



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas



THAIANE DA SILVA RIOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DOS ÁCIDOS
GRAXOS ÔMEGA-3 EM OVÁRIOS DE CAMUNDONGOS OBESOS**

LIMEIRA
2022



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas



THAIANE DA SILVA RIOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DOS ÁCIDOS
GRAXOS ÔMEGA-3 EM OVÁRIOS DE CAMUNDONGOS OBESOS**

*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.*

Orientador: Prof. Dr. Dennys Esper Cintra.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA THAIANE DA SILVA RIOS, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. DENNYS ESPER CINTRA.

LIMEIRA
2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Ana Luiza Clemente de Abreu Valério - CRB 8/10669

R479a Rios, Thaiane da Silva, 1996-
Avaliação do potencial anti-inflamatório dos ácidos graxos ômega-3 em ovários de camundongos obesos / Thaiane da Silva Rios. – Limeira, SP : [s.n.], 2022.

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

1. Síndrome do ovário policístico. 2. Obesidade. 3. Hiperinsulinemia. 4. Inflamação. 5. Ácidos graxos Ômega-3. I. Cintra, Dennys Esper, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of the anti-inflammatory potential of omega-3 fatty acids in the ovaries of obese mice

Palavras-chave em inglês:

Polycystic ovary syndrome

Obesity

Hyperinsulinemia

Inflammation

Omega-3 fatty acids

Área de concentração: Ciências Nutricionais e Metabolismo

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

Banca examinadora:

Dennys Esper Cintra [Orientador]

Carla Roberta de Oliveira Carvalho

Célio Júnior da Costa Fernandes

Data de defesa: 25-02-2022

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

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-7984-651>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2175370146840264>

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Thaiane da Silva Rios

Título: Avaliação do potencial anti-inflamatório dos ácidos graxos ômega-3 em ovários de camundongos obesos.

Natureza: Dissertação de Mestrado

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas – Unicamp.

Data da Defesa: 25 de Fevereiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Dennys Esper Cintra (Orientador)

Dr. Célio Júnior da Costa Fernandes (Membro interno)

Prof. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho (Membro externo)

Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por sempre dirigir meu caminho e iluminar os meus sonhos, sendo meu alicerce e força em todas as circunstâncias.

Minha eterna gratidão e amor aos meus pais Josenil da Silva Rios e Ana Maria da Silva Rios e a minha irmã Thainara da Silva Rios, obrigada por sempre me apoiarem, me incentivarem e me aconselharem, sem vocês nada disso seria possível.

Um agradecimento especial ao meu orientador Dennys Cintra por me dar a oportunidade de viver a pesquisa e de aprender, o senhor é o meu exemplo de resiliência e resistência no mundo da ciência. Obrigada por compartilhar seu tempo e conhecimentos conosco e contribuir para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus amigos Susana Nakandakari, Renan Vieira, Camila Ramos e Giovana Rios muito obrigada por tudo, vocês foram essenciais para esse trabalho acontecer, obrigada por todos os ensinamentos, momentos de trabalho juntos e pelas alegrias compartilhadas, contem sempre comigo. Agradeço a todos os alunos que passaram pelo LABGEN e LABMEX por todo o aprendizado compartilhado, admiro todos vocês.

Agradeço também a todos os professores do LABMEX Rodrigo Pauli, Eduardo Ropelle e Leandro Pereira.

Gostaria de agradecer a professora Carla Carvalho pelos direcionamentos para iniciarmos esta pesquisa e pela paciência em compartilhar seus conhecimentos conosco.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço à CAPES, à Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo (CNEM), pelo incentivo à pesquisa e suporte financeiro para realização deste trabalho.

RESUMO

Introdução: A obesidade atinge proporções pandêmicas e é atualmente considerada o principal problema de saúde pública mundial. A inflamação crônica de baixo grau associada à obesidade contribui para o desenvolvimento de diversas comorbidades precipitadas pela resistência à insulina, entre elas, a síndrome dos ovários policísticos (SOP). Apesar de não fazer parte dos critérios de diagnóstico, estima-se que a resistência à insulina acomete cerca de 70% das mulheres com SOP, podendo intensificar a inflamação. Baseado nos parâmetros dismetabólicos característicos da obesidade e, sabendo que podem afetar a saúde ovariana, é possível que ácidos graxos ômega-3 ($\omega 3$) possam auxiliar na diminuição do tônus inflamatório e melhorar a sensibilidade à insulina, entretanto, sem clareza dos seus mecanismos de ação nos ovários. Portanto, o intuito deste trabalho é avaliar o potencial anti-inflamatório do óleo de linhaça, rico em $\omega 3$ no ovário de camundongos obesos.

Materiais e métodos: Camundongos Swiss, fêmeas, foram mantidos em dieta normocalórica (grupo CT) ou induzidos à obesidade com dieta hiperlipídica (grupo HFD) rica em gorduras saturadas oriundas da gordura suína (35%) por 8 semanas. Após indução da obesidade, um subgrupo foi tratado por mais 8 semanas com a substituição de 10% da gordura suína por óleo de linhaça (grupo FS). Semanalmente controlou-se o peso e a ingestão alimentar. Ao final do período experimental foram realizados o teste de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina, além de coletado o tecido ovariano para análises em Western blot, RT-qPCR, histologia, e espectrometria de massas.

Resultados: A dieta HFD induziu maior consumo alimentar, ganho de peso, adiposidade, hiperinsulinemia e alteração do ciclo estral em relação ao grupo CT ($P < 0,05$). Apesar do estado dismetabólico induzido nos animais e da alteração no ciclo estral, os ovários não apresentaram infiltrado inflamatório significativo. O grupo FS apresentou redução ($P < 0,05$) em proteínas importantes controladoras do inflamassomo, como NLRP3 e IL1 β , e como desfecho clínico, melhorou o ciclo estral dos animais, aumentando a permanência na fase estro. A molécula de $\omega 3$ presente na dieta (FS), o ácido alfa linolênico, foi incorporado de forma significativa ($P < 0,05$) no tecido ovariano e a expressão gênica do receptor GPR120 foi restaurada, em comparação ao grupo HFD ($P < 0,05$).

Conclusão: A exposição de animais à dieta rica em gordura saturada induziu condição dismetabólica significativa ao desenvolvimento da SOP. Houve impacto negativo no ciclo estral, mas recuperado pela dieta FS. A dieta HF não foi capaz de induzir inflamação no tecido ovariano. Contudo, a dieta FS reduziu marcadores inflamassomais no ovário. O efeito desregulador do ciclo estral induzido pela dieta hiperlipídica e a melhora do ciclo pela dieta FS parecem não ser devido à orquestração do processo inflamatório ovariano, apesar da modulação do inflamassomo. Novas vias sinalizatórias coordenadas por nutrientes devem ser investigadas a fim de compreender as alterações fisiológicas observadas neste estudo e se o ômega-3 pode contribuir com a prevenção ou retardo da deterioração da reserva ovariana a longo prazo.

Palavras-chave: Síndrome dos Ovários Policísticos; Obesidade; Hiperinsulinemia; Inflamação; Ácidos Graxos Ômega-3.

ABSTRACT

Introduction: Obesity reaches pandemic proportions and is currently considered the main global health problem. Obesity-associated chronic inflammation contributes to the development of several comorbidities precipitated by insulin resistance, including polycystic ovary syndrome (PCOS). Although it is not part of the diagnostic criteria, it is estimated that insulin resistance affects about 70% of women with PCOS, which can intensify the inflammation. Based on the dysmetabolic parameters characteristic of obesity and, knowing that they can affect ovarian health, it is possible that omega-3 can help to decrease the inflammatory tonus and improve the insulin sensitivity, however, without clarity in the mechanism of the ovaries. Therefore, the aim of this work is to evaluate the anti-inflammatory flaxseed oil potential, rich in $\omega 3$ in the ovary of obese mice.

Materials and Methods: Female Swiss mice were maintained on a norm caloric diet (CT group) or induced to obesity with a high fat diet (HFD group) rich in saturated fat from pork fat (35%) for 8 weeks. After obesity induction, a subgroup was treated for an additional 8 weeks with the replacement of 10% of pork fat with flaxseed oil (FS group). Weight and food intake were monitored weekly. At the end of the experimental period, glucose tolerance and insulin sensitivity tests were performed, and ovarian tissue was collected for analysis in Western blot, RT-qPCR, histology, and mass spectrometry.

Results: The HFD diet induced greater food consumption, weight gain, adiposity, hyperinsulinemia and changes in the estrous cycle in relation to the CT group ($P < 0.05$). Despite the dysmetabolic state induced in the animals and the change in the estrous cycle, the ovaries did not show a significant inflammatory infiltrate. The FS group showed a reduction ($P < 0.05$) in important proteins controlling the inflammasome, such as NLRP3 and IL1 β , and as a clinical outcome, it improved the estrous cycle of the animals, increasing the permanence in the estrus phase. The $\omega 3$ molecule present in the diet (FS), alpha linolenic acid, was significantly incorporated ($P < 0.05$) in the ovarian tissue and the gene expression of the GPR120 receptor was restored, compared to the HFD group ($P < 0.05$).

Conclusion: The exposure of animals to a diet rich in saturated fat induced a significant dysmetabolic condition for the development of PCOS. There was a

negative impact on the estrous cycle, but recovered by the FS diet. The HF diet was not able to induce inflammation in the ovarian tissue. However, the FS diet reduced inflammatory markers in the ovary. The deregulating effect of the estrous cycle induced by the high fat diet and the improvement of the cycle by the FS diet do not seem to be due to the orchestration of the ovarian inflammatory process, despite the modulation of the inflammasome. New nutrient-coordinated signaling pathways should be investigated in order to understand the physiological changes observed in this study and whether omega-3 can contribute to preventing or delaying the deterioration of the ovarian reserve in the long term.

Key-words: Polycystic Ovary Syndrome; Obesity; Hyperinsulinemia; Inflammation; Omega-3 Fatty Acids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos Moleculares Afetados pela Obesidade	20
Figura 2. Potenciais Mecanismos Anti-inflamatórios Mediados pelo GPR120.	26
Figura 3. Desenho Experimental	28
Figura 4. Parâmetros Fisiológicos dos Animais.....	37
Figura 5. Parâmetros Fisiológicos da Homeostase Glicêmica.....	38
Figura 6. Avaliação do Ciclo Estral com Imagens Representativas.....	39
Figura 7. Análise Morfológica do Tecido Ovariano.....	40
Figura 8. Expressão Gênica de Marcadores Inflamatórios e do Receptor GPR120 (Ffar4) nos Ovários.	41
Figura 9. Conteúdo Proteico de Marcadores inflamatórios e Angiogênicos no Ovário	42
Figura 10. Conteúdo Proteico de Marcadores da Estrutura Inflamassomal nos Ovários.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das Dietas.	29
Tabela 2. Lista de Primers.	33
Tabela 3. Perfil de Ácidos Graxos no Ovário.	44

LISTA DE ABREVIACÕES

3 β -HSD: 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase

AG: ácido graxo

AGL: ácido graxos livres

AGMI: ácido graxo monoinsaturado

AGPI: ácido graxo poli-insaturado

AGS: ácido graxo saturado

AKT: proteína quinase B

ALA: alfa-linolênico

AMH: hormônio anti mulleriano

AMPc: adenosina 3,5-monofosfato cíclico

APPL1: proteína adaptadora endossomal 1

ASC: proteína adaptadora do domínio CARD associada a apoptose

At: folículo atrésico

AUC: área sob a curva

Bax: proteína X associada a bcl2

BCL2: Linfoma de células B2

Bcl2: Proteína anti-apoptótica pertencente à família BCL-2

CARD: Domínio recrutador de caspase

CCL2: *chemokine (C:C motif) ligand 2*

CCL5: *chemokine (C:C motif) ligand 5*

CL: corpo lúteo

CREB: proteína de ligação ao elemento de resposta AMP cíclico

CT: controle

Ct: cistos

DAMPs: padrões moleculares associados à danos

DHA: docosahexaenoico

DHEA: desidroepiandrosterona

EPA: eicosapentaenoico

FFAR4: gene do GPR120

FS: dieta hiperlipídica + óleo de linhaça

FSH: hormônio folículo:estimulante

Fshb: gene codificador do hormônio folículo-estimulante

FSHR: receptor hormônio folículo-estimulante

GLUT4: transportador de glicose insulino-sensível:4

GnRH: hormônio liberador de gonadotrofina

GPR120: receptor acoplado à proteína G 120

GTT: Teste de Tolerância à Glicose

hCG: hormônio gonadotrofina coriônica humana

HFD: dieta hiperlipídica

HPO: hipotálamo-pituitária-ovariano

IFN- γ : interferon- γ

IKK β : quinase inibidora do complexo kappa

IL10: interleucina 10

IL18: interleucina 18

IL1 β : interleucina 1 β

IL6: interleucina 6

IL8: interleucina 8

Inhbb: inibina B

IRAK: membro da família quinase associada ao receptor de IL1

ITT: teste de tolerância à insulina

I κ B: inibidor kappa b

JNK: c-Jun N-terminal quinase

K_{itt}: constante de decaimento da glicose sérica

LC3-II: *microtubule-associated protein light chain 3*

LDLR: receptor da lipoproteína de baixa densidade

LH: hormônio luteinizante

Lhb: gene codificador do hormônio luteinizante

LHR: receptor hormônio luteinizante

LPS: lipopolissacarídeo

MCP1: proteína de quimioatração de monócitos:1

mTOR: *Mammalian Target of Rapamycin*

Myd88: gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88

NF κ B: fator nuclear kappa B

NLRP3: receptor do tipo NOD 3

P: folículo primário

PCR: proteína C reativa

PKA: proteína quinase A

PKC: proteína quinase C

PPAR- γ : receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama

PRR: receptores de reconhecimento de padrões

ROS: espécies reativas de oxigênio

S: folículo secundário

SHBG: globulina ligadora de hormônios sexuais

SOP: síndrome dos ovários policísticos

StAR: proteína reguladora aguda esteroidogênica

TAB1/2: proteína 1 ligadora da TAK1

TAK1: quinase 1 ativada por fator de crescimento transformador β

TGF β : fator de crescimento transformador β

TLR: receptores do tipo Toll

TNF α : fator de necrose tumoral α

TRAF6: fator 6 associado ao receptor de TNF

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade

ω 3: ômega-3

ω 6: ômega-6

LISTA DE SÍMBOLOS

α : alpha

β : beta

γ : gamma

®: registrado

ω : omega

κ : kappa

μ : micro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Obesidade e os Mecanismos Moleculares da Inflamação Crônica de Baixo Grau no Desenvolvimento da Síndrome dos Ovários Policísticos	17
1.2. Obesidade e os Impactos na Saúde Metabólica e Reprodutiva da Mulher	20
1.3. Ômega- 3, Inflamação e SOP	24
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo Geral.....	27
2.2. Objetivos Específicos	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Animais Experimentais	28
3.1.1. Modelo Experimental de Obesidade induzido por Dieta Hiperlipídica (HFD)...	28
3.1.2. Tratamento Via Oral- Dieta Contendo Ácidos Graxos $\omega 3$	29
3.2. Ciclo Estral	29
3.3. Glicemia de Jejum	30
3.4. Teste de Tolerância à Glicose (GTT)	30
3.5. Teste de Tolerância à Insulina (ITT)	30
3.6. ELISA	30
3.7. Extrações Teciduais	31
3.8. Western Blotting	31
3.8.1. Reagentes	32
3.9. PCR quantitativo em Tempo Real.....	32
3.10. Análise Morfológica do Tecido Ovariano.....	33
3.10.1. Contagem de Folículos.....	33
3.11. Análise do Perfil Lipídico.....	34
3.11.1. Preparo de Amostras.....	34
3.11.2. Condições Cromatográficas.....	34
3.12. Análise Estatística	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Caracterização do Modelo Experimental e Tratamento da Obesidade com Dieta Constituída de Óleo de Linhaça	36
4.2. Ciclo Estral	38
4.3. Análise Morfológica dos Ovários e Contagem de Folículos	39
4.4. Proteínas e Genes Relacionados aos Mecanismos Inflamatórios nos Ovários	40
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

1. INTRODUÇÃO

1.1. Obesidade e os Mecanismos Moleculares da Inflamação Crônica de Baixo Grau no Desenvolvimento da Síndrome dos Ovários Policísticos

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é a desordem que mais acomete mulheres em idade reprodutiva, caracterizada por alterações clínicas, endócrinas, metabólicas e moleculares (AZZIZ et al., 2016; MCCARTNEY; MARSHALL, 2016). O hiperandrogenismo (aumento dos níveis séricos de androgênios e/ou hirsutismo), anovulação ou oligovulação e morfologia ovariana policística, estão entre as principais alterações observadas. (ROTTERDAM, 2004).

