



Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA



PATRÍCIA BRITO RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO INTESTINAL EM
CAMUNDONGOS C57BL/6J APÓS CURTO PERÍODO DE
CONSUMO DE DIETA HIPERLIPÍDICA**

**INTESTINAL INFLAMMATORY PROFILE EVALUATION IN
C57BL/6J MICE AFTER A SHORT PERIOD OF HIGH-FAT DIET
CONSUMPTION**

**LIMEIRA
2017**

PATRÍCIA BRITO RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO INTESTINAL EM
CAMUNDONGOS C57BL/6J APÓS CURTO PERÍODO DE
CONSUMO DE DIETA HIPERLIPÍDICA**

**INTESTINAL INFLAMMATORY PROFILE EVALUATION IN
C57BL/6J MICE AFTER A SHORT PERIOD OF HIGH-FAT DIET
CONSUMPTION**

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

Dissertation presented to the Faculty of Applied Sciences of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master, in the area of Nutrition.

Orientador: Prof. Dr. Dennys Esper Corrêa Cintra

Coorientador: Dr. Rodrigo Miguel Marin

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA PATRÍCIA BRITO RODRIGUES, E ORIENTADA PELO PROF. DR. DENNYSPER CINTRA.

**LIMEIRA
2017**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 1506362

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

R618a Rodrigues, Patrícia Brito, 1991-
Avaliação do perfil inflamatório intestinal em camundongos C57BL/6J após curto período de consumo de dieta hiperlipídica / Patrícia Brito Rodrigues. – Limeira, SP : [s.n.], 2017.

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

1. Dieta hiperlipídica. 2. Intestinos - Doenças inflamatórias. 3. Ômega-3. 4. Linhaça. I. Cintra, Dennys Esper, 1976-. II. Marin, Rodrigo Miguel. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Intestinal inflammatory profile evaluation in C57BL/6J mice after a short period of high-fat diet consumption

Palavras-chave em inglês:

High fat diet

Intestines - Inflammatory diseases

Omega 3

Flaxseed

Área de concentração: Nutrição

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

Banca examinadora:

Dennys Esper Cintra [Orientador]

Raquel Franco Leal

Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro

Data de defesa: 06-04-2017

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

Autor (a): Patrícia Brito Rodrigues

Título: Avaliação do perfil inflamatório intestinal em camundongos C57BL/6J após curto período de consumo de dieta hiperlipídica

Natureza: Dissertação de Mestrado.

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA) – Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

Data da Defesa: Limeira, 06 de abril de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Presidente da banca : Prof Dr. Dennys Esper Corrêa Cintra

Comissão examinadora:

Profa Dra. Raquel Franco Leal

Profa Dra. Maria Claudia Gonçalves de Oliveira Fusaro

Prof Dr. Dennys Esper Corrêa Cintra

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

À Deus, que sabe de todas as coisas e que me permitiu traçar essa caminhada tentando compreender um pedaço tão pequeno de suas maravilhas, que pode se comparar à um micro RNA no meio do oceano atlântico.

À minha mãe, Eliane, por acreditar em mim e em minhas escolhas, mesmo sem entender completamente as coisas que me tomaram infinitos finais de semana sem retornar para casa.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

À **minha família**, que de muitas maneiras me ajudou a me manter firme frente à todas as dificuldades desde à graduação. **Em especial às mulheres**, minha avó **Maria de Lourdes**, minha mãe **Eliane** e minha irmã **Érika**, que são meus exemplos de superação e garra.

Ao Prof. Dr. Dennys Esper Cintra, por todos os votos de confiança depositados em mim. Agradeço pela paciência e por ter me dado não só o exemplo, mas por ter segurado a minha mão e me mostrado na prática como ser uma pesquisadora, cientista, professora e ser humano de verdade. Por isso e por tantos outros aprendizados que tive no percurso do mestrado, considero-o como meu pai na ciência.

À **Prof.^a Dr.^a Ana Carolina Junqueira Vasques**, por ter sido, talvez sem saber, minha mentora e modelo. Obrigada por ter me escolhido no processo seletivo de iniciação científica para trabalhar no Estudo Brasileiro de Síndrome Metabólica, foi a primeira porta que se abriu para mim nesse fantástico mundo da Ciência. Obrigada por me guiar não só na iniciação científica, mas também no estágio de docente, foram dois momentos da minha vida que aprendi através da sua clareza, calma e benignidade como honrar minha profissão e respeitar os que estão ao meu redor, seja aluno ou paciente.

À **Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** por todo apoio e infraestrutura oferecidos, sem os quais não seria possível o desenvolvimento deste projeto.

À **toda equipe do Laboratório de Genômica Nutricional (LABGEN)**, em especial à Marcella Dátilo, Marcella Ramos Sant'Ana e Guilherme Pedron Formigari, por todo apoio experimental, teórico e filosófico. Pelo apoio em todos os momentos, nas limpezas das gaiolas, pelo cuidado dos animais, pela mão-de-obra nas extrações em que aproveitávamos até a respiração dos camundongos. Obrigada pelo carinho de cada um de vocês e por se importarem muito além do que a maioria se importa, porque vocês não fazem parte da maioria, são na verdade especiais e únicos.

À toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Exercício

“Me pergunto centenas de perguntas, mas eu estou aprendendo tanto. Estou cometendo erros e aprendendo com eles, não tenho medo de errar. Eu abraço os erros, eles te fazem quem você é. Nunca tive medo de cair.” Beyoncé

RESUMO

Introdução: A inflamação crônica de baixo grau é um dos principais mecanismos envolvidos na gênese da obesidade e a redução na função da barreira intestinal, também ocasionada por esse tipo de inflamação pode contribuir com a perpetuação do estado de obesidade.

Objetivos: Caracterizar o perfil inflamatório intestinal em curto período de consumo de dieta rica em gordura predominantemente saturada, ou na presença de ácidos graxos ômega-3.

Materiais e métodos: Camundongos *C57BL/6J* machos, com seis semanas de idade, foram expostos à dieta padrão (CT) ou dieta hiperlipídica (35% da composição) (HF) ou dieta hiperlipídica com conteúdo de 10% da fração de banha substituída por óleo de linhaça (HF+FS) rico em ômega 3 do tipo alfa-linolênico, durante três, sete ou quatorze dias. Após cada período de tratamento foram realizados testes de glicemia de jejum e tolerância à insulina. O íleo distal foi removido para análises em qPCR *real-time* para os genes Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF α); Interleucinas 1 β , 6 e 10 (IL-1 β , IL6 e IL10); receptores 120 e 40 acoplados à proteína G (GPR120 e GPR40); Claudina 7 (Cldn 7) e Zona Ocludente 1 (ZO-1). Análises de variância (ANOVA) seguida pelo teste de significância de Tukey mostram-se significativos quando $P < 0,05$.

