico (C20:5, ω3) e docosa-hexaenóico (C22:6, ω3) são preferencialmente incorporados às membranas celulares. Após ação da enzima fosfolipase A2 na membrana plasmática, o ácido araquidônico dos fosfolipídios é liberado no citosol e torna-se substrato de enzimas lipooxigenases e ciclooxigenases culminando na produção de ampla variedade de eicosanoides da série par incluindo os leucotrienos, prostaglandinas, prostaciclinas e tromboxanos, com características pró-inflamatórias. Em contrapartida, ácidos graxos ω3 EPA e DHA,ao sofrerem ação das mesmas enzimas, liberam eicosanoides da série ímpar, com baixo poder inflamatório, atenuando,desse modo,a inflamação (Hwang, 2001; Simopoulos, 2002; Magdalon, 2012).

Neste sentido, estudos como o de Guebre-Egziabher et al, (2008) mostram que a diminuição da razão ω6/ω3 na dieta promoveu melhora no perfil metabólico e inflamatório de indivíduos saudáveis, e conclui que para a promoção e manutenção da boa saúde a relação ω6/ω3 deveria ser inferior à encontrada atualmente na população ocidental. Para tanto, a proporção de consumo entre alimentos ricos em ω6 e ω3 deveria ser melhorada, indo de encontro à razão ω6/ω3 de 5:1, indicada como ideal para regulação do status inflamatório (Simopoulos, 2006; Arq. Bras. Cardiologia, 2013).

Estudos da década de 1970 de Dyerberg & Bang realizados com Eskimós foram os primeiros a evidenciarem as possíveis ações dos ω3 em reduzir a agregação plaquetária e prevenir doenças cardiovasculares mediante sua capacidade anti-inflamatória. Todavia, esses efeitos eram atribuídos à capacidade desses nutrientes em inibir a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas (PGE_2, PGI_2 e TXA_2), por intermédio da ciclooxigense2 (COX-2).

Esta hipótese foi sustentada durante quase três décadas até o surgimento das técnicas de acesso genômico, às quais proporcionaram novas compreensões sobre os mecanismos moleculares envolvidos na inflamação. Nesse ínterim, percebeu-se que tais gorduras eram capazes de atuar em pontos anteriores

(*upstream*) à COX-2. Então, foi demonstrada a capacidade desses ácidos graxos em reduzirem a expressão gênica de peptídeos pró-inflamatórios como TNF-α, JNK, IL-1β, IL-6, iNOS e NF-κB (Hwang, 2001).

Tais proteínas surgem anteriormente à COX-2, sendo NF-κB, NFAT (fator nuclear ativador de linfócitos T) e JNK os efetores descritos da transcrição gênica da COX-2, responsável pela potente ativação das prostaglandinas (Dunne et al, 2003). Além disso, a proteína iNOS, transcrita pelo NF-κB, foi demonstrada essencial para ativação da COX-2 (Kim et al, 2005).

Atualmente o ácido graxo oleico (ω9), também foi descrito com robusto potencial anti-inflamatório no SNC (Cintra et al, 2012) e periferia (Morari et al, 2010) atuando em pontos semelhantes ao ω3 (Talukdar et al, 2011). Além disso, também foi capaz de modular positivamente a sensibilidade à insulina no cérebro resultando efeitos benéficos na atividade cortical, locomoção e sono em animais e humanos (Sartorius et al, 2012).

1.4 O Mecanismo de Ação dos Ácidos Graxos ω3 e ω9 na Remissão da Inflamação

Um importante trabalho desenvolvido por Oh et al., (2010) demonstrou que em monócitos RAW 264.7 e em linhagem primária de macrófagos intraperitoneais, estimulados com LPS bacteriano e posteriormente tratadas com ω3, ocorria a ativação do receptor de membrana GPR120 (receptor 120 acoplado à proteína G). Mediante estímulo por tais ácidos graxos, o GPR120 recruta para si, justaposto à membrana celular, a proteína β-arrestina-2. Esta proteína, ao deixar o citoplasma em direção à membrana, agrega-se ao receptor e arrasta para si as proteínas TAB-1, 2 e 3, as quais se encontravam anteriormente presentes na cascata inflamatória referente ao TLR-4, associadas à TAK-1. Com a TAK-1 desagregada das proteínas TAB, ocorre a desarticulação do processo inflamatório (Oh et al., 2010). Com este trabalho, Oh e colaboradores demonstraram o mecanismo pelo qual os ácidos graxos ω3 atuam na remissão da inflamação, repercutindo em melhora na sensibilidade à insulina e na homeostase da glicose, uma vez que

serinas-quinases pertencentes às vias inflamatórias prejudicam a transdução do sinal da insulina.

Além disso, Oh e seus colaboradores demonstraram em mecanismo paralelo, relativo à melhora da resistência à insulina, a ação de forma independente da resolução da inflamação. Nessa perspectiva, os ácidos ω3 e ω9 promoveram melhora na sinalização de insulina e captação periférica de glicose devido à capacidade dos ômegas em estimularem a subunidade Gαq-11, acoplada ao GPR120. Ao inibirem quimicamente a expressão da Gαq-11estímulos com ω3 ou análogos, não promoveram melhoras na captação de glicose em adipócitos 3T3 L1. Desse modo, o estudo propôs mecanismos diferentes para as ações benéficas dos ω3 e ω9, tanto como agentes anti-inflamatórios como na melhora da sinalização da insulina (Oh et al., 2010).

Morari, et al (2010) propôs mecanismo adjacente ao apresentado, onde, em cultura primária de hepatócitos de roedores, o estímulo com ácido oleico promoveu aumento na expressão da interleucina anti-inflamatória IL-10 em 50% quando comparado ao grupo controle. O mecanismo pelo qual o ω9 demonstrou suas ações deu-se por meio da ativação do coativador-1α do proliferador de peroxissomos gama (PGC-1α), o qual se complexou a proteína c-MAF ativando-a. Esta proteína é um protooncogene, capaz de migrar até o núcleo da célula e aumentar a transcrição específica do gene da IL-10 deflagrando redução do processo inflamatório.

Em estudo recente com animais obesos e diabéticos, Cintra e colaboradores demonstraram o importante papel anti-inflamatório de ambos ω3 e ω9, ao reverterem a inflamação e a apoptose no SNC. Além disso, foi descrito pela primeira vez, a existência do receptor GPR120 e de seu agregado protéico intracelular (β-arrestina-2 e proteínas TAB), responsável pelo seu mecanismo de ação, em neurônios hipotalâmicos controladores da fome, justificando a redução no ganho de peso bem como o emagrecimento dos animais pelo restabelecimento do controle da fome (Cintra et al, 2012).

Além desses surpreendentes efeitos, ácidos graxos ω3 mostram-se eficientes em reduzir a deposição de ácidos graxos livres oriundos do tecido

adiposo em células musculares, além de reverterem a resistência à insulina nessas células, melhorando a captação sistêmica de glicose (Lam et al, 2011)

De forma semelhante, animais e humanos tratados com ω3 apresentaram melhora na capacidade de produção hepática de glicogênio, bem como aumento na taxa de oxidação de triacilgliceróis presentes no parênquima hepático em decorrência do consumo de dietas ricas em gordura saturada (Pachikian et al, 2011). O mecanismo proposto para a conquista de tais benefícios está em torno da modulação da expressão de genes lipogênicos (Pachikian et al, 2011). Contudo, é bastante pertinente o fato de que esta melhora seja mera repercussão da redução do estado inflamatório local, após o tratamento com ω3, sendo o receptor GPR120 a via de acesso para esta sinalização.

Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) são importantes moléculas sinalizadoras para diversas funções celulares. São membros de uma grande família que compartilham semelhanças estruturais como sete hélices transmembranas e a habilidade de ativar proteínas G heterotrimétricas como Gαs, Gαi e Gαq, ser fosforilados por quinases ou ligar-se a arrestinas. Ligantes como hormônios, neurotransmissores e moléculas sinalizadoras ativam GPCRs específicos induzindo inúmeras respostas intracelulares (Gether, 2000; Oh et al., 2010; Latek et al., 2012).

Nos últimos anos, estudos verificaram que alguns destes receptores, GPR40, GPR41, GPR43, GPR84 e GPR120 podem ser ativados por ácidos graxos livres. Ácidos graxos de cadeia curta ativam GPR41 e 43 (Tazoe et al., 2008), os de cadeia média o GPR84 (Wang et al., 2006a) e os de cadeia longa, particularmente o ácido palmitoleico e os da família ω3 (ácidos α-linolênico, eicosapentaenóico e docosahexaenóico) são agonistas do GPR40 e GPR120 (Itoh et al., 2003; Hirasawa et al., 2005; Oh et al., 2010).

Outros trabalhos verificaram que a estimulação do GPR40 (Liou et al., 2011) e GPR120 (Tanaka et al., 2008) por ácidos graxos de cadeia longa induz à secreção do hormônio colecictocinina (CKK) *in vivo* e em células enteroendócrinas de camundongos.

Baseado no conjunto de efeitos benéficos apresentados pelos ácidos graxos ω3 e ω9, a compreensão sobre o mecanismo molecular de ação dessas substâncias pode compor novas diretrizes aos tratamentos nutricionais perante as doenças de repercussão metabólica.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar o perfil meta-inflamatório e a homeostase glicêmica em animais obesos e resistentes à insulina, tratados com ácidos graxos insaturados ω3 e ω9 presentes em suas matrizes alimentares como o óleo de linhaça e de oliva, respectivamente, através da modulação do receptor GPR120.

Específicos

- Avaliar o consumo alimentar e ganho de peso dos animais ao longo de 8 semanas de tratamento com as dietas experimentais;
- Analisar a expressão e atividade de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina;
- Investigar a associação entre proteínas pertencentes à via de sinalização do GPR120 quando modulado pelos AGs ω3 e ω9 nos tecidos alvo;
- Testar a ativação do receptor GPR120 pelos ácidos graxos de modo agudo e crônico, determinando tempo e local de ação;

CAPÍTULO 1 - ARTIGO

Dietary substitutions of saturated by unsaturated ω3 and ω9 fatty acids rescues obese mice from insulin resistance

[a,b]Oliveira V, [b]Vitorino D, [c]Santos GA, [b]Dragano N, [b]Moraes JC, [d]Marinho R, [d]Pereira L, [c]Catharino RR, [d,f]Ropelle ER, [d,f]Pauli JR, [g]De Souza CT, [b]Velloso LA, [a,b,e,f]Cintra DE.

[a]Laboratory of Nutritional Genomics – State University of Campinas

[b]Laboratory of Cell Signaling – State University of Campinas

[c]Innovare – State University of Campinas

[d]Laboratory of Molecular Biology of Exercise – State University of Campinas

[e]Nutrigenomics and Lipids Center

[f]Biological Assay Center – School of Applied Sciences – State University of Campinas

[g]Laboratory of Exercise Biochemistry and Physiology, Health Sciences Unit, Universidade do ExtremoSulCatarinense

Corresponding author at: Laboratory Nutritional Genomics – LabGeN

School of Applied Sciences – Pedro Zaccaria, 1300 – Zip 13.484-350 – Limeira – Brazil. E-mail address: dcintra@yahoo.com – (Cintra DE)

Abstract

Subclinical systemic inflammation is a hallmark of obesity and insulin resistance. The results obtained from a number of experimental studies suggest that targeting different components of the inflammatory machinery may result in the improvement of the metabolic phenotype. Unsaturated fatty acids exert anti-inflammatory activity through several distinct mechanisms. Here, we tested the capacity of omega-3 (ω3) and omega-9 (ω9) fatty acids in the diet to exert anti-inflammatory activity through the GPR120 and GPR40 pathways. GPR120 was activated in liver, skeletal muscle and adipose tissues, reverting inflammation and insulin resistance in obese mice. Part of this action was also mediated by GPR40 on muscle. Pair-feeding and immunoneutralization experiments reinforced the pivotal role of GPR120 as a mediator in the response to the nutrients. The improvement in insulin sensitivity in the high-fat substituted diets was associated with a marked reduction in tissue inflammation, decreased macrophage infiltration and increased IL-10 levels. Furthermore, improved glucose homeostasis was accompanied by the reduced expression of hepatic gluconeogenic enzymes and reduced body mass. Thus, our data indicate that GPR120 and GPR40 play a critical role as mediators of the beneficial effects of dietary unsaturated fatty acids in the context of obesity-induced insulin resistance.

Introduction

The increasing global incidence of obesity and type 2 diabetes mellitus is regarded as one of the most challenging contemporary threats to public health (1). It is now clear that obesity and obesity-related disorders, including insulin resistance and type 2 diabetes, are associated with a metabolically driven, low-grade, chronic inflammatory state referred to as *metaflammation*. Several inflammatory cytokines, as well as lipids and metabolic stress pathways, can activate *metaflammation* (2).

Impaired insulin-mediated inhibition of hepatic glucose production in the liver, decreased insulin-stimulated glucose uptake into skeletal muscle, and reduced ability of insulin to inhibit lipolysis in adipose tissue are some of the main outcomes of insulin resistance (2,5). In these tissues, unsaturated fatty acids have well known anti-inflammatory effects, ranging from inhibiting the lipoxygenase and cyclooxygenase pathways (3) and decreasing neutrophil adhesion (3,4) to reducing inflammatory cytokine levels (5) and inhibiting TLR4 signaling (4). However, these mechanisms are poorly understood. Recently, a number of studies have reported that five orphan receptors, GPR40, GPR41, GPR43, GPR84, and GPR120, can be activated by free fatty acids (FFAs) and, in certain contexts, can deliver an anti-inflammatory signal (6).

In cell culture or in a restricted number of *in vivo* studies, GPR120 can be activated by isomers of ω3 (C18:3, C20:5 and C22:6) and ω9 (C18:1) fatty acids, apparently mediating some classical anti-inflammatory activities attributed to these long-chain fats (7,8). Nevertheless, despite the enthusiasm regarding the therapeutic avenue opened by these reports, the mechanisms behind the beneficial effects of ω3 and

ω9 fatty acids are still not completely elucidated. In the present study, the objective was to investigate the role of alpha linolenic (C18:3) and oleic (C18:1) acids provided by food sources, such as flaxseed oil and olive oil, respectively, for their capacity to disrupt the inflammatory cascade and reverse insulin resistance in tissues with important metabolic function. As a whole, we demonstrate that either ω3- or ω9-rich diets improve whole body insulin resistance in an animal model of diet-induced obesity. Either diet produced an improvement of insulin signal transduction in metabolically relevant tissues, which was accompanied by reduced inflammation. Finally, we show that both ω3 and ω9 fatty acids can activate signal transduction through GPR120.

Material and Methods

Experimental animals. Male, 4-week old, Swiss mice (*Musmusculus*) were obtained from the University of Campinas Breeding Center. Animals with an initial body mass of 15 g were included in the study and were allowed access to either standard rodent chow (CT) or a high-fat diet (HF) for eight weeks. Thereafter, mice on CT remained on that diet, while mice on HF were subdivided into three groups: maintained on HF, HF + flax seed oil (FS) (10% of total caloric value) or HF + olive oil (OL) (10% of total caloric value) for another eight weeks, as described below and in Table 1. The general protocol is presented in Figure 1A. All animals received food and water *ad libitum* and were maintained in individual cages at 21±2 ºC with a 12-h dark/12-h light cycle. The diets were prepared in accordance with the guidelines of the American Institute of Nutrition (AIN-93G) (9). Food intake

was measured every three days, and body mass was evaluated every five days. All experiments were conducted in accordance with the principles and procedures described by the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals and were approved by the University of Campinas Ethical Committee (ID 2842-1). The detailed compositions of the diets were obtained by gas chromatography analysis, which is presented in Tables 1 and 2. The high-fat diet (HF) contained 36.6% saturated fat, while the chow contained 17.2%. The 10% FS substitution led to an increase in the ω3 component of the diet from 1.3 to 16.4%, while the 10% OLsubstitution led to an increase in the ω9 component of the diet from 43.1 to 45.4%. No LPS contamination was detected in the diets, as determined by HPLC. Additionally, some mice were evaluated in a pair-feeding protocol (Fig. 1B). For that experiment, mice fed on HF for eight weeks were distributed into three groups (HF, FS or OL). Based on previous measurements, food intake of the OL group was adopted as the standard for pair-feeding in the HF and FS groups. Finally, in a separate set of experiments, diet preference was tested in obese male Swiss mice that were fasted for 12 h and then exposed simultaneously to three containers with equal amounts of three different diets. The amount of each diet consumed over a period of 12 h was recorded, and the caloric value was calculated. The results are presented as the relative preference for each of the diets, as obtained from the ratio of caloric intake from each diet.

GPR120 neutralizing antibody. Initially, mice fed on HF for eight weeks were randomly selected for treatment with saline, rabbit pre-immune serum (RPIS) or rabbit antiserum against GPR120 (GPR120 Ab). To evaluate the capacity of the

antiserum to neutralize GPR120 in the liver, skeletal muscle or adipose tissue, doses of 1.25 and 0.625 µg antibody diluted in 100 µL saline were tested in a protocol consisting of one dose delivered by i.p. injection every other day for 30 days. Neutralizing efficiency was evaluated at the end of the experimental period by immunoprecipitating total protein samples obtained from the liver, skeletal muscle and adipose tissue with anti-β-arrestin followed by immunoblotting with a GPR120 antibody. The 1.25 µg dose was selected for use in the remaining experiments. Additionally, lean mice were treated acutely with a GPR120 Ab to test the affinity and capacity of injected lipids to activate the GPR120 signaling cascade. After 8 h of fasting, mice were treated with a GPR120 Ab or RPIS and, 3h later, with 500 µL of solubilized lard, soy, flaxseed or olive oil by oral gavage.

Additional methods used in the study. Details of the following information are presented in the accompanying supplementary file: Reagents used in the study; gas chromatography method for the evaluation of diet composition; glucose- and insulin-tolerance tests; HPLC for determination of LPS contamination; mass spectrometry for the evaluation of liver lipid content; histological studies; immunoblots and immunoprecipitation; real-time PCR.

Statistical analysis. Specific protein bands present in the blots were quantified by digital densitometry (UN-SCAN-IT). All data were subjected to the Kolmogorov-Smirnov test to check for symmetry. For variables with normal distribution, Student's *t* test was used to compare two independent samples (CT and HF groups). Analysis of variance was used to compare independent samples. Mean values ± SD obtained from densitometry scans, real-time PCR measurements,

body mass determination, food intake, the area under glucose curves and K_{ITT} were compared using *Tukey's* test, and *P<0.05* was accepted as statistically significant. The number of mice used in distinct experiments is shown in the figure legends.

Results

FS and OL substitutions reduce body mass gain and adiposity. Either FS or OL substitution led to reduced body mass gain (Fig. 2A) over a period of 60 days, resulting in a significantly lower body mass at the end of the experimental period compared with HF (Fig. 2B). The body mass reductions in the FS and OL groups were accompanied by reduced epididymal fat pad content (Fig. 2C) and reduced mean adipocyte diameter (Fig. 2D-E). To evaluate the possible impact of taste on food consumption (Fig. 2F-F1), a food preference assay was carried out as previously described (14). As depicted in Figure 2G, mice presented no significant difference in the preference for either diet.

FS and OL substitutions improve glucose homeostasis and insulin action. HF produced a significant increase in the fasting blood glucose levels, which were normalized in the FS or OL groups (Fig. 3A). As depicted in Figures 3B-B1 and 3C-C1, both the FS and OL substitutions produced significant reductions in K_{ITT} and the glucose area under the curve during a GTT. Immunoblot analysis revealed that insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IR and IRS-1 and serine phosphorylation of Akt in the liver, (Fig. 4A-C), muscle (Fig. 4D-F) and adipose tissue (Fig. 4G-I) were significantly reduced in the HF group compared with the CT

group. When mice were fed FS or OL, insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IR and IRS-1 and serine phosphorylation of Akt in the liver (Fig. 4A-C), muscle (Fig. 4D-F) and adipose tissue (Fig. 4G-I) were significantly increased compared with the HF group.