Estudos epidemiológicos apresentam resultados conflitantes sobre a prevalência da SOP, com divergências encontradas provavelmente devido aos diferentes critérios de diagnóstico utilizados (GOLDRAT; DELBAERE, 2018). Estima-se que esta desordem endócrina reprodutiva acomete cerca de 5 a 20% das mulheres no mundo (AZZIZ et al., 2016). Entretanto, cerca de 70% das mulheres jovens com SOP não são diagnosticadas (BOYLE; TEEDE, 2012; ROJAS et al., 2014).

A etiologia da doença não está totalmente esclarecida, contudo, estudos demonstram que alterações da microbiota intestinal, hereditariedade, ambiente intrauterino, estilo de vida e obesidade possuem influências importantes à patogênese da SOP (QI et al., 2019; RISAL et al., 2019; GOODARZI et al., 2011). Dados sobre prevalência da obesidade em mulheres em idade reprodutiva demonstram resultados preocupantes no que se refere a saúde da mulher. A análise de dados da pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), entre os anos de 2008 a 2015, verificou que 18% das mulheres brasileiras, em idade reprodutiva (18-49 anos), estavam obesas (ARAÚJO; VELASQUEZ-MELENDÉZ; SANTOS, 2019). No mesmo período, 36,5% das mulheres estadunidenses entre 20 e 39 anos apresentaram algum grau de acúmulo de peso em gordura (HALES et al., 2017).

A obesidade possui diversos fatores etiológicos distintos, de características psico-bio-sociais, que conjuntamente repercutem no desequilíbrio crônico entre ingestão calórica excessiva e redução do gasto energético, seguido de hipertrofia do tecido adiposo branco. Alterações fisiopatológicas ocasionadas pela hipertrofia dos adipócitos, estão associadas às interações metabólicas e imunológicas, que

acarretam em lipotoxicidade, inflamação e resistência à insulina (GHABEN; SCHERER, 2019).

Os adipócitos hipertrofiados levam à hipóxia local, induzindo hipersecreção de citocinas, que adquirem caráter pró-inflamatório e prejudicam sistemicamente a sinalização da insulina. Além disso, a obesidade acarreta no aumento da infiltração de monócitos e neutrófilos periféricos para o tecido adiposo e induz a transição da polarização de macrófagos M2 para os inflamatórios M1 (WEISBERG et al., 2003; WENSVEEN et al., 2015). Estas modificações fisiopatológicas são sustentadas por ensaios clínicos e estudos experimentais, em que demonstram que humanos e animais obesos possuem concentrações elevadas de TNF α (Fator de Necrose Tumoral- α), interleucinas (IL)6, IL1 β , IFN γ (interferon- γ), MCP1 (proteína de quimioatração de monócitos-1) e redução de adiponectina (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993; NAGAREDDY et al., 2014; WENSVEEN et al., 2015).

Estes mecanismos contribuem para resistência à insulina, que potencializam o processo inflamatório. A resistência à insulina no tecido adiposo eleva a concentração plasmática de ácidos graxos livres (AGL), devido a intensificação da via lipolítica (YU et al., 2002). Os AGL interligam a resposta metabólica ao sistema imunológico, por meio da ativação dos receptores do tipo Toll (TLRs). Tais receptores são amplamente distribuídos em diversos tipos celulares e, por isso induzem inflamação sistêmica (WADA; MAKINO, 2016; LEE; WOLLAM; OLEFSKY, 2018; BEN et al., 2019). Um padrão alimentar desequilibrado também pode levar à resistência à insulina e proporcionar o desequilíbrio na liberação de AGL pelo tecido adiposo (YU et al., 2002).

Receptores do tipo Toll, principalmente TLR2 e TLR4, ao serem ativados por ácidos graxos saturados oriundos da lipólise ou do excedente consumido pela alimentação, induzem a resposta inflamatória intracelular. Isso ocorre devido a dimerização e mudanças conformacionais dos TLRs para recrutar a proteína Myd88 (Gene de Resposta Primária de Diferenciação Mielóide 88) para sua base. A associação de TLR4 e Myd88 promove a interação com as proteínas IRAK 1/4 (membro da família quinase associada ao receptor de IL1) e, na sequência, ocorre a ativação das proteínas TRAF6 (fator 6 associado ao receptor de TNF) (VELLOSO; FOLLI; SAAD, 2015). Esse complexo proteico formado na base do TLR ativam as proteínas TAB1/2 (proteína 1 ligadora da TAK1) e TAK1 (quinase 1 ativada por fator

de crescimento transformador β). Uma vez fosforilada, a TAK1 fosforila e ativa a quinase inibidora do complexo kappa, o IKK β . Então, IKK β fosforila e inibe o I κ B (Inibidor kappa B), que é degradado e libera o fator nuclear kappa B (NF κ B) (KAWAI; AKIRA, 2006; SUI et al., 2014). O NF κ B é um fator de transcrição que migra ao núcleo e aumenta a síntese de citocinas pró-inflamatórias (SUGANAMI et al., 2006), como MCP1, TNF α , IL1 β , IL6, NLRP3 (receptor do tipo NOD 3) e também a proteína contra regulatória, IL10 (XU et al., 2003; SUGANAMI; NISHIDA; OGAWA et al., 2005; SUGANAMI et al., 2006; VANDANMAGSAR et al., 2011). Outras proteínas intracelulares ativadas a partir dos receptores TFN- α e TLRs também possuem potentes ações inflamatórias e contribuem para a resistência à insulina. A JNK (c-Jun N-terminal quinase) e o IKK β são consideradas alvos chave na relação entre obesidade e resistência à insulina (PRADA et al., 2005; ARKAN et al., 2005) (Figura 1).

Além dos mecanismos inflamatórios descritos, as moléculas estressoras denominadas padrões moleculares associados à danos (DAMPs), presentes na obesidade e também na SOP, podem ser identificados por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os receptores do tipo NODs (NLRs) (GUO; CALLAWAY; TING, 2015; WEN et al., 2011).

Entre os membros da família dos NLRs, o NLRP3 tem sido descrito em diversas células, inclusive nas células ovarianas (ZHANG; WANG; ZHANG, 2019). A ativação do NLRP3 pode levar a interação com a proteína ASC (proteína adaptadora do domínio CARD associada a apoptose), e o recrutamento da pró-caspase-1. A formação deste trímero origina o complexo inflamassomo, que cliva a pró-caspase-1 em sua forma ativa, a caspase-1. Consecutivamente, a caspase-1 cliva a pró-IL1 β e pró-IL18 em suas formas ativas, as IL1 β e IL18, também relacionadas à resistência à insulina (GUO; CALLAWAY; TING, 2015; NARDO; LATZ, 2011; WEN et al., 2011) (Figura 1).

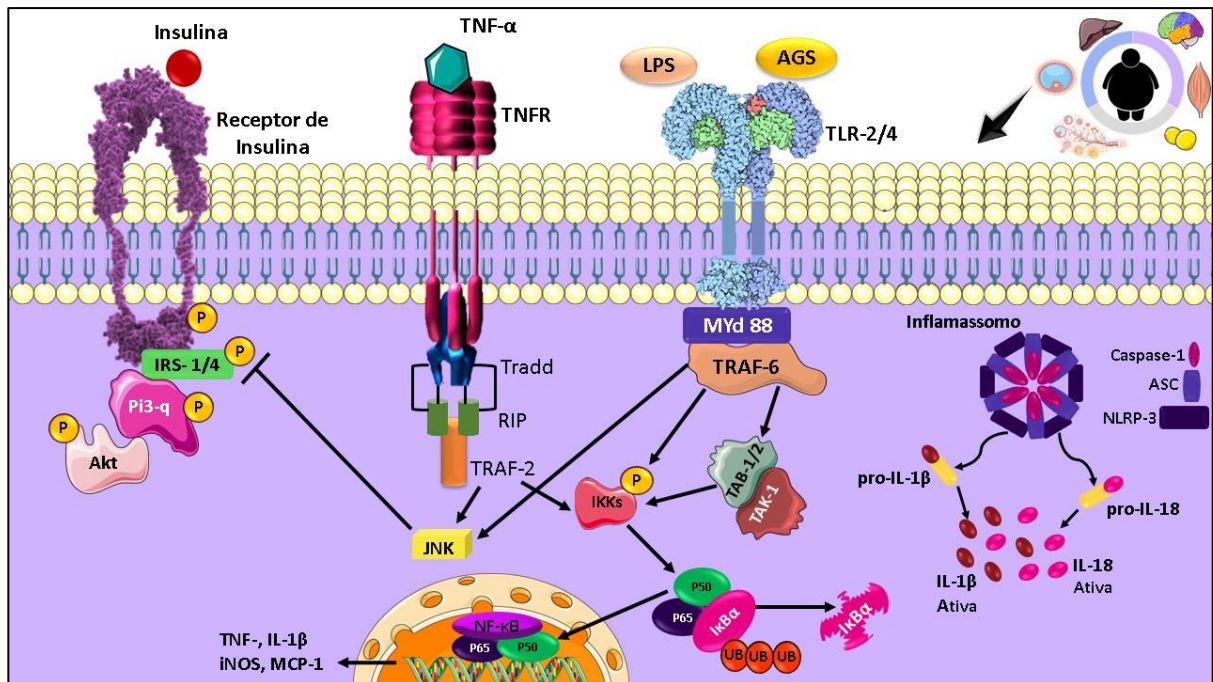


Figura 1. Mecanismos moleculares afetados pela obesidade. Os mecanismos moleculares decorrentes dos padrões alimentares inadequados podem ativar componentes do sistema imune, como o TLR-2/4 e o inflamassomo, propiciando o aumento no conteúdo de citocinas que, em condições suprafisiológicas, adquirem caráter pró-inflamatório. A ativação destes componentes do sistema imune integra as alterações metabólicas, como a resistência à insulina, em diferentes tecidos periféricos (adiposo, músculo, fígado) e sistema nervoso (hipotálamo), por meio da ativação das proteínas JNK e IKK, que fosforilam o receptor de insulina em resíduos inoperantes de serina, interrompendo essa via de sinalização. A ativação de IKK, leva à ubiquitinação de IκBα, que é degradado e permite liberar NFκB para migrar ao núcleo e transcrever citocinas inflamatórias. Fonte: Imagem da autora.

1.2. Obesidade e os Impactos na Saúde Metabólica e Reprodutiva da Mulher

A inflamação crônica e de baixo grau presente na obesidade interrompe os eventos sincronizados mediados pela ação da insulina, induzindo resistência ao hormônio, que induz prejuízos metabólicos significantes, como o aumento da glicemia por deficiência na captação de glicose, aumento da gliconeogênese, intensificação do processo de lipólise e, descontrole da fome e do gasto energético (CZECH, 2017). A resistência à insulina aumenta a secreção de insulina pelas células β-pancreáticas, tornando o indivíduo hiperinsulinêmico. A exaustão das células β-pancreáticas resulta em morte celular, acompanhada de hiperglicemia crônica e evolução do quadro ao diabetes *mellitus* tipo 2 (CHAWLA; NGUYEN; GOH, 2011).

A ação da insulina já é bem estabelecida em seus tecidos alvo clássicos, como em células do músculo, tecido adiposo e fígado. Entretanto, a relação da insulina com doenças relacionadas à disfunção ovariana se deu a partir da relação da

resistência à insulina e a síndrome dos ovários policísticos (SOP) (DIAMANTI-KANDARAKIS; DUNAIF, 2012). Em 1980, Burghen *et al.* observaram associação positiva da hiperinsulinemia com o hiperandrogenismo, em mulheres obesas portadoras de SOP (BURGHEN; GIVENS; KITABCHI, 1980). Estima-se que cerca de 70% das mulheres portadoras de SOP apresentam resistência à insulina (BOYLE; TEEDE, 2012), estando presente em 75% das mulheres eutróficas e 95% das obesas com diagnóstico de SOP (STEPTO *et al.*, 2013).

Sendo assim, a inflamação sistêmica induzida pela obesidade leva à prejuízos que não impactam somente a saúde metabólica, mas também a saúde reprodutiva das mulheres (SNIDER; WOOD, 2019). A saúde reprodutiva feminina é mantida através da comunicação equilibrada entre o eixo hipotálamo-pituitária-ovariano (HPO). No hipotálamo, os pulsos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) ativam a hipófise para liberação do hormônio folículo-estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH). O FSH, ao se ligar ao seu receptor (FSHR) nas células ovarianas, dispara sinalização específica fosforilando o fator de transcrição CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta AMP cíclico), que segue ao núcleo e induz transcrição do gene da enzima aromatase. A aromatase é responsável pela conversão de testosterona e androstenediona em estrona e estradiol, respectivamente (HUNZICKER-DUNN; MAIZELS, 2006; DUPONT; SCARAMUZZI, 2016; CASARINI; CRÉPIEUX, 2019). Os estímulos de FSH também ativam a proteína AKT, a qual controla a mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*), responsável pelo crescimento, proliferação e sobrevivência dos folículos ovarianos (DUPONT; SCARAMUZZI, 2016; GLOAGUEN *et al.*, 2011). Ao avançar o ciclo ovariano, os estrogênios, juntamente com a inibina B (*Inhbb*), agem como *feedback* negativo da liberação de FSH, e aumentam a secreção de LH hipofisário (GOLDSAMMLER; MERHI; BUYUK, 2018).

O LH é fundamental para iniciar a ovulação, e seus receptores (LHR) estão localizados principalmente nas células da teca e granulosa, na fase folicular tardia, que, quando ativados, desencadeiam mecanismos que levam a liberação da progesterona. O LH ativa a proteína citoplasmática StAR (proteína reguladora aguda esteroidogênica), que carrega o colesterol até as mitocôndrias para que seja convertido em pregnenolona e, posteriormente, convertido em androgênios (DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 2008).

A insulina parece exercer ação crucial para a saúde reprodutiva, uma vez que os sinais de propagação deste hormônio também estão presentes nos ovários, podendo interagir cruzadamente com as vias de sinalização dos hormônios FSH e LH. A insulina pode induzir a síntese de androgênios, de forma independente, por meio da ativação de PKC (proteína quinase C), que provoca aumento da concentração de AMPc (adenosina 3,5-monofosfato cíclico) intracelular, que leva a ativação de PKA (proteína quinase A). Por sua vez, a PKA ativa CREB, que induz transcrição da aromatase (DUPONT; SCARAMUZZI, 2016).

Entretanto, estudos demonstram que quadros hiperinsulinêmicos, comumente presentes na obesidade e também na SOP, podem trazer prejuízos a saúde ovariana, pois potencializam as ações de LH, bem como antecipam sua ação sobre os folículos durante o ciclo ovariano. A ação prematura de LH interrompe o desenvolvimento adequado dos folículos, aumentando o número de folículos atresícos, levando à anovulação. Esta sinergia entre insulina e LH intensifica a maquinaria para síntese de hormônios androgênicos, dentre as enzimas chaves deste processo destaca-se o aumento da proteína StAR e 3 β -hidroxisteroide desidrogenase (3 β -HSD) (DIAMANTI-KANDARAKIS; PAPAVASSILIOU, 2006; SEKAR; LAVOIE; VELDHUIS, 2000; DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2008; WILLIS et al., 1998).

A hiperinsulinemia ainda pode reduzir a síntese da proteína hepática SHBG (globulina ligadora de hormônios sexuais) e aumentar a concentração sérica de estrogênios livres que, por *feedback* negativo, agem no eixo HPO, aumentando a secreção de LH e reduzindo FSH. Em paralelo, glândulas adrenais aumentam a secreção de androgênios e os adipócitos aumentam, a atividade da enzima aromatase. Todas estas alterações concomitantemente contribuem à elevação dos androgênios séricos (BEST; BHATTACHARYA, 2015; KLENOV; JUNGHEIM, 2014; PLYMATE et al., 1988). Brothers *et al.* (2010), observaram que animais induzidos à obesidade e hiperinsulinêmicos, com dieta rica em gordura, apresentaram aumento da resposta de GnRH, elevação da secreção de LH, diminuição do número de corpo lúteo e infertilidade (BROTHERS et al., 2010). Além disso, Sharma *et al.* (2013), demonstraram que os AGL ativam os sinais de TLR-2/4 em células adeno-hipofisárias L β T2, aumentando o gene que codifica LH (*Lhb*) e suprimindo o gene codificador de FSH (*Fshb*). Ensaios *in vivo* confirmaram que animais alimentados com dietas ricas em gordura não apresentaram pico pré-ovulatório de FSH e LH, permanecendo maior tempo no ciclo estro, seguidos de menores quantidades de corpo lúteo (SHARMA et

al., 2013). Wu *et al.* (2012), verificaram que a hipófise e os ovários de camundongos obesos, mesmo em consumo de dietas gordurosas, por 12 semanas, mantiveram a sensibilidade à insulina, ainda que em paralelo à resistência ao hormônio no fígado e no músculo. Assim, a hiperinsulinemia, neste contexto, contribui para o aumento da esteroidogênese e para o desenvolvimento da SOP (WU *et al.*, 2012).