Resultados: Ao final de cada período experimental, todos os grupos apresentaram ganho de peso, contudo, após três dias de consumo apenas o grupo HF apresentou aumento significativo da massa do tecido adiposo epididimal ($p=0,007$). Em relação à glicemia de jejum, houve aumento dos níveis após três dias para ambos os grupos em consumo de dieta hiperlipídica ($p < 0,0001$). Entretanto, após sete dias apenas o grupo HF manteve altos níveis de glicemia ($p=0,0002$) e o grupo HF+FS apresentou redução significativa quando comparado ao grupo HF ($p=0,0002$). Ao longo dos curtos períodos de consumo das dietas hiperlipídicas a sensibilidade à insulina não foi alterada. Entretanto, interessante, após quatorze dias de ingestão os animais HF+FS em teste de tolerância à insulina apresentou maior taxa de remoção de glicose, quando comparado ao grupo Ctl e ao grupo HF ($p < 0,05$). Nos resultados de PCR *real time*, observou-se alterações em diferentes marcadores inflamatórios de acordo com o tempo de consumo e o tipo da dieta hiperlipídica. Após três dias, os níveis de IL10 reduziram em ambos os grupos HF ($p < 0,0001$) e HF+FS ($p < 0,005$). Com sete dias de consumo

houve considerável redução dos transcritos de TNF α nos grupos HF e HF+FS (p=0,0009), o que pode ser uma resposta natural do sistema imune inato frente ao estímulo inflamatório da gordura saturada presente nas dietas. É possível que o ômega 3 presente na dieta HF+FS tenha protegido do aumento dos níveis de IL1 β no íleo distal, uma vez que apenas o grupo HF apresentou aumento progressivo nos níveis de IL1 β a partir de sete (p=0,02) até quatorze (p=0,003) dias de tratamento. Curiosamente, ao final de quatorze dias de ingestão, o grupo HF+FS apresentou redução nas quantidades de IL1 β (p<0,05) e aumento de IL6 (p=0,03) quando comparadas ao grupo HF. Em relação às quantidades gênicas dos receptores de ácidos graxos no intestino distal, observaram-se diferenças no GPR40 tanto no grupo HF quanto no grupo HF+FS apenas após sete dias de consumo das dietas (p<0,0001). A expressão gênica de moléculas participantes do mecanismo de adesão celular ZO-1 e Cldn7 também apresentaram variações durante curto período de consumo de dietas hiperlipídicas. Verificou-se aumento do conteúdo gênico da ZO1 apenas após três dias de consumo no grupo HF (p<0,05), e após três (p<0,001) e sete (p<0,001) dias no grupo HF+FS. Já a Cldn7 sofreu redução do seu conteúdo gênico apenas após três dias de consumo em ambos os grupos HF e HF+FS (p<0,05).

Conclusão: Por fim, um curto período de consumo de dieta rica em gordura foi capaz de alterar marcadores de inflamação aguda em íleo distal e o consumo do óleo rico em ácido graxo alfa-linolênico parece atenuar essas respostas além de contribuir com aumento de genes da proteína ZO1, importante no controle de permeabilidade, nos períodos iniciais de exposição à dieta hiperlipídica.

Palavras Chave: Dieta hiperlipídica; Inflamação intestinal; ômega-3; Linhaça.

ABSTRACT

Introduction: Low-grade chronic inflammation is one of the main mechanisms involved in the genesis of obesity and the reduction in intestinal barrier function, also caused by this type of inflammation, may contribute to the perpetuation of the obesity state.

Objective: To characterize the inflammatory profile in the short period of consumption of a diet rich in fat predominantly saturated, or in the presence of omega-3 fatty acids.

Materials and methods: C57BL / 6J male mice at 4 weeks-age were exposed to the standard diet (CT) or hyperlipid diet (35% of composition) or a hyperlipid diet containing 10% of the lard fraction replaced with flaxseed oil rich in alpha-linolenic free fatty acid, that is an omega 3 type (HF+FS) for three, seven or fourteen days. After each treatment period, tests of fasting glucose and insulin tolerance were performed. The distal ileum was removed for analyzes in qPCR real-time for Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) genes; Interleukins 1 β , 6 and 10 (IL-1 β , IL6 and IL10); receptors 120 and 40 coupled to G protein (GPR120 and GPR40); Claudine 7 (Cldn 7) and Zonula ocludens-1 (ZO-1). Analysis of variance followed Tukey's test were used and $P < 0,05$ was accepted as statistically significant.

Results: At the end of each experimental period, all groups presented weight gain, however, after three days of consumption only the HF group showed a significant increase in the mass of the epididymal adipose tissue ($p = 0,007$). In relation to fasting glycemia, there was an increase in levels after three days for both groups in hyperlipidic diet consumption ($p < 0,0001$). However, after seven days only the HF group maintained high blood glucose levels ($p = 0,0002$) and the HF+FS group presented a significant reduction when compared to the HF group ($p = 0,0002$). During the short periods of consumption of the hyperlipidic diets the insulin sensitivity was not altered. Interestingly, after fourteen days of ingestion, the HF+FS animals in the insulin tolerance test had a higher rate of glucose removal when compared to the Ctl group and the HF group ($p < 0,05$). In the real-time PCR results, changes in different inflammatory markers were observed according to the time of consumption and the type of the hyperlipidic diet. After three days, IL10 levels decreased in both HF ($p < 0,0001$) and HF+FS ($p < 0,005$) groups. At seven days of consumption, there was a considerable reduction of TNF α transcripts in the HF and HF+ FS groups ($p = 0.0009$), which may be

a natural response of the innate immune system caused for an inflammatory stimulus of the saturated fat present in the diets. It is possible that the omega-3 present in the HF+FS diet were protected from increased levels of IL-1 β in the distal ileum, because only the HF group showed the progressive increase in IL-1 β levels from seven ($p = 0.02$) to fourteen ($p = 0.003$) days of treatment. Interestingly, at the end of fourteen days of ingestion, the HF+FS group presented a reduction in the amounts of IL1 β ($p < 0,05$) and an increase in IL6 ($p = 0,03$) when compared to the HF group. In relation to the amount of the fatty acid receptors in the distal intestine, differences in GPR40 were observed both in the HF group and in the HF+FS group only after seven days of diet consumption ($p < 0,0001$). The gene expression of molecules participating in the ZO-1 and Cldn7 cell adhesion mechanism also showed variations during a short period of consumption of hyperlipidic diets. Upregulation of ZO1 was observed only after three days of consumption in the HF group ($p < 0,05$), and after three ($p < 0,001$) and seven ($p < 0,001$) days in the HF+FS group. On the other hand, Cldn7 underwent downregulation only after three days of consumption in both HF and HF+FS groups ($p < 0,05$).