FS and OL Substitutions Reduce Diet-Induced inflammation. Mice fed HF presented increased expression of a number of inflammatory markers in the liver (Fig. 5A-F), muscle (Fig. 5H-M) and adipose tissue (Fig. 5O-T). Both FS and OL substitutions produced significant reductions in the expression or phosphorylation on pro-inflammatory markers, such as, IL-1β, IL-6, P-IKK, P-IκBα, TNFα and P-JNK in the liver (Figs. 5A-F), skeletal muscle (Figs. 5H-M) and adipose tissue (Figs. 5O-T). The expression levels of the anti-inflammatory marker IL-10 were regulated in a diet- and tissue-specific pattern. Therefore, while OL produced significant increases in IL-10 expression in all tissues evaluated (Fig. 5G,N and U), FS produced a significant increase in IL-10 expression only in the liver (Fig. 5G).

FS and OL change liver lipid composition. The macroscopic appearance of the liver was completely modified by either FS or OL. Mice fed HF presented with a yellowish and hypertrophic liver, which was reverted by FS or OL (Fig. S1). The lipid composition of the liver was also modified by both FS (Fig 6B) and OL (Fig 6C) in comparison with HF (Fig 6A), with a particular increase of C18:3 (Fig 6D) and C18:1 (Fig 6E) content in the livers of FS- and OL-fed mice, respectively. Markers of gluconeogenesis were also reduced by both FS and OL. The inhibitory phosphorylation of GSK3 and FOXO1 was increased, while the expression levels of PEPCK and G6Pase were decreased (Fig. S2). In addition, both FS and OL

caused a reduction in the presence of CD11b cells colocalized with GPR120 in the liver (Fig S3).

The beneficial effects of FS and OL are not dependent on caloric intake. A pair-feeding experiment was undertaken to evaluate a possible role for different caloric intake on the beneficial effects of the FS and OL diets. As depicted in Figure 7, pair-feeding resulted in very similar body mass and adiposity at the end of the experimental period. However, there was retention of the beneficial effects of both diets on insulin signal transduction in the liver (Fig 8A-C), muscle (Fig 8D-F) and adipose tissue (Fig. 8G-I), as well as on the expression of inflammatory markers in the liver (Fig 9A-D), muscle (Fig 9E-H) and adipose tissue (Fig. 9I-L).

GPR120 is activated by fatty acids present in the diet. To evaluate the capacity of fatty acids present in the diet to activate GPR120 signaling in insulin-sensitive tissues, mice fasted for eight hours were treated with 500 µL of soy, flaxseed or olive oils or with lard, by oral gavage. As depicted in Figure 10, all fatty acid sources were capable of inducing the recruitment of β-arrestin to GPR120. As expected, flaxseed, which is both a source for ω3 and a known high-affinity ligand for the GPR120 (7,8), produced the most potent induction of the GPR120/β-arrestin association in all tissues (Fig. 10A-C). As a rule, the greatest activation of GPR120 occurred at 150 and 180 min (Fig. 10D,E,G). In muscle, GPR40 signaling was also stimulated (Fig. 10F). Next, mice fed FS or OL were evaluated for the activation of the complete GPR120 signaling cascade. As depicted in Figure 11, both FS and OL resulted in the increased association of GPR120 with β-arrestin(Fig. 11A,D,G) accompanied by the increased recruitment of TAB1/2 (Fig.

11B,E,H) to the GPR120/β-arrestin complex and the displacement of TAK from its association with TAB1/2 in the liver (Fig. 11C), muscle (Fig. 11F) and adipose tissue (Fig. 11I).

Immunoneutralization of GPR120 inhibits its activation by ω3 fatty acid. Lean mice were fasted for 8 h and then treated with a single dose of anti-GPR120 antibody (1.25 µg/100 µL by i.p.). After an additional 3 h, mice received 500 µL of flaxseed oil by gavage. As shown in Figure 12, the immunoneutralization of GPR120 completely inhibited the flaxseed oil-induced activation of GPR120/β-arrestin association in liver (Fig. 12A), muscle (Fig. 12B) and adipose tissue (Fig. 12C).

Discussion

In 1979, the classic Eskimos study carried out by Dyerberg and Bang was the first to show the beneficial effects of ω3 fatty acids altering cyclooxygenase function (10). Thereafter, ω3 fatty acids have been explored exhaustively, and additional anti-inflammatory mechanisms have been determined. However, only recently were GPCRs identified as membrane receptors that transduce some of the activities of ω3 fatty acids (6-8).

Metabolic inflammation present in obesity is one of the most important factors leading to insulin resistance and to a number of comorbidities that threaten the quality of life and lifespan of affected subjects (2). Recent studies have shown that at least some of the beneficial effects of ω3 and ω9 fatty acids on human health are due to their anti-inflammatory properties. However, few studies have evaluated GPR120 as a mediator of at least part of these effects (11-13). Here, we

used an animal model of diet-induced obesity and type 2 diabetes to further explore GPR120 as a mediator of the metabolic effects of ω3 and ω9 fatty acids.

Because of the undisputed evidence of dietary intervention on human health (14), we focused on the effects of dietary ω3 and ω9 fatty acids. Both FS and OL substitutions resulted in a significant decrease of caloric intake occurring in the first two weeks following diet change and remaining steady thereafter. Based on a previous study (8), we believe that the anorexigenic effect of the substituted diets is mostly due to reduced hypothalamic inflammation. As reduced caloric intake resulted in lower body mass, we performed a caloric pair-feeding experiment to exclude the possibility that the whole body metabolic improvement was due to reduced adiposity. Even with similar body mass, mice on HF retained the insulin resistance phenotype, reinforcing the beneficial role of dietary ω3 and ω9 fatty acids. It is noteworthy that the reduction in body adiposity is accompanied by a reduction in inflammation in adipose tissue. This is in line with a previous study (15) showing that a reduced number and size of adipocytes in distinct fat deposits in overweight humans directly correlated with the presence of ω3 and ω9 fatty acids in the tissue.

Next, we evaluated the effect of fatty acid substitution on whole body insulin action and glucose homeostasis. Similarly to the effect on food intake, the substituted diets led to a complete restoration of insulin action and glucose homeostasis to levels similar to those in lean controls, independent of the fatty acid type. Because the effect of fatty acid substitution on body mass was independent of the quality of the unsaturated fatty acids, we believe the effect on insulin action

and glucose homeostasis was due to the presence of increased amounts of unsaturated fatty acids in the diets and not secondary to body mass reduction. Mejía-Barradas et al. (2013) found improvements on the anthropometric parameters of adolescents submitted to increased ω3 consumption and attributed the outcomes to the down regulation of lipogenic factors, such as sterol-regulated element binding protein and peroxisome proliferator activated receptor-gamma (16). However, the control of glucose homeostasis may be due to additional mechanisms. Recently, oleic fatty acids were shown to mediate insulin secretion by activating GPR40 in the pancreas (17) and to induce CCK release in the small intestine (18), further improving the central control of food intake. Moreover, free oleic fatty acid, or oleoylglycerol, can activate a GPR119-releasing GLP-1/2 in the small intestine, thereby improving insulin actions (19). GPR120 is another fatty acid receptor found in the intestine; the activation of GPR120 has been shown to stimulate GLP-1 release. Thus, while α-linolenic acid and docosahexaenoic acid were found to be full GPR120 agonists *in vitro,* oleic acid only secondarily activated the receptor, indicating that GPR120 is primarily activated by ω-3 fatty acids (18).

The improvement in glucose homeostasis obtained in the present study is certainly an outcome of reduced inflammation and improved insulin signal transduction in the main metabolic tissues (19-21). However, it is noteworthy that ω3 and ω9 fatty acid substitutions had a particularly important effect on the liver. In the liver, the substitutions resulted in improved steatosis, increased ω3 and ω9 fatty acid deposits, reduced expression of markers of inflammation and, finally, reduced expression or activity of proteins involved in gluconeogenesis. Because of

the important role of hepatic glucose production in whole body glucose homeostasis (22), we believe that hepatic glucose production accounts for much of the metabolic effect produced by the substitutions.

The role of unsaturated fatty acids in anti-inflammatory activity has been highlighted since the first reports describing the beneficial effects of these nutrients for human health (7,8,10). Here, we demonstrate a consistent reduction of inflammatory markers in different tissues of mice fed on substituted diets. We expect that some, if not all, of the anti-inflammatory mechanisms induced by unsaturated fats in combination produce the final outcome herein reported. However, the main objective of this study was to determine the impact of GPR120 signaling as a mediator of these actions.

As recently described (7), ligand binding induces conformational changes in GPR120, resulting in the recruitment of β–arrestin and the subsequent impairment of inflammatory signaling through TAB1/2. Important inflammatory signaling pathways, such as TLR4 and TNF-a, transduce their signals through TAB1/2 (7,23). Thus, under GPR120 activation, intracellular inflammatory signal transduction is inhibited (7,8). In fact, mice fed on substituted diets presented an activation of GPR120 signaling in the liver, muscle and adipose tissue. This was accompanied by the reduced expression of inflammatory markers and increased expression of IL-10, an anti-inflammatory cytokine (8,22). Some recent studies have shown that in different tissues involved in the control of metabolic activity, IL-10 has beneficial effects (22, 24, 25). Thus, we propose that in addition to the reduction in classic inflammatory activity, the increase in IL-10, an important anti-

inflammatory mediator, plays a role in the metabolic effects of the ω3 and ω9 fatty acids.

In the final part of the study, we used an immunoneutralizing antibody to dampen GPR120 activity. A similar approach has been tested previously with reproducible results (22,26). Under specific antibody treatment, ω3 and ω9 fatty acids could no longer activate signal transduction through this receptor, providing further support for the important role of GPR120 as a mediator of some of the effects of dietary saturated fats.

As a whole, this study provides evidence for the beneficial metabolic effects of ω3 and ω9 fatty acids present in the diet. It extends the findings of previous studies showing that the whole body effects are a result of the action of the nutrients in different metabolically relevant tissues (Fig 13). Our results reinforce the role of correct nutritional approaches for the control of complex metabolic disorders.

Acknowledgements

We thank Laboratory of Cellular Signaling group for assistance on technical procedures. This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) – grant 2012/06469-8. The funders had no role in study design, data lection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests

The authors have declared that no competing interests exist.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VO, LAV and DEC. Performed the experiments: VO, DV, GS, ND, JM, RM, LP, RC, JRP and CTS. Analyzed the data: VO, ERR, JRP and DEC. Contributed reagents/materials/analysis tools: LAV and CTS. Wrote the paper: DEC and VO.

References

1 – Danaei G, et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2·7 million participants. Lancet. 2011; 378(9785):31-40.

2 – Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. Nature. 2006; 444(7121): 840-6.

3 – Lee TH, et al. Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. N Engl J Med. 1985; 312(19): 1217-24.

4 – Norris PC, Dennis EA. Omega-3 fatty acids cause dramatic changes in TLR4 and purinergic eicosanoid signaling. ProcNatlAcadSci U S A. 2012; 109(22): 8517-22.

5 – Simon MC, et al. Fatty acids modulate cytokine and chemokine secretion of stimulated human whole blood cultures in diabetes. ClinExpImmunol. 2013; 172(3): 383-93.

6 – Kebede MA, Alquier T, Latour MG, Poitout V. Lipid receptors and islet function: therapeutic implications? Diabetes ObesMetab. 2009; 11 Suppl 4:10-20.

7 – Oh DY, et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. Cell. 2010; 142(5): 687-98.

8 – Cintra DE et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. PLoS One. 2012; 7(1): e30571.

9 – Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 Purified diets of laboratory rodents: final report of the American Institute Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr.1993; 123:1939-51.

10 – Dyerberg J, Bang HO. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. Lancet. 1979; 2(8140):433-5.

11 – Lee TH, et al. Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. N Engl J Med. 1985; 312: 1217-1224.

12 – Endres S, et al. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells.N Engl J Med. 1989; 320: 265-271.

13 – Reynolds CM, et al. A conjugated linoleic acid-enriched beef diet attenuates lipopolysaccharideinduced inflammation in mice in part through PPARgamma-mediated suppression of toll-like receptor 4. J Nutr.2009; 139: 2351-2357.

14 – Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, Gortmaker SL. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. Lancet. 2011 Aug 27;378(9793):804-14.

15 – Garaulet M, et al. Relationship between fat cell size and number and fatty acid composition in adipose tissue from different fat depots in overweight/obese humans. Int J Obes (Lond). 2006; 30(6):899-905.

16 – Mejía-Barradas CM, et al. The consumption of n-3 polyunsaturated fatty acids differentially modulates gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma and hypoxia-inducible factor 1 alpha in subcutaneous adipose tissue of obese adolescents. 2014 Feb;45(1):98-105.

17 – Ferdaoussi M, et al. G protein-coupled receptor (GPR)40-dependent potentiation of insulin secretion in mouse islets is mediated by protein kinase D1. Diabetologia. 2012; 55(10):2682-92.

18 – Liou AP, et al. The G-protein-coupled receptor GPR40 directly mediates long-chain fatty acid-induced secretion of cholecystokinin. Gastroenterology. 2011; 140(3):903-12.

19 – Augustine AH, Lowenstein LM, Harris WS, Shearer GC, Block RC. Treatment with omega-3 fatty acid ethyl-ester alters fatty acid composition of lipoproteins in overweight or obese adults with insulin resistance.Prostaglandins LeukotEssent Fatty Acids. 2014; 90(2-3):69-75.

20 – Janczyk W, et al. Omega-3 fatty acids for treatment of non-alcoholic fatty liver disease: design and rationale of randomized controlled trial. BMC Pediatr.2013; 13:85.

21 – Rafraf M, Mohammadi E, Asghari-Jafarabadi M, Farzadi L. Omega-3 fatty acids improve glucose metabolism without effects on obesity values and serum visfatin levels in women with polycystic ovary syndrome. J Am CollNutr. 2012; 31(5):361-8

22 – Cintra DE, et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. J Hepatol. 2008; 48(4): 628-37.

23 – Kobayashi Y1, Mizoguchi T, Take I, Kurihara S, Udagawa N, Takahashi N. Prostaglandin E2 enhances osteoclastic differentiation of precursor cells through protein kinase A-dependent phosphorylation of TAK1. J Biol Chem. 2005; 280(12):11395-403.

24 – Ropelle ER, et al. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. PLoSBiol 8(8): e1000465.

25 – Morari J, et al. The role of proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-alpha in the fatty-acid-dependent transcriptional control of interleukin-10 in hepatic cells of rodents.Metabolism. 2010; 59(2):215-23.

26 – Milanski M, et al. Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver. Diabetes. 2012; 61(6):1455-62.

Table 1. Composition of Experimental Diets (g/Kg)				
Ingredients	Standard chow	High fat diet	FS (10%)	OL (10%)
Corn Starch (Q.S.P)	427.5	115.5	115.5	115.5
Casein	200	200	200	200
Sucrose	132	132	132	132
DextrinatedStarch	100	100	100	100
SoybeanOil	40	40	40	40
Lard	0	312	208	208
FlaxSeedOil	0	0	104	0
Olive Oil	0	0	0	104
Cellulose	50	50	50	50
Mineral Mix	35	35	35	35
Vitamin Mix	10	10	10	10
L-Cystine	3	3	3	3
Choline	2.5	2.5	2.5	2.5
Total	1000	1000	1000	1000

Table 2. Fatty acid composition of the diets (% of total fat).				
FattyAcids	CT	HF	FS-10%	OL-10%
C14:0	0.56±0.22	1.68±0.04$^{\#}$	0.03±0.01^{b}	0.79±0.01^{b}
C16:0	13.2±0.06	22.2±0.64^{a}	15.8±1.29^{b}	19.44±1.02^{b}
C18:0	3.01±0.52	11.18±0.12$^{\#a}$	9.12±0.2^{b}	9.02±0.18^{b}
C20:0	0.02±0.01	0.9±0.09^{a}	0.22±0.01^{b}	0.23±0.03^{b}
C22:0	-	0.07±0.01	0.12±0.01	0.11±0.02
Σ SFA	17.22±0.12	36.62±1.18^{a}	26.02±2.01^{b}	30.33±1.98^{b}
C16:1 ω7	0.09±0.01	1.18±0.05	1.0±0.07	1.99±0.15
C18:1 ω9	29.33±1.02	43.12±1.1$^{\#a}$	33.12±0.09^{b}	45.46±0.75^{b}
Σ MUFA	29.56±0.18	44.72±2.81$^{\#a}$	34.22±1.8^{b}	47.80±2.01^{c}
C18:2 ω6	50.62±0.53	16.13±0.47$^{\#}$	18.13±0.8	19.4±0.18
C18:3 ω3	5.83±1.02	1.3±0.09$^{\#a}$	16.42±0.09^{b}	1.3±0.01^{a}
C20:4 ω6	0.28±0.02	0.21±0.01	0.18±0.01	0.21±0.02
C20:5 ω3	-	0.01±0	0.01±0	0.01±0
C22:5 ω3	-	0.02±0	0.03±0.01	0.03±00.1
C22:6 ω3	-	0.02±0	0.01±0.01	0.021±0.01
Σ PUFA	57.12±1.22	18.27±0.17$^{\#a}$	35.22±0.9^{b}	22.082±0.1^{a}
Σ ω6	51.0±1.09	16.98±1.9$^{\#}$	18.57±3.1	19.81±0.88
Σ ω3	5.83±1.02	1.35±0.08$^{\#a}$	16.47±0.93^{b}	1.37±0.02^{a}
ω6:ω3 ratio	8.7:1	12.5:1	1.1:1	14.4:1

Figure 1.