Estudos experimentais demonstram que roedores induzidos a obesidade com dieta hiperlipídica, apresentam aumento do tamanho dos adipócitos do tecido peri-ovariano e consecutivo aumento na migração de células do sistema imune e expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias como TNF α , IL1 β e IL6 e quimiocinas como o CCL2 (*chemokine (C-C motif) ligand 2*) e CCL5. Este aumento de processos inflamatórios também são verificados no tecido ovariano (NTEEBA; ORTINAU; PERFIELD, 2013; NTEEBA; GANESAN; KEATING, 2014).

Lima *et al.* (2018), também observaram alterações no balanço imunológico nos ovários de ratas androgenizadas e em ovários humanos com diagnóstico de SOP, o qual houve um aumento da taxa de macrófagos M1:M2, devido à redução significativa do subtipo M2, nos folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento das ratas e no fluido folicular ovariano humano, quando comparado aos animais controles e mulheres sem diagnóstico da SOP, respectivamente (LIMA *et al.*, 2018).

Os macrófagos são as principais células imunológicas no ovário e apresentam papel crítico para o desenvolvimento dos folículos, ovulação, formação e regressão do corpo lúteo. Estas células imunológicas promovem a liberação de moléculas importantes em diferentes fases do ciclo ovariano, como citocinas (IL1, TNF α , IL6, IL10), quimiocinas e fatores de crescimento (WU *et al.*, 2004; ZHANG; HUANG; BRAYBOY, 2021). As alterações na taxa de macrófagos M1:M2 estão intimamente relacionadas ao balanço de processos inflamatórios e anti-inflamatórios (WU *et al.*, 2004; ZHANG; HUANG; BRAYBOY, 2021).

Além disso, o expressivo aumento da infiltração de macrófagos nos ovários parece contribuir para a apoptose exacerbada das células da granulosa, favorecendo o aumento de folículos não saudáveis (LIMA *et al.*, 2018). O aumento de citocinas liberadas por macrófagos pode ativar proteínas que sinalizam caminhos apoptóticos nos ovários. De acordo com Yamamoto *et al.* (2015), após induzir a ovulação com hCG (human chorionic gonadotropin hormone) e administrar TNF α em ratas, notou-se aumento após 12h de tratamento, no conteúdo proteico de caspase-3 clivada e Bax

(proteína X associada a bcl2) nos ovários, sendo estas proteínas relacionadas aos caminhos apoptóticos, ainda foi visto aumento da taxa Bax/Bcl2 (B-cell lymphoma 2).

Liu et al. (2021a), observaram que mulheres com SOP apresentavam maiores concentrações séricas de IL1 β e IL18. Experimentos *in vitro* mostraram que células primárias da granulosa, provenientes de pacientes portadores de SOP, apresentaram conteúdo aumentado de NLRP3, ASC, pró-caspase-1, caspase-1 clivada e IL1 β (LIU et al., 2021a). Para comprovar que de fato o inflamassomo pode ser ativado nas células da granulosa, os autores trataram culturas de células da granulosa primárias e células KGN (*human granulosa-like tumor cell*) com LPS e, após 4h de tratamento, o conteúdo de IL1 β , NLRP3, ASC, pró-caspase-1 e caspase-1 clivada apresentaram aumento em ambos os experimentos (LIU et al., 2021a). Ao analisar a interferência da inflamação sobre células ovarianas, por meio de microscopia confocal, notou-se que a morfologia das mitocôndrias das células da granulosa estavam fragmentadas em pacientes com SOP e também nas células tratadas com LPS. A fragmentação mitocondrial, somada aos efeitos cumulativos da inflamação, acentuaram a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e diminuiu a proliferação celular em células tratadas com LPS e no fluido folicular de pacientes com SOP (LIU et al., 2021a).

1.3. Ômega- 3, Inflamação e SOP

Visto as alterações negativas ocasionadas pela obesidade e os prejuízos em relação à saúde reprodutiva das mulheres, alternativas nutricionais como os ácidos graxos insaturados podem auxiliar na prevenção e tratamento da SOP (YANG et al., 2018).

Devido ao processo de transição nutricional, ao longo do tempo, as dietas ocidentais foram modificadas para um conteúdo elevado de ácidos graxos saturados e dos poli-insaturados da classe ômega-6 (ω 6), em detrimento aos ômega-3 (ω 3) (SIMOPOULOS; GENE, 2016). Tem-se como recomendação adequada a ingestão de até 5 partes de ω 6 para cada 1 parte de ω 3, entretanto, na sociedade ocidental atual, este desequilíbrio pode chegar a 20:1 de ω 6: ω 3 (ALBRACHT-SCHULTE et al., 2018).

Um estudo realizado por Phelan et al. (2011), verificaram que mulheres com concentração plasmática elevada de ω 6 apresentaram correlação positiva com o aumento de testosterona e desidroepiandrosterona (DHEA) na circulação. Além disso, o estudo verificou o efeito dos ácidos graxos no tratamento de células da teca

primárias, onde o ácido araquidônico ($\omega 6$), diferentemente do $\omega 3$ (EPA e DHA), induziu aumento na secreção de androstenediona induzida por LH (PHELAN et al., 2011). Além das propriedades nutricionais essenciais do $\omega 3$, essa substância apresenta importante função na regulação da resposta imune, sensibilidade a insulina, diferenciação celular e ovulação (YANG et al., 2018).

O consumo de ácidos graxos ômega-3, como alfa-linolênico (ALA), proveniente de fontes vegetais (chia, linhaça e nozes), o eicosapentaenoico (EPA) e o docosahexaenoico (DHA), presentes no óleo de peixes de água fria e cápsulas, ativam mecanismos capazes de modular a inflamação (ELAGIZI et al., 2021; SCHULZE et al., 2020). Já foi demonstrado que substituir parcialmente o consumo de gorduras saturadas por gorduras insaturadas como o ômega-3 pode melhorar a sensibilidade à insulina e tolerância à glicose, contribuir para redução parcial de peso corporal, reduzir a secreção de citocinas inflamatórias e promover aumento na conversão de macrófagos do tipo M1 para M2 (OH et al., 2010; CINTRA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015).

Yan et al. (2013), constataram através de ensaios com *in vitro* e *in vivo*, que o ômega-3 é capaz de desarticular os mecanismo de ativação de NLRP3, contribuindo para redução dos níveis de IL1 β e caspase-1 clivada (p20). Esse pontencial mecanismo foi observado em macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) e também em macrófagos humanos (THP-1). Além disso, neste estudo observou-se que animais alimentados com dieta HFD acrescida de DHA apresentaram melhora nos parâmetros glicêmicos e insulinêmicos, além de reduzirem o conteúdo proteico de citocinas pró-inflamatórias TNF α , IL1 β , IL18 e MCP1 no fígado e tecido adiposo branco, quando comparados aos animais que receberam somente dieta HFD (YAN et al., 2013).

Os mecanismos de modulação da resposta anti-inflamatória dos ácidos graxos $\omega 3$, parecem ser mediados por sua ligação ao receptor acoplado à proteína G, denominado GPR120 (OH et al., 2010). A ativação deste receptor por seus ligantes promove o recrutamento da proteína intracelular β arrestina2 para a base dos receptores, justaposta à membrana plasmática. No contexto inflamatório, durante o trânsito intracelular da β arrestina2, esta proteína desestabiliza a cascata sinalizatória *downstream* aos receptores TLR e TNF, por dissociar o complexo TAB1/2/TAK1 (OH et al., 2010). Por fim, a β arrestina2 ainda internaliza o receptor, juntamente com seus agonistas extracelulares, respondendo parcialmente pela absorção nutricional destas

espécies lipídicas. A desarticulação destas importantes vias inflamatórias contribui para a melhora da sensibilidade sistêmica à insulina, seguida de estímulo à captação muscular de glicose independente de insulina, através da ativação de pAKT e GLUT4 (OH et al., 2010). Além disso, o mecanismo direcionado pela β arrestina2, também propicia atração da proteína NLRP3, interferindo na formação do inflamassomo e, consequentemente, na redução da clivagem de pró-IL1 β e pró-IL18 (YAN et al., 2013) (Figura 2).

O GPR120 é expresso no intestino (HIRASAWA et al., 2005), retina (DÁTILO et al., 2018), na aorta (MOURA-ASSIS et al., 2018), em macrófagos (OH et al., 2010), no tecido adiposo, fígado, músculo (OLIVEIRA et al., 2015) e hipotálamo (CINTRA et al., 2012). Além dos tecidos e células mencionados, estudos verificaram a expressão do receptor na hipófise (MORIYAMA et al., 2015), nas células da granulosa (MAILLARD et al., 2018) e mais recentemente nos ovários (LIU et al., 2021b).

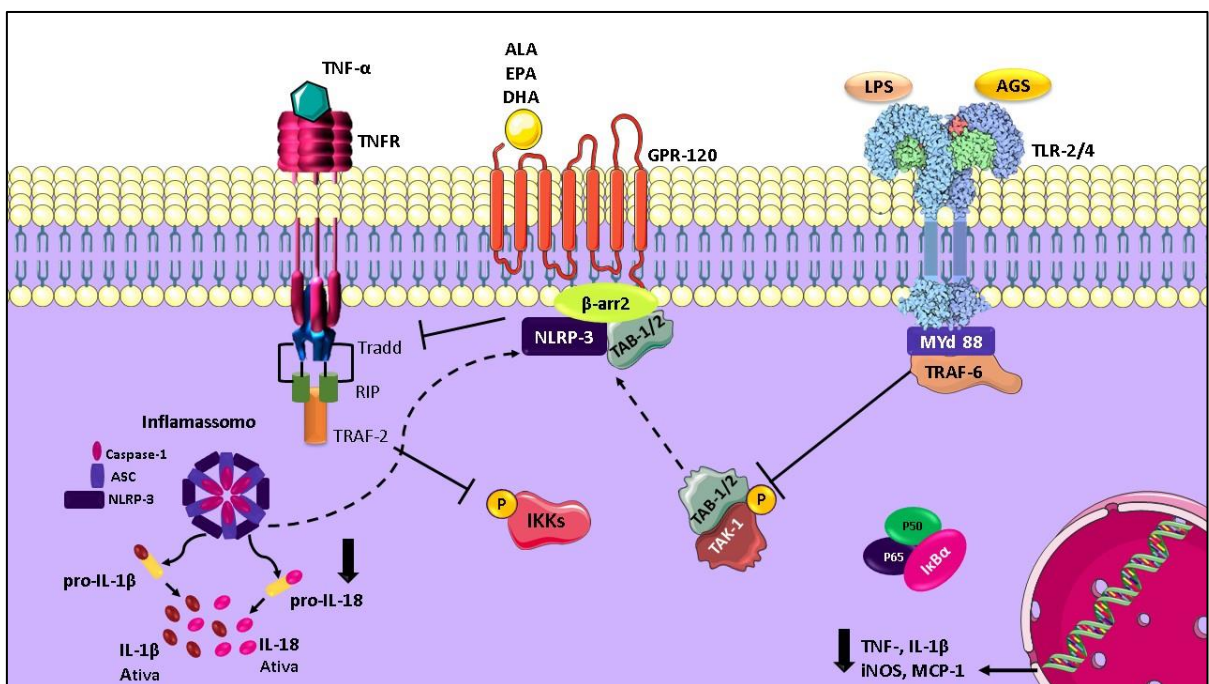


Figura 2. Potenciais Mecanismos Anti-inflamatórios Mediados pelo GPR120. Os ácidos graxos ômega-3 (ALA, EPA e DHA) se ligam ao seu receptor GPR-120 e, recrutam a proteína β arrestina2 que atrai TAB-1/2 e impede a migração do NF κ B para o núcleo celular. Além disso, durante o percurso da β arrestina2 o NLRP-3, proteína constituinte da via inflamassomal é recrutado, alterando a clivagem das citocinas inflamatórias IL1 β e IL18. Fonte: Imagem da autora.

Diante do exposto, este trabalho tem como hipótese a possibilidade dos benefícios do consumo de uma fonte de $\omega 3$, o óleo de linhaça, atenuarem o impacto da obesidade sobre o tecido ovariano, em camundongos induzidos à obesidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar o impacto da obesidade induzida por dieta nos ovários de camundongos, bem como os possíveis efeitos benéficos associados ao consumo de fontes de $\omega 3$.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Caracterizar o modelo experimental de obesidade induzida por dieta hiperlipídica (HFD), em modelo de fêmeas de murino;
- b) Mensurar o processo inflamatório ovariano induzido por dieta HFD, bem como o potencial restabelecimento promovido por dieta contendo $\omega 3$ (FS) referente aos marcadores TNF α , NLRP3, IL1 β , IL18, caspase-1, pJNK, pTAK, VEGF;
- c) Acompanhar as possíveis alterações no ciclo estral dos camundongos tratados com dietas HFD e FS;
- d) Avaliar a biodisponibilidade do $\omega 3$ oriundo da dieta por meio de sua incorporação no tecido ovariano;
- e) Verificar o comportamento da expressão gênica do *Ffar4* (receptor GPR120) no tecido ovariano.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais Experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas, com quatro semanas de idade, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório-UNICAMP (CEMIB). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animal (CEUA), do Instituto de Ciências Biológicas, da UNICAMP, sob protocolos nº 5671-1/2020 e nº 5300-1/2019. Os animais foram separados em gaiolas individuais e passaram por adaptação durante uma semana, sem manipulação. Após o período de adaptação os animais foram pesados e distribuídos de forma randomizada em grupos, de acordo com a similaridade do peso corporal. Todos os animais receberam água e dieta *ad libitum* e foram acondicionados em ambiente com temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 2$) e fotoperíodo (12/12 horas claro/escuro) controlados. Figura 3.

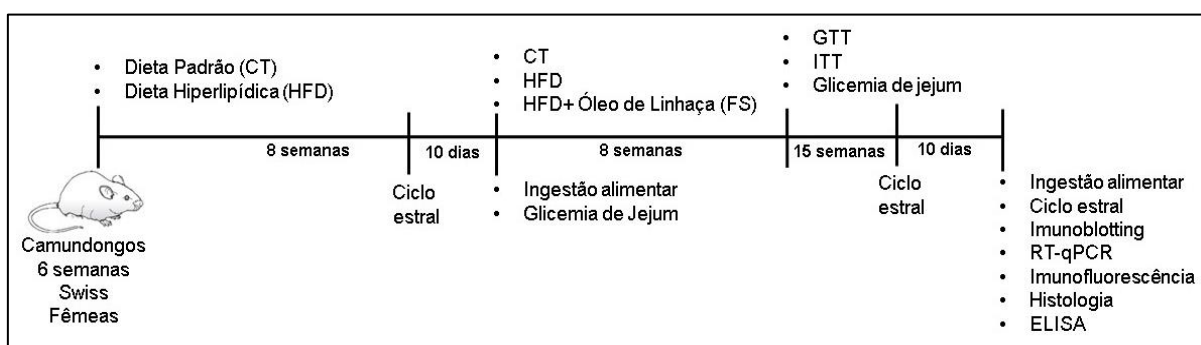


Figura 3. Desenho Experimental. Camundongos Swiss fêmeas com 6 semanas de idade receberam dieta normo (CT) ou hipercalórica (HFD) durante 8 semanas. Após esse período, foi verificado a glicemia de jejum, mensuração do peso e consumo alimentar a fim de identificar a efetividade da dieta HFD em induzir ganho de peso. Posteriormente, durante outras 8 semanas, o grupo CT foi mantido nesta mesma dieta, enquanto o grupo HFD foi separado em dois grupos, onde um continuou recebendo a dieta HFD e o outro recebeu a dieta HFD substituída em 10% de fração lipídica correspondente à banha, por óleo da semente de linhaça, como fonte de ômega-3 (FS). Ao final do período experimental, o tecido ovariano, o músculo gastrocnêmio e o soro foram coletados e submetidos a análises bioquímicas e moleculares.

3.1.1. Modelo Experimental de Obesidade induzido por Dieta Hiperlipídica (HFD)

A dieta isocalórica de manutenção foi a ração comercial, da marca Labina®. A dieta hiperlipídica (HFD) seguiu o modelo proposto pelo American Institute of Nutrition (AIN) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), sendo seu conteúdo de lipídios modificado de 4% para 35%, por meio da adição de 31% de gordura suína. Após 8 semanas espera-se que os animais se tornem obesos e resistentes à insulina (Tabela 1) (CINTRA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015).