Conclusion: Finally, a short period of consumption of a high-fat diet was able to change markers of acute inflammation in the distal ileum, and the consumption of the oil rich in alpha-linolenic acid seems to attenuate these responses in addition to contributing to the increase of ZO1 genes, important in the control of permeability, in the initial periods of exposure to the hyperlipidic diet.

Keywords: High fat diet; Intestinal inflammation; Omega 3; Flaxseed.

LISTA DE ABREVIATURAS

- cDNA – *Complementary DNA* – DNA complementar
- CCK - Colecistoquinina
- CEA – Coeficiente de Eficiência Alimentar
- CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório
- Cldn7 – Claudina 7
- CT – Grupo de animais que foram alimentados apenas com dieta padrão
- DEPC - *Diethyl pyrocarbonate* – Dicarbonato de dietila
- DEXA- Densitometria por dupla emissão de raio-x
- DM2 – Diabetes Mellitus do tipo 2
- DNA - deoxyribonucleic acid – Ácido Desoxirribonucleico
- ECI - *Efficiency of Conversion of Ingested Foods* - Coeficiente de Eficiência Alimentar
- FFR4 - Receptor 4 de ácidos graxos livres
- FXR – (*Farnesoid X receptor*) – Receptor nuclear ativado por ácidos biliares
- GAPDH - *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- GIP - Peptídeo inibidor gástrico
- GLP-1 – (*Glucagon-like peptide 1*) – Peptídeo semelhante ao glucagon 1
- GLP-2 – (*Glucagon-like peptide 2*) – Peptídeo semelhante ao glucagon 2
- GPR120 – (*G protein-coupled receptor 120*) – Receptor 120 acoplado à proteína G
- GPR40 - (*G protein-coupled receptor 40*) – Receptor 40 acoplado à proteína G
- HF – Hiperlipídica (referente à dieta) ou Grupo de animais que receberam dieta hiperlipídica
- HFD – (*High Fat Diet*) – Dieta hiperlipídica
- HFD+FS – (*High Fat Diet + Flaxseed*) – Dieta hiperlipídica + óleo de linhaça
- IFN γ - interferon gama
- IL1 β – Interleucina 1 beta
- IL6 – Interleucina 6
- IL10 – Interleucina 10
- IL13 – Interleucina 13
- LPS – Lipopolissacarídeo
- LXRs – (*Liver X receptor*) Receptor X hepático

MCP-1 – Proteína de Quimiotração para Monócitos 1

MPO – Mieloperoxidase

MUFA - *Monoinsaturated fatty acids* – Ácidos graxos monoinsaturados

NF- κ B – Fator nuclear κ B

Ocln – Ocludina

PCR – (*polimerase chain reaction*) – Reação em cadeia da polimerase

PLC – Enzima fosfolipase C

PPARs – Receptores ativados por proliferador de peroxissoma

PUFA - *Polyunsaturated fatty acids* – Ácidos graxos poliinsaturados

RNA – *Ribonucleic acid* – Ácido ribonucleico

SCT1 – Linhagem de células endócrinas oriunda de camundongos

Tjp1 - *Tight junction protein 1* - Primer da Zonula oclusiva 1

TLR4 – (*Toll like receptor 4*) – Receptor 4 do tipo Toll

TNF α – (*Tumor Necrosis Factor α*) - Fator de Necrose Tumoral alfa

ZO-1 – (*zonula occludens 1*) – Zonula oclusiva 1

Figura 1. Esquema do desenho experimental	06
Figura 2. Representação esquemática dos segmentos do intestino de camundongo para localização do íleo distal	10
Figura 3 – Evolução ponderal	14
Figura 4 – Consumo alimentar e seu equivalente calórico.....	15
Figura 5 – Perfil glicêmico	17
Figura 6 – Marcadores de transcritos inflamatórios	19
Figura 7 – Transcritos dos receptores GPR120 e GPR40	21
Figura 8 – Transcritos dos componentes de adesão celular	23
Tabela 1 – Composição de macronutrientes das dietas	07
Tabela 2 – Composição das dietas experimentais Dietas (g/Kg)	08
Tabela 3 – Composição de ácidos graxos das dietas (% do total de lipídios)	09
Tabela 4 – Ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar (CEA)	15

RESUMO	8
ABSTRACT	10
2. INTRODUÇÃO.....	16
3. OBJETIVOS.....	20
Objetivo Geral	20
Objetivo Específico	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Animais experimentais	21
4.2 Delineamento experimental.....	22
4.3 Avaliação do perfil glicêmico.....	24
4.4 Extração dos tecidos	25
4.5 PCR em tempo real.....	26
4.7 Análises estatísticas	27
5. RESULTADOS	28
5.1 Evolução Ponderal, Consumo Alimentar e Eficiência Energética da Dieta.....	28
5.2 Perfil glicêmico	31
5.3 Alterações na expressão gênica de citocinas inflamatórias no íleo distal após consumo de dieta HF	33
5.4 Expressão gênica intestinal dos receptores de ácidos graxos GPR120 e GPR40.	35
6. DISCUSSÃO.....	39
7. CONCLUSÃO.....	45
8. REFERÊNCIAS	46
9. ANEXOS	53
Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética no uso de animais	53

2. INTRODUÇÃO

Diante do aumento da prevalência da obesidade, também se tornaram mais comuns as complicações a ela associadas, como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensão arterial, dislipidemias e até mesmo doenças neurodegenerativas e alguns tipos de câncer (Herrera-Covarrubias 2015), fatores que têm alarmado os sistemas de saúde no mundo (Fincham 2011).