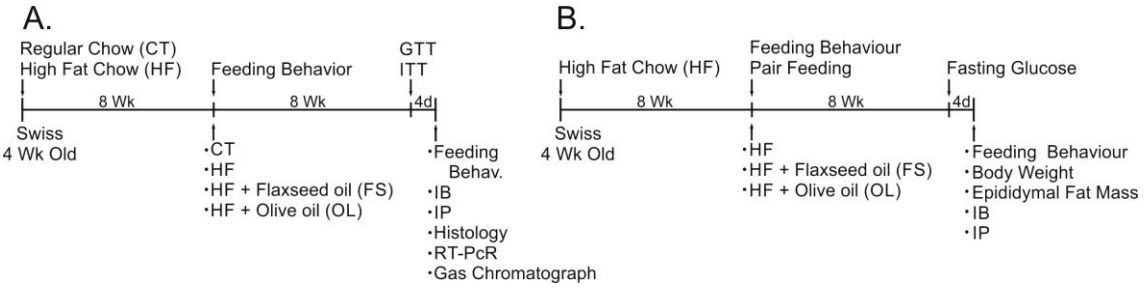


Figure 2. Food Intake and Body Mass Variation

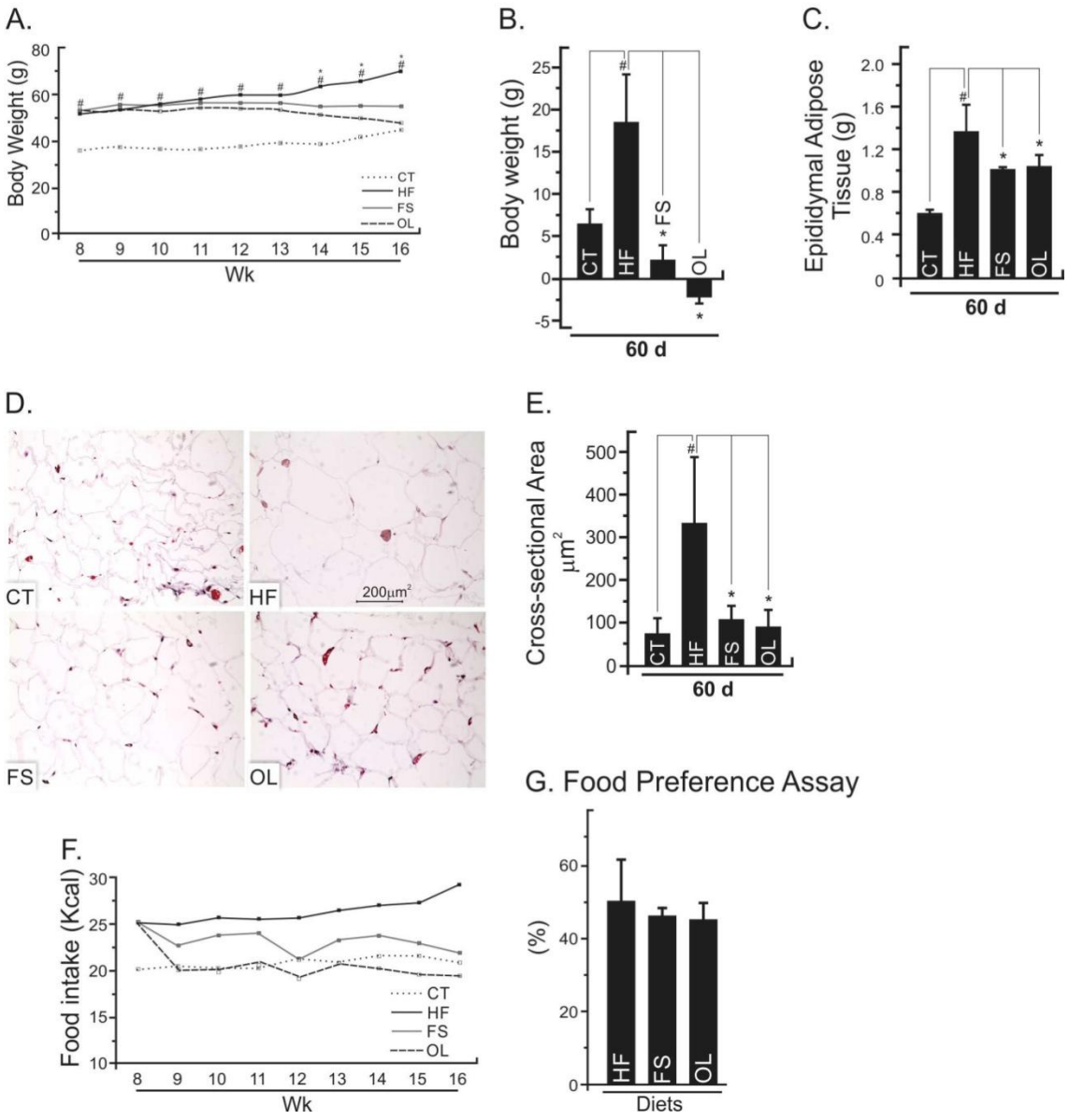


Figure 3. Glucose Homeostasis

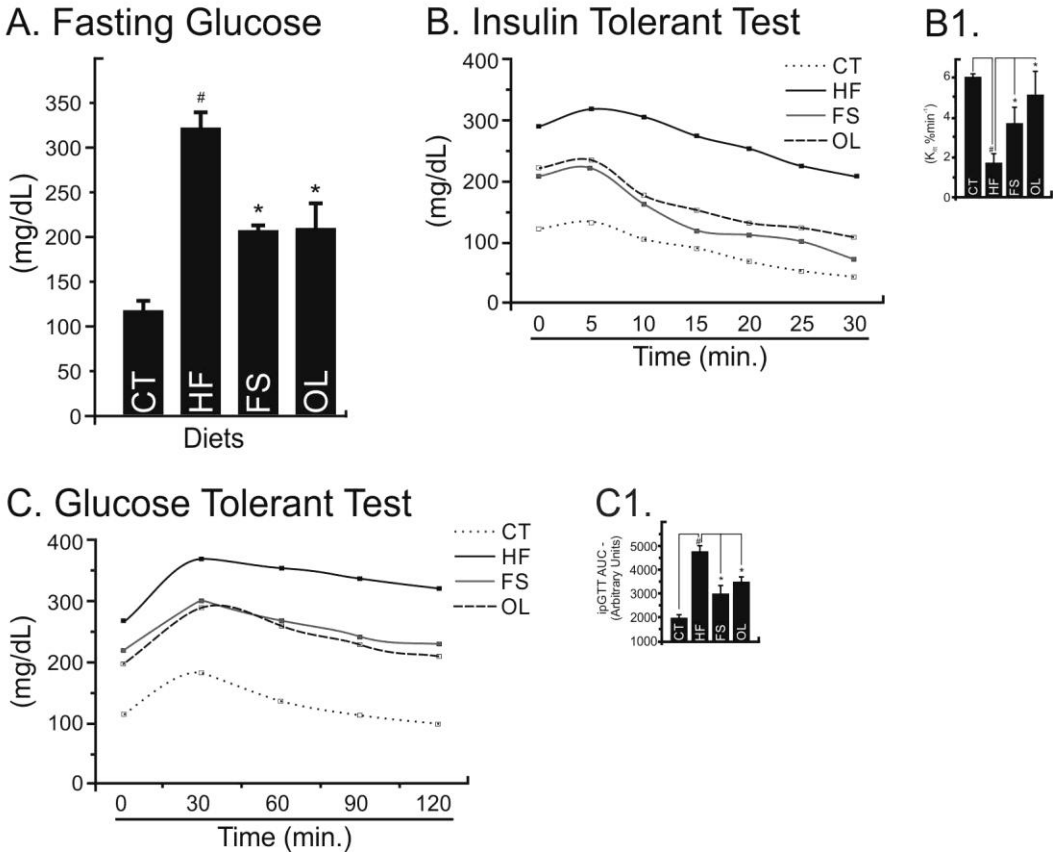
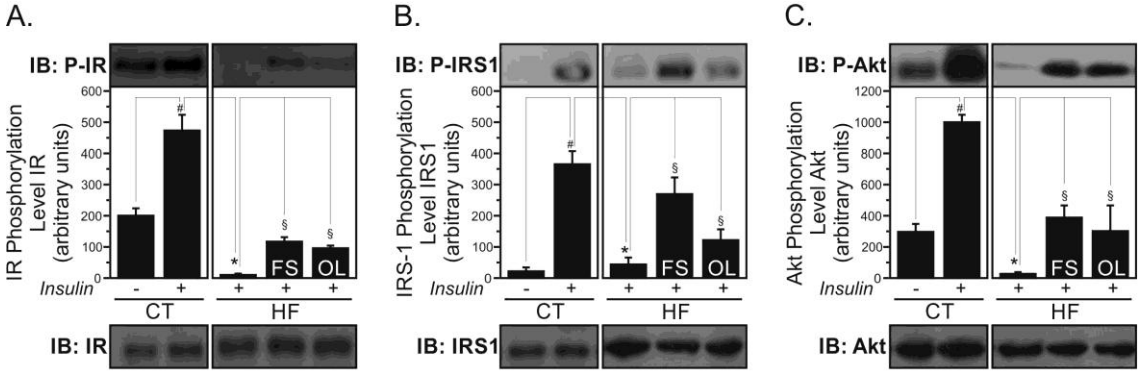
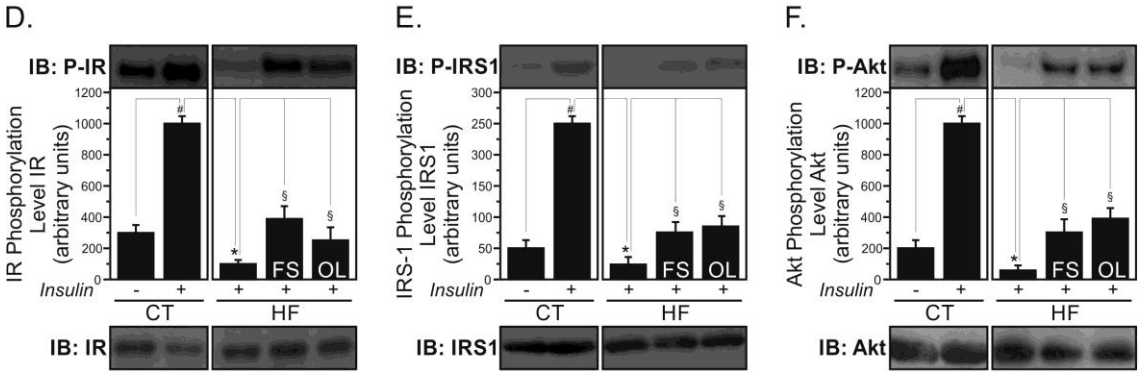


Figure 4. Insulin Signaling

Liver



Muscle



Adipose

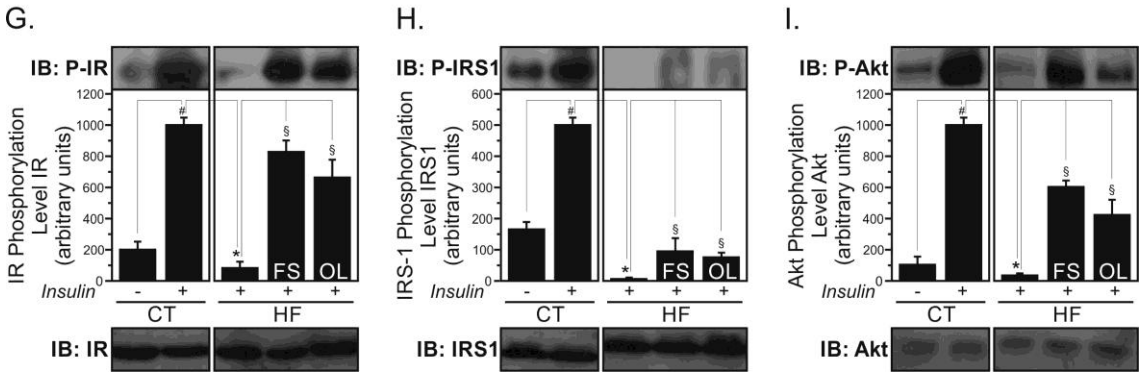
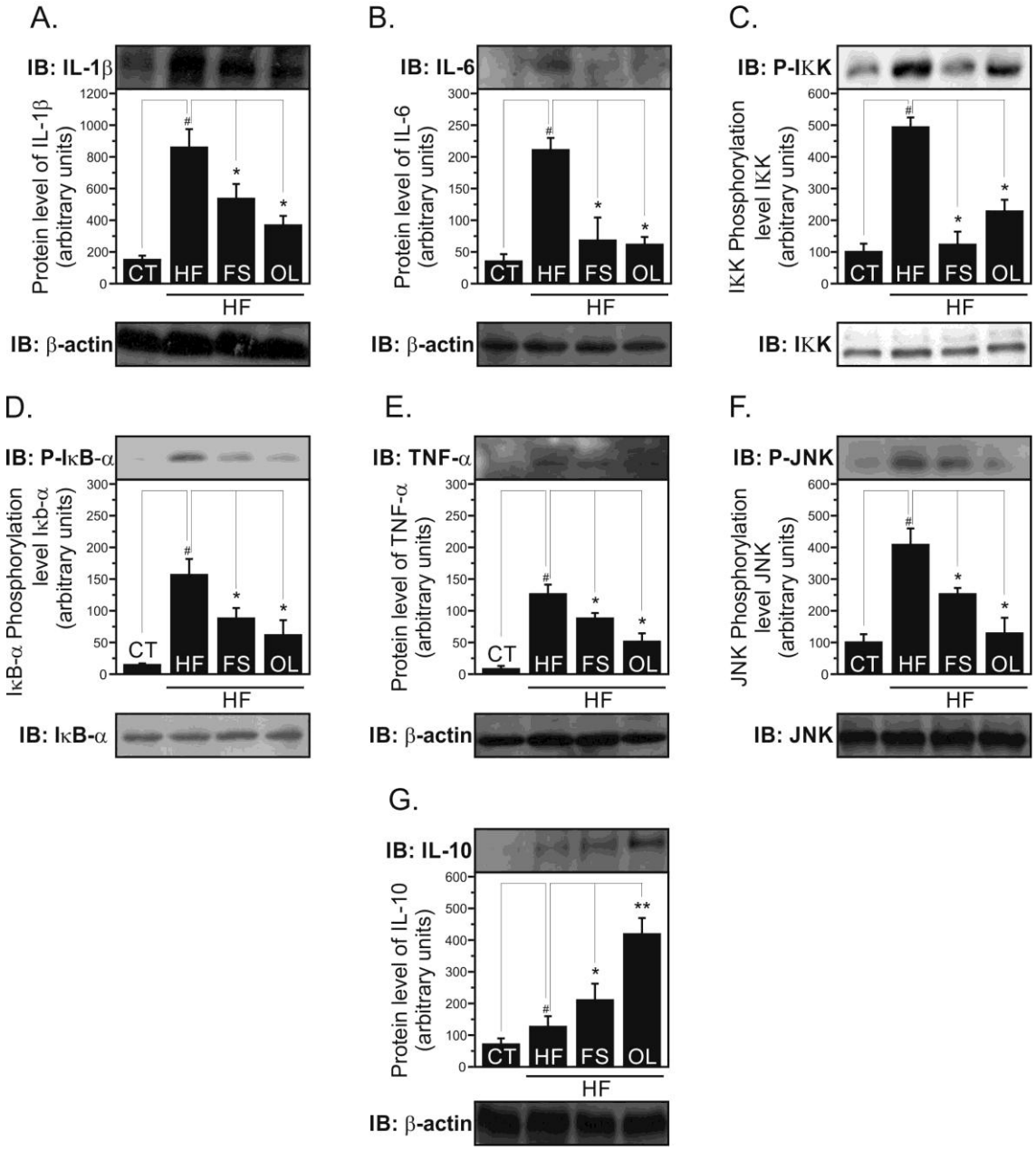
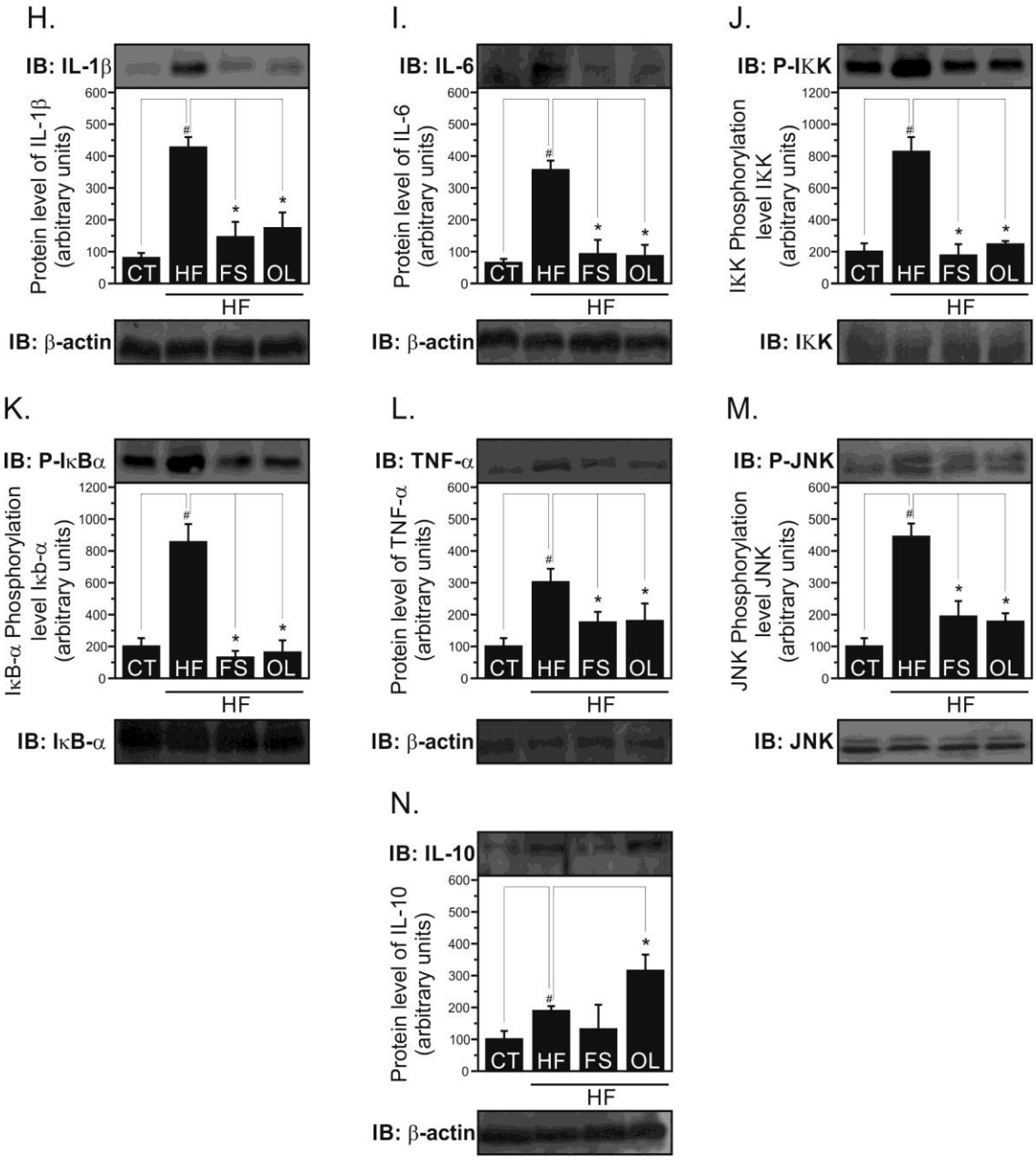


Figure 5. Pro-inflammatory Proteins Expression

Liver



Muscle


H.
IB: IL-1β
Protein level of IL-1β (arbitrary units)
CT
HF
FS
OL
HF
IB: β-actin
I.
IB: IL-6
Protein level of IL-6 (arbitrary units)
IB: β-actin
J.
IB: P-IKK
IKK Phosphorylation level IKK (arbitrary units)
IB: IKK
K.
IB: P-IκBα
IκB-α Phosphorylation level Iκb-α (arbitrary units)
IB: IκB-α
L.
IB: TNF-α
Protein level of TNF-α (arbitrary units)
IB: β-actin
M.
IB: P-JNK
JNK Phosphorylation level JNK (arbitrary units)
IB: JNK
N.
IB: IL-10
Protein level of IL-10 (arbitrary units)
IB: β-actin

Adipose

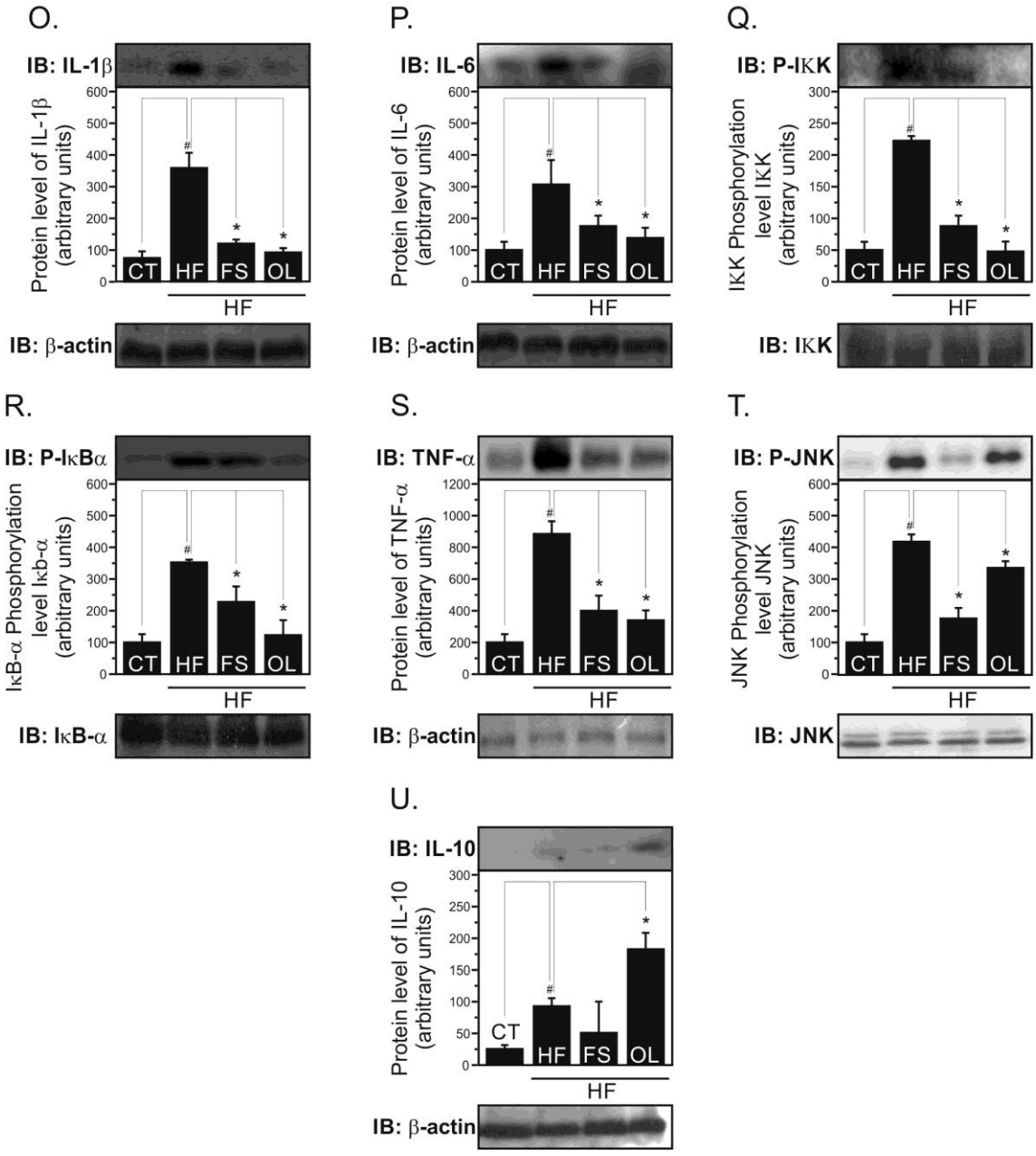

O.
IB: IL-1β
Protein level of IL-1β (arbitrary units)
CT
HF
FS
OL
HF
IB: β-actin
P.
IB: IL-6
Protein level of IL-6 (arbitrary units)
IB: β-actin
Q.
IB: P-IKK
IKK Phosphorylation level IKK (arbitrary units)
IB: IKK
R.
IB: P-IκBα
IκB-α Phosphorylation level Iκb-α (arbitrary units)
IB: IκB-α
S.
IB: TNF-α
Protein level of TNF-α (arbitrary units)
IB: β-actin
T.
IB: P-JNK
JNK Phosphorylation level JNK (arbitrary units)
IB: JNK
U.
IB: IL-10
Protein level of IL-10 (arbitrary units)
IB: β-actin