3.1.2. Tratamento Via Oral- Dieta Contendo Ácidos Graxos $\omega 3$

Após indução da doença metabólica pela HFD, os animais foram separados em 2 grupos, onde um grupo seguiu com a dieta HFD e outro grupo com dieta modificada. A modificação foi na substituição de 10% da gordura suína por óleo de semente de linhaça, fonte de ômega-3 ($\omega 3$), sendo denominado como “FS”, do inglês, *FlaxSeed*. O grupo controle (CT) foi mantido em dieta normocalórica comercial (Labina®). (Tabela 1).

Tabela 1. Composição das Dietas.

	Dieta HFD***	FS#
Ingredientes	(1000 g)	(1000 g)
Amido (Q.S.P.)*	115,5	115,5
Caseína	200	200
Amido de Milho Dextrinizado	132	132
Sacarose	100	100
Óleo de Soja	40	40
Óleo de Linhaça	0	104
Óleo de azeite	0	0
Banha	312	208
Celulose microfina (Fibra)	50	50
Mix Minerais	35	35
Mix Vitaminas	10	10
L-Cistina	3	3
Bitartarato de colina	2,5	2,5
TOTAL	1000	1000

*Q.S.P. – Amido adicionado em Quantidade Suficiente Para – completar 1000 g de dieta.

AIN – *American Institute of Nutrition*, segundo Reeves, 1993. *Dieta modificada para 35% de lipídios (312 g de banha + 40 g de óleo de soja). #Dieta modificada para 10% de lipídios oriundos do óleo da semente de linhaça. HFD – Dieta Hiperlipídica. FS – Dieta Hiperlipídica + Óleo de Linhaça.

3.2. Ciclo Estral

Para determinação do ciclo estral foi realizada a análise da secreção vaginal. Para isso, após a 8ª e 15ª semanas sob consumo de dieta rica em gordura ou com óleo de linhaça, a análise de secreção vaginal foi realizada durante dez dias consecutivos, no período das 7:00 às 9:00 (a.m). Foram utilizados 10 μ L de solução salina (NaCl 0,9%) para obtenção das células, dispersadas em lâminas e analisadas em microscópio óptico (Olimpus®) para determinação da fase do ciclo estral. Essa análise foi realizada considerando os ciclos: proestro, com a presença células cornificadas predominantemente nucleadas; estro, que consistiu principalmente de células cornificadas anucleadas; metaestro, que apresentou uma proporção de

leucócitos, células epiteliais cornificadas e nucleadas; e diestro, em que foi considerado a predominância de leucócitos (CALIGIONI, 2009; WANG et al., 2014).

3.3. Glicemia de Jejum

A glicemia de jejum foi avaliada na 8^a e 15^a semana experimental em que, após jejum de 8 horas, coletou-se sangue por punção caudal para a dosagem da glicemia de jejum (tempo zero) utilizando-se tiras glicêmicas reagentes, aferidas em glicosímetro da marca Accu-Chek (Roche®).

3.4. Teste de Tolerância à Glicose (GTT)

A tolerância à glicose dos animais foi avaliada por meio do GTT na 15^a semana experimental. Após jejum de 8 horas, coletou-se sangue por punção caudal para a dosagem da glicemia de jejum (tempo zero). Em sequência, injetou-se solução glicosada a 25% (1 g/Kg de peso corporal) por via intraperitoneal, com posteriores coletas de amostras sanguíneas nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos. Os resultados foram avaliados a partir da determinação da área sob a curva (AUC) da glicose sérica durante todo teste, utilizando o programa Microsoft Excel 2013®. Os níveis de glicose sérica foram aferidos por meio do glicosímetro da marca Accu-Chek (Roche®).

3.5. Teste de Tolerância à Insulina (ITT)

A sensibilidade à insulina dos animais foi avaliada por meio do ITT na 15^a semana experimental. Para esta análise, os animais permaneceram em jejum por 8 horas, sendo realizado punção caudal para coleta do sangue e dosagem da glicemia (tempo zero). Posteriormente, aplicou-se insulina intraperitoneal na dosagem de 1,5 U/Kg, e o sangue foi coletado nos tempos 10, 15, 20, 25 e 30 min. A constante de decaimento da glicose sérica (Kitt) foi calculada segundo Bonora et al. (1989). Os níveis de glicose sérica foram medidos por meio do glicosímetro da marca Accu-Chek (Roche®).

3.6. ELISA

Para analisar a concentração sérica de insulina, o sangue coletado após a eutanásia foi centrifugado a 3500 rpm, a 4 °C, por 15 minutos. No soro dosou-se a concentração de insulina utilizando-se o kit ELISA #EZRMI-13K (Millipore®).

3.7. Extrações Teciduais

No último dia de experimento, após determinação do ciclo estral, os animais que estavam no ciclo estro foram anestesiados com a administração intraperitoneal de tiopental sódico (15 mg/kg) e o tecido ovariano foi coletado e armazenado em -80 °C para análises de Western blotting e em paraformaldeído para as análises histológicas.

3.8. Western Blotting

O tecido ovariano foi homogenizado em tampão de imunoprecipitação contendo 1% de Triton X 100, 100 mM de Tris (pH 7,4), 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA, 10 mM de vanadato de sódio, 2 mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4 °C. O homogenato foi centrifugado à 12000 rpm, por 40 minutos, e o sobrenadante coletado. No sobrenadante foi determinada a concentração de proteína total, utilizando o método do ácido bicinconínico (BCA) proposto por Smith et al. (1985) e as amostras foram concentradas em 16 µg para realização da técnica de *Western blotting*.

As amostras foram incubadas com tampão Laemmli a 95 °C, por 15 minutos e, posteriormente aplicadas em de gel de poliacrilamina (8 a 15%) para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD® e a eficiência da transferência foi confirmada por meio do corante vermelho *Ponceau*. Em seguida, as membranas foram pré-incubadas com tampão de bloqueio para minimização de ligações inespecíficas (5% de leite em pó desnatado; 10 mmol/L de Tris; 150 mmol/L de NaCl; 0.02% de Tween 20) por 1 hora. Posteriormente, as membranas foram incubadas “overnight” com anticorpos primários de interesses específicos: β -actina (sc 47778 – 1:1000), α Tubulina (cell #2144S – 1:1000), TNF α (B506102 – 1:500), IL1 β (B122 – 1:1000), IL18 (sc 7954 – 1:500), caspase-1 (sc 56036 – 1:1000), NLRP3 (cell #15101S – 1:500), ASC (sc 22514 – 1:1000), pJNK (cell #4671S - 1:1000), JNK1 (sc-472 – 1:1000), pTAK^{s412} (cell #9339S – 1:500), TAK1 (sc 7967 – 1:1000) e VEGF [vascular endothelial growth fator](sc 7269 – 1:500). Após o período de incubação com os anticorpos primários, as membranas foram incubadas por 1 hora, em temperatura ambiente, com os respectivos anticorpos secundários. As bandas foram obtidas por meio de quimiluminescência e visualizadas com o auxílio de fotodocumentador (G:BOX Chemi XRQ – Syngene – EUA). As bandas foram quantificadas utilizando o

software UN-SCAN-IT gel 6.1. As imagens obtidas apresentadas neste trabalho são originais, não foram cortadas, giradas, invertidas, emendadas ou alteradas em brilho, cor e contraste.

3.8.1. Reagentes

Os reagentes e equipamentos para o gel de sódio dodecil sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram da Bio-Rad® (Richmond, CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), aprotinina e ditioneitol (DTT) foram da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). A membrana de nitrocelulose (0,45 µm) e os reagentes de quimioluminescência foram fornecidos pela Amersham (Aylesbury, UK). Os anticorpos monoclonais foram provenientes da Santa Cruz Biotechnology® (Santa Cruz, CA), BioLegend® (San Diego, CA) e Cell Signaling Technology® (Boston, USA), conforme especificidade do método.

3.9. PCR quantitativo em Tempo Real

Após a extração do tecido ovariano, o ovário direito foi homogeneizado em PureZOL® e o RNA total foi isolado de acordo com as recomendações do fabricante. Uma alíquota de 2000 ng de RNA total foi usada para a síntese de cDNA, com sistema de amplificação do kit de transcrição reversa *High Capacity* (Applied Biosystems®). As reações da PCR foram preparadas utilizando o sistema Sybr®. Os primers utilizados estão descritos na Tabela 2. Para cada reação foi utilizado 10 µL de Master Mix: 5 µL de sybr®, 0,5 µL de primer forward, 0,5 µL de primer reverse, 3 µL de água DEPC e 1 µL de amostra diluída em concentração 1:2 para o gene TNFα ou 1:5 para os demais genes. As condições de ciclagem utilizadas foram: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa 7500 System SDS Software (Applied Biosystems®). O conteúdo relativo de mRNAs foi determinado após a normalização com αtubulina usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

Tabela 2. Lista de primers.

Primers	Sequência 5'-3'
α Tubulina – Humano – 50 nMol	Forward: CTCCTTGCCASTGGTGTAGTGC Reverse: CGGGCAGTGTTTGTAGACTTGG
Tnf – Camundongo – 50 nMol	Forward: CCCACGTCGTAGCAAACC Reverse: CAAGGTACAACCCATCGGC
Ccl2 – Camundongo – 100 nMol	Forward: CCTGCTGCTGACTCATTACCC Reverse: CTTGGTGACAAAACTACAGC
Il1- β – Camundongo – 100 nMol	Forward: GCCACCTTTTGACAGTGATGA Reverse: GATGTGCTGCTGCGAGATTT
Nlrp3 – Camundongo – 100 nMol	Forward: ATTACCCGCCCGAGAAAGG Reverse: TCGCAGCAAAGATCCACACAG
Il18 – Camundongo – 100 nMol	Forward: GACTCTTGCGTCAACTTCAAGG Reverse: CAGGCTGTCTTTTGTCAACGA
Caspase-1 - Camundongo – 100 nMol	Forward: ACAAGGCACGGGACCTATG Reverse: TCCCAGTCAGTCCTGGAAATG
Il10 – Camundongo – 100 nMol	Forward: GCATTTGAATTCCCTGGGTGA Reverse: ACACCTTGGTCTTGGAGCTTATTA
Ffar4 – Macrófago – 100 nMol	Forward: CAACCGCATAGGAGAAATCT Reverse: GGACTCCACATGATGAAGAA

Tabela 2. Primers utilizados para as análises de RTq-PCR com as respectivas sequências forward e reverse, desenhados no sentido 5' para 3'.

3.10. Análise Morfológica do Tecido Ovariano

O ovário esquerdo foi coletado e fixado em paraformaldeído a 4%, por 24 horas. Então, os ovários fixados passaram por banhos sequenciais em concentrações crescentes de álcool para desidratação. Posteriormente, foram submetidos a dois banhos seriados em xilol para diafanização. Em sequência, os tecidos foram banhados em parafina por duas vezes e, após parafinizados, foram emblocados em cassetes específicos e identificados. Com o apoio de um micrótomo da marca (Microm HM340E®), os blocos foram cortados em seções de 5 μ m de espessura e fixados em lâminas histológicas. As colorações iniciais foram com os corantes hematoxilina e eosina de Harris.

3.10.1. Contagem de Folículos

A determinação do estágio folicular levou em consideração os seguintes aspectos: quando o oócito foi circundado por uma camada de células da granulosa cúbicas, o folículo ovariano foi classificado como um folículo primário. Oócitos circundados por células cuboides da granulosa, por duas ou três camadas, juntamente com células da teca achatadas em seu entorno, sem a presença de antro, foram classificados como folículo secundário. Quando os folículos apresentavam mais de

quatro camadas de células da granulosa em formato cuboide e com a presença de antro, estes eram classificados como antrais. Considerou-se folículos atrésicos os folículos com núcleos dos oócitos com aspecto “coagulado” indefinidos. Quanto ao corpo lúteo, considerou-se a presença de células da granulosa-luteínicas, grandes e globosas, reconstituídas pelo estroma (HOHOS et al., 2020).

Para a contagem de folículos foram utilizados 5 ou 6 cortes histológicos com espessura de 5 μ m. Foi realizado a contagem total de cada corte e, posteriormente, realizou-se a média dos cortes e a multiplicação pelo número de cortes utilizados (MALAMED; GIBNEY; OJEDA, 1992; TILLY, 2003).

3.11. Análise do Perfil Lipídico

3.11.1. Preparo de Amostras

As frações lipídicas do ovário dos animais foram extraídas a frio por meio da técnica de Folch (FOLCH; LEES; SLOANE, 1957), em que cerca de 10 mg de tecido foram homogeneizados no equipamento *TissueLyser* (QIAGEN®), com 1 mL de da solução clorofórmio/metanol (2:1 v/v). Sequencialmente, as amostras foram centrifugadas a 11000 rpm, por 10 minutos. Ao final, o sobrenadante foi coletado para outro tubo plástico e reservado. Em seguida, resgatou-se 1000 μ L do obtido inicial do tecido ovariano, que foram transferidos para tubos de vidro com tampa de rosca, seguidos da adição de 1 mL de NaOH metanólico a 0,5 M. As amostras foram agitadas e aquecidas em banho-maria por 15 minutos a 100 °C. Em seguida, foram resfriadas, com posterior adição de 2 mL de BF₃ (trifluoreto de boro, Sigma-Aldrich®), e novamente agitadas e aquecidas em banho-maria por 20 segundos a 100 °C. Após resfriamento, adicionou-se 1 mL de isooctano e, após a agitação, mais 5 mL de solução saturada de NaCl. O sobrenadante foi coletado, e transferido para *vials* específicos.

3.11.2. Condições Cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (GCMS-QP2010 Ultra; Shimadzu®). Utilizou-se coluna de sílica fundida Stabilwax (30 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno; 0,25 μ m de espessura; Restek®). Através de um injetor automático (AOC-20i), injetou-se 1 μ L de amostra, na razão de divisão de 1:10 do ovário. A temperatura do injetor foi mantida em 250 °C, enquanto a programação de aquecimento do forno iniciou-se a 80 °C, com

velocidade de aquecimento programado em rampa de 5 °C/min até 175 °C, seguido por uma taxa de aquecimento de 3 °C/min até 230 °C, onde a temperatura foi mantida por 20 minutos. O gás hélio ultrapuro foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1,3 mL/min. O espectrômetro de massa seguiu as seguintes condições: voltagem de ionização de 70 eV, temperatura da fonte de ionização de 200 °C, modo de escaneamento completo com amplitude de 35-500 m/z e velocidade de 0,2 seg. por escaneamento.

3.12. Análise Estatística

As variáveis em estudo foram submetidas ao teste de *Shapiro-wilk* para verificar a distribuição dos dados e, *Bartlett's* para conferir se os dados apresentam igualdade de variância. Para variáveis com distribuição normal, foi utilizado o teste *t* de *Student* para comparação de duas amostras independentes (grupos CT vs HFD; grupo HFD vs FS) e *one-way* ANOVA com *post-hoc* teste de *Bonferroni*, para avaliação dos três grupos. Para os dados que não apresentaram distribuição normal ou igualdade de variância foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* para comparação de duas amostras independentes (grupos CT vs HFD; grupo HFD vs FS) e *Kruskal-Wallis* com *post-hoc* teste de *Dunn's* para avaliação dos três grupos. Foram considerados significantes os dados que apresentaram mais de 95% de diferença ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização do Modelo Experimental e Tratamento da Obesidade com Dieta Constituída de Óleo de Linhaça

Em relação ao ganho de peso durante o período de indução, observa-se que o grupo HFD apresentou maior ganho de massa corpórea quando comparado aos animais do grupo CT ($P < 0,05$) (Figura 4A-C). É interessante notar que tal diferença já se inicia durante a primeira semana de oferta de HFD. Um dado importante e que reforça a eficiência do modelo experimental na indução de obesidade é que o incremento em massa corporal foi acompanhado por aumento significativo em tecido adiposo gonadal ($P = 0,01$) e circunferência da cintura ($P = 0,02$) em comparação ao grupo CT (Figura 4D-E). Os animais do grupo FS também seguiram o mesmo padrão de ganho de peso e massa gorda comparados ao grupo HFD ($P > 0,05$) (Figura 4A-E). Quando comparadas a razão entre peso/tíbia, bem como a relação peso dos ovários/tíbia, não houveram diferenças significativas ($P > 0,05$) (Figura 4F-H).

No que se refere, à ingestão alimentar dos animais durante todo o período experimental (Figura 4I-J), nota-se que os animais do grupo HFD apresentaram consumo calórico maior ($P < 0,05$) quando comparado aos animais CT, entretanto, o grupo tratado com óleo de linhaça não apresentou diferenças em relação ao grupo HFD ($P > 0,05$).