A dificuldade em tratar a obesidade está no fato de que esta doença possui características de gênese multifatorial. Fatores causais interagem entre si como genética, ambiente e o meio social de inserção do indivíduo, sendo esse conjunto, o real determinante para a progressão da doença e perpetuação no processo de acúmulo de gordura corporal (Y. C. Wang et al. 2011).

Em 1994, pela primeira vez foi postulada a hipótese de que a obesidade poderia ser originada com base num processo inflamatório, de grau atenuado (Hotamisligil and Spiegelman 1994). Hotamisligil e colaboradores (1994) demonstraram a presença de uma importante proteína inflamatória secretada pelo tecido adiposo de obesos, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Parecia estar claro que quanto maior fosse o adipócito e também a massa de tecido adiposo, maior seria a concentração desta proteína no próprio tecido e também na circulação.

Posteriormente outros trabalhos conseguiram demonstrar a presença de outros marcadores inflamatórios correlacionados ao alto peso em massa adiposa, como as interleucinas 1 β (IL-1 β) e 6 (IL-6), e redução da adiponectina (Iyer et al. 2010). Ainda, a descrição do papel da proteína de quimiotração para monócitos 1 (MCP-1) trouxe a participação do componente imunológico para a compreensão da gênese da obesidade, onde tal proteína, produzida e liberada também pelo tecido adiposo, recrutaria monócitos para a região, que se diferenciariam em macrófagos, repercutindo, consecutivamente, na intensificação do processo inflamatório. Desse ponto de vista, estaria iniciada a perpetuação do ganho de peso e a proliferação negativa das repercussões desse processo (Hotamisligil 2006; Shoelson, Lee, and Goldfine 2006; De Souza et al. 2005).

Em 2005, De Souza et al., demonstraram pela primeira vez que o processo inflamatório provocado pelo consumo excessivo de gordura saturada estava presente

também no hipotálamo, centro nervoso do controle da fome. Este trabalho quebrou o paradigma que havia sobre a gênese da obesidade ser iniciada no tecido adiposo. Mas apenas em 2012, Thaler et al., demonstraram que o consumo excessivo de gordura em um único dia já era capaz de induzir o processo inflamatório hipotalâmico.

A gênese do processo inflamatório envolvido com a obesidade, mediante consumo de gordura, parece ser induzida através de receptores do sistema imune inato, os *Toll Like Receptors 2* (TLR2) e, principalmente, 4 (TLR4)(Shi et al. 2006)(Tsukumo et al. 2007). Este receptor é encontrado em diversos tecidos do organismo de mamíferos, sendo um dos principais sensores de infecções bacterianas. O TLR4 é capaz de reconhecer o lipopolissacáride (LPS) presente na parede celular de bactérias Gram Negativas e, o consumo de dietas ricas em gorduras, predominantemente saturadas, é capaz de iniciar um processo inflamatório de baixo grau, por ativar similarmente o TLR4. Não obstante, dietas ricas em gorduras têm sido associadas ao aumento de concentrações plasmáticas de LPS, tornando o sistema predisposto ao surgimento de resistência à insulina, e demais desordens metabólicas associadas ao estado inflamatório crônico de baixo grau (Cani et al. 2007; Erridge et al. 2007).

O aumento dos níveis de LPS circulante é chamado de endotoxemia metabólica e muitos estudos observaram esse fenômeno principalmente em indivíduos obesos e DM2 (Al-Disi et al. 2015; Amar et al. 2008; de Courten et al. 2016). O consumo de dietas ricas em gorduras parece ser capaz de modificar o perfil da microbiota intestinal, por aumentar o número de bactérias Gram-negativas, com consequente aumento do conteúdo de LPS presente no lúmen intestinal. Isso parece prejudicar a função de barreira do epitélio intestinal, o que promoveria o alcance do LPS do intestino à corrente sanguínea (Delzenne et al. 2011). Nesse contexto, se torna cada vez mais evidente a relação da obesidade com o perfil das gorduras dietéticas, absorção intestinal e o desenvolvimento de endotoxemia metabólica.

Os mecanismos de translocação do LPS para a circulação, promovendo a endotoxemia metabólica mediante consumo de gorduras, ainda não é claro. Entretanto, há evidências que justificam tal efeito, pois a maior solubilização dos LPS e sua incorporação à quilomicrons poderiam aumentar as concentrações dessas endotoxinas, bem como as concentrações de citocinas pró-inflamatórias em situação pós-prandial (Ghoshal et al. 2009; Laugerette et al. 2011). Com relação à redução da função de barreira exercida pelo epitélio intestinal, o consumo de dieta rica em gordura saturada parece estar relacionado com alterações na quantidade e localização de proteínas de

junção celular, Zonula Ocludente 1 (ZO-1) e Ocludina (Ocldn), importantes no controle da permeabilidade de barreiras, como a intestinal (Balakumar et al. 2016; Cani et al. 2008; de La Serre et al. 2010). As proteínas de junção celular podem desempenhar outras funções além das relacionadas ao controle de permeabilidade, como no caso da claudina 7 que parece estar relacionada com a manutenção das interações entre as células epiteliais de matriz e também à homeostase intestinal (Ding et al. 2012). Em camundongos, a redução do conteúdo de claudina 7 levou à má formação do complexo proteico que existe entre a claudina7, a sub unidade $\alpha 2$ da integrina e a claudina 1 existente na região basolateral do epitélio intestinal, e contribuiu para ativação de estado inflamatório intestinal (Ding et al. 2012).

Não há dúvidas que o consumo excessivo de gordura saturada gera prejuízos à permeabilidade intestinal. Entretanto, não há um consenso sobre os mecanismos envolvidos na gênese desse efeito, principalmente com relação à cronologia dos fatos. Algumas evidências de modelos com longo período de consumo de HFD, apontam a inflamação local no intestino, como sendo fator chave para o desarranjo das proteínas de junção celular do epitélio intestinal (Beaurepaire, Smyth, and McKay 2009; Luck et al. 2015; Yang et al. 2014). Porém, recentemente um estudo utilizou-se de modelo de curto prazo de consumo de dieta hiperlipídica e observou que houve permeabilidade intestinal relacionada. Entretanto, houve também deficiência no sistema imune da mucosa do intestino, apesar de não terem registrado eventos inflamatórios locais (Johnson et al. 2015).