Figure 6. Mass Spectrometry Lipid Incorporation

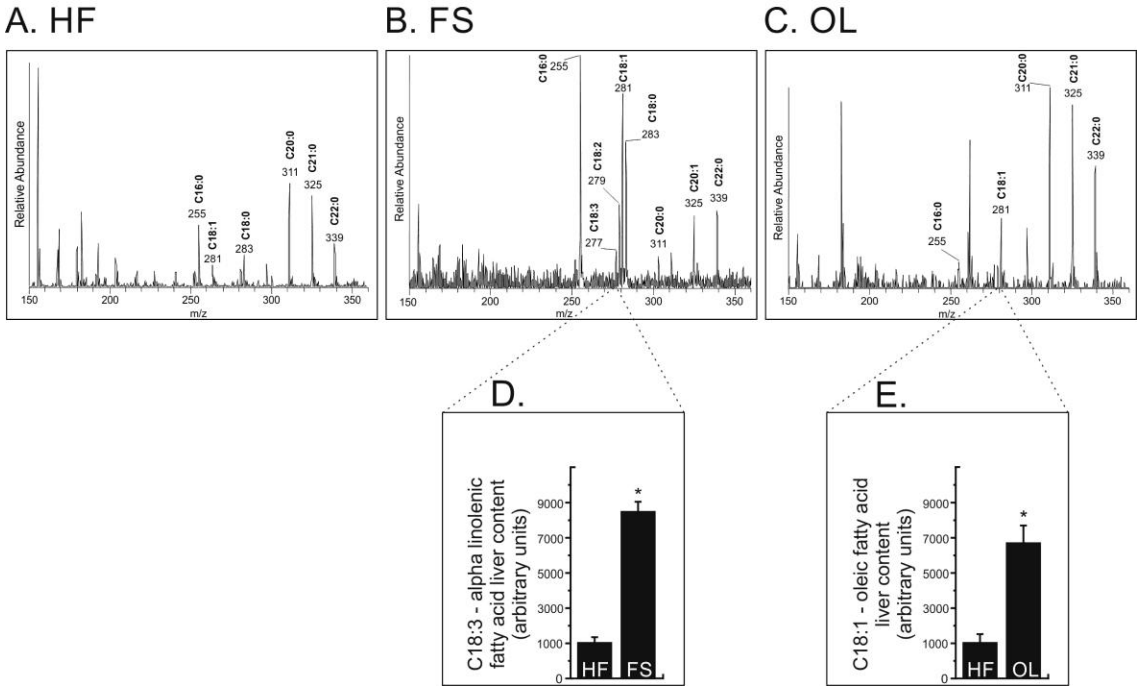


Figure 7. Pair Feeding - Food Intake and Body Mass Variation

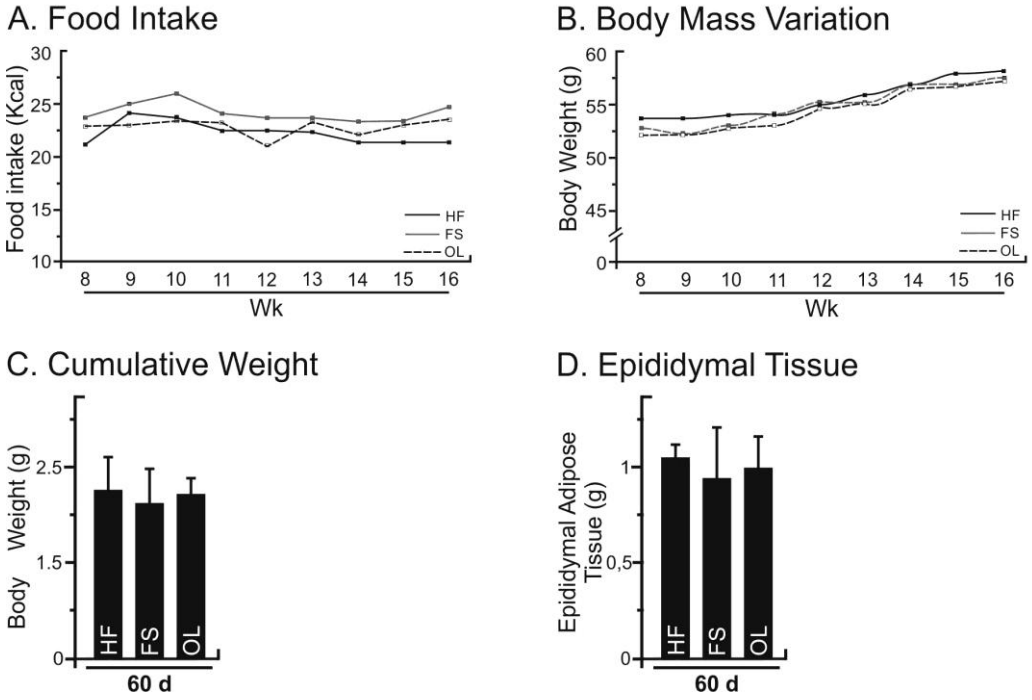


Figure 8. Insulin Signaling

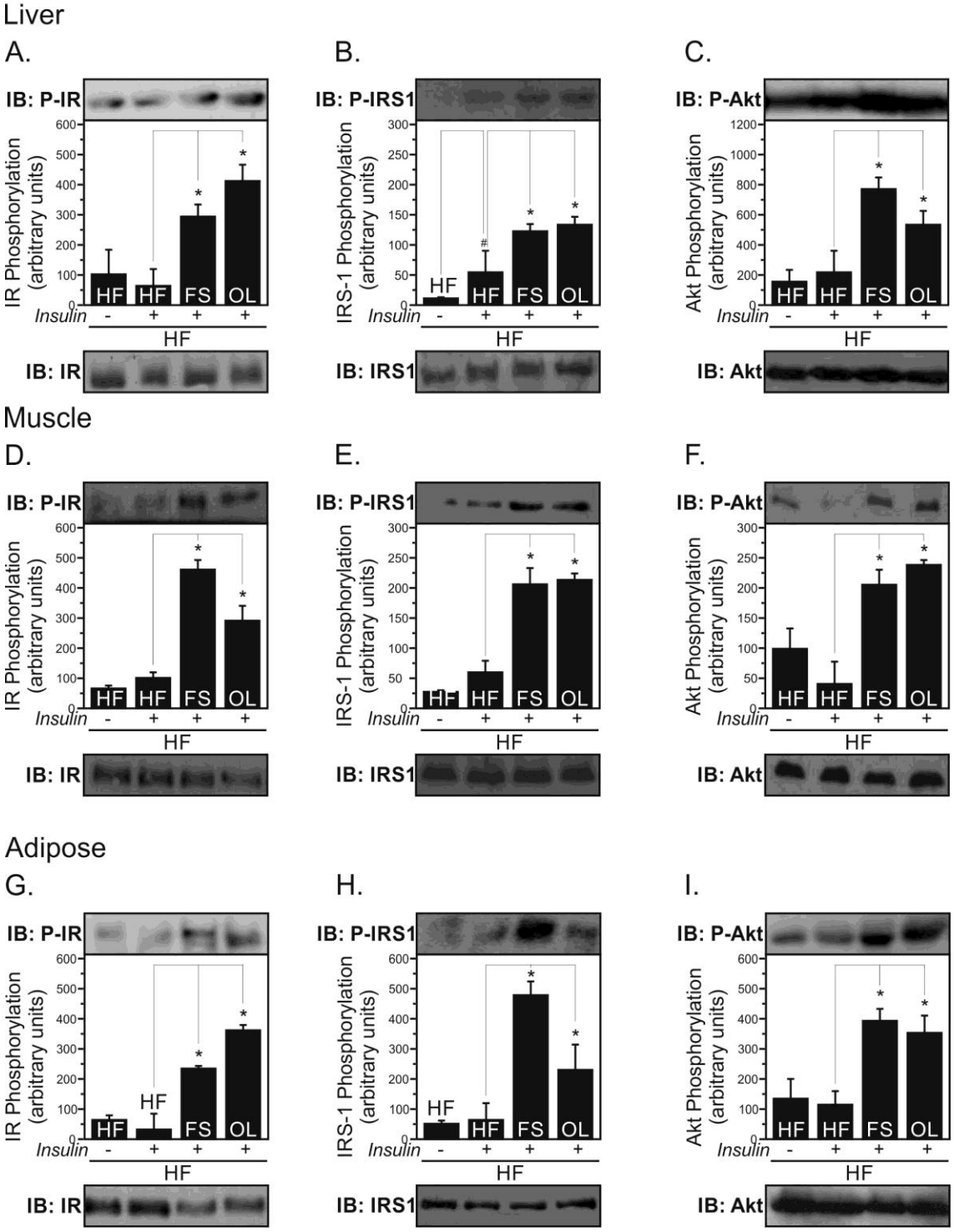


Figure 9. Pro-inflammatory Proteins Expression

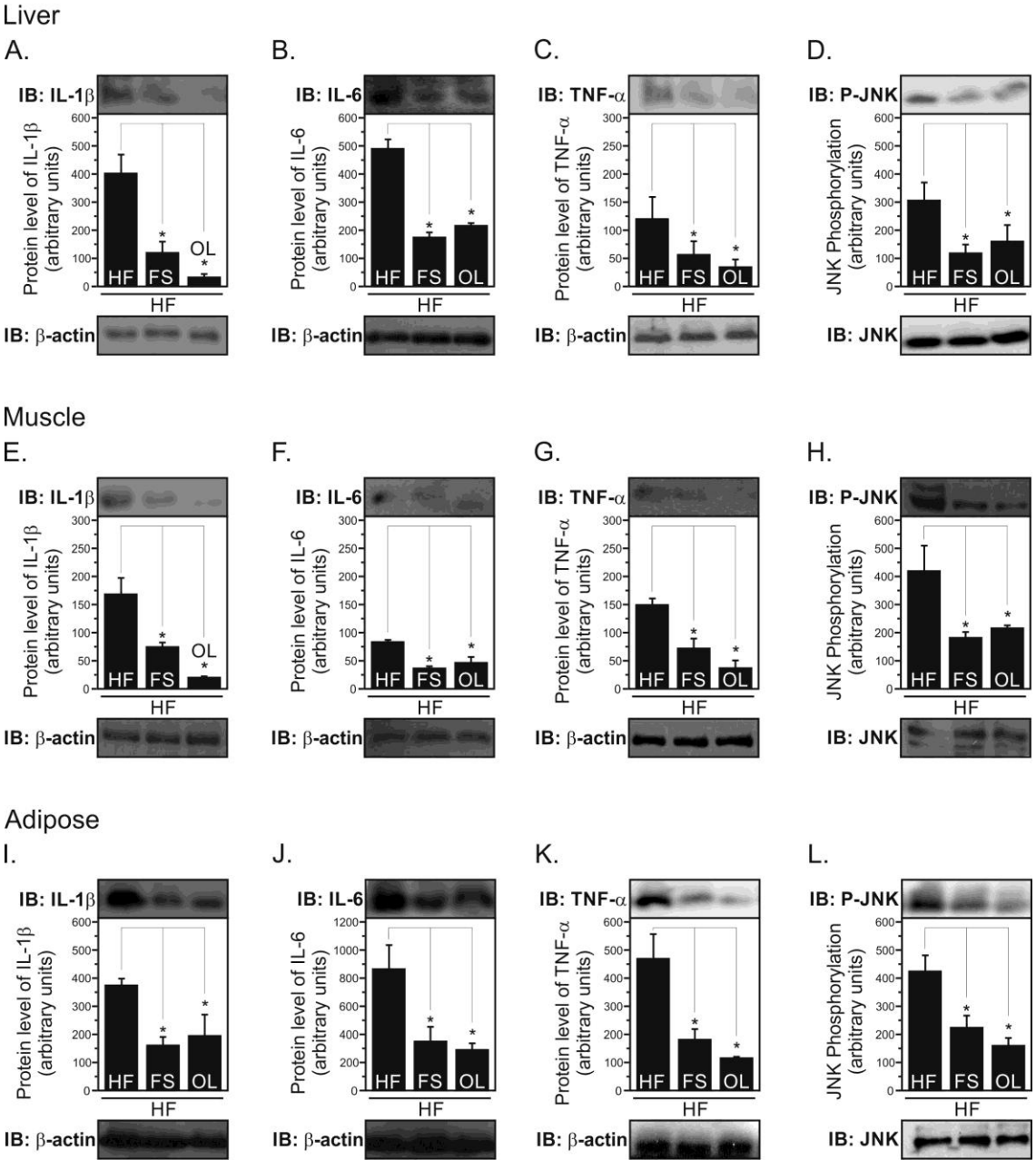


Figure 10. GPR120 Signaling Mediated by Fat Source and Time Course

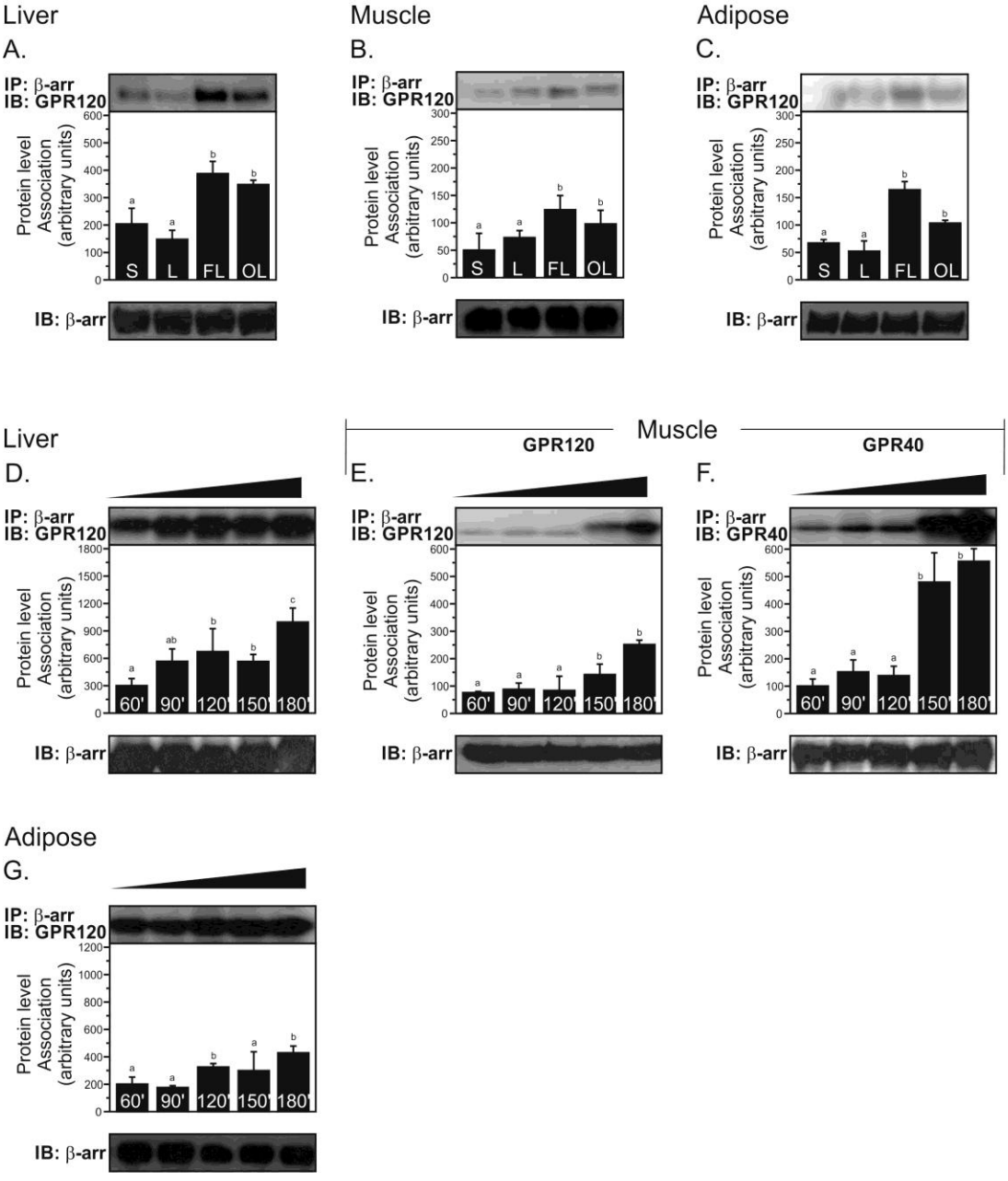


Figure 11. GPR120 Pathway

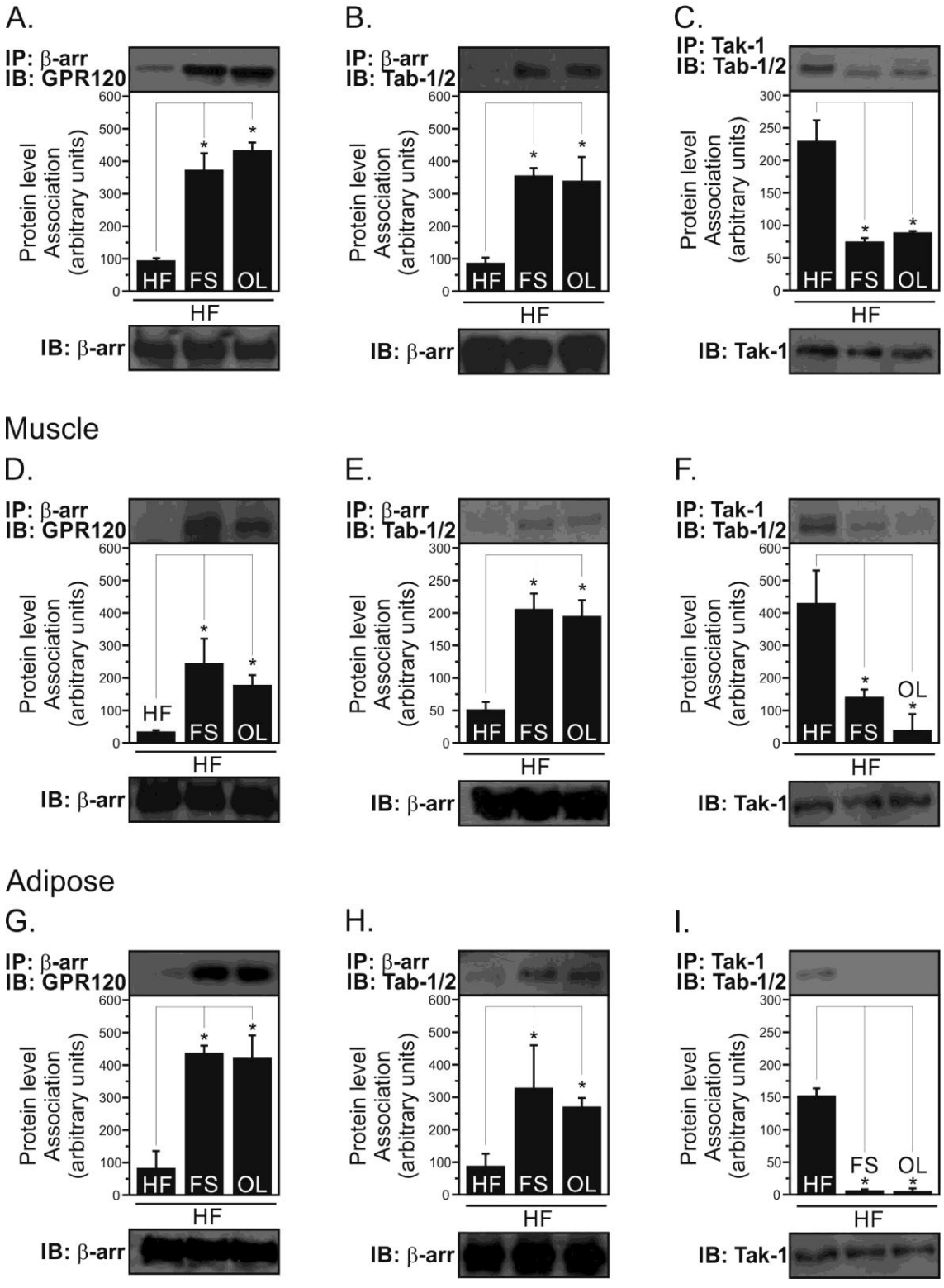


Figure 12. GPR120 Immune Neutralization

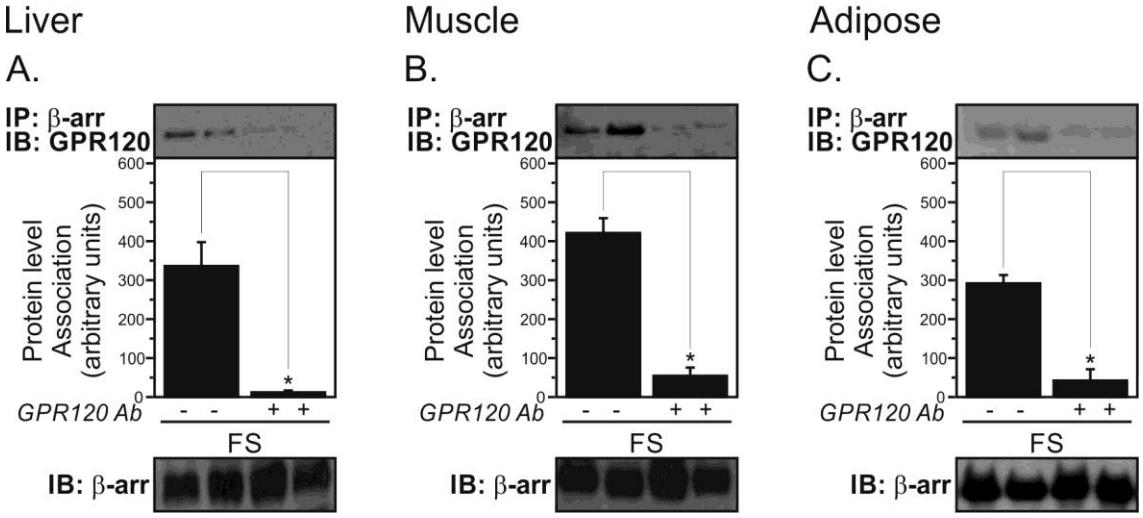


Figure 13. Schematic Diagram of GPR120/40 Activities

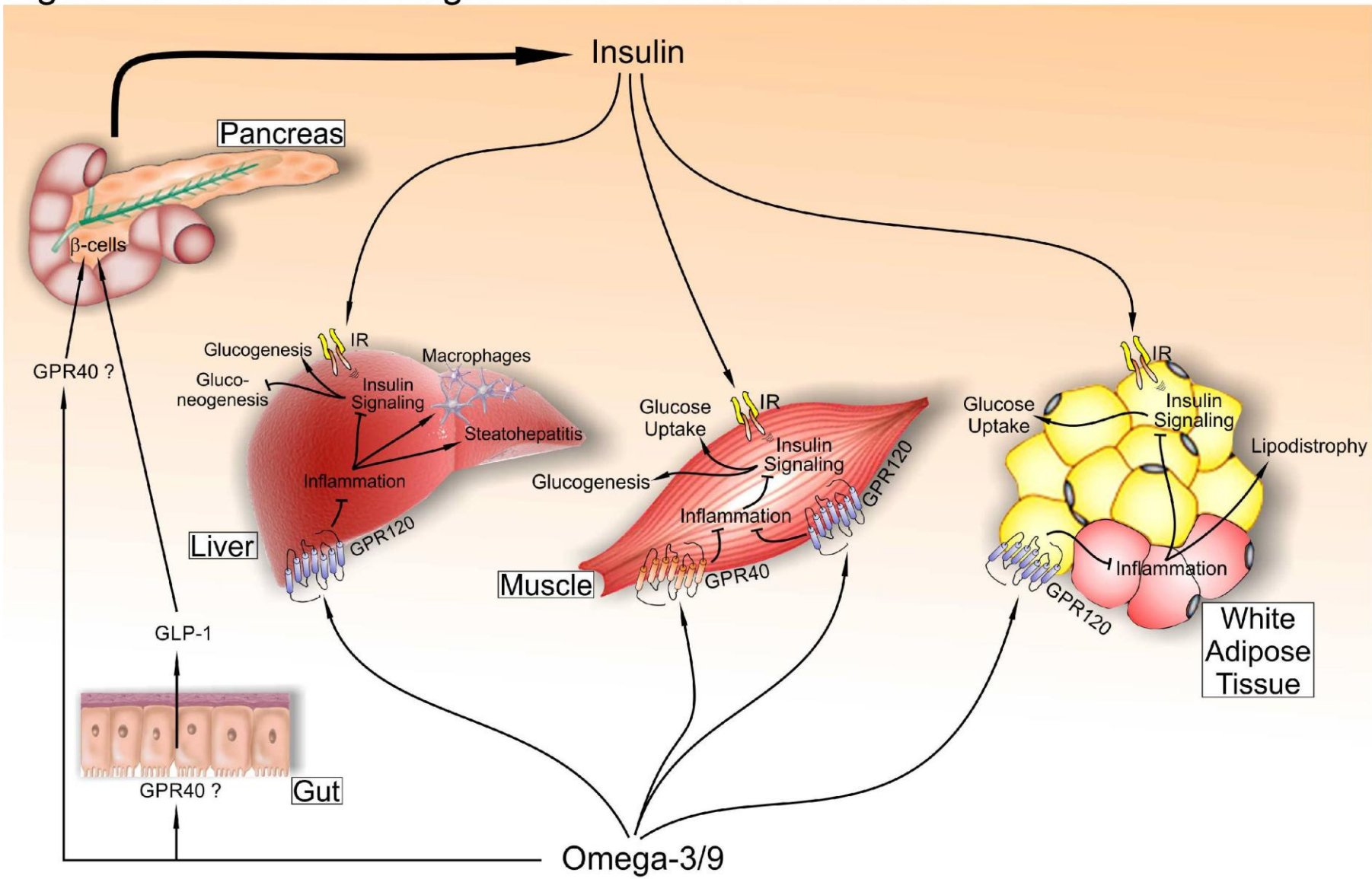


Figure S1.

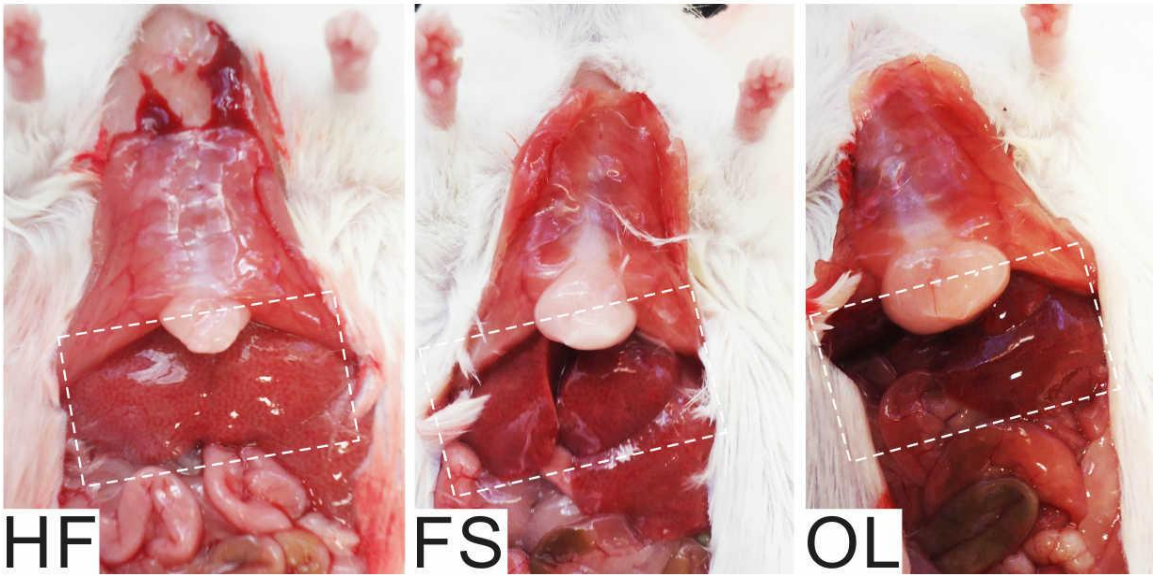


Figure S2. Liver Metabolic Pathway

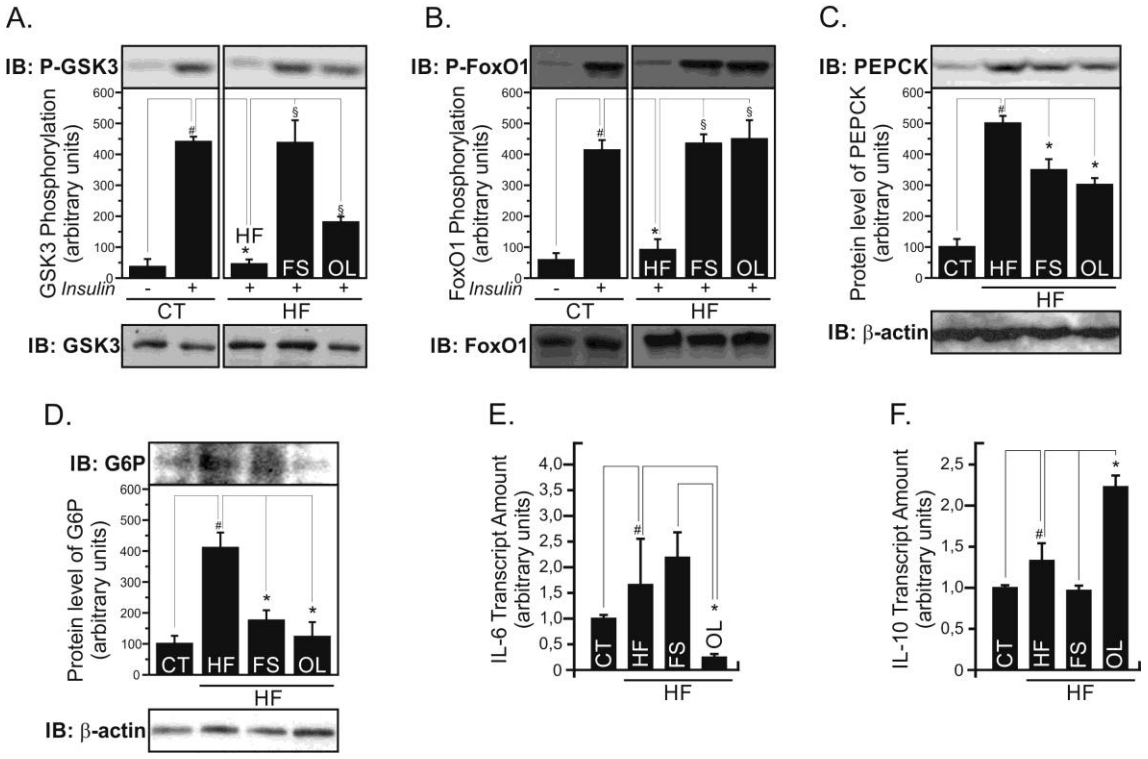


Figure S3. Liver Imunohistochemistry

A.

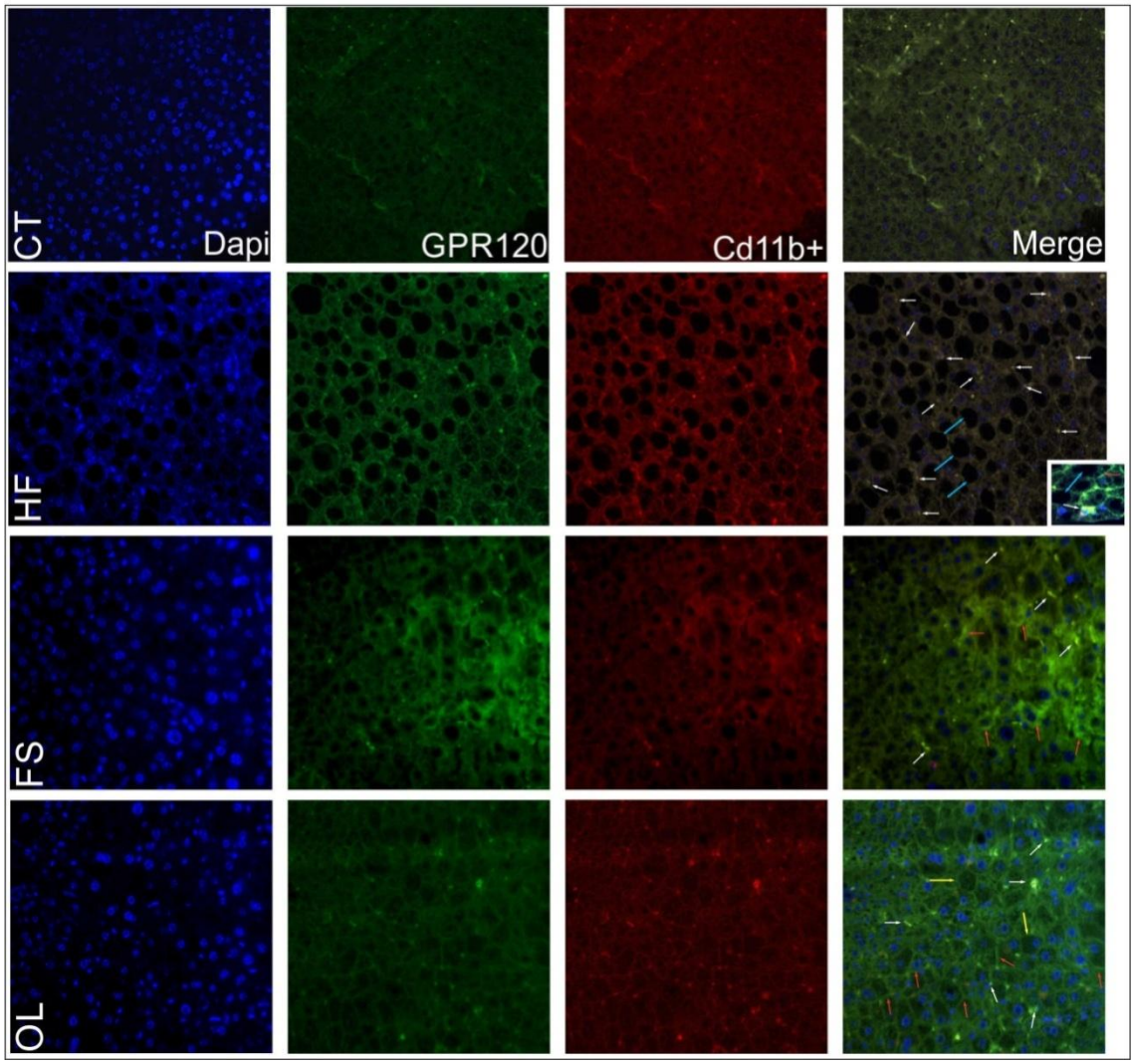


Table 1. Diets based on AIN-93 G – American Institute of Nutrition – 1993(9). CT – control diet; HF – high fat; FS – high fat diet substituted on 10% of flaxseed oil; OL – high fat diet substituted on 10% of olive oil.

Table 2. CT – Control Diet; FS – Flax Seed Oil Substituted 10%; HF – High Fat Diet; MUFA – Monounsaturated Fatty Acid; OL - Olive Oil Substituted 10%; PUFA – Polyunsaturated Fatty Acid; SFA – Saturated Fatty Acid. #, mean significant difference between CT an HF groups by Student's test ($P<0.05$). a-c, mean values followed by the same letter in the line are not different by Tukey's test ($P< 0.05$). ∑ SFA, includes 8:0, 10:0, 12:0 and 17:0. ∑ MUFA, includes 14:1, 17:1, 20:1(ω-7) and 24:1. ∑ PUFA, includes 18:3(ω-6), 20:2(ω-6), 20:3(ω-6) and 22:5(ω-6).

Figure 1. Experimental Protocols. (A) – Four-week old male Swiss mice were fed regular chow (CT) or high-fat diet (HF) for eight weeks and then randomly separated into four groups: CT mice, maintained for another eight weeks on the same CT diet; or HF mice which were either maintained on the same HF diet; or transferred to diets containing substitution of lard by flaxseed or olive oils to final concentrations of 10%, according to Table 1. (B) – Pair feeding Test – Swiss mice were fed high-fat diet (HF) for eight weeks and then randomly separated into three groups: HF mice, maintained for another eight weeks on the same HF