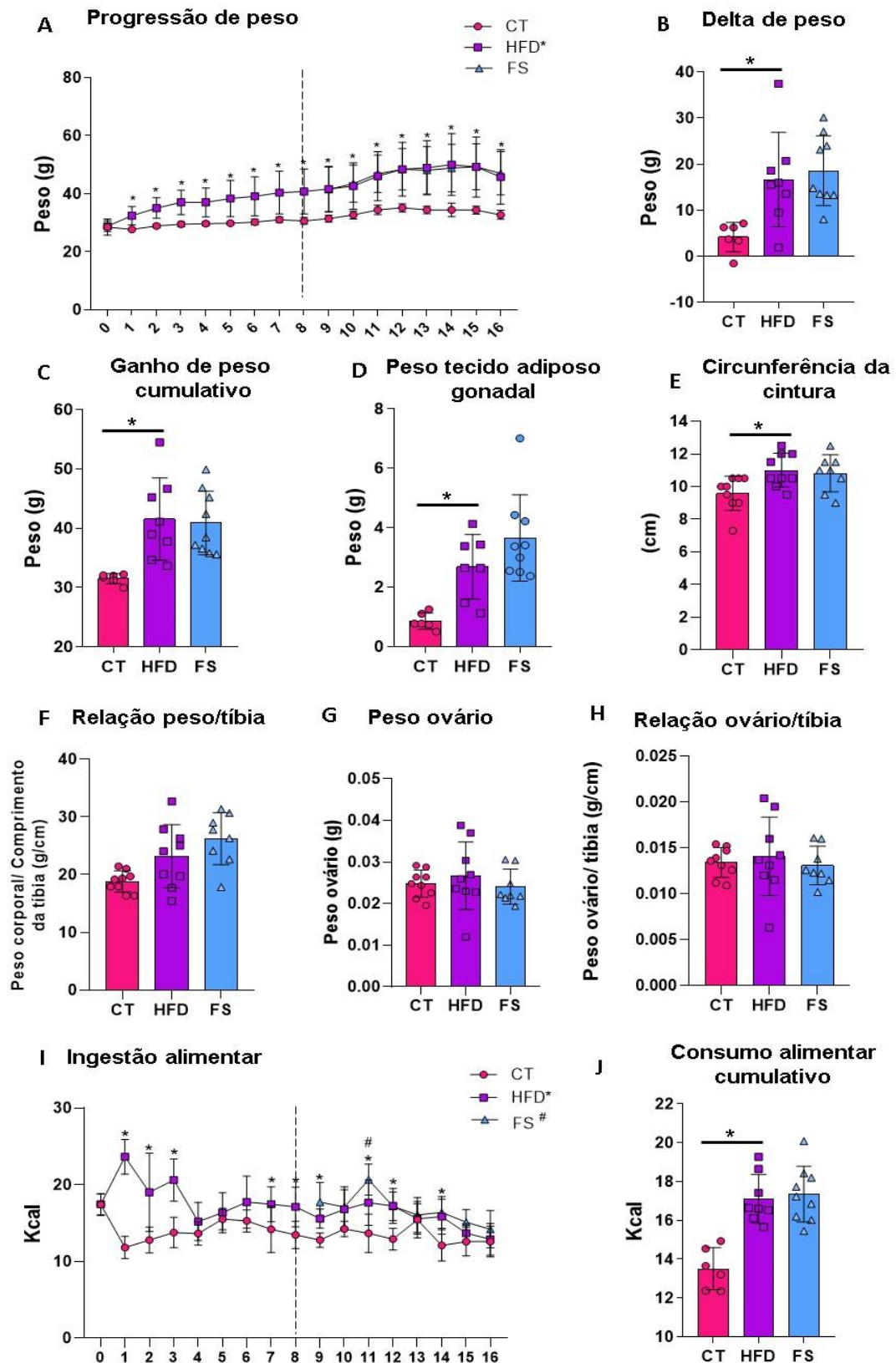


Figura 4. Parâmetros fisiológicos dos animais. **A.** Variação da massa corporal entre os grupos. **B.** Delta de peso (resultados expressos como médias entre peso final e inicial). **C.** Peso cumulativo (resultados expressos como médias de ganho de peso obtidas durante todo o período experimental). **D.** Peso do tecido adiposo gonadal. **E.** Circunferência da cintura. **F.** Relação peso/tíbia. **G.** Peso dos ovários. **H.** Relação ovário/tíbia. **I.** Média diária (kcal) de ingestão alimentar espontânea de animais alimentados com dieta CT, HFD e FS. **J.** Os resultados são representados como as médias

do consumo calórico obtidas durante todo o período experimental. Número de animais por grupo: CT – N=6; HFD – N=8; FS – N=9. Em todos os experimentos, $P < 0,05$ * CT vs HFD; e # HFD vs FS.

Durante avaliação do comportamento da glicemia nos animais nota-se que os três grupos não apresentaram diferenças significativas entre si ($P > 0,05$), após realização dos testes de GTT e ITT (Figura 5A-D). O mesmo foi observado na análise de glicemia de jejum após 8 semanas e 16 semanas do desenho experimental (Figura 5E-F). Contudo, os animais do grupo HFD, demonstraram aumento da concentração sérica de insulina, em comparação ao controle ($P < 0,05$), após 16 semanas de tratamento (Figura 5G).

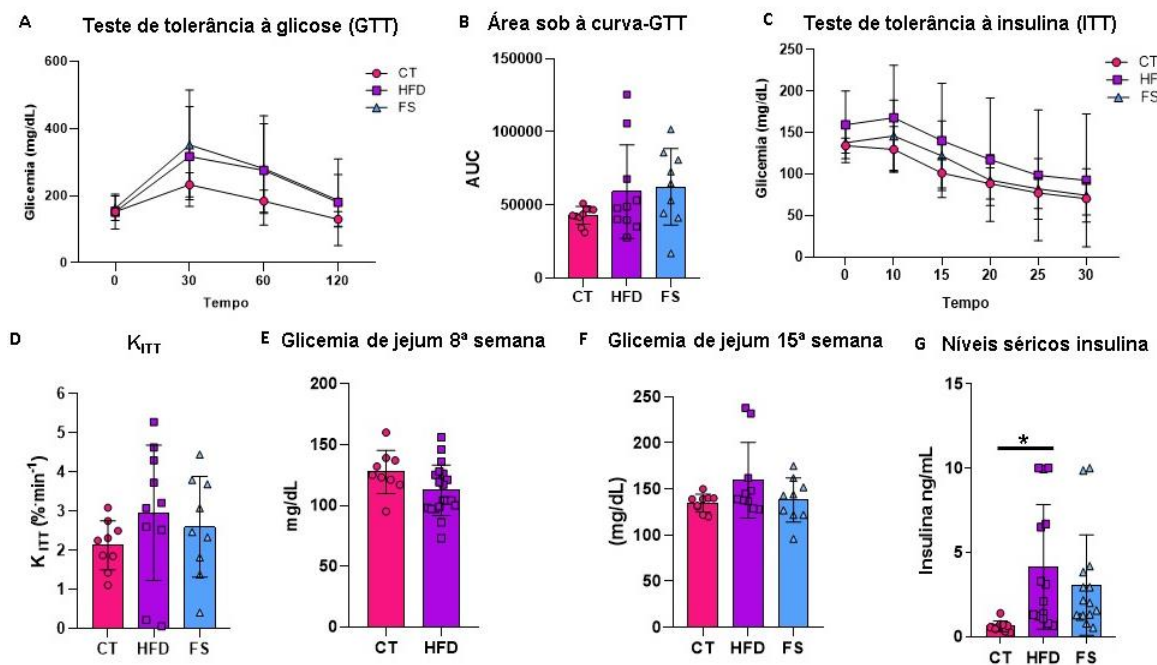


Figura 5. Parâmetros fisiológicos da homeostase glicêmica. A. Teste de tolerância à glicose (GTT). B. Área sobre a curva (AUC) durante o teste de tolerância à glicose intraperitoneal (GTT). C. Teste de tolerância à insulina (ITT). D. Constante para queda da glicose durante um teste de tolerância à insulina (K_{ITT}) (% / min). E. Concentração de glicose no sangue obtida após 8 semanas de tratamento. F. Glicemia de jejum obtida no fim de 15 semanas do período experimental. G. Concentração de insulina sérica. Em todos os experimentos, $P < 0,05$ * CT vs HFD; e # HFD vs FS.

4.2. Ciclo Estral

A análise do ciclo estral dos camundongos realizada na 8ª semana e 15ª semana de experimento, demonstra que somente os animais que receberam a dieta FS apresentaram tempo maior do ciclo estral na fase estro, em relação aos animais HFD, após dezesseis semanas. Apesar de não apresentar diferença estatística significativa, é importante salientar que alguns animais que receberam a dieta HFD apresentaram uma perturbação do ciclo estral em comparação aos animais controles,

após oito semanas de experimento e, após dezesseis semanas, alguns pararam de ciclar adequadamente permanecendo longos períodos na fase metaestro/diestro (Figura 6A-C).

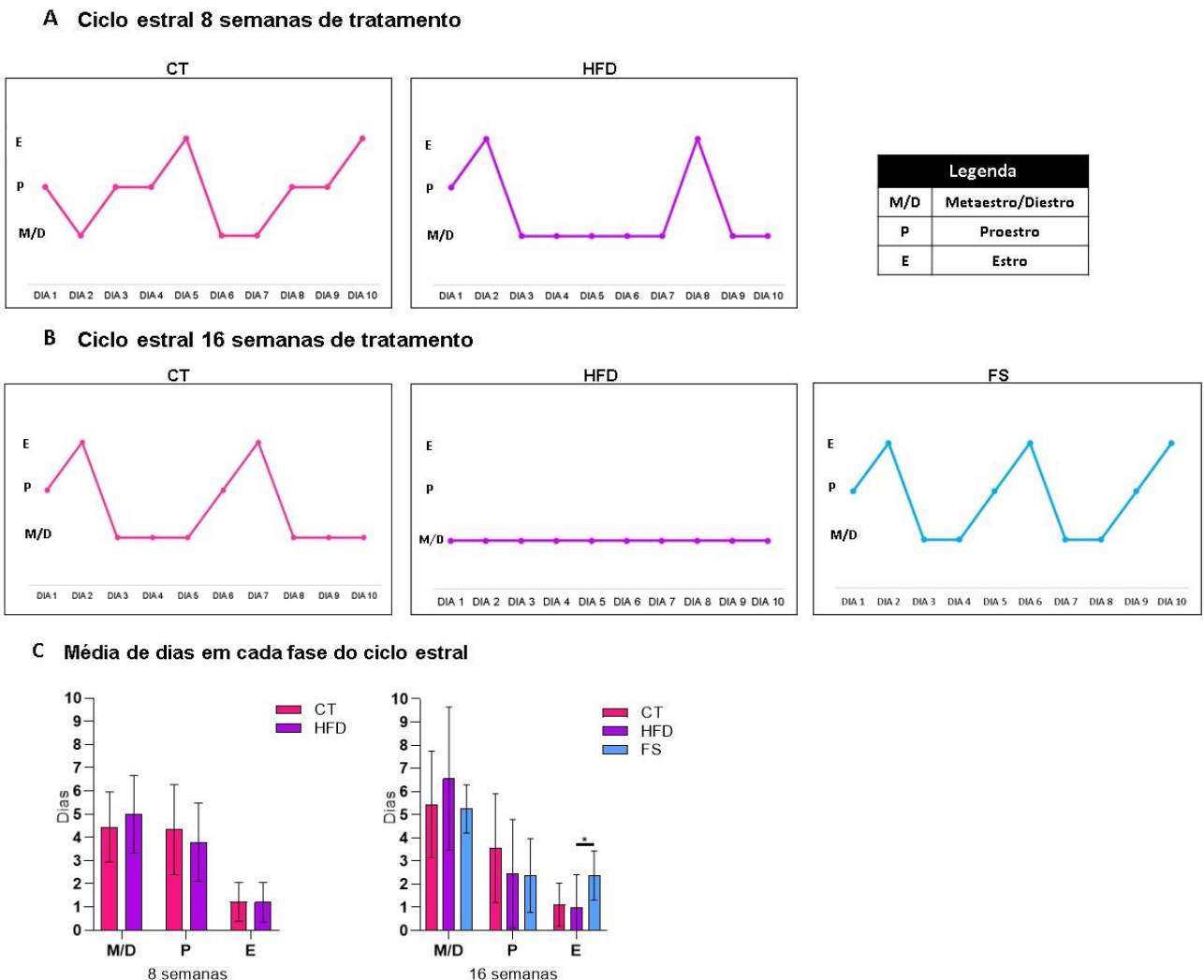


Figura 6. Avaliação do Ciclo Estral com Imagens Representativas. A. Imagem representativa da média do ciclo estral após 8 semanas de tratamento para os grupos CT e HFD. **B.** Imagem representativa da média do ciclo estral após 16 semanas de tratamento para os grupos CT, HFD e FS. **C.** Média de dias em cada fase do ciclo estral de cada grupo avaliado no período de 10 dias, após 8 semanas, onde CT (n=9); HFD (n=19); e 16 semanas de tratamento, CT (n=9); HFD (n=9) e FS (n=8). Em todos os experimentos, $P < 0,05$ * CT vs HFD.

4.3. Análise Morfológica dos Ovários e Contagem de Folículos

Na Figura 7A é demonstrado imagem que representa o comportamento morfológico ovariano dos animais CT, HFD e FS. Referente à contagem de folículos ovarianos, não se observou diferença estatística ($P > 0,05$) entre o número de folículos

primários, secundários, antrais, corpo lúteo, atresicos e cistos ovarianos, entre os três grupos (Figura 7A-C).

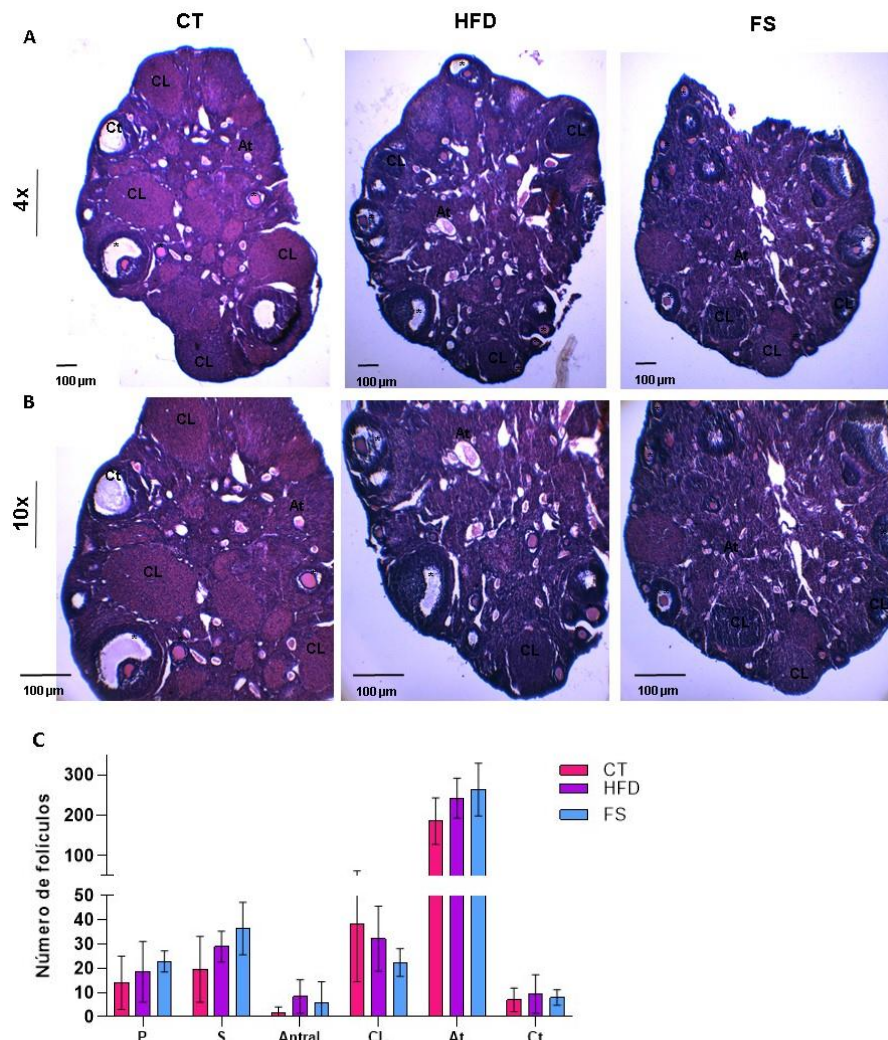


Figura 7. Análise Morfológica do Tecido Ovariano. **A.** Fotomicrografias representativas do tecido ovariano dos animais experimentais em aumento de 4x. **B.** Fotomicrografias representativas do tecido ovariano dos animais experimentais em aumento de 10x. **C.** Média de folículos contados em diferentes estágios de desenvolvimento, multiplicados pelo total de cortes para CT (n=5), HFD (n=5) e FS (n=5). A indicação de “*” nas imagens indicam folículos em diferentes estágios de desenvolvimento. P = Folículo primário, S = Folículo secundário, CL = Corpo lúteo, At = Folículos atresicos e Ct= Cistos ovarianos.