De forma interessante, em modelo de obesidade, a redução da inflamação de baixo grau intestinal parece reduzir a inflamação do tecido adiposo e melhorar a homeostase metabólica (Luck et al. 2015). Neste trabalho, Luck e colaboradores verificaram que um composto anti-inflamatório específico para mucosa intestinal foi capaz de atenuar a inflamação local dessa mucosa causada pelo consumo de dieta rica em gordura saturada.

Por outrora, considerando os efeitos anti-inflamatórios da ativação do receptor 120 acoplado à proteína G (GPR120) (Oh et al. 2010), Anbazhagan et al (2016) verificaram que tal efeito ocorre principalmente em células do tipo epitelial, enquanto que em células do tipo secretoras (SCT1) os efeitos da ativação do GPR120 induz secreção do hormônio *Glucago-like peptide 1* (GLP-1) (Anbazhagan et al. 2016). A ativação não apenas do GPR120, mas também de outro receptor acoplado à proteína G, o GPR40, como proposta para reduzir estado inflamatório tem sido testada em diferentes tecidos, como fígado, tecido adiposo, músculo esquelético (V. Oliveira et al. 2015) e no sistema

nervoso central (Cintra et al. 2012). Ambos receptores são ativados por ácidos graxos de cadeia média e longa (Miyachi et al. 2010) e quando ativos podem reduzir o processo inflamatório por inibirem a atividade do Fator de necrose tumoral (NF- κ B), um fator de transcrição atuante na produção de citocinas inflamatórias (D. Oh et al. 2011; V. Oliveira et al. 2015).

Perante a escassez de dados envolvendo o papel da ativação do GPR120 e GPR40, via ácidos graxos poli-insaturados oriundos da dieta, no controle da inflamação e permeabilidade intestinal em modelo obesogênico, este trabalho tem como objetivo caracterizar o perfil inflamatório intestinal em curto período de consumo de dieta rica em gordura saturada ou na presença de ácidos graxos ômega-3.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o perfil inflamatório intestinal em camundongos C57BL/6J após o consumo de dietas ricas em gordura, bem como os possíveis efeitos anti-inflamatórios do ômega 3 do tipo alfa-linolênico oriundo do óleo de linhaça presente na dieta.

Objetivo Específico

- Avaliar o perfil inflamatório intestinal após curto consumo (3, 7 e 14 dias) de dieta hiperlipídica.
- Avaliar a interferência de dieta hiperlipídica, contendo ácidos graxos ômega-3, no processo inflamatório intestinal.
- Avaliar o conteúdo de transcritos (RNA mensageiro) das proteínas de junção intestinal (ZO-1 e Cldn7) sensíveis à dieta hiperlipídica ou contendo ômega-3.
- Avaliar a resistência sistêmica à insulina após curto consumo de dieta rica em gordura.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos *C57BL/6J* machos, com quatro semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Foram alocados em ambiente com controle de temperatura ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) e fotoperíodo (12/12 horas claro/escuro) cinco animais por gaiola, contendo maravalha. Foram ambientizados por uma semana e, posteriormente, mantidos em dietas experimentais e água filtrada *ad libitum*. A composição detalhada da dieta está demonstrada na Tabela 2. Todos dos procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Estadual de Campinas e seguirão as diretrizes propostas pelo *Guide for the care and use of Laboratory animals* (The National Academies 2011). Figura 1.

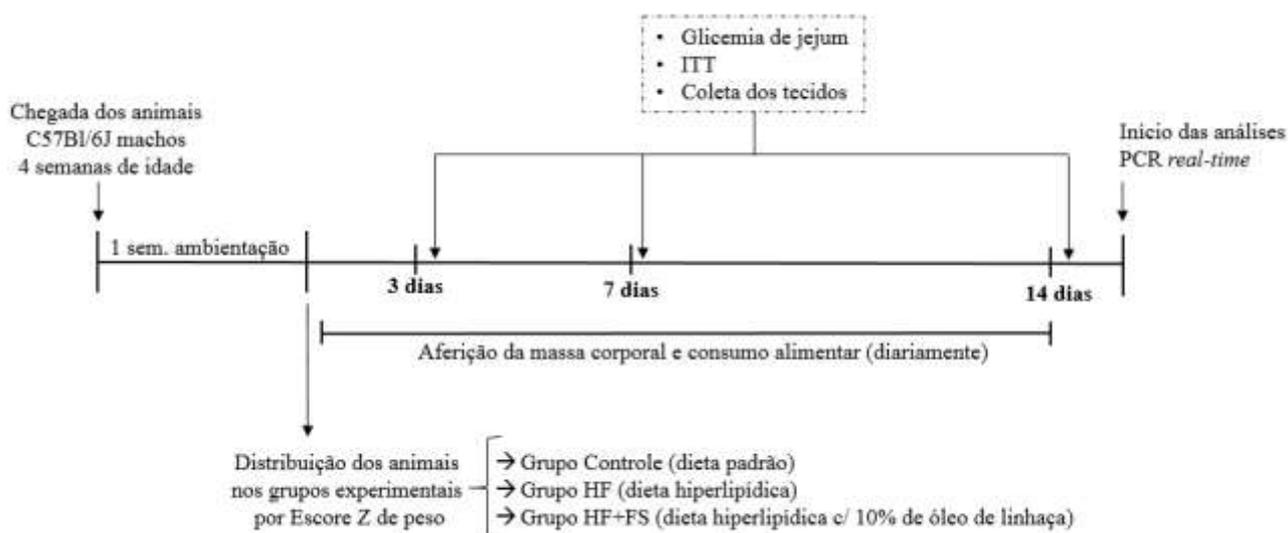


Figura 1. Esquema do desenho experimental destacando as principais etapas da experimentação animal.

4.2 Delineamento experimental

Ao início do período experimental, os animais foram randomizados em seus grupos experimentais pelo método do escore Z de distribuição por peso. Foram mantidos em gaiolas individuais, recebendo dietas específicas por três, sete ou quatorze dias. O grupo CT (controle) recebeu ração comercial (Nuvilab[®]); o grupo HF recebeu dieta hiperlípica e o grupo HF+FS recebeu dieta hiperlipídica com conteúdo de 10% da fração banha substituída por óleo de linhaça. A distribuição do percentual energético por macronutriente, a composição dos ingredientes bem como a composição dos ácidos graxos das dietas estão detalhadas, respectivamente nas tabelas 1, 2 e 3.