diet, however, the amount in grams offered was similar to the OL group, which, based on previous experiments was the group which ate less; or transferred to diets containing substitution of lard by flaxseed or olive oils to final concentrations of 10%, according to Table 1. At the end of the experimental period, the mice were submitted to a glucose tolerance test (GTT) and an insulin tolerance test (ITT), four days later, feeding behavior was evaluated and samples were obtained for immunoblotting (IB) and real-time PCR (RT-PCR). Feeding behavior and body mass were determined throughout the experimental period. At the end of the experimental period some mice were randomly selected for histology, IB and RT-PCR.

Figure 2. Food Intake and Body Mass Variation.

(A) Body mass variation for each group during the whole experimental period. (B) Results are depicted as the weight gain means obtained during the whole period. (C) – Epididymal fat mass (g) at the end of the experimental period. (D) – Histological evaluation (hematoxilin-eosin staining of 4 mm sections) of epididymal fat. (E) – Mean adipocyte area obtained from histological sections. (F) – Mean daily spontaneous food intake (Kcal) of Swiss mice fed on regular chow- (CT), high-fat diet- (HF), flax seed- (FS) or olive oil- (OL) substituted (10%) diets for eight weeks; results are depicted as daily food intake calories along the time. (G) – Diet preference assay, lean Swiss mice were fasted for 10 h and then similar amounts of HF, FS or OL diets were offered to compare the preference for each one; results are presented as the relative caloric consumption of the tested diet during 12h. In all experiments, n=9; in A-F, #$P<0.05$ vs. CT (Student's test) and *$P<0.05$ vs. HF, FS or OL (Tukey's test).

Figure 3. Glucose Homeostasis. (A) – Fasting glucose were obtained at the end of an eight-week experimental period for Swiss mice fed on regular chow (CT), high-fat diet (HF), flaxseed- (FS) or olive oil- (OL) substituted (10%) diets. (B) – Blood glucose levels and (B1) constant for glucose decay during an insulin tolerance test (Kitt) (%/min); (C) – Blood glucose levels and (C1) the area under glucose curve (AUC) during an intraperitoneal glucose tolerance test (i.p.GTT). In all experiments, n=9; #P<0.05 vs. CT (Student's test) and *P<0.05 vs. HF, FS or OL (Tukey's test).