4.4. Proteínas e Genes Relacionados aos Mecanismos Inflamatórios nos Ovários

Durante a avaliação da expressão de genes relacionados à inflamação, como *Tnf*, *Ccl2*, *Nlrp3*, *Il1β* e *Il18* e *Il10* não foi observado diferença significativa ($P>0,05$) quando comparados animais do grupo controle e HFD (Figura 8A-E e G).

Entretanto, houve redução na expressão gênica da *caspase-1* no grupo HFD, em comparação aos animais controles ($P<0,04$) (Figura 8F), que é um indicativo de ativação inflamassomal.

A dieta HFD foi capaz de induzir redução na expressão gênica do *Ffar4*, codificador do receptor GPR120, em comparação aos animais do grupo CT ($P<0,02$). Por outro lado, a dieta FS foi capaz de manter os níveis de expressão em normalidade, quando comparado ao grupo HFD ($P<0,04$) (Figura 8H).

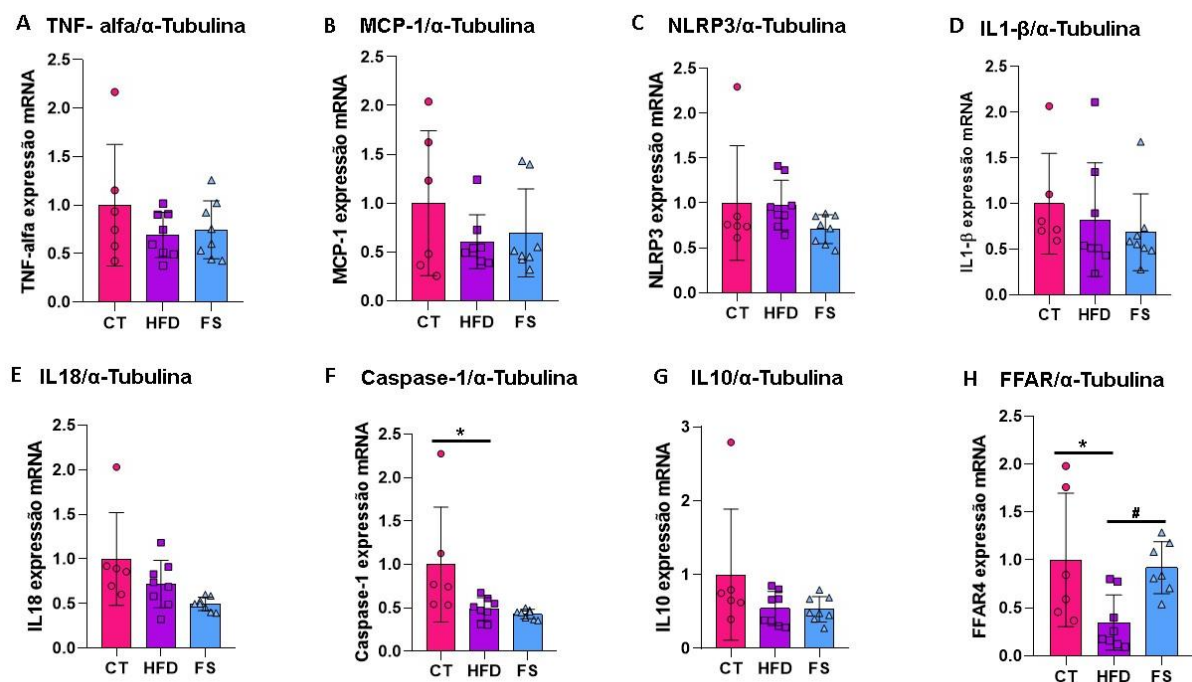


Figura 8. Expressão Gênica de Marcadores Inflamatórios e do Receptor GPR120 (*Ffar4*) nos Ovários. Após o tratamento de 16 semanas os ovários foram extraídos e submetidos a RT-qPCR. O RNA total obtido foi usado para amplificar os genes, em: **A.** *Tnfa*. **B.** *Ccl2*. **C.** *Nlrp3*. **D.** *Il1β*. **E.** *Il18*. **F.** *Caspase-1*. **G.** *Il10*. **H.** *Ffar4*. O gene *Ffar4* foi analisado com número experimental em: CT=6, HFD=8 e FS=7, enquanto os demais genes em CT=6, HFD=8 e FS=8. Em todos os experimentos, $P<0,05$ * CT vs HFD; e # HFD vs FS.

Quanto ao conteúdo proteico de marcadores inflamatórios, como pJNK, pTAK, TNFα e do marcador de angiogênese VEGF, não foi observado nenhuma alteração significativa no tecido ovariano dos três grupos experimentais (Figura 9A-D). Em relação as proteínas que compõem o inflamassomo, o grupo FS apresentou redução do conteúdo proteico de NLRP3 e de IL1β em comparação ao grupo HFD. A proteína ASC não apresentou diferença entre os grupos, entretanto a caspase-1 clivada esteve aumentada no grupo HFD quando comparada aos animais CT. (Figura 10A-D).

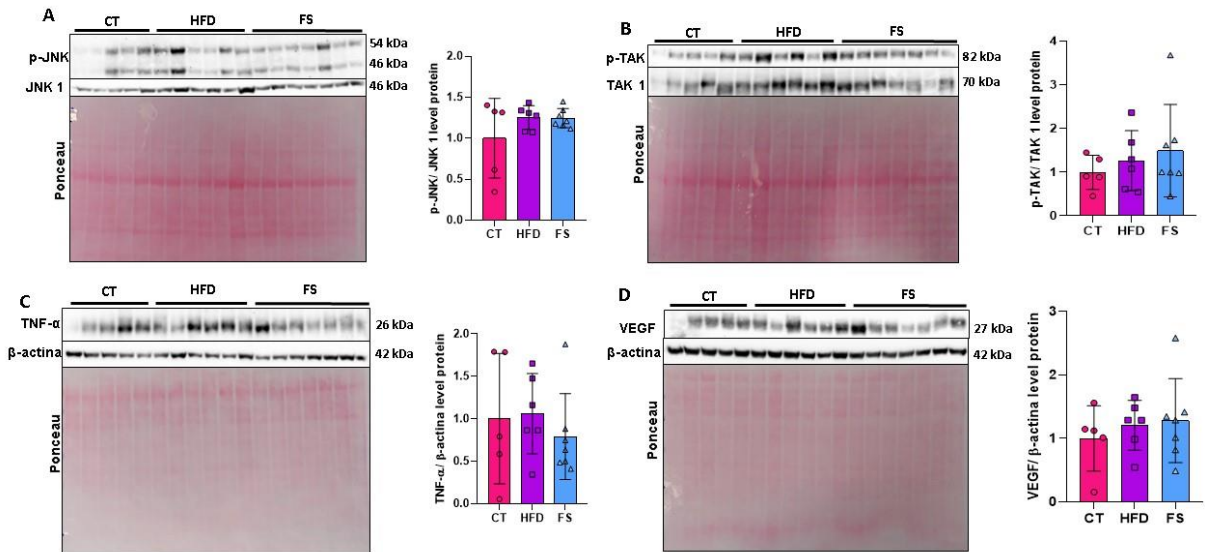


Figura 9. Conteúdo Proteico de Marcadores inflamatórios e Angiogênicos no Ovário. Após o tratamento de 16 semanas o extrato proteico total dos ovários foi utilizado para avaliação do conteúdo proteico de marcadores inflamatórios e angiogênicos, por meio da técnica Western blotting. **A.** pJNK. **B.** pTAK. **C.** TNFα. **D.** VEGF. Para todos os grupos, o número amostral foi: CT=5, HFD=6 e FS=7. Em todos os experimentos, $P < 0,05$ *.

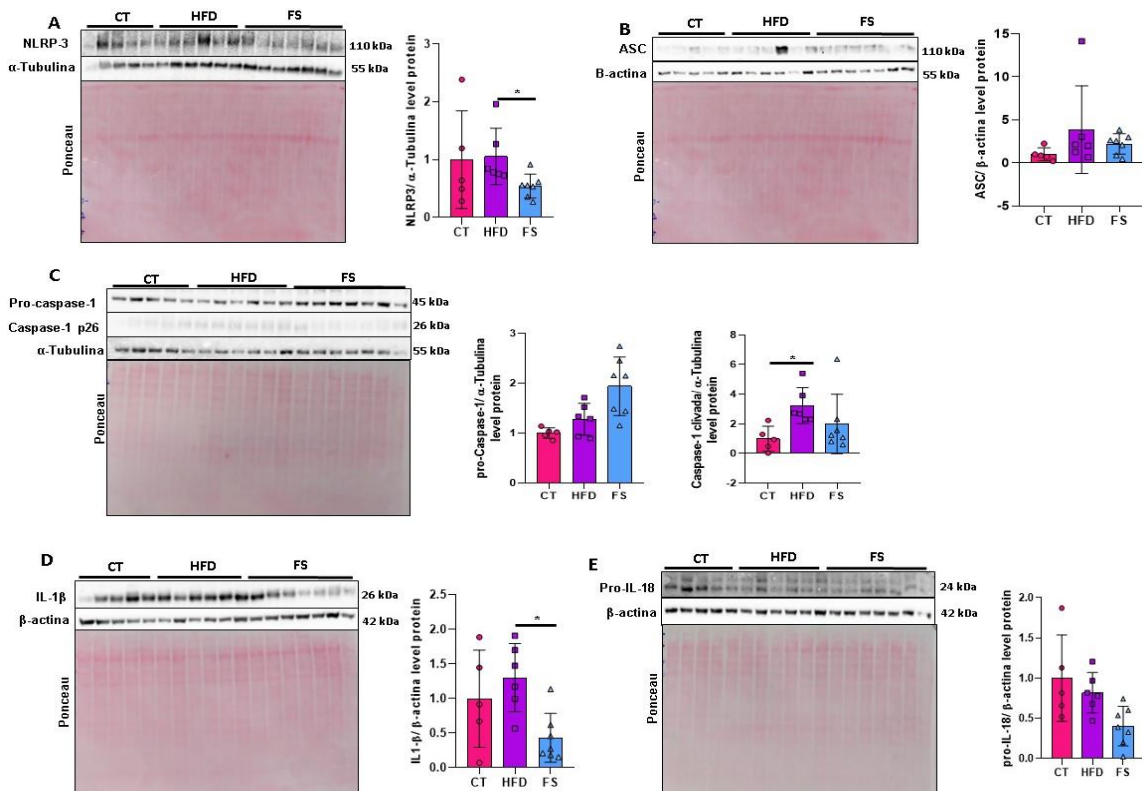


Figura 10. Conteúdo Proteico de Marcadores da Estrutura Inflamassomal nos Ovários. Após o tratamento de 16 semanas o extrato proteico total dos ovários foi utilizado para avaliação do conteúdo de marcadores da estrutura inflamassomal por meio da técnica de Western blotting, sendo: **A.** NLRP3 **B.** ASC. **C.** Caspase-1. **D.** IL1β. **E.** IL18. Para todos os grupos, o número amostral foi: CT=5, HFD=6 e FS=7. Em todos os experimentos, $*P < 0,05$ - CT vs HFD.

4.5. Bioacessibilidade de Ácidos Graxos aos Ovários dos Animais Experimentais

Ao final do período experimental era fundamental a avaliação do perfil de ácidos graxos do tecido ovariano, para verificação e validação da incorporação de ácidos graxos oriundos das dietas experimentais. Os animais que receberam a dieta HFD apresentaram alterações significativas no perfil lipídico dos ovários. Entre os grupos HFD e CT, não houve diferença no montante de ácidos graxos saturados ou entre suas subespécies. Entre os ácidos graxos monoinsaturados, esteve aumentado o ácido graxo paulínico – C20:1 ($P<0,04$), quando comparados ao grupo CT. Entre os ácidos graxos poli-insaturados da família $\omega 6$ e $\omega 7$, apenas os ácidos eicosadienóico – C20:2 ($P<0,02$) e eicosatrienóico – C20:3 ($P<0,01$), respectivamente, estiveram aumentados, comparados ao grupo CT, sem alteração nos demais subtipos lipídicos.

Em relação aos ovários dos animais do grupo FS, não houveram alterações significativas na incorporação de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e nem em suas subespécies, quando comparados ao grupo HFD ($P>0,05$). Dentre os ácidos graxos poli-insaturados da família $\omega 6$, apenas o ácido docosatetraenóico – C22:4 apresentou redução significativa ($P<0,001$) quando comparado ao grupo HFD. Contudo, as principais e mais robustas alterações entre o grupo FS e HFD foram observadas entre os representantes dos ácidos graxos $\omega 3$, assim como esperado. Houve alteração extremamente significativa na incorporação total de ácidos graxos $\omega 3$ nos ovários dos animais experimentais ($P<0,0003$). Provavelmente o maior responsável por tamanho efeito foi a incorporação do ácido graxo alfa-linolênico – C18:3 ($P<0,0001$), representando aumento de mais de 1300% em comparação ao grupo HFD, uma vez que esse ácido é o mais presente no óleo da semente de linhaça. De forma interessante, é possível observar a presença ou aumento de outras espécies de $\omega 3$ mais longas, como o ácido eicosatetraenoato – C20:4, o eicosapentaenóico – C20:5 e o docosapentaenóico – C22:5 ($P<0,0001$), em comparação ao grupo HFD. (Tabela 3).

Tabela 3. Perfil de Ácidos Graxos no Ovário.

Ácido Graxo	CT (µg/mg)	HFD(µg/mg)	FS(µg/mg)
C14:0	0,40 ± 0,22	0,39 ± 0,19	0,57 ± 0,12
C15:0	0,06 ± 0,03	0,06 ± 0,03	0,09 ± 0,04
C16:0	11,78 ± 4,67	13,94 ± 6,22	18,02 ± 8,00
C16:1 ω9	0,25 ± 0,13	0,39 ± 0,20	0,64 ± 0,32
C16:1 ω7	1,61 ± 0,95	2,01 ± 1,57	3,59 ± 3,59
C17:0	0,11 ± 0,06	0,17 ± 0,08	0,22 ± 0,11
C17:1	0,05 ± 0,02	0,13 ± 0,09	0,19 ± 0,14
C18:0	4,61 ± 1,33	6,69 ± 2,29	6,98 ± 2,27
C18:1 ω9-cis	15,04 ± 7,27	26,33 ± 14,68	40,06 ± 20,93
C18:1 ω9-trans	1,71 ± 0,64	2,15 ± 1,03	2,95 ± 1,48
C18:2 ω6	13,56 ± 7,51	11,49 ± 6,96	19,03 ± 10,39
C18:3 ω3	0,53 ± 0,31	0,37 ± 0,25	4,87 ± 2,80 [#]
C20:0	0,11 ± 0,09	0,09 ± 0,02	N.D.
C20:1 ω7	0,37 ± 0,20	0,60 ± 0,19 [*]	0,53 ± 0,24
C20:2 ω6	0,32 ± 0,16	0,49 ± 0,13 [*]	0,49 ± 0,20
C20:3 ω7	0,27 ± 0,08	0,41 ± 0,13 [*]	0,43 ± 0,12
C20:4 ω6	3,12 ± 1,17	3,34 ± 1,32	2,89 ± 0,76
C20:3 ω3	N.D.	N.D.	0,13 ± 0,05
C20:4 ω3	N.D.	N.D.	0,09 ± 0,01
C20:5 ω3	N.D.	N.D.	0,19 ± 0,06
C22:1	0,07 ± 0,04	0,12 ± 0,03	0,06 ± 0,02
C22:4 ω6	1,91 ± 1,75	1,85 ± 1,04	0,62 ± 0,14 [#]
C22:5 ω6	0,19 ± 0,09	0,16 ± 0,04	N.D.
C22:5 ω3	0,30 ± 0,15	0,36 ± 0,17	1,39 ± 0,28 [#]
C22:6 ω3	0,89 ± 0,29	1,04 ± 0,22	1,36 ± 0,32
Σ AGS	17,08 ± 5,92	21,52 ± 8,38	26,08 ± 10,66
Σ AGMI	19,05 ± 9,05	31,65 ± 17,62	47,96 ± 25,47
Σ AGPI	21,02 ± 9,86	19,47 ± 7,55	31,39 ± 14,72
Σ ω6	19,04 ± 9,33	17,29 ± 7,20	23,03 ± 11,27
Σ ω3	1,71 ± 0,57	1,769 ± 0,45	7,924 ± 3,45 [#]
ω6:ω3	10,82 ± 2,84	9,81 ± 2,83	2,87 ± 0,40 [#]

Tabela 3. Perfil de Ácidos Graxos dos Ovários. Dados expressos em média (µg/mg) ± desvio padrão (DP), para cada grupo experimental, sendo: dieta controle (CT=9 animais), dieta rica em gordura saturada (HFD=9 animais), dieta rica em gordura com substituição de 10% de óleo de linhaça (FS=8 animais). N.D. ácidos graxos não detectados. AGS: ácido graxo saturado; AGMI: ácido graxo monoinsaturado; AGPI: ácido graxo poli-insaturado. Em todos os experimentos, * CT vs HFD; e # HFD vs FS.