Para aferição da massa corporal foi utilizado balança analítica (Sartorius[®]) e uma caixa acrílica de 10x6x4 cm. Essa dimensão da caixa utilizada para contenção do animal durante aferição do peso facilitou a realização da medida por reduzir a movimentação do camundongo, sem causar estresse ao animal.

O consumo alimentar foi realizado diariamente e individualmente, ofertando-se quantidade conhecida da ração ou dieta, e após 24 horas de exposição, realizou-se a aferição das sobras para estimar a quantidade ingerida pelo animal.

Tabela 1 – Composição de macronutrientes das dietas

Macronutrientes	Dieta padrão (Nuvilab [®])	<i>High fat</i>	<i>High fat + Flaxseed Oil (10%)</i>
Proteína	22%	20,3%	20,3%
Carboidratos	56%	34,7%	34,7%
Fibras	8%	5%	5%
Gorduras	4%	35,2%	35,2%
Energia	3,48Kcal/g	5,43 kcal/g	5,43 kcal/g

Tabela 2 – Composição das dietas experimentais (g/Kg)

Ingredientes	<i>High fat</i>	<i>High fat + Flaxseed Oil (10%)</i>
Amido de milho	115.5	115.5
Caseína	200	200
Amido de milho dextrinizado	132	132
Sacarose	100	100
Celulose	50	50
Óleo de soja	40	40
Banha de porco	312	208
Óleo de linhaça	0	104
Mix de minerais	35	35
Mix de vitaminas	10	10
L-Cistina	3	3
Bitartarato de Colina	2.5	2.5

Dietas baseadas na AIN-93 – American Institute of Nutrition – 1993.

Tabela 3 – Composição de ácidos graxos das dietas (% do total de lipídios)

Ácidos graxos	Dieta padrão	High fat	High fat + Flaxseed Oil (10%)
C14:0	0.56±0.22	1.68±0.04 [#]	0.03±0.01 ^b
C16:0	13.2±0.06	22.2±0.64 ^a	15.8±1.29 ^b
C18:0	3.01±0.52	11.18±0.12 ^{#a}	9.12±0.2 ^b
C20:0	0.02±0.01	0.9±0.09 ^a	0.22±0.01 ^b
C22:0	-	0.07±0.01	0.12±0.01
Σ ácidos graxos saturados	17.22±0.12	36.62±1.18 ^a	26.02±2.01 ^b
C16:1 ω7	0.09±0.01	1.18±0.05	1.0±0.07
C18:1 ω9	29.33±1.02	43.12±1.1 ^{#a}	33.12±0.09 ^b
Σ MUFA	29.56±0.18	44.72±2.81 ^{#a}	34.22±1.8 ^b
C18:2 ω6	50.62±0.53	16.13±0.47 [#]	18.13±0.8
C18:3 ω3	5.83±1.02	1.3±0.09 ^{#a}	16.42±0.09 ^b
C20:4 ω6	0.28±0.02	0.21±0.01	0.18±0.01
C20:5 ω3	-	0.01±0	0.01±0
Σ PUFA	57.12±1.22	18.27±0.17 ^{#a}	35.22±0.9 ^b
Σ ω6	51.0±1.09	16.98±1.9 [#]	18.57±3.1
Σ ω3	5.83±1.02	1.35±0.08 ^{#a}	16.47±0.93 ^b
ω6: ω3 razão	8.7 : 1	12.5 : 1	1.1 : 1

4.3 Avaliação do perfil glicêmico

Para avaliar sensibilidade à insulina, após 8 horas de jejum, foi determinada a glicemia por punção caudal, utilizando-se glicosímetro Accu-Chek[®] - modelo Active. Primeiramente foi dosada a glicemia de jejum, equivalente ao tempo zero para o teste de glicemia de jejum. Em seguida foi administrado insulina regular (Humulin[®]) intraperitoneal (2 U/Kg de peso corporal) e mensurada a glicemia nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a infusão do hormônio. Para o cálculo da constante de decaimento da glicose, foi utilizado do software InStat GraphPad.

4.4 Extração dos tecidos

Após 8 horas de jejum os animais foram sedados e anestesiados por infusão intraperitoneal de xilazina (0,5 $\mu\text{L/g}$ de peso animal) e cetamina (1-1,5 $\mu\text{L/g}$ de peso animal) no quadrante posterior do abdome, do lado direito do animal. Os devidos cuidados foram tomados para uma correta contenção manual e procedimento de anestesia, pois uma perfeita contenção reduz o estresse do animal (Menezes 2013). O início do procedimento cirúrgico ocorreu apenas após completa ausência de resposta a todos os estímulos realizados no camundongo.

Para a coleta dos tecidos os animais foram colocados em posição de decúbito dorsal, prendendo as patas com fitas autoadesivas. Em seguida foi aplicado álcool 70% com auxílio de gaze em toda a extensão do tórax e abdome para realizar laparotomia. Após abertura do tórax, o coração foi exposto para realização da punção cardíaca, utilizando-se seringa de 1 mL e agulha hipodérmica 0,45 x 13mm (26G x 1/2’’).

Logo após a coleta do sangue o intestino foi completamente removido, junto ao tecido adiposo mesentérico e epididimal. Para padronização da porção do íleo distal, considerou-se aproximadamente 25% do comprimento do intestino delgado adjacentes ao cécum (F. Canonne-Hergaux, S. Gruenheid, P. Ponka 1999) de acordo com a figura 2.

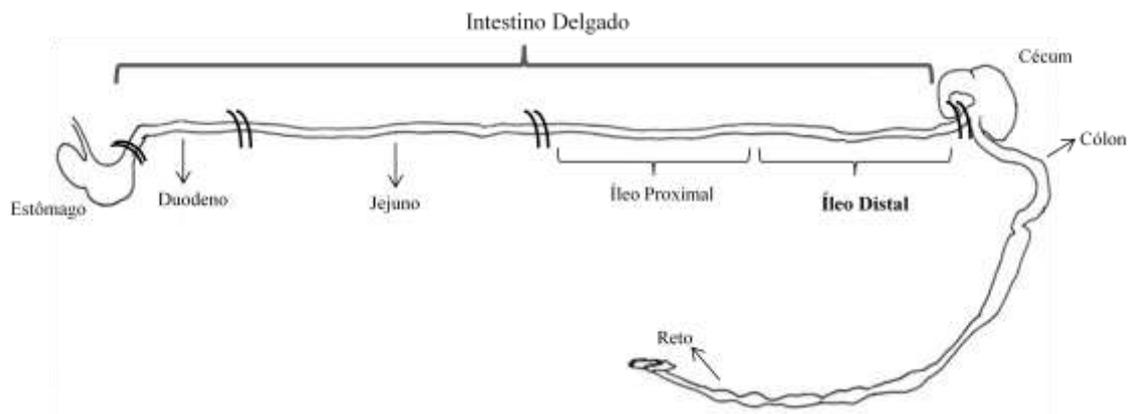


Figura 2. Representação esquemática dos segmentos do intestino de camundongo para localização do íleo distal, porção removida na coleta de amostra do presente estudo. Adaptado (F. Canonne-Hergaux, S. Gruenheid, P. Ponka 1999).