Figure 4. Insulin Signal Transduction in Animals fed with CT, HF, FS or OL diets. Sixteen-week old Sw/Uni mice were anesthetized and acutely treated through portal vein with saline (100 µL) (-) or insulin (100 µL 10^{-6}mol/L) (+). After 30' (liver (A-C)) or 1:30'' (muscle (D-G) and adipose tissue (H-J)), fragments were obtained and used in immunoblotting (IB) experiments. In direct IB experiments, samples containing 0.1 mg total protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted with respective antibodies (Phospho Insulin Receptor (P-IR) (A, D and G), Phospho Insulin Receptor Substrate 1 (P-IRS-1) (B, E and H) or PhosphoAkt (P-Akt) (C, F and I)). Loading was evaluated by re-probing the membranes with anti- IR (A, D and G), IRS-1 (B, E and H) and Akt (C, F and I). The bar graphs represent means ± SD of densitometric values obtained for the bands of CT, HF, FS or OL treated with insulin (+). In all experiments, n=6. Mean significant difference between §CT(-) and CT (+); #CT(+) and HF(+) groups by Student's test (P<0.05). *P<0.05 vs. HF, FS or OL (Tukey's test).

Figure 5. Inflammatory Signal Transduction. Extracts obtained from liver, muscle and adipose tissue of Swiss mice fed on regular chow (CT), high-fat (HF), flaxseed oil- (FS) or olive oil (OL) substituted (10%) diets for eight weeks were used in immunoblotting (IB) experiments to evaluate protein expression and/or activity. Specific antibodies against Interleukin-1 beta (IL-1β) (A,H and O), Interleukin-6 (IL-6) (B, I and P)), phospho Inhibitor kinase Kappa (P-IKK) (C, J and Q), phospho inhibitor kinase B alpha (P-IκB-α) (D, K and R), Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-α) (E, L and S), phospho c-Jun N-terminal kinase (P-JNK) (F, M and T), and anti-inflammatory Interleukin-10 (IL-10) (G, N and U) were used to identify respective protein targets. Loading was evaluated by re-probing the membranes with anti-β-actin (A, B, E, G, H, I, L, N, O, P, S and U), anti- IKK (C, J and Q), IκB-α (D, K and R), JNK (F, M and T). In all experiments, n=6. #P<0.05 vs. CT (Student's test) and *P<0.05 vs. HF, FS or OL (Tukey's test).

Figure 6. Mass Spectrum of Fatty Acid Fingerprint on Liver. The metabolic fingerprint analyses emphasize the overall distribution of lipid molecular species obtained directly from liver of mice fed with HF (A), FL (B) or OL diets (C). As depicted, D and E panels respectively shows C18:3 alpha-linolenic and C18:1 oleic fatty acids abundance defined by MALDI-MS in the sample. The conditions for lipid analysis were described in Methods. C16:0 – Palmitic acid; C18:0 – Stearic acid; C18:1 – Oleic acid; C18:2 – linoleic acid; C18:3 – alpha-linolenic acid; C20:0 – arachidic acid; C21:0 – heneicosaenoic acid; C22:0 Behenic acid. *HF vs FS or OL groups by Student's test (P<0.05)

Figure 7. Pair Feeding.Food Intake and Body Mass Variation. (A) – Pair feeding Test – Swiss mice were fed high-fat diet (HF) for eight weeks and then randomly separated into three groups: HF

mice, maintained for another eight weeks on the same HF diet, however, the amount in grams offered was similar to the OL group, which, based on previous experiments was the group which ate less; (B) – Body mass variation for each group during the whole experimental pair-feeding period. (C) Results are depicted as the weight gain means obtained during the whole period. (D) – Epididymal fat mass (g) at the end of the experimental period. In this experiment, n=5. No data showed statistical differences.

Figure 8. Insulin Signal Transduction after Pair-Feeding Test. After pair-feeding period, sixteen-week old Sw/Uni mice fed with HF, FS or OL diets were anesthetized and acutely treated through portal vein with saline (100 µL) (-) or insulin (100 µL 10^{-6}mol/L) (+). After 30' (liver) or 1:30'' (muscle and adipose tissue), fragments were obtained and used in immunoblotting experiments. In direct immunoblotting (IB) experiments, samples containing 0.1 mg total protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted with respective antibodies (Insulin Receptor (IR) (A, D and G), Insulin Receptor Substrate 1 (IRS-1) (B, E and H) or Akt (C, F and I)). The analyses were carried out on liver (A, B and C), muscle (D, E and F) and adipose tissue (G, H and I). Loading was evaluated by re-probing the membranes with anti- IR (A, D and G), IRS-1 (B, E and H) and Akt (C, F and I). The bar graphs represent means ± SD of densitometric values obtained for the bands of HF, FS or OL treated with insulin (+). In all experiments, n=5. #P<0.05 vs. HF (+) and *P<0.05 vs. HF, FS or OL (Tukey's test).

Figure 9. Inflammatory Signal Transduction after Pair-Feeding Test. After pair-feeding period, sixteen-week old Sw/Uni mice fed with HF, FS or OL diets were anesthetized and extracts obtained from liver, muscle and adipose tissue of Swiss mice fed on regular chow (CT), high-fat (HF), flaxseed oil- (FS) or olive oil (OL) substituted (10%) diets were used in immunoblotting (IB) experiments to evaluate protein expression and/or activity. Specific antibodies against Interleukin-1 beta (IL-1β) (A, E and I), Interleukin-6 (IL-6) (B, F and J), Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-α) (C, G and K) and phospho c-Jun N-terminal kinase (P-JNK) (D, H and L) were used to identify respective protein targets. Loading was evaluated by re-probing the membranes with anti-β-actin (A, B, C, E, F, G, I, J and K), anti- JNK (D, H and L). In all experiments, n=5. *P<0.05 vs. HF, FS or OL (Tukey's test).

Figure 10. Signaling Mediated by Fat Source and Time-Course Test. To test the strength in GPR120 activation mediated by isolated fat components of experimental diets, lean Swiss mice, six-week old were treated acutely with 500 µL of soy oil (S), solubilized lard (L), flaxseed (FL) or olive (OL) oils by gavage (A-C). To test the time spent to be absorbed and activate GPR receptors, we carried out a time-course experiment. Flaxseed oil was chosen to this test due its high capacity on GPR120/40 activation on liver (D), muscle (E and F) and adipose tissue (G). In both experiments, samples contenting 1.0 mg total protein extracts from tissues were incubated with β-arrestin antibody and immunocomplexes recovered with protein A Sepharose were separated, under denaturing conditions, by SDS-PAGE. Nitrocellulose transfers were blotted (IB) with GPR120 or GPR40. The bar graphs represent means ± SD of densitometric values obtained for the bands of S, L, FL or OL. Loading was evaluated by re-probing all membranes with anti- β-arrestin. In all experiments, n=4. *Mean values followed by the same letter in the bars are not different by Tukey's test (P>0.05).

Figure 11.GPR120 Signal Transduction. Extracts obtained from liver, muscle and adipose tissue of Swiss mice fed on high-fat (HF), flaxseed oil- (FS) or olive oil (OL) substituted (10%) diets for eight weeks were used in immunoblotting (IB) experiments to evaluate GPR120 signaling cascade. Samples contenting 1.0 mg total protein extracts from tissues were incubated with β-arrestin (A, B, D, E, G and H) and Tak-1 (C, F and I) antibodies. The immunocomplexes were recovered with protein A Sepharose and, under denaturing conditions, separated by SDS-PAGE. Nitrocellulose transfers were blotted (IB) with GPR120 (A, D and G) or Tab1/2 (B, C, E, F, H and I) antibodies. Loading was evaluated by re-probing the membranes with anti- β-arrestin (A, B, D, E, G and H) or Tak-1 (C, F and I). In all experiments, n=5. *P<0.05 vs. HF, FS or OL.

Figure 12.GPR120 Immune Neutralization. After 8h fasting, lean Swiss mice, six-week old were treated acutely with GPR120 antibody (+) (1.25 µg/100 µL i.p.) or with rabbit pre-immune serum (RPIS) (-). After 3 h they receive 500 µL of flaxseed oil by gavage. After another 3 h, GPR120 signaling was lost on liver (A), Muscle (B) or adipose tissue (C). After homogenates, samples contenting 1.0 mg total protein extracts from tissues were incubated with β-arrestin antibody. The immunocomplexes were recovered with protein A Sepharose and, under denaturing conditions, separated by SDS-PAGE. Nitrocellulose transfers were blotted (IB) with GPR120 antibody. Loading was evaluated by re-probing the membranes with anti- β-arrestin. In all experiments, n=6. Mean significant difference between *FS(-) and FS(+) groups by Student's test (P<0.05).

Figure 13. Schematic Diagram of the b-arrestin2 and GPR120-mediated Anti-inflammatory Mechanism. Nevertheless, some authors (18, 19) appoint omega-3 or 9 as GPCRs activators in the gut, beginning their actions even before absorption and when in blood circulation, could increase insulin release directly in the pancreas.

Supplemental Information –Extended Experimental Procedures

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) and sodium thiopental were from Lilly (Indianapolis, IN, USA). Anti-Insulin Receptor-β (IR-β) (C19) (sc-711, rabbit polyclonal), anti-phospho [Tyr 1162/1163] Insulin Receptor (P-IR) (sc-25103- R, rabbit polyclonal), anti-Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) (A19) (sc-560, rabbit polyclonal), anti-Phospho [Tyr 989] Insulin Receptor Substrate-1 (P-IRS-1) (sc-17200-R, rabbit polyclonal), anti-AKT 1/2/3 (H 136) (sc-8312, rabbit polyclonal), anti-Inhibitor kinase B-α (IκBα) (sc 847, rabbit polyclonal), anti-Phospho [Ser 32] Inhibitor kinase B-α (P-IκB-α) (sc-7977-R, rabbit polyclonal), anti-Inhibitor kinase kappa-β (IKKβ) (P20) (sc-34673, rabbit polyclonal), anti-Phospho [Ser180/181] Inhibitor kinase kappa-β (P-IKKαβ) (sc-23470-R, rabbit polyclonal), anti-Phosphoenol Pyruvate Carboxy-Kinase (PEPCK) (H300) (sc-32879, rabbit polyclonal), anti-Glucose-6-Phosphatase-α (G6Pase-α) (G20) (sc-33839, goat polyclonal), anti-c-Jun N terminal kinase (JNK) (F3) (sc 1648, mouse monoclonal), anti-Phospho [Thr 183/185] c-Jun N terminal kinase (P-JNK) (sc-6254, mouse monoclonal), anti-Interleukin 10 (IL-10) (sc-1783, goat polyclonal), anti- Interleukin-6 (IL-6) (sc-1266, goat polyclonal), anti-Interleukin 1β (IL-1β) (sc-1252, goat

polyclonal), anti-Tumor Necrosis Factor-α (TNFα) (sc-8301, rabbit polyclonal), anti-TNFα (sc-1350, goat polyclonal), anti-Integrin-αM ($CD11B^{+}$) (H61) (sc-28664, rabbit polyclonal), anti-G-Protein Coupled Receptor-120 (GPR120) (sc-99105, rabbit polyclonal), anti-GPR120 (sc-48203, goat, polyclonal), anti-GPR40 (sc-32905, rabbit polyclonal), anti-β-arrestin 2 (sc- 365445, mouse monoclonal), anti-TAK 1 (sc-7967, mouse monoclonal), anti-Fatty Acid Synthase (FAS) (sc-20140, rabbit polyclonal), anti-β-actin (sc-7210, rabbit polyclonal), FITC-conjugated mice anti-Rabbit and Rhodamine-conjugated anti-Goat antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-Forkhead box protein O1 (FoxO1) (#2880, rabbit monoclonal), anti-Phospho [Ser256] Forkhead box protein O1 (pFoxO1) (#9461S, rabbit polyclonal), anti-TAB1 (#3225, rabbit polyclonal), anti-Glycogen Synthase Kinase-αβ (GSK-3α/β) (#5676, rabbit monoclonal), anti-Phospho [Ser9] Glycogen Synthase Kinase-3β (P-GSK-3β) (#5558, rabbit monoclonal), anti-β-arrestin 2 (#3857, rabbit monoclonal), were from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Anti- Interleukin-1β (IL-1β) (503502, mouse & rat) and anti-TNFα (506102, mouse & rat) were from BioLegend (San Diego, CA, USA). All the chemicals used in the real-time PCR experiments and 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) used in immunofluorescence staining were purchased from Invitrogen and Applied Biosystems.

Gas chromatography method for the evaluation of diet composition

The fatty acids present in the diets were separated by gas chromatography (CGC 6850 Series Gas Chromatography System, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) using a 60-m-long, 0.25-mm-inner diameter, and 0.25-µm-film

methylpolysiloxanecapillary column (DB-23, 50% cyanopropyl, Agilent). The running time for each sample was approximately 60 min. The carrier gases used were nitrogen (carrier gas), hydrogen, helium, and synthetic air. The operating conditions of the chromatograph were as follows: column flux, 1.00 mL/min; linear velocity, 24 cm/s; detector temperature, 280 °C; injector temperature, 250 °C; oven temperature, 110 °C for 5 min, 110 to 215 °C (5 °C/min), 215 °C for 24 min; volume of carrier gas injected, 1.0 µL. A cleaning procedure for the chromatograph was performed at intervals between samples by using isopropanol and petroleum ether. The fatty acids were quantified by interpolation of an external pattern curve of the fatty acid profiles found in the diets (Table 2). Extracted lipids were stored at -20 ºC, protected from light (1).

Intraperitoneal Insulin-tolerance Test

After 8 h of fasting, CT, HF, FS- and OL- substituted mice groups were submitted to an 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/biological half-life (t1/2). The plasma glucose t1/2 was calculated from the slope of last square analysis of the plasma glucose concentration during the linear phase of decline (n=9) (2).

Intraperitoneal Glucose Tolerance Test (i.p. GTT)

After 8 h of fasting, mice were submitted to a 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 (n = 9).

HPLC for determination of LPS contamination

Determination of LPS content in diets was performed using a HPLC method described previously (3). Briefly, fatty acids of the diet were derivatized with 4-bromomethyl-7-coumarin and the analysis performed in a Shimadzu model LC-10A liquid chromatographer. The samples were eluted using a C8 column (25 cm 64.6 id, 5 mm of particles) with a C8 precolumn (2.5 cm 64.6 id, 5 mm of particles), 1.0 mL/min of acetonitrile/water (77%/23%, v/v) flow and fluorescence detector (325 nm excitation and 395 nm emission). For quantification of fatty acids, the capacity factor, elution sequence, linearity, recovery, precision, interference, and limit of detection were determined. The lower limit of detection was 1.0 pg and highly purified LPS was used as a tracer.

Mass spectrometry for the evaluation of liver lipid content

Sample preparation and analysis.

Liver samples were submitted to STELDI-MSI (Sorptive 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.

Histological studies

Approximately 0.5 cm^3 of epididymal fat specimen was dehydrated with ethanol, cleared with xylene, and embedded in paraffin wax (Histosec® - Merck, Darmstadt, Germany), and 4 mm sections were obtained. The epididymal tissue sections were stained with hematoxylin and eosin. Photomicrographs were obtained as described below. The mean area of adipocytes (average surface area of 30 randomly sorted adipocytes, per animal) was determined by the Image J® Analysis software, v. 1.41 (National Institutes of Health, USA). Hydrated, 4 mm sections of paraformaldehyde-fixed, paraffin embedded, epididymal and liver sections were obtained from mice treated during 8 weeks with CT or HF diets plus the respective treatment (FS or OL diets). The $CD11b^+$ and GPR120 levels were evaluated by indirect immunofluorescence staining, as described previously (5). In short, hydrated sections were incubated for 30 min at room temperature with 2% rabbit pre-immune serum and then incubated for 12 h, at 4 ºC, in a moister chamber, with

an anti- $CD11b^+$ (1:100) or an anti-GRP120 (1:100). Sections incubated with the anti- $CD11b^+$ antibody were then incubated with a FITC conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody. Sections incubated with the anti-GRP120 antibody were then incubated with the second primary antibody against CD11b+ (1:100) for another 12 h, at 4 ºC, in the moister chamber. Finally, sections were incubated with FIT-C, and rhodamine-conjugated secondary antibodies. The nuclei were stained in blue with DAPI. Analysis and documentation of results were performed using a Leica FW 4500 B microscope.

Immunoblots and Immunoprecipitation

As soon as anaesthesia (i.p. injection of ketamine (50 mg/Kg body $weight^{-1}$) and xylazine (20 mg/Kg body $weight^{-1}$)) was assured by the loss of pedal and corneal reflexes, the abdominal cavities were opened and fragments of liver, gastrocnemius muscle and adipose tissue (3.0 x 3.0 x 3.0 mm) were gently removed and immediately homogenized. After pooled, 125 mg of protein was used as a whole tissue extract. For evaluation of insulin signal transduction, the animals received an injection of insulin (100 µL 10^{-6}mol/L) or saline (100 µL) through the portal vein. After different intervals (30'' (liver), 1:30' (skeletal muscle and adipose tissue)), tissues 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^{-1}aprotinin) at 4 ºC with a Polytron PTA 20S generator (Brinkmann Instruments model PT 10/35) operated at maximum speed for 15'. The extracts were

centrifuged at 9,000 g and 4 ºC in a Beckman 70.1 Ti rotor (Palo Alto, CA, USA) for 45 min to remove insoluble material, and the supernatants of these tissues were used for protein quantification, using the Bradford method (6). Proteins were denatured by boiling in Laemmli sample buffer. Samples containing 125 mg of protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with antibodies against IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, JNK, P-JNK, IKK, P-IKK, IκBα, P-IκBα, IR, P-IR, IRS-1, P-IRS1, Akt, P-Akt, FoxO1, P-FoxO1, GSK-3, P-GSK3, PEPCK, G-6P and β-actin. Specific bands were labeled by chemiluminescence and visualization was performed by exposure of the membranes to RX-films. For the evaluation of GPR120 and GPR40 signal transduction, 500 mg protein was used for immunoprecipitation with GPR120, GPR40, β-arrestin 2 or TAK1 antibodies. Immunoprecipitates were separated by SDS–PAGE and membranes were blotted with either β-arrestin or TAB1 antibodies.

Real-time PCR.

Reverse-transcription was performed using total RNA from liver samples, as described previously (7). IL-6 and IL-10 mRNAs were measured in the liver of mice treated with CD, HF, FS or OL diets. Intron-skipping primers for IL-6 and IL-10 were obtained from Applied Biosystems. Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase primers (Applied Biosystems) were used as a control. Real-time PCR analysis of gene expression was performed in an ABI Prism 7700 sequence detection system (Applied Biosystems). 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 are expressed as relative transcript amount as previously optimized (7).

References

1 – Oliveira DD, et al. Effects of lipid sources in the diet of laying hens on the fatty acid profiles of egg yolks. Poult Sci. 2010; 89(11):2484-90.

2 – Bonora E, et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. J ClinEndocrinol.Metab.1989; 68: 374-378.

3 – Martins EF, et al. Changes of fatty acid composition in incubated rat pancreatic islets. Diabetes Metab.2004; 30: 21-27.

4 – Stockert J, et al. Regulation of TAK1/TAB1-mediated IL-1β signaling by cytoplasmic PPARβ/δ. PLoS One. 2013; 8(4):e63011.

5 – Cintra DE et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. PLoS One. 2012; 7(1): e30571.

6 – 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: 248–254.

7 – Cintra DE, et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. J Hepatol. 2008; 48(4): 628-37.

Supplemental Information – Foot Notes.

Figure S1. Omega-3 or 9 Decrease Liver Weight and Normalize Macroscopic Appearance. Livers (FS, OL) at 16 weeks did not accumulate excess fat on the high-fat diet.