5. DISCUSSÃO

O consumo excessivo e frequente de gorduras saturadas, provenientes da dieta, promove a ativação de caminhos moleculares e metabólicos relacionados a processos inflamatórios e imunológicos, este ciclo contribui para o desenvolvimento de doenças crônicas, como: obesidade, diabetes, dislipidemias, considerados um dos maiores problemas de saúde pública, as consequências secundárias a estas patologias muitas vezes se dão de forma insidiosa, dentre elas inclui-se a síndrome dos ovários policísticos (SOP).

Neste estudo, observou-se que os animais que receberam a dieta hiperlipídica (HFD), apresentaram um ganho de peso maior e persistente quando comparado aos animais controles. Tais dados vão de encontro aos estudos de Skaznik-Wikiel et al. (2016) que induziram a obesidade em camundongos fêmeas, durante 10 semanas e 32 semanas e, o estudo de Negrón; Radovick (2020) que ofertaram HFD (60%) por 12 semanas, que também observaram um aumento de massa corporal significativo após o consumo de dietas ricas em gorduras saturadas (NEGRÓN; RADOVICK, 2020; SKAZNIK-WIKIEL et al., 2016). Entretanto, observou-se no presente estudo que os animais que receberam a dieta com substituição de 1/3 da gordura saturada por óleo de linhaça (FS), não apresentaram benefícios quanto a prevenção do ganho de peso.

Na literatura, há diversas discussões sobre as repercussões negativas do desequilíbrio hormonal e metabólico ocasionados pela obesidade e, os possíveis impactos que levam a disfunção reprodutiva. Contudo, Skaznik-Wikiel et al. (2016) demonstraram resultados interessantes em seu estudo, os autores identificaram que os prejuízos relacionados ao consumo crônico de uma dieta rica em gordura saturada acarretam alterações glicêmicas e diminuição de folículos primordiais, ou seja, há redução da reserva ovariana, mesmo na ausência da obesidade.

Já Risal e colaboradores (2019), trouxeram evidências ainda mais alarmantes quando os autores identificaram que a SOP pode ser transgeracional, ou seja, pode afetar até a terceira geração. Através de ensaios experimentais observou-se que o fenótipo da SOP relacionado a desfechos metabólicos e reprodutivos podem ser transmitidos por gerações através da androgenização, além disso, efeitos mais leves, porém não menos importantes são vistos nos animais obesos. Contudo, neste mesmo estudo, as fêmeas obesas e androgenizadas apresentaram um impacto importante no desenvolvimento dos fetos nas gerações posteriores, o que corrobora

os achados clínicos de mulheres obesas com SOP, que apresentam um maior risco de pré-eclâmpsia, diabetes gestacional, abortos espontâneos, parto prematuro e mortalidade perinatal (RISAL et al., 2019).

Na presente pesquisa, apesar do consumo crônico de HFD, não se observou alterações nos parâmetros glicêmicos, como os testes de GTT, ITT e glicemia de jejum. Somente os níveis séricos de insulina apresentavam-se elevados no grupo HFD, quando comparado aos animais controles. Enquanto, os animais que receberam a dieta FS não apresentaram diferenças estatísticas dos níveis insulinêmicos, em comparação ao grupo HFD. Contudo, em outros estudos que realizaram o mesmo desenho experimental em machos, a dieta HFD ocasionou intolerância à glicose e redução da sensibilidade à insulina (DÁTILO et al., 2018; MOURA-ASSIS et al., 2018). Nos estudos de Moura-Assis et al. (2018) e Cintra et al. (2012), identificou-se que a dieta FS foi capaz de melhorar a sensibilidade à insulina quando comparado ao grupo HFD (CINTRA et al., 2012; MOURA-ASSIS et al., 2018).

Um estudo realizado por Ande e colaboradores (2017), induziu a obesidade, em fêmeas Swiss, através de uma modificação genética do gene chamado proibitina no tecido adiposo dos animais. Após a modificação gênica, os animais foram avaliados em 3, 6 e 9 meses de vida. Surpreendentemente, os animais apresentaram redução no número de filhotes, morfologia ovariana policística e aumento da concentração sérica de estradiol, após 9 meses de tratamento. Entretanto, os parâmetros glicêmicos (GTT e ITT) permaneceram inalterados. Estes resultados são interessantes, pois demonstram que a SOP pode ser desenvolvida sem a apresentação clínica de resistência à insulina e hiperandrogenismo (ANDE et al., 2017).

Provavelmente, as fêmeas durante a idade reprodutiva podem apresentar fatores protetores ao desencadeamento da resistência à insulina. Possivelmente, o impacto na sensibilidade à insulina dos camundongos machos nos estudos aqui citados pode estar relacionado ao dimorfismo da adiponectina (DIAMANTI-KANDARAKIS; DUNAIF, 2012). Xu e colaboradores (2005), demonstraram que fêmeas de roedores possuem maiores quantidades séricas de adiponectina (complexo oligomérico de alto peso molecular >250 kDa), em comparação aos animais machos. Este mesmo padrão também foi identificado em humanos, em que mulheres apresentam níveis séricos maiores de adiponectina do que os homens. Já Combs et al. (2003), também identificaram que fêmeas possuem uma maior produção

e secreção de adiponectina, através da quantificação sérica e conteúdo proteico de adiponectina em diferentes tecidos adiposos (COMBS et al., 2003). Evidências realizadas *in vitro* e *in vivo* mostram que homens possuem uma maior probabilidade de desenvolver resistência à insulina quando comparados às mulheres, um dos fatores que contribuem para tal se dá pela maior produção e secreção de testosterona (XU et al., 2005).

Além disso, deve-se considerar o tempo de exposição a HFD, que parece ser um fator importante nos impactos glicêmicos de fêmeas com base na literatura. No estudo de Hohos et al. (2020), animais que receberam HFD por 10 semanas também não apresentaram diferenças glicêmicas significativas, porém após 20 semanas de tratamento notou-se prejuízos relacionados a glicemia. Já Skaznik-Wikiel et al. (2016), identificaram que após 10 semanas de HFD, somente apresentou alterações glicêmicas os animais tratados com HFD, porém que efetivamente se tornaram obesos (≥ 25 g). Contudo, após 32 semanas de tratamento os animais do grupo HFD magros e HFD obesos apresentaram prejuízos glicêmicos significativos em comparação aos animais controles.

No que se refere ao ciclo estral dos camundongos do presente estudo, não foi observado diferenças significativas na média de dias em cada fase do ciclo entre os grupos CT e HFD, contudo, nota-se que a dieta HFD gerou uma perturbação no ciclo estral. Após 16 semanas de tratamento, o grupo FS permaneceu um maior tempo do ciclo estral na fase estro. Assim como nosso estudo, Negrón e colaboradores (2020), após 12 semanas de tratamento com HFD, observou que a ciclicidade dos animais obesos era comparável aos animais controles. Já Hohos et al. (2020), trataram os animais com HFD por 10 e 20 semanas, e identificaram que os dois tratamentos causaram prejuízos no ciclo estral dos animais. Contrariamente, aos nossos resultados os autores observaram que o tratamento com ômega-3 DHA, após indução da obesidade com HFD não foi capaz de restaurar o ritmo do ciclo estral (HOHOS et al., 2020).

A morfologia ovariana apresentou-se inalterada para os três grupos experimentais, assim como não foi observado diferença no número de folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento. Assim como no presente trabalho, Hohos et al. (2020) também não observaram diferenças significativas na morfologia ovariana e na contagem de folículos, após indução da obesidade e tratamento com ômega-3 DHA em fêmeas C57BL/6 J. De maneira oposta Hilal e

colaboradores (2020), observaram que fêmeas *Swiss*, após 9 semanas de tratamento com HFD, apresentaram um aumento do peso dos ovários e diminuição dos folículos primordiais, o qual indica redução da reserva ovariana. Além disso, os autores identificaram aumento do número de folículos primários, secundários, antrais, corpo lúteo e folículos atresícos (HILAL et al., 2020). Da mesma forma, Roberts e colaboradores (2017), evidenciaram que ratas tratadas com uma dieta rica em gordura e açúcar, apresentavam um aumento de cistos ovarianos e redução de corpos lúteos, apesar de não observarem mudanças de peso do ovário em relação aos animais controles (ROBERTS et al., 2017).

No que se refere aos parâmetros inflamatórios a indução da obesidade com HFD, pelo período de 16 semanas, não ativou proteínas relacionadas aos caminhos inflamatórios nos ovários. Gao et al. (2021), após tratar fêmeas C57BL/6 J com HFD, por 10 semanas, constataram um aumento de citocinas pró-inflamatórias, como IL6 e TNF- α no tecido ovariano, entretanto, esta alteração não era mediada pelos caminhos da proteína JNK, visto que assim como no presente estudo, a p-JNK não apresentou diferença estatística entre os grupos avaliados (GAO et al., 2021). Apesar dos ovários do grupo HFD não terem apresentado sinais de inflamação, conforme a hipótese inicial do estudo, foi observado que os animais HFD apresentaram uma quantidade maior de conteúdo proteico da caspase-1 clivada do que os animais CT. Curiosamente, notou-se no grupo FS uma redução do conteúdo proteico de algumas proteínas relacionadas ao complexo inflamassomo, como NLRP3 e IL1 β .

A ativação do complexo inflamassomo tem um papel importante para o desenvolvimento de uma foliculogênese adequada, o qual Zhang; Wang e Zhang (2019), notaram que ao induzir a ovulação em fêmeas C57BL/6 J, após 52h, era observado um aumento da expressão de NLRP3, ASC e IL1 β durante a foliculogênese (ZHANG; WANG; ZHANG, 2019). Entretanto, a ativação exacerbada do complexo inflamassomo pode estar relacionada com distúrbios reprodutivos. Um estudo demonstrou que animais modelos de SOP, elevaram a expressão de NLRP3, ASC e observou-se um aumento da atividade da caspase-1, com consequente acréscimo do conteúdo proteico de IL1 β , quando comparado aos controles (WANG et al., 2017).

No estudo de Rostamtabar et al. (2020), foi identificado que pacientes com SOP, tiveram expressão elevada de componentes do inflamassomo AIM2, NLRP3, e do conteúdo proteico de ASC, caspase-1 e IL1 β . Dentre as mulheres obesas portadoras de SOP, a concentração de IL18 também esteve elevada

(ROSTAMTABAR et al., 2020). Yang, Pang e Miao (2018), mostram que os níveis de IL1 α e IL1 β no soro e no fluido folicular de mulheres com insuficiência ovariana primária (POI) eram maiores em comparação às mulheres saudáveis. Quando avaliado a expressão gênica, somente a IL1 α apresentava-se aumentada no grupo de mulheres com POI. Interessantemente, as mulheres com diagnóstico de insuficiência ovariana também apresentavam níveis elevados de marcadores pró-apoptóticos e pró-inflamatórios, como Bax e TNF α , respectivamente, e redução de anti-apoptóticos Bcl2 (YANG; PANG; MIAO, 2018).

Visto a relação entre o inflamassomo e a saúde reprodutiva, especialmente no tecido ovariano, estudos com animais *knockout* apresentam resultados interessantes e promissores a respeito da preservação da saúde reprodutiva. Uri-Belapolsky et al. (2014), identificaram que camundongos *knockout* IL1 α (IL1 α KO) e IL1 β (IL1 β KO) apresentaram um aumento significativo no número de oócitos, taxa de gestação e número de filhotes nascidos, e nos níveis de um importante marcador da reserva ovariana, o AMH (Anti-Müllerian hormone), quando comparado aos animais *wild-type* (WT).

Estudos que realizaram a deleção Nlrp3^{-/-} (LLIBEROS et al., 2021; NAVARRO-PANDO et al., 2021) e Asc^{-/-} (LLIBEROS et al., 2021), em fêmeas com envelhecimento reprodutivo (12 meses de vida) verificaram diminuição da expressão de genes pró-inflamatórios, como TNF α , IL1 α , IL1 β e Ccl5 (gene relacionado ao recrutamento de leucócitos). Além disso, os animais *knockout* apresentaram maior número de folículos ovarianos em desenvolvimento, maior número de corpo lúteo, diminuição de folículos atresícos e aumento da taxa de gestação. Estes dados indicam que possivelmente a diminuição dos parâmetros inflamatórios pode reduzir a depleção de folículos ovarianos no envelhecimento reprodutivo e estender a capacidade reprodutiva (LLIBEROS et al., 2021).

A deleção do gene Nlrp3^{-/-} pode preservar a reserva ovariana, pois observa-se uma diminuição da expressão proteica de proteínas relacionada a apoptose, como Bax e aumenta Bcl2, bem como reduz a taxa Bax/Bcl2 nos ovários de animais jovens (4 meses) (NAVARRO-PANDO et al., 2021).

Apesar de ter poucos estudos na literatura sobre a atuação do NLRP3 nos ovários é possível notar que o inflamassomo exerce um papel crítico nos processos inflamatórios, bem como podem estar relacionados de forma direta ou indireta aos caminhos autofágicos e apoptóticos nas células ovarianas, que culmina na

deterioração da reserva ovariana, interferindo tanto na quantidade de folículos, como na qualidade de oócitos. Sendo assim, é possível que o $\omega 3$ possa ajudar na diminuição da deterioração da reserva ovariana a longo prazo, visto que, o grupo FS apresentou uma redução significativa do NLRP3 e IL1 β no tecido ovariano. Entretanto, mais estudos precisam avançar, visto que patologias com interfaces inflamatórias de modo crônico, como a SOP e obesidade, podem ser beneficiadas com tratamentos que interfiram na ativação do inflamassomo.

De forma interessante, foi possível observar que os animais que receberam HFD apresentaram uma redução da expressão do receptor GPR120 (Ffar4) nos ovários, em relação aos animais controles e, o grupo que recebeu a dieta FS conseguiu prevenir esta redução. Um estudo realizado por Liu et al. (2021b), demonstraram que animais modelos de SOP, apresentaram uma redução da expressão do gene e conteúdo proteico do GPR120 nos ovários de ratas. Porém, ao tratar os animais induzidos a SOP com um agonista sintético do GPR120 (TUG-891) foi observado aumento do GPR120 nos ovários dos animais, além disso, notou-se uma melhora nos parâmetros glicêmicos (HOMA-IR, GTT e glicemia de jejum), redução de LH e testosterona sérica.

Já Hirashawa et al. (2005), ao tratar células HEK-293 com ALA também demonstraram que houve um aumento da expressão de mRNA de GPR120. Oliveira e colaboradores (2015), identificaram que animais tratados agudamente com 500 μ L de óleo de linhaça, apresentaram uma maior associação do GPR120 com a proteína β -arrestina e, este mecanismo está relacionado com a redução de proteínas relacionadas a inflamação, já que a β -arrestina é capaz de recrutar a proteína TAB1, desfazendo o complexo TAB1/2/TAK1 (OH et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2015). Outro estudo realizado por Yan et al. (2013), observou que a ativação do GPR-120 pelo $\omega 3$ DHA, em macrófagos, era capaz de recrutar a proteína β -arrestina e desestabilizar o complexo inflamassomo através da associação com a proteína NLRP3. Este pode ser um dos mecanismos os quais foram observados na presente pesquisa, já que o grupo FS apresentou uma maior expressão do gene GPR120 e diminuição das proteínas NLRP3 e IL1 β .

Para avaliar se as alterações observadas na presente pesquisa tiveram alguma influência das dietas ofertadas, sendo elas CT, HFD e FS, foi realizado a análise cromatográfica em que observou-se um aumento da incorporação de ácidos graxos $\omega 3$ e diminuição da razão $\omega 6:\omega 3$, nos ovários de animais que receberam a

dieta FS, em comparação aos animais HFD. Yi; Zeng e Guo (2012), também avaliaram o perfil de ácidos graxos dos ovários de camundongo *kunming* fêmeas alimentados com dieta adicionada de 40g de $\omega 3$ ou $\omega 6$, e também observaram redução do ácido graxo C22:4 ($\omega 6$) e aumento de C22:5 ($\omega 3$), com consequente diminuição da razão $\omega 6:\omega 3$ (YI; ZENG; GUO, 2012).