4.5 PCR em tempo real

Os fragmentos de ileo distal destinados à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (*real time PCR*), após sua coleta foram imediatamente armazenados em 1 mL de Trizol[®] (Life TechnologiesTM) à -80 °C até que as etapas seguintes fossem realizadas. Posteriormente os tecidos foram homogeneizados e realizada a extração do RNA total.

A extração do RNA foi realizada adicionando-se 200 µL de clorofórmio em cada amostra e submetendo-a a centrifugação a 10.500 rpm, na temperatura de 4 °C, por 15 minutos. Em seguida coletou-se o sobrenadante (fase em que o RNA está presente), transferindo-o para um novo tubo (livre de RNase) para realização de lavagens com álcool isopropílico, álcool etílico 70% e 100% (diluídos em água tratada com DEPC da Thermo Fisher[®]), para completa retirada do fenol presente nas amostras. Posteriormente o RNA foi diluído em água DEPC (30 µL) e quantificado em espectrofotômetro (Biotek[®]) pelo *software* Gen 5.

Removeu-se a DNA genômico por reação enzimática da DNase (Takara, 2270A) seguindo as recomendações do fabricante e em seguida nova quantificação da concentração total de RNA foi realizada. Para a conversão do RNA em cDNA utilizou-se o kit *High Capacity* cDNA (Applied Biosystems, #4368813). Foi realizado eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da integridade do RNA.

Finalmente, realizou-se a reação em cadeia da polimerase em tempo real por Taqman para os genes alvos IL1 β (Mm00434228_m1), IL-6 (Mm00446190_m1), TNF- α (Mm00443258_m1), IL-10 (Mm0439614_m1), Claudina 7 (Mm00516817_m1), *Tight junction protein 1* (Tjp1) (Mm00493699_m1) referente ao gene da ZO1, Receptor 4 de ácidos graxos livres (FFR4) (Mm00725193_m1) referente ao GPR120 e Receptor 1 de ácidos graxos livres (FFR1) (Mm00809442_m1) referente ao GPR40 em aparelho StepOnePlus (Applied Biosystems). A expressão de cada gene foi normalizada pelo gene endógeno GAPDH (Mm99999915_g1).

Para tratamento e análise dos resultados, logo após o término da corrida as triplicatas foram avaliadas e excluídas as amostras que não seguiram o mesmo padrão de amplificação da mesma amostra, bem como o padrão do grupo do tratamento. Em seguida, utilizando-se o *software* do equipamento de PCR StepOnePlus, os dados de posição do *Baseline*, bem como *Threshold* foram configurados seguindo-se as recomendações do fabricante do aparelho.

4.7 Análises estatísticas

As variáveis em estudo foram submetidas ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov para verificar a simetria. Para variáveis com distribuição normal, foi utilizado o Teste “t” de Student, para comparação de duas amostras independentes. As variáveis com três ou mais grupos foram submetidas à análise de variância pelo teste Anova e ao teste *pós-hoc* de Tukey, para determinação da significância. Para todos os testes foram adotados o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Evolução Ponderal, Consumo Alimentar e Eficiência Energética da Dieta

Ao final do período experimental, todos os grupos apresentaram ganho de peso. Houve diferença na média de massa corporal após 2, 3 e 7 dias de consumo das dietas experimentais quando comparados os grupos HF e HF+FS com o grupo controle (Figura 3A). Contudo, o delta da massa corporal, ao final de cada período de tratamento demonstrou que tanto o grupo HF, quanto o grupo HF+FS apresentaram ganho de peso significativo quando comparados ao grupo que recebeu dieta controle (Figura 3B-D). Em relação ao tamanho dos coxins adiposos, pode-se observar aumento significativo da massa do tecido adiposo epididimal, após três dias apenas no grupo HF ($p=0,007$). Nos tempos seguintes de sete e quatorze dias de tratamento, ambos os grupos HF e HF+FS apresentaram diferença na massa do tecido adiposo epididimal quando comparados ao grupo Ctl (Figura 3E-G).

A ingestão calórica e em gramas das dietas HF ($24,07 \text{ kcal} \pm 1,88 / 4,43 \text{ g} \pm 0,34$) e HF+FS ($24,39 \text{ kcal} \pm 2,10 / 4,49 \text{ g} \pm 0,38$) foram diferentes do grupo Ctl ($10,73 \text{ kcal} \pm 2,22 / 3,08 \text{ g} \pm 0,63$) logo no primeiro dia de exposição às dietas ($p<0,05$). Contudo, a quantidade de dieta ingerida em gramas pelos HF e HF+FS foi reduzida no segundo dia de tratamento, de modo que o valor consumido foi semelhante à ingerida pelo grupo Ctl ao longo do período experimental (Figura 4A). No entanto no terceiro dia de tratamento, o grupo HF+FS ainda apresentou maior consumo calórico quando comparado ao controle ($p=0,04$) e no sétimo dia tanto o grupo HF ($p=0,003$), quanto o grupo HF+FS ($p=0,04$) apresentaram maior ingestão calórica. Ao final do tratamento, apenas o grupo HF+FS manteve maior consumo calórico ($p=0,008$) versus o grupo que consumiu ração (Figura 4B).

A eficiência energética, ou Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA), é obtida através da razão entre o ganho de peso médio (em gramas) por animal durante o tempo de tratamento, dividido pela média de consumo (em gramas) durante mesmo período. Na tabela 4 é retratado o resultado do CEA, onde se observa resumidamente, nítida eficiência alimentar nos grupos que receberam dieta rica em gordura (HF e HF+FS) em comparação ao grupo CT. Interessantemente, os animais demonstraram aumento progressivo da eficiência em converter a dieta ingerida em peso vivo. Ao final de

quatorze dias de consumo, os grupos HF e HF+FS foram respectivamente, 145% e 112% eficientes para converter as dietas em massa corporal.