Figure S2. FS or OL Diet Restores Liver Metabolic Functions. To access the status of activity related to glucose homeostasis enzymes, extracts obtained from liver of Swiss mice fed on regular chow (CT), high-fat (HF), flaxseed oil- (FS) or olive oil (OL) substituted (10%) diets were used in immunoblotting (IB) experiments, to evaluate protein expression and/or activity. Specific antibodies against phospho Glycogen Syntase Kinase-3 (P-GSK3) (A), phosphoForkhead box Protein O1 (P-FoxO1) (B), Phosphoenol-Pyruvate-Carboxy-Kinase (PEPCK) (C) and Glucose-6-phosphatase (G6P) (D) were used to identify respective protein targets. Loading was evaluated by re-probing the membranes with anti-β-actin (C,D) and anti- GSK3 (A) or FoxO1 (B). Total RNA obtained from liver was used in real-time PCR to amplify the mRNAs of IL-6 (E) and IL-10 (F). In immunoblots experiments n=6, in RT-PCR, n=5. #vs. CT(-) and CT (+); *vs. CT(+) and HF(+) groups by Student's test ($P<0.05$). §vs. HF, FS or OL groups by Tukey's test ($P<0.05$).

Figure S3. FS or OL Diets Reduces Macrophage Infiltration and Macroscopic Lipid Accumulation. (A) – Liver fragments (3.0x3.0x3.0 mm) of Swiss mice fed on regular chow (CT), high-fat (HF), flaxseed oil- (FS) or olive oil (OL) substituted (10%) diets were used in immunofluorescence experiments. Specific antibodies against GPR120 (Green) and $CD11b^{+}$ (Red) were performed in 4-µm sections of liver used to identify the respective protein co-localization targets. White arrows show M1 macrophage; Yellow and blue arrows show micro and macrovesicularsteatosis respectively; red arrows show GPR120 surrounding hepatocytes membrane. The photomicrographs were taken on 40x magnification, and on highlighted image, 100x. (B) – A ventral view of lipid content in liver of HF, FS or OL mice.

DISCUSSÃO

Perante a ineficiência de estratégias farmacológicas voltadas para o tratamento da obesidade, diversos componentes bioativos emergem como promissoras alternativas nutricionais no combate a esta doença. Assim, foi hipotetizado neste trabalho que ácidos graxos insaturados, de conhecido caráter anti-inflamatório (Lee et al, 2001; Pachikian et al, 2011; Asahara et al, 2012; Cintra et al, 2012) poderiam modular negativamente as vias intracelulares inflamatórias em tecidos periféricos repercutindo no restabelecimento da sensibilidade à insulina e na melhora da tolerância sistêmica à glicose. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da substituição de fontes alimentares de ácidos graxos saturados por fontes de ácidos graxos insaturados, e suas ações moleculares diretas sobre vias inflamatórias e da sinalização da insulina no tecido hepático, muscular e adiposo branco.

Substituição de Gordura Saturada por FS ou OL Reduziu Ingestão Alimentar e Ganho de Peso dos Animais

A substituição em 10% de banha suína, fonte de ácidos graxos saturados por óleo de semente de linhaça resultou em aumento significativo na quantidade ALA na dieta hiperlipídica. Este mesmo procedimento em relação ao óleo de oliva resultou em aumento sutil na concentração do AO na dieta. Todavia, esta pequena diferença foi suficiente para induzir profundas mudanças as quais repercutiram positivamente no perfil metabólico dos animais obesos e diabéticos.

O tratamento com as dietas modificadas reduziu a ingestão alimentar pelo restabelecimento do controle da fome, o que contribuiu significativamente com o menor ganho de peso, chegando até a perda de peso em alguns animais, quando comparados aos seus controles obesos. Entretanto, as dietas que receberam os óleos de linhaça e oliva poderiam apresentar alterações na palatabilidade em relação à dieta hiperlipídica, possivelmente alterando a preferência alimentar dos animais. Neste sentido, um teste aplicado previamente ao tratamento dietético, em que os animais foram expostos aos três tipos de dieta (FS, OL e HF) simultaneamente, excluiu a possibilidade de preferência e /ou recusa alimentar

visto que a diferença de consumo entre as dietas, após 24h, foi insignificante ($P<0,05$). Tais resultados sugerem restauração do controle da fome e gasto energético promovidos pelos ácidos graxos insaturados presentes em altas concentrações nas dietas FS e OL, similarmente a outros estudos como o de Cintra et al, 2012 e Lim et al, 2013.

Ácidos Graxos Insaturados Promovem Restabelecimento da Via de Sinalização da Insulina – O Papel do Fígado na Recuperação do Controle Glicêmico

Repercussões fisiológicas observadas nos testes de tolerância à glicose e à insulina,e nas medidas de glicemia de jejum, evidenciaram significativa melhora na tolerância orgânica à glicose em decorrência da recuperação da sensibilidade à insulina pelos tecidos responsivos a esse hormônio. Tais fenômenos foram comprovados pelas análises moleculares, mediante modulação positiva na fosforilação, indicando maior atividade das proteínas-chave envolvidas na via de sinalização da insulina, como seu receptor IR, substratos (IRS1/2), e das proteínas Akt e FoxO1.

Com base na literatura, hipotetizamos que tais resultados seriam decorrentes das potentes ações anti-inflamatórias exercidas pelo ALA e AO presentes em abundância nas dietas que sofreram substituição de parte da fração saturada pelos óleos fontes destes componentes.Tal hipótese pôde ser comprovada pela redução da atividade de proteínas comuns às vias inflamatórias do TLR-4, TNF-α e IL-1β, como IKK, IKBα e JNK, culminando na redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-1β e IL-6 e concomitante aumento na expressão da proteína anti-inflamatória, contra-reguladora destas vias, a IL-10. Morari et al, (2010), demonstraram que o ácido oléico é capaz de induzir aumento na expressão desta interleucina por meio da complexação da proteína PGC-1α com c-MAF e a porção p50 do fator de transcrição NF-kB em células hepáticas de roedores, tratando-se de importante mecanismo pelo qual o ω9 atua promovendo o controle da inflamação. Já no trabalho de Asahara et al, (2012), a administração de 1,8 g por dia de EPA altamente purificado (98%), foi

capaz de promover significativo aumento na expressão do mRNA de IL-10 em monócitos de pacientes obesos e dislipidêmicos por intermédio do PPARγ (receptor γ ativado por proliferador de peroxissomos). Esses achados reforçam a importante participação destes nutrientes na remissão do processo inflamatório.

Sendo os tecidos periféricos analisados metabolicamente ativos, responsáveis por desempenhar papéis fundamentais no metabolismo da glicose, a remissão da inflamação proporciona aumento na sensibilidade ao sinal gerado pela insulina e a melhora da homeostase sistêmica da glicose. Neste ínterim, o aumento na sensibilidade à insulina em hepatócitos, induziu incremento na atividade quinase da proteína Akt, a qual fosforila e inativa outra quinase, a GSK-3, que possui 2 isoformas, α e β, sendo a GSK-3α mais ativa no fígado e a GSK-3β no músculo (Roach et al, 2012). No fígado, uma vez fosforilada, a GSK-3α deixa de inibir a GS, resultando em maior produção de glicogênio hepática (Roach, 2002). Adicionalmente, a maior ativação da Akt culmina em fosforilação da proteína nuclear FoxO1, ocasionando sua extrusão do núcleo celular e consequente remissão de sua atividade transcripcional (Tikhanovich et al, 2013). Dessa maneira, a transcrição gênica regulada por este fator nuclear é bloqueada resultando em drástica redução dos níveis protéicos de enzimas como a PEPCK (codificada pelo gene *Pck-1*) (Lin & Accili, 2011), responsável pela glicogenólise, contribuindo assim para o aumento dos estoques de glicogênio no fígado. Outra enzima que participa da regulação dos níveis sanguíneos de glicose, e que teve seu conteúdo proteico reduzido pela ação dos ácidos graxos insaturados foi a G6-Pase (Glicose-6 fosfatase) (Lin & Accili, 2011). Esses dados enaltecem os efeitos benéficos e potentes desses nutrientes no controle glicêmico tendo o fígado um importante papel de pivô dessas ações.

PairFeeding não Suprime os Efeitos das Dietas com FS ou OL

No intuito de verificar se os efeitos benéficos observados, tanto no plano fisiológico quanto molecular, ocorreram em função das ações diretas dos ácidos graxos ω3 e ω9, foi realizada a técnica de pareamento alimentar (*PairFeeding*) de caráter quantitativo. Para tal, animais submetidos à dieta HF ao longo de todo

período experimental tiveram a ingestão alimentar controlada diariamente durante 8 semanas. Ao final deste período, os animais apresentaram o mesmo peso daqueles que receberam dieta com azeite de oliva, os quais, segundo experimentos prévios, habituavam ganhar menos peso após o tratamento. O rigoroso controle do consumo alimentar do grupo HF, foi eficiente em fazer com que os animais chegassem ao final do período experimental com o mesmo peso do grupo OL e também do grupo FS.

Todavia, os animais alimentados com óleo de linhaça e oliva obtiveram menor conteúdo de tecido adiposo epididimal, bem como menor hipertrofia deste tecido quando comparados aos controles obesos. Dados similares foram encontrados por Hill, et al (1993) onde ratos *Wistar* tratados com dieta contendo ω3 por 6 meses apresentaram menor adiposidade corporal total, menor conteúdo de tecido adiposo intra-abdominal e menor resistência à insulina quando comparados a grupos tratados com dieta rica em banha, óleo de milho ou triglicerídeos de cadeia média. Em estudo de caráter transversal randomizado, Piers et al, (2003) analisaram o efeito da substituição alimentar de gordura saturada (SFA) por monoinsaturada (MUFA) sobre o peso e composição corporal de indivíduos adultos, com sobrepeso ou obesos (IMC = 25,5 – 31,3 kg/m^2). Após 4 semanas, os sujeitos que receberam dieta rica em MUFA manifestaram menor peso corporal e massa adiposa em comparação aos que receberam dieta rica em SFA, sem mudanças significativas na ingestão alimentar. Além dessas alterações, foram observadas diferenças no colesterol total e no perfil de ácidos graxos de ésteres de colesterol séricos.

No presente estudo, mesmo estando os animais equiparados pelo peso corporal, observou-se considerável melhora periférica na sensibilidade à insulina e no controle glicêmico em decorrência da remissão da inflamação nos animais dos grupos FS e OL, similarmente ao tratamento padrão deste estudo. Magdalon et al (2012) verificaram que a administração oral diária de ácido oléico reduziu a expressão de IL-6 e IL-1β em macrófagos residentes de ratos. Em relação a estudos com humanos, Hutchins e colaboradores (2013) demonstraram repercussões positivas da ingestão diária de semente de linhaça no controle

glicêmico de indivíduos de ambos os sexos com sobrepeso ou obesidade e pré-diabéticos ao longo de 12 semanas.

Esses resultados confirmam a hipótese de que os efeitos positivos observados no modelo experimental adotado para este trabalho ocorreram em virtude das potentes ações anti-inflamatórias dos ácidos graxos insaturados, presentes nas dietas com óleo de linhaça ou oliva e não apenas como consequência da redução no ganho de peso.

O Receptor GPR120 Como Mediador das Ações dos Ácidos Graxos Insaturados em Tecidos Periféricos – Modulações Tecido - Específicas

Os ácidos graxos em geral são capazes de ativar receptores de membrana acoplados à proteína G, conhecidos por GPCR´s (Talukdar et al, 2011). Oh et al, (2010), propôs mecanismo de ação específico, pelo qual ácidos graxos insaturados de cadeia longa são internalizados pela célula podendo então exercer suas funções. Constatou-se que o DHA, EPA, ALA e AO possuem importante afinidade pelo receptor GPR120 e por seu homólogo, o GPR40, ativando-os em linhagens de células adiposas e musculares respectivamente. Após o estímulo, alterações conformacionais no domínio intracelular desses receptores atraem para si a proteína citoplasmática β-arrestina-2, capaz de arrastar as proteínas TAB1/2/3, comuns às vias pró-inflamatórias do TLR-4, TNF-α e IL-1β, culminando na desarticulação destas vias e na remissão do processo inflamatório (Talukdar et al, 2011; Oh & Olefsky, 2012).Em estudo recente, Cintra e colaboradores avaliaram a presença do receptor GPR120 reproduzindo o mesmo mecanismo de ação ativado por AO e ALA no hipotálamo de roedores tanto via intracerebroventricular (i.c.v.), quanto por via oral.

Neste trabalho, demonstramos *in vivo,* que esses receptores estão presentes em células do fígado, músculo e tecido adiposo de camundongos *Swiss* e que, mecanisticamente similar aos trabalhos citados, após o estímulo do GPR120/40 pelos ácidos graxos insaturados ω3 e ω9, ocorre a atração da proteína β-arrestina-2 e o arraste das proteínas da TAB, interrompendo a transdução do sinal das vias inflamatórias ativadoras do NF-κB.

Além da identificação da associação entre o receptor GPR120 e sua proteína acopladora, β-arrestina-2, nos três tecidos estudados, foi observada forte associação entre o GRP40, com a mesma proteína subsequente no músculo esquelético após estímulo com os óleos fontes de ácidos graxos ω3 e ω9. Itoh e colaboradores (2003) verificaram que ácidos graxos são capazes de regular a secreção de insulina pelas células-β através do GPR40. Desde então, diversos trabalhos como o de Brisco et al, 2003, Doshi et al, 2009, Lin et al, 2011 e Ferdaoussi et al, 2012 vem relatando o importante papel deste receptor na regulação da secreção de insulina e no controle glicêmico.No presente estudo, as ações mediadas pelo GPR120 no músculo foram de média intensidade, o que sugere provável receptor adjacente. Assim surge seu receptor homólogo, o GPR40 potencializando o efeito dos ômegas no músculo esquelético.

Em vista da surpreendente melhora na sensibilidade periférica à insulina, postula-se que além da participação de receptores homólogos ao GPR120, exista mecanismo adjacente que justifique tal fenômeno. Oh et al (2010) citou em seu estudo a provável participação da proteína Gαq-11 em adipócitos 3T3-L1 paralela ao mecanismo de ação via GPR120, que poderia auxiliar no controle glicêmico.

Esses achados evidenciam estratégias moleculares presentes em tecidos periféricos que auxiliam o transporte de glicose mediado por insulina independente da existência do processo inflamatório.

Ativação Aguda do Receptor GPR120

Dispondo de dados comprobatórios do mecanismo de ação dos ácidos graxos em modelo experimental crônico, restava verificar tal mecanismo de modo agudo.Assim, camundongos de 4 semanas de idade foram divididos em grupos, e submetidos a tratamentos com soro pré-imune ou anticorpo anti-GPR120 via intraperitoneal (i.p.) e via oral por gavagem com soro fisiológico ou óleo de semente de linhaça. Mediante técnica de imunoprecipitação, foi possível detectar associação entre o receptor GPR120 e a proteína β-arrestina-2 apenas nos animais que receberam soro pré-imune via i.p., sendo esta associação mais intensa em animais que receberam o óleo de semente de linhaça, fonte de ALA.

Todavia, a associação entre o receptor e sua proteína subsequente foi enfraquecida ou abolida nos animais tratados com anticorpo anti-GPR120 via i.p. e óleo fonte de ω3, sendo que a maior dose de anticorpo pareceu ser mais eficiente na inibição da ativação do GPR120 pelo ácido graxo. Esses resultados revelam que os receptores GPR120 e 40 bem como o acoplamento à proteína β-arrestina-2 são essenciais para que os ácidos graxos insaturados de cadeia longa possam mediar a remissão da inflamação e, caso sejam realmente internalizados pela célula, possam exercer suas atividades em âmbito genômico. Além desses fatores, foi possível comprovar que esta associação ocorre agudamente após uma única dose de óleo vegetal rico em ω3, o que ressalta e impulsiona as investigações em torno desta fonte alimentar. Ainda, a semente de linhaça contém vitamina E que poderia manter íntegra a gordura em comparação às fontes marinhas de ω3, além de ser amplamente disponível na natureza e mais acessível economicamente à população de um modo geral (Arq. Bras. Cardiologia, 2013).

Diferentes fontes lipídicas de ácidos graxos insaturados utilizadas no preparo das dietas experimentais, tais como banha suína, óleo de soja, óleo de semente de linhaça e azeite de oliva, possibilitaram constatar que as fontes ricas em ω3 e ω9 (óleo de linhaça e de oliva respectivamente), são as que possuem maior afinidade pelos receptores GPR120/40 nos três tecidos analisados e, portanto, as que estimulam com maior potência suas vias de sinalização. Esses resultados vão de encontro às análises *in vitro* com ácidos graxos purificados do estudo de Oh e colaboradores (2010).

No que tange o tempo necessário para maior ativação dos GPRs pelos ácidos graxos, foi realizado um ensaio de *Time Course*, no qual animais magros com 6 semanas de vida receberam gavagem com 500μLde óleo de semente de linhaça e foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos para extração de fragmentos dos tecidos de interesse em diferentes intervalos de tempo. Transcorrido o período necessário para os processos fisiológicos de digestão e absorção do óleo ingerido e da distribuição sistêmica dos ácidos graxos que o compõe, verificou-se maior associação entre o GPR120/40 e a proteína β-arrestina-2 após 150 minutos das gavagens, sendo possível observar este

fenômeno com mais robustez após 180 minutos do procedimento. Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Lim et al, (2013), em que camundongos tratados via gavagem com ácido oléico apresentaram maior expressão gênica de proteínas relacionadas à oxidação lipídica no músculo esquelético, 3h pós estímulo. Desse modo, sugere-se que o intervalo de tempo de 180 minutos seja mais adequado para que os efeitos teciduais específicos dos ácidos graxos possam ser realmente observados.

Ácidos Graxos Insaturados Revertem a Condição de Esteatose Hepática e Reduzem a Hipertrofia do Tecido Adiposo

As análises dos cortes de fígado dos animais tratados com as dietas com ω3 ou ω9 revelaram considerável redução da condição de esteatose hepática uma vez que o tamanho das vesículas gordurosas foi diminuído. Geralmente, análises histológicas do tecido hepático de animais alimentados com dieta HF costumam apresentar acentuada esteatose com macrovesículas de gorduras bem delineadas, presença de macrófagos do tipo M1 (células de Kupfer) e inflamação (Puerta et al, 2005; Cintra et al, 2008).

Associado a esses fatores, a presença de marcadores Cd11b+, reconhecedores de macrófagos M1 no parênquima hepático foi reduzida, especialmente nos animais tratados com FS. Este fato colaborou com a redução do tônus inflamatório, fazendo com que o fígado dos animais alimentados com FS ou OL apresentasse aspecto muito próximo ao padrão saudável.

Análises de fitomicrografias do tecido adiposo revelaram significativa redução na hipertrofia dos adipócitos dos grupos tratados em relação aos controles obesos em vista da notória diminuição no tamanho destas células. Houve ainda redução na infiltração de macrófagos do tipo M1 neste tecido, fenômeno considerado crucial no contexto da obesidade, visto que este tecido é reconhecido como importante órgão endócrino, atuante na gênese e propagação da inflamação crônica e sub-clínica, dada sua capacidade em produzir e secretar citocinas pró-inflamatórias.Tais citocinas atuam de modo autócrino, parácrino e endócrino perpetuando os distúrbios metabólicos característicos do processo

obesogênico (Yudkin, 2003; Lumen & Saltiel, 2011). Sendo assim, a redução da hipertrofia dos adipócitos associada à menor presença de macrófagos ativos neste tecido, induzidas por FS ou OL, é de suma importância na contenção do fenômeno da “diabesidade”.

Além destes eventos, foi verificada a presença do receptor GPR120 na membrana de hepatócitos, adipócitos e macrófagos ativos infiltrados nesses tecidos, o que fortalece as evidências da participação deste receptor na mediação das ações exercidas pelos ácidos graxos insaturados.