Apesar de haver trabalhos na literatura descrevendo os mecanismos e os benefícios da ativação do GPR120 mediados pelo $\omega 3$, em tecidos metabólicos e em células do sistema imune, este trabalho é inovador no que diz respeito a avaliação dos possíveis mecanismos desencadeados por fontes alimentares, como o óleo de linhaça na expressão do GPR120 no tecido ovariano. Sendo assim, achados do presente estudo demonstram que fontes alimentares como óleo de linhaça, fonte de $\omega 3$, pode promover a diminuição de proteínas relacionadas ao inflamassomo, entretanto, para descobrir os efeitos desta redução na saúde ovariana são necessárias mais investigações.

6. CONCLUSÃO

O consumo de uma dieta rica em gorduras saturadas por um período de 16 semanas deu início a hiperinsulinemia, sendo este um fator metabólico de risco importante para o desenvolvimento da SOP, contudo, impactos de maior intensidade sobre os ovários podem estar relacionados ao tempo de exposição a dieta rica em gordura, bem como ao modelo experimental utilizado, com base em estudos da literatura. Apesar disso, a presente pesquisa trouxe resultados importantes, pois foi demonstrado achados que relacionam as alterações metabólicas com a saúde reprodutiva, visto que vários estudos na literatura induzem a obesidade somados a androgenização dos animais, o qual dificulta relacionar os efeitos diretos da obesidade para o desenvolvimento da SOP.

Além disso, os animais tratados com dieta rica em $\omega 3$ preveniram a redução do gene do GPR120 nos ovários e, diminuíram o conteúdo proteico de proteínas relacionadas ao complexo inflamassomo NLRP3 e IL1 β , o que pode estar relacionado a melhores resultados reprodutivos, já que este grupo também permaneceu um maior tempo na fase estro do ciclo estral. Entretanto, mais estudos são necessários a fim de avaliar os benefícios da diminuição da ativação do inflamassomo nos ovários mediados pelo $\omega 3$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRACHT-SCHULTE, K. et al. Omega-3 fatty acids in obesity and metabolic syndrome: A mechanistic update. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 58, p. 1–16, 2018.
- ARAÚJO, F. G.; VELASQUEZ-MELENDZ, G.; SANTOS, M. Health Care for Women International Prevalence trends of overweight , obesity , diabetes and hypertension among Brazilian women of reproductive age based on sociodemographic characteristics. **Health Care for Women International**, v. 40, n. 4, p. 1–21, 2019.
- ARKAN, M. C. et al. IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 11, n. 2, p. 191–198, 2005.
- AZZIZ, R. et al. Polycystic ovary syndrome. **Nature Reviews**, v. 2, p. 1–18, 2016.
- BEN JINGJING ET AL. Major vault protein suppresses obesity and atherosclerosis through inhibiting IKK–NF- κ B signaling mediated inflammation. **Nature Communications**, p. 1–15, 2019.
- BEST, D.; BHATTACHARYA, S. Obesity and fertility. **Horm Mol Biol Clin Invest**, p. 1–6, 2015.
- BONORA E. *et al.* Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 68, n. 2, p. 374–378, 1989.
- BOYLE, J.; TEEDE, H. J. Polycystic ovary syndrome. **Australian Family Physician**, v. 41, n. 10, p. 752–756, 2012.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 254, p. 248–254, 1976.
- BROTHERS, K. J. et al. Article Rescue of Obesity-Induced Infertility in Female Mice due to a Pituitary-Specific Knockout of the Insulin Receptor. **Cell Metabolism**, v. 12, n. 3, p. 295–305, 2010.
- BURGHEN, G. A.; GIVENS, J. R.; KITABCHI, A. E. Correlation of Hyperandrogenism with Hyperinsulinism in Poly cystic Ovarian Disease *. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 50, n. 1, p. 113–116, 1980.
- CALIGIONI, C. Assessing Reproductive Status/Stages in Mice. **Curr Protoc Neurosci.**, v. 1, p. 1–11, 2009.
- CASARINI, L.; CRÉPIEUX, P. Molecular Mechanisms of Action of FSH. **Front. Endocrinol.**, v. 10, n. May, p. 1–10, 2019.
- CHAWLA, A.; NGUYEN, K. D.; GOH, Y. P. S. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 11, p. 738–49, 2011.
- CINTRA, D. E. et al. Unsaturated Fatty Acids Revert Diet-Induced Hypothalamic Inflammation in Obesity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2012.
- CZECH, M. P. perspective Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. v. 23, n. 7, p. 804–814, 2017.
- DÁTILO, M. N. et al. Omega-3 from Flaxseed Oil Protects Obese Mice Against Diabetic Retinopathy Through GPR120 Receptor. **SCIENTIFIC REPORTS**, n. September, p. 1–13, 2018.

- DIAMANTI-KANDARAKIS, E. et al. Insulin Resistance and the Polycystic Ovary Syndrome Revisited : An Update on Mechanisms. **Endocrine Reviews**, v. 2, n. December, p. 981–1030, 2012.
- DIAMANTI-KANDARAKIS, E. et al. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology Defects in insulin signaling pathways in ovarian steroidogenesis and other tissues in polycystic ovary syndrome (PCOS). **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 109, p. 242–246, 2008.
- DUPONT, J.; SCARAMUZZI, R. J. Insulin signalling and glucose transport in the ovary and ovarian function during the ovarian cycle. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 11, p. 1483–1501, 2016.
- ELAGIZI, A. et al. An Update on Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Health. **Nutrients**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2021.
- GHABEN, A. L.; SCHERER, P. E. Adipogenesis and metabolic health. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, p. 242–258, 2019.
- GLOAGUEN, P. et al. Mapping the follicle-stimulating hormone-induced signaling networks. *Frontiers in Endocrinology*, v. 2, n. 45, p. 1–13, 2011.
- GOLDRAT, O.; DELBAERE, A. PCOS: update and diagnostic approach. **Clinical Biochemistry**, v. 62, p. 24–31, 2018.
- GOLDSAMMLER, M.; MERHI, Z.; BUYUK, E. Role of hormonal and inflammatory alterations in obesity-related reproductive dysfunction at the level of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 16, n. 45, p. 1–10, 2018.
- GOODARZI, M. O. et al. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. **Nature Publishing Group**, v. 7, n. 4, p. 219–231, 2011.
- GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P. Inflammasomes : mechanism of action , role in disease , and therapeutics. **Nature Medicine**, v. 21, n. 7, p. 677–687, 2015.
- HALES, C. M. et al. Prevalence of Obesity Among Adults and Youth: United States, 2015–2016. **National Center for Health Statistics**, n. 288, p. 2015–2016, 2017.
- HIRASAWA, A. et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. **Nature Medicine**, v. 11, n. 1, p. 90–94, 2005.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- α : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. v. 259, n. January, p. 87–92, 1993.
- HUNZICKER-DUNN, M.; MAIZELS, E. T. FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression : Branching out from protein kinase A. **Cell Signal**, v. 18, n. 9, p. 1351–1359, 2006.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, p. 816–825, 2006.
- KLENOV, V. E.; JUNGHEIM, E. S. Obesity and reproductive function : a review of the evidence. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 26, p. 455–460, 2014.
- LEE, Y. S.; WOLLAM, J.; OLEFSKY, J. M. An Integrated View of Immunometabolism. **Cell**, v. 172, n. 1–2, p. 22–40, 2018.
- LIMA, P. D. A. et al. Polycystic ovary syndrome : possible involvement of androgen-induced , chemerin-mediated ovarian recruitment of monocytes / macrophages †. **Biology of Reproduction**, v. 99, n. 4, p. 838–852, 2018.

LIU, Y. et al. The Release of Peripheral Immune Inflammatory Cytokines Promote an Inflammatory Cascade in PCOS Patients via Altering the Follicular Microenvironment. **Front. Immunol**, v. 12, p. 1–14, 2021a.

LIU, Y et al. GPR120 agonist ameliorated insulin resistance and improved ovarian function. **Zygote**, v. 1, p. 1-6, 2021b.

LIVAK K. J.; SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MAILLARD, V. et al. Docosahexaenoic acid (DHA) effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, n. 40, p. 1–18, 2018.

MCCARTNEY, C. R.; MARSHALL, J. C. Polycystic Ovary Syndrome. **n engl j med**, v. 375, n. 1, p. 54–64, 2016.

MORIYAMA, R. et al. Expression of the long - chain fatty acid receptor GPR120 in the gonadotropes of the mouse anterior pituitary gland. **Histochem Cell Biol**, v. 143, p. 21–27, 2015.

MOURA-ASSIS, A. et al. Flaxseed oil rich in omega-3 protects aorta against inflammation and endoplasmic reticulum stress partially mediated by GPR120 receptor in obese , diabetic and dyslipidemic mice models. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 53, p. 9–19, 2018.

NAGAREDDY, P. R. et al. Article Adipose Tissue Macrophages Promote Myelopoiesis and Monocytosis in Obesity. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 5, p. 821–835, 2014.

NARDO, D. DE; LATZ, E. NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 8, p. 373–379, 2011.

NTEEBA, J.; GANESAN, S.; KEATING, A. F. Progressive Obesity Alters Ovarian Folliculogenesis with Impacts on Pro- Inflammatory and Steroidogenic Signaling in Female Mice 1. v. 91, n. August, p. 1–11, 2014.

NTEEBA, J.; ORTINAU, L. C.; II, J. W. P. Diet-Induced Obesity Alters Immune Cell Infiltration and Expression of Inflammatory Cytokine Genes in Mouse Ovarian and Peri-Ovarian Adipose Depot Tissues. v. 958, p. 948–958, 2013.

OH, D. Y. et al. GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. **Cell**, v. 142, n. 5, p. 687–698, 2010.

OLIVEIRA, V. et al. Diets containing alpha-linolenic (omega 3) or oleic (omega 9) fatty acids rescues obese mice from insulin resistance. **Endocrinology**, n. September, p. 1–14, 2015.

PHELAN, N. et al. Hormonal and metabolic effects of polyunsaturated fatty acids in young women with polycystic ovary syndrome: results from a cross-sectional analysis and a randomized , placebo-controlled , crossover trial 1 – 4. **Am J Clin Nutr**, v. 93, n. 1, p. 652–662, 2011.

PLYMATE, S. R. et al. Inhibition of Sex Hormone-Binding Globulin Production. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 67, n. 3, p. 460–464, 1988.

PRADA, O. P. et al. Western Diet Modulates Insulin Signaling , c-Jun N-Terminal Kinase Activity , and Insulin Receptor Substrate-1 ser307 Phosphorylation in a. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1576–1587, 2005.

QI, X. et al. Gut microbiota – bile acid – interleukin-22 axis orchestrates polycystic ovary syndrome. **Nature Medicine**, v. 25, n. August, 2019.

REEVES, P. G. F. H. N. G. C. F. Committee Report AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents : Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. March, p. 1939–1951, 1993.

RISAL, S. et al. Prenatal androgen exposure and transgenerational susceptibility to polycystic ovary syndrome. **Nature Medicine**, v. 25, p. 1894–1904, 2019.

ROGERO, M. M.; CALDER, P. C. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids Marcelo. **Nutrients**, v. 10, n. 432, p. 1–19, 2018.

ROJAS, J. et al. Polycystic Ovary Syndrome , Insulin Resistance , and Obesity : Navigating the Pathophysiologic Labyrinth. **International Journal of Reproductive Medicine**, v. 2014, p. 1–17, 2014.

ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. **Fertility and sterility**, v. 81, n. 1, p. 19–25, 2004.

ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. **FERTILITY AND STERILITY**, v. 81, n. 1, p. 19–25, 2004.

SCHULZE, M. B. et al. Review Intake and metabolism of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids : nutritional implications for cardiometabolic diseases. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, v. 8, n. 11, p. 915–930, 2020.

SEKAR, N.; LAVOIE, H. A.; VELDHUIS, J. D. Concerted Regulation of Steroidogenic Acute Regulatory Gene Expression by Luteinizing Hormone and Insulin (or Insulin-Like Growth Factor I) in Primary Cultures of. **Endocrinology**, v. 141, n. 11, p. 3983–3992, 2000.

SHARMA, S. et al. mRNA in Pituitary L β T2 Gonadotropes and Diet- Induced Obesity Reduces FSH Levels in Male Mice and Disrupts the Proestrous LH / FSH Surge in Female Mice. **Endocrinology**, v. 154, n. 6, p. 2188–2199, 2013.

SMITH, PK et al. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p.76-85, 1985.

SIMOPOULOS, A. P.; GENE, O. An Increase in the Omega-6 / Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. **Nutrients**, v. 8, p. 1–17, 2016.

SNIDER, A. P.; WOOD, J. R. Obesity Induces Ovarian Inflammation and Reduces Oocyte Quality. **Reproduction**, p. 1–41, 2019.

SONG, M. J. et al. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 346, p. 739–745, 2006.

STEPTO, N. K. et al. Women with polycystic ovary syndrome have intrinsic insulin resistance on euglycaemic – hyperinsulaemic clamp. **Human Reproduction**, v. 28, n. 3, p. 777–784, 2013.

SUGANAMI, T. et al. A Paracrine Loop Between Adipocytes and Macrophages Role of Free Fatty Acids and Tumor Necrosis Factor alfa. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 25, p. 2062–2068, 2005.

SUGANAMI, T. et al. Role of the Toll-like Receptor 4NF- κ B Pathway in Saturated Fatty Acid-Induced Inflammatory Changes in the Interaction Between Adipocytes and Macrophages. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 27, p. 84–91, 2006.

SUI, Y. et al. IKK B links vascular inflammation to obesity and atherosclerosis. **J. Exp. Med**, v. 211, n. 5, p. 869–886, 2014.

- TSUKUMO, D. M. L. et al. Prevents Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. **Diabetes**, v. 56, p. 1986–1998, 2007.
- VANDANMAGSAR, B. et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 17, n. 2, 2011.
- VELLOSO, LA; FOLLI, F; SAAD, MJ. TLR4 at the Crossroads of Nutrients, Gut Microbiota, and Metabolic Inflammation. **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 3, p. 245–271, 2005.
- WADA, J.; MAKINO, H. Innate immunity in diabetes and diabetic nephropathy. **Nature Reviews Nephrology**, v. 12, n. 1, p. 13–26, 2016.
- WANG, F. et al. Activation of NLRP3 inflammasome in the ovaries during the development and treatment of polycystic ovary syndrome. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 10, n. 5, p. 5022–5030, 2017.
- WANG, N. et al. Obesity accelerates ovarian follicle development and follicle loss in rats. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 63, n. 1, p. 94–103, 2014.
- WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue Find the latest version : Obesity is associated with. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.
- WEN, H. et al. Fatty acid – induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. **Nature Immunology**, v. 12, n. 5, 2011.
- WENSVEEN, F. M. et al. NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. **Nature Immunology**, v. 16, n. 4, p. 376–387, 2015.
- WILLIS, D. S. et al. Premature Response to Luteinizing Hormone of Granulosa Cells from Anovulatory Women with Polycystic Ovary Syndrome: Relevance to Mechanism of Anovulation. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, n. 11, p. 3984–3991, 1998.
- WU, R. et al. Macrophage contributions to ovarian function. **Human Reproduction Update**, v. 10, n. 2, p. 119–133, 2004.
- XU, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance Find the latest version : a crucial role in the development. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1821–1830, 2003.
- YAMAMOTO, Y. et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits ovulation and induces granulosa cell death in rat ovaries. **Reprod Med Biol**, v. 14, n. 3, p. 107–115, 2015.
- YAN, Y. et al. Omega-3 Fatty Acids Prevent Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome Activation. **Immunity**, v. 38, n. 6, p. 1154–1163, 2013.
- YANG, H.; PANG, H.; MIAO, C. Ovarian IL-1 α and IL-1 β levels are associated with primary ovarian insufficiency. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 11, n. 9, p. 4711–4717, 2018.
- YU, C. et al. Mechanism by Which Fatty Acids Inhibit Insulin Activation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) -associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity in Muscle. **The journal of biological chemistry**, v. 277, n. 52, p. 50230–50236, 2002.
- ZHANG, Z.; HUANG, L.; BRAYBOY, L. Macrophages : an indispensable piece of ovarian health. **BiologymofReproduction**, v. 104, n. 3, p. 527–538, 2021.
- ZHANG, Z.; WANG, F.; ZHANG, Y. Expression and Contribution of NLRP3 Inflammasome During the Follicular Development Induced by PMSG. **Frontiers in Cell and Development Biology**, v. 7, n. October, p. 1–8, 2019.