Figura 3 – Evolução ponderal

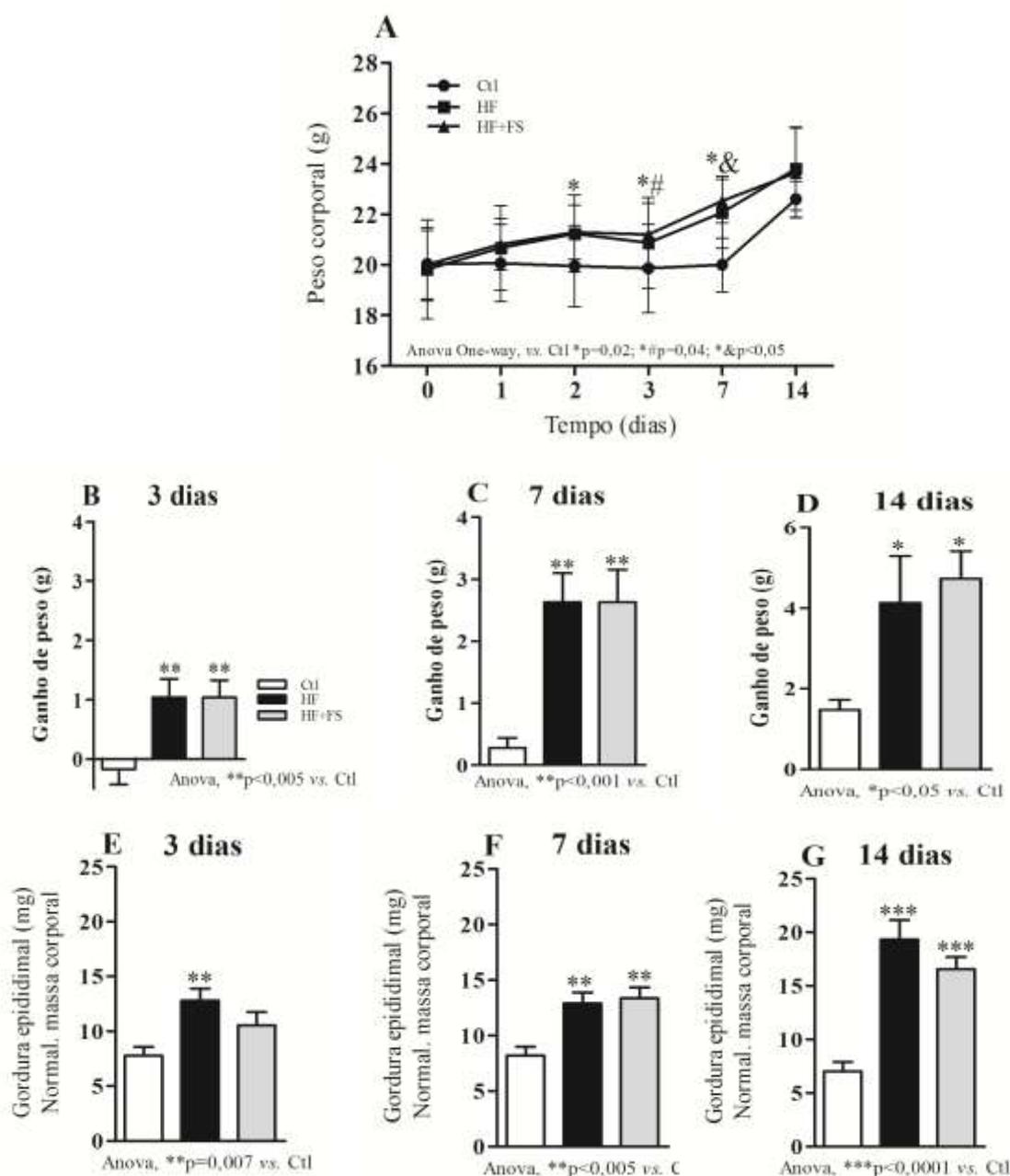


Figure 3 – Evolução ponderal. (A) – Variação do peso corporal de cada grupo durante o período experimental. (B) – Ganho de peso após três dias de tratamento (delta de peso) (C) – de peso após sete dias de tratamento (delta de peso). (D) – de peso após quatorze dias de tratamento (delta de peso) (E) – Gordura epididimal normalizada pelo peso corporal após três dias de tratamento. (F) – Gordura epididimal normalizada pelo peso corporal após sete dias de tratamento. (G) – Gordura epididimal normalizada pelo peso corporal após quatorze dias de tratamento. Os gráficos de barra e de linhas representam as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental, Ctl (n=6-11); HF (n=6-11); HF+FS (n=7-12).

Tabela 4 – Ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar (CEA)

Grupos experimentais / Tempo de tratamento	Ganho de peso (g)	Consumo alimentar (g)	CEA
CT (3 dias)	0.58 ± 0.33 ^a	4.04 ± 1.05 ^a	0.15 ± 0.09 ^a
HF (3 dias)	1.72 ± 0.58 ^b	2.93 ± 0.25 ^a	0.59 ± 0.24 ^b
HF+FS (3 dias)	1.50 ± 0.55 ^b	3.51 ± 0.56 ^a	0.42 ± 0.11 ^b
CT (7 dias)	0.72 ± 0.50 ^a	3.29 ± 0.39 ^a	0.21 ± 0.12 ^a
HF (7 dias)	2.60 ± 0.70 ^b	2.70 ± 0.17 ^b	0.96 ± 0.28 ^b
HF+FS (7 dias)	2.36 ± 0.30 ^b	3.16 ± 0.46 ^{a,b}	0.75 ± 0.11 ^c
CT (14 dias)	1.08 ± 0.51 ^a	3.25 ± 0.09 ^a	0.33 ± 0.15 ^a
HF (14 dias)	3.80 ± 1.08 ^b	2.58 ± 0.32 ^a	1.45 ± 0.34 ^b
HF+FS (14 dias)	3.28 ± 0.61 ^b	3.32 ± 1.02 ^a	1.12 ± 0.55 ^b

Figura 4 – Consumo alimentar e seu equivalente calórico