Espectometria de Massa Reforça Hipótese Sobre Ação Direta dos Ômegas

No intuito de endossar a hipótese sobre a autoria dos ômegas nos desfechos observados, recorremos à técnica de espectometria de massa. Para tal, fragmentos de fígado dos animais submetidos às dietas HF, FS e OL foram minuciosamente analisados. O consumo de dieta hiperlipídica promoveu incorporação hepática de ácidos graxos saturados, principalmente palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), araquídico (C20:0) e behênico (C22:0). Contudo, foi constatada a presença do ácido mirístico (C14:0) apenas em fígado de animais tratados com dieta HF ao longo de todo período experimental, provavelmente devido à quantidade significativamente maior ($P<0,05$) deste ácido graxo na dieta HF em comparação à CT. Em estudo recente, Pal et al (2012) verificaram que os ácidos graxos saturados que possuem maior afinidade pela fetuína A, são C14:0, C16:0 e C18:0. Esta glicoproteína cuja síntese em hepatócitos é estimulada por AGS via NF-κB, atua como ligante endógeno propiciando a ativação da via inflamatória do TLR-4 ao interagir fisicamente com este receptor e os ácidos saturados. Assim, a presença dessas substâncias no tecido hepático, sustenta os pilares do status inflamatório crônico e de baixo grau que culmina em resistência à insulina e demais complicações.

As dietas com substituição em 10% da fração saturada por FS ou OL promoveram maior incorporação hepática de ALA e AO respectivamente, em comparação ao fígado dos controles obesos. De modo interessante, mesmo com

tal substituição, houve considerável presença de AGS no tecido hepático de animais tratados com FS. No entanto, observamos incorporação de ácidos ω3 como o ALA e DHA. Provavelmente a presença de DHA deve-se à conversão endógena a partir de ALA proveniente de FS (Calder, 2003). Ressalta-se que embora o conteúdo de ω3 seja inferior ao de AGS, as ações anti-inflamatórias do ALA foram suficientemente potentes para superar os efeitos deletérios provocados por eles. Resultado semelhante foi encontrado por Cintra et al (2012). A administração de ALA purificado via i.c.v. em roedores foi eficiente em reduzir a inflamação hipotalâmica deflagrada pelos AGS provenientes da dieta HF.

Por meio da técnica de cromatografia gasosa verificamos diminuição no conteúdo de AO da dieta com FS em comparação às dietas com OL ou HF. Entretanto, constatamos alto conteúdo de AO no parênquima hepático de animais alimentados com FS. Este parece ser um indício do aumento nos níveis protéicos da SCD1 (stearoyl-CoAdesaturase-1) e de sua atividade enzimática que resulta em conversão de C18:0 em C18:1. Este evento foi similarmente observado no estudo de Cintra e colaboradores (2012). Mediante o tratamento i.c.v. com ALA, houve incremento do conteúdo protéico hipotalâmico de SCD1 bem como da incorporação tecidual de AO, sugerindo maior atividade desta enzima.

Esses fatores fortalecem a hipótese deste trabalho de que os fenômenos observados surgem como consequências das modulações positivas diretas dos ácidos graxos insaturados em vias pró-inflamatórias, nos tecidos periféricos, repercutindo em melhoras metabólicas sistêmicas.

CONCLUSÃO

Atualmente pesquisas têm demonstrado que a substituição alimentar de gorduras ricas em AGS por outras ricas em insaturados promove melhoras metabólicas em níveis sistêmicos tanto em modelos experimentais de obesidade e diabetes quanto em pacientes que padecem sob tais condições. Neste sentido, tanto estudos *in vivo* envolvendo a administração via oral, e i.c.v. de fontes de ácidos graxos de reconhecido papel anti-inflamatório como os ácidos oléico e α-linolênico, quanto trabalhos *in vitro* que visam contemplar as ações mecanísticas destes componentes em sua forma purificada, vêm contribuindo fortemente com o desvendar das ações e efeitos destes nutrientes em condições de higidez ou não.

Sabe-se que é importante considerar a relação ω6/ω3 nos debates sobre inflamação, contudo, os discursos em torno de fenômenos pós NF-κB, envolvendo ciclooxigenases e a produção de prostaglandinas e leucotrienos tornaram-se exaustivos nesse campo, principalmente após a importante descoberta em 2010 do mecanismo molecular pelo qual os ácidos graxos insaturados de cadeia longa atuam, estimulando receptores acoplados à proteína G, os GPCRs e suas vias de sinalização intra-celulares.

Baseado na miríade de informações sobre o tema, o presente estudo nos possibilitou confirmar que a simples substituição de gordura animal por óleos vegetais ricos em ácidos graxos das famílias ω3 e ω9, em quantidades facilmente alcançáveis pela alimentação, é suficiente para promover potentes ações anti-inflamatórias em nível molecular. As ações mediadas por esses componentes na periferia parecem ocorrer de maneira tecido-específica, por meio da ativação de um receptor comum a esses ácidos. No tocante aos tecidos analisados neste estudo, o GPR120 ou seu homólogo, o GPR40, parece ser os principais receptores responsáveis por mediar as ações dos ômegas. Tais eventos moleculares induzem profundas mudanças fisiológicas repercutindo em surpreendentes melhoras sistêmicas, uma vez que os tecidos estudados possuem papéis fundamentais na regulação do metabolismo glicêmico.

Ressalta-se que as matrizes dos ácidos oléico e α-linolênico utilizadas na confecção das dietas experimentais, são amplamente disponíveis e acessíveis à população, por serem economicamente viáveis.

As complexas ações nutrigenômicas destes componentes bioativos merecem ser alvo de novas investigações no âmbito das pesquisas sobre a obesidade e os processos deletérios causados por ela. As possibilidades de intervenção mostram-se deveras instigantes e promissoras, revelando-se como instrumentos terapêuticos indispensáveis na luta contra as doenças crônicas não transmissíveis que tanto ameaçam o futuro das sociedades modernas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akira S, Takeda, K. Toll-like receptor signaling. Nature Reviews, 2004; 4:499-511.

Alessi DR, Downes CP. The role of PI3-kinase in insulin action. Biochimica et Biophysica Acta, 1998; 1436: 151-164.

American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. Diabetes Care, 2005; 28, supl. 1: s4-s36.

Araújo EP, De Souza CT, Ueno M, Cintra DE, Bertolo MB, Carvalheira JB, Saad MJ, Velloso LA. Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. Endocrinology, 2007; 148(12):5991-7.

Asahara SN, Shimatsu A, Sasaki Y, Nakaoka H et al. Highly purified eicosapentaenoic acid increases interleukin-10 levels of peripheral blood monocytes in obese patients with dyslipidemia. Diabetes Care, 2012; 35:2631-2639.

Barton GM, Medzhitov R. Toll like receptor signaling pathways. Science, 2003; 300:1524-1525.

Bradley JR, Pober, JS. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) Oncogene.2001; 20:6482–6491.

Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eliert MM, Elshourbagy NA, Goetz AS, et al. The orfan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. Journal Biol Chemistry, 2003; 278(13): 11303-11. Epub 2002.

Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides.Carbohydrate Research, 2003; 338(23):2431-47.

Cintra DE, Costa AGV, Peluzio MCG, Matta SLP, Silva MTC, Costa NMB. Lipid profile of rats fed high-fat diets based on flaxseed, peanut, trout, or chicken skin. Nutrition, 2006; 22:197–205.

Cintra DE, Pauli JR, Araújo EP, Moraes JC, De Souza CT, Milanski M, Morari J, Gambero A, Saad MJ, Velloso LA. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. Journal of Hepatology, 2008: 48:628–637.

Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, Pauli JR, Morari J, De Souza CT, Grimaldi R, Stahl M, Carvalheira JB, Saad MJ, Velloso LA. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. PLoS One. 2012; 7(1):e30571.

Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. Trends in Immunology, 2004; 25(1): 4-7.

Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ. Activation of the IkB Kinase Complex by TRAF6 Requires a Dimeric Ubiquitin-Conjugating Enzyme Complex and a Unique Polyubiquitin Chain. Cell, 2000; v.103, 351–36.

De Souza CT,Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. Endocrinology, 2005; 146(10):4192-9.

Doshi LS, Brahma MK, Sayyed SG, Dixit AV, Chandak PG, Pamidiboina V, Motiwala HF, Sharma SD, Nemmani KV. Acute administration of GPR40 receptor agonist potentiates glucose-stimulated insulin secretion in vivo in the rat. Metabolism, 2009; 58(3): 333-43.

Dunne A, O´Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. Sci STKE. 2003; 2003(171):re3.

Dyerberg J, Bang HO. Homeostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. Lancet, 1979; 2(8140):433-5.

Eliasson L, Abdulkader F, Braun M, et al. Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion. Journal of Physiology, 2008; 586(14): 3313–3324.

Ferdaoussi M, Bergeron V, Zarrouki B, Kolic J, Cantley J, Fielitz J, Olson EN, Prentki M, Biden T, MacDonald PE, Poitout V. G-protein coupled receptor (GPR) 40-dependent potentiation of insulin secretion in mouse islets is mediated by protein kinase D1. Diabetologia, 2012; 55(10):2682-92.

Gao ZG, Ye JP. Why do anti-inflammatory therapies fail to improve insulin sensitivity? ActaPharmacol Sin. 2012; 33(2):182-8.

Garg ML, Blake RJ, Wills RBH. Macadamia nut consumption lowers plasma total and LDL cholesterol levels in hypercholesterolemic men. The Journal of Nutrition, 2003; 1060-1063.

Gether U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. Endocrinology Reviews, 2000; 21: 90-113.

Gluckman PD, Hanson M, Zimmet P, Forrester T. Losing the war against obesity: the need for a developmental perspective. Sience, 2011; 3(93):93cm19.

Gregor MF, Hotamisligi GS. Inflammatory mechanisms in obesity. Annual Reviews Immunology, 2011. 29:415-445.

Guebre-Egziabher F, Rabasa-Lhoret R, Bonnet F, Bastard JP, Desage M, Skilton MR, Vidal H, Laville M. Nutritional intervention to reduce the n-6/n-3 fatty acid ratio increases adiponectin concentration and fatty acid oxidation in healthy subjects.Eur J ClinNutr. 2008; 62(11):1287-93.

Heinrichsdorff J, Olefsky JM. Fetuin-A: the missing link in lipid-induced inflammation. Nature Med. 2012;18(8):1182-3.

Hill JO, Peters JC, Lin D, Yakubu F, Greene H, Swift L. Lipid accumulation and body fat distribution is influenced by type of dietary fat fed to rats. Int J Obesity 1993;17:23– 6.

Hofmann RM, Pickart CM. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. Cell, 1999; 96, 645–653.

Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. International Journal of Obesity, 2003; 27: S53–S55.

Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. Nature, 2006; 444(7121):860-7.

Huang S, Czech, MP. The GLUT4 glucose transporter. Cell Metabolism, 2007; 5:237-52.

Hutchins AM, Brown BD, Cunnane SC, Domitrovich SG, Adams ER, Bobowiec CE. Daily flaxseed consumption improves glycemic control in obese men and women with pre-diabetes: a randomized study. Nutrition Research, 2013; 33: 367-75.

Hwang D. Modulation of the expression of cyclooxygenase-2 by fatty acids mediated through Toll-like receptor 4-derived signaling pathways. The FASEB Journal, 2001; 15: 2556-64.

Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. Nature, 2003; 422:173–176.

Kim MS, Pak YK, Jang PG, Namkoong C et al. Role of hypothalamic Foxo1 in the regulation of food intake and energy homeostasis. Nature Neuroscience, 2006; 9(7): 901-906.

Kopelman PG. Obesity as a medical problem. Nature, 2000; 404:635-43.

Latek D, Modzelewska A, Trzaskowski B, et al. G protein-coupled receptors — recent advances. Acta Biochimica Polonica, 2012; 59 (4):515–529.

Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through toll-like receptor 4.Journal of Biological Chemistry, 2001; 276(20):16683-9.

Lin DC, Zhang J, Zhuang R, Li F, Nguyen K, Chen M, Tran T, Lopez E, Lu JY, Li XN, Tang L, Tonn GR, Swaminath G, Reagan JD, Chen JL, Tian H, Lin YJ, Houze JB, Luo J. AMG837: a novel GPR40/FFA1 agonist that enhances insulin secretion and lowers glucose levels in rodents. Plos One, 2011; 6(11):e27270

Lin HV, and Accili D. Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease. Cell Metabolism, 2011;14: 9–19.

Liou AP, Lu X, Sei Y, et al. The G-Protein-Coupled Receptor GPR40 directly mediates long-chain fatty acid-induced secretion of cholecystokinin. Gastroenterology, 2011; 140: 903-912.

Lumeng CN; SaltielAR .Inflammatory links between obesity and metabolic disease. The Journal of Clinical Investigation, 2011; 121(6): 2111-2117.

Magdalon J, Vinolo MAR, Rodrigues HG, Paschoal VA, Torres RP, Mancini-Filho J, Calder PC, Hatanaka E, Curi R. Oral administration of oleic or linoleic acids modulates the production of Inflammatory mediators by rat macrophages. Lipids, 2012; 47:803–812.

Marette A. Molecular mechanisms of inflammation in obesity-linked insulin resistance. International Journal of Obesity, 2003; 27: S46–S48.

Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation.Nature, 2008; 454:428-35.

Milanski M,Degasperi G, Coope A, Morari J,Denis R,Cintra DE, Tsukumo DML,Anhe G,Amaral ME,Takahashi HK , Curi R, Oliveira HC, Carvalheira JBC,Bordin S,Saad MJ,VellosoLA. Saturated fatty acids produce an inflammatory responsepredominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. The Journal of Neuroscience. 2009; 29(2):359-70.

Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity.NatureReviewsMicrobiology; 2005; 3(1):36-46.

Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR,Romanatto T, Carvalheira JB, Oliveira ALR, Saad MJ, VellosoLA. High-Fat Diet Induces Apoptosis of Hypothalamic Neurons.PLoS One. 2009; 4(4):e5045.

Morari J, Torsoni AS, Anhê GF, Roman EA, Cintra DE, Ward LS, Bordin S, Velloso LA. The role of proliferator-activated receptor γ coactivator–1α in the fatty acid dependent transcriptional control of interleukin-10 in hepatic cells of rodents. Metabolism, 2010; 59(2):215-23.

Ninomiya-Tsuji, J.et al. The kinase TAK1 can activate the NIK-IkB as well as theMAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. Nature, 1999; 398,252±256.

Oh DY and Olefsky JM. Omega 3 Fatty Acids and GPR120. Cell Metabolism, 2012; 15: 564-565;

Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan WQ, Li P, Lu WJ, Watkins SM, and Olefsky JM. GPR120 Is an Omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. Cell, 2010; 142: 687–698.

Okada S, Crosson S, Mori M, Saltiel AR, Pessin JE. Insulin Action, Post-Receptor Mechanisms. Encyclopedia of Endocrine Diseases, 2004; 3:14-22.

OuHY,Wu HT, Hung HC, Yang YC,Wu JS, Chang CJ.Multiplemechanisms of GW-9508, a selective G protein-coupled receptor 40agonist, in the regulation of glucose homeostasis and insulin sensitivity.Am J PhysiolEndocrinol Metabolism, 2013*;* 67: 668–676;

Pachikian BD, Essaghir A, Demoulin JB, Neyrinck AM, Catry E, De Backer FC, Dejeans N, Dewulf EM, Sohet FM, Portois L, Deldicque L, et al. Hepatic n-3 polyunsaturated fatty acid depletion promotes steatosis and insulin resistance in mice: genomic analysis of cellular targets.PLoS One, 2011; 6(8):e23365.

Pal D, Dasgupta S, Kundu R, Maitra S, Das G, Mukhopadhyay S, Ray S, Majumdar SS, Bhattacharya S. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. Nature Medicine, 2012; 18(8):1279-1285.

Patti, ME & Kahn, CR.The insulin receptor—a critical link in glucose homeostasis and insulin action. J. Basic Clin. Physiology Pharmacology, 1998; 9: 89–109.

Pessin JE, Saltiel, AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. J. Clin. Invest.,2000; 106: 165–169.

Piers LS, Walker KZ, Stoney RM, Soares MJ, O'Dea K. Substitution of saturated with monounsaturated fat in a 4-weekdiet affects body weight and composition of overweight andobese men. British Journal of Nutrition, 2003; 90: 717–727;

Pirola L, Johnston AM, Obberghen EV. Modulators of insulin action and their role in insulin resistance. International Journal of Obesity, 2003; 27: S61–S64.

Popkin,B. The nutrition transition and it´s health implications in lower income - countries.Public Health Nutrition,1998; 1: 5-21.

Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Amaral MEC, Höer NF, Boschero AC, Saad MJ. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1 ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. Endocrinology, 2005; 146(3):1576–1587.

Puerta LDM, Esteban CV, Hernández BFJ, Guerrero GL, Molinero RMA, Larrauri J, et al.Nonalcoholic steatohepatitis, the enigma of bad progression. An Med Interna. 2005; 22(2):85-7.

Ramachandrappa S, Farooqi IS. Genetic approaches to understanding human obesity. The Journal of Clinical Investigation, 2011; 121(6): 2080-2086.

Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. Biochemistry Journal, 2012; 441: 763–787;

Roach PJ. Glycogen and its metabolism. Current Molecular Medicine, 2002; 2: 101-120;

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature, 2001; 414: 799-806.

Sartorius T, Ketterer C, Kullmann S, Balzer M, Rotermund C,Binder S, Hallschmid M, Machann J, Schick F, Somoza V, Preissl H, Fritsche A,Häring HU,Hennige AM. Monounsaturated fatty acids prevent the aversive effects of obesity on locomotion, brain activity, and sleep behavior. Diabetes, 2012; doi:10.2337/db11-1521/-/DC1.

Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R.Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. Nature, 2001; 2(10): 947-950.

Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte D Jr. insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. Endocrine Reviews, 1992; 13(3): 387-414.

Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krahn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun SC, Karin M. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. Science, 2001; 293(5534):1495-9.

Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. J Clinical Investigation, 2006; 116(11):3015–3025.

Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. J Clinical Investigation, 2006; 116(7):1793-801.

Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistence. J Clinical Investigation, 2000;106:171-6;

Simopoulos AP. The importance of the ratio omega 6 / omega 3 essential fatty acids. Biomed Pharmacother, 2002; 56(8):365-79.

Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet, the omega 6 / omega 3 ratio and genetic variation: nutricional implications for chronic diseases. Biomed Pharmacother, 2006; 60(9):503-7.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. ISSN-0066-782X • Volume 100, Nº 1, Supl.3, Janeiro, 2013.

Swinburn, B.A. et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. Lancet, 2011; 378: 804-814;

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors.Annu Rev Immunol.2003; 21: 335-376.

Talukdar S, Olesfky JM, Osborn O. Targeting GPR-120 and other fatty-acid-sensing GPCRs ameliorates insulin resistance and inflammatory diseases. Cell, 2011; 32(9): 543-550.

Tanaka T, et al. Free fatty acids induce cholecystokynin secretion trhough GPR120. Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 2008; 377: 523-527.

Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. Nature Reviews Mol. Cell. Biol.,2006; 7:85-96.

Tazoe H, Otomo Y, Kaji I, et al. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. J. Physiological Pharmacology, 2008; 59: (Suppl 2), 251–262.

Thomas D, Powell JA, Green BD,et al. Protein Kinase Activity of Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Cytokine-Dependent Cell Survival. Plos Biology, 2013; 11(3): e1001515.

Tsuruzoe K, Emkey R, Kriauciunas KM, Ueki K, Kahn CR. Insulin Receptor Substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 Impair IRS-1- and IRS-2-Mediated Signaling. Molecular and Cellular Biology, 2001; 21(1): 26–38.

Tvrzicka E, Kremmyda LS, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review part 1: classification, dietary sources and biological functions. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Republic, 2011; 155(2):117–130.

Velloso LA. O Controle hipotalâmico da fome e da termogênese – implicações no desenvolvimento da obesidade. ArqBras Endocrinologia e Metabolismo, 2006; 50.

Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J,Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. Nature, 2001; 412:346-351.

Wang J, Wu X, Simonavicius N, Tian H, Ling L. Medium chain fatty acids as ligands for orphan G protein-coupled receptor GPR84. J. Biological Chemistry, 2006a; 281: 34457–34464.

Wang Y, McPherson K, Marsh T, Gortmaker SL, Brown M. Health and economic burden of the projected obesity trends in the US and the UK. Lancet, 2011; 378:815–25.

White MF. IRS proteins and the common path to diabetes. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2002**;** 283**:** E413-E422.

WHO, 2013. Media centre. Obesity and overweight. Key Facts. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html

Yudkin JS. Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. International Journal of Obesity, 2003; 27:S25–S28.

Zuany-Amorim C, Hastewell J, Walker C. Toll-like receptors as potential therapeutic targets for multiple diseases. Nat. Rev. Drug Discov.,2002; 1:797–807

.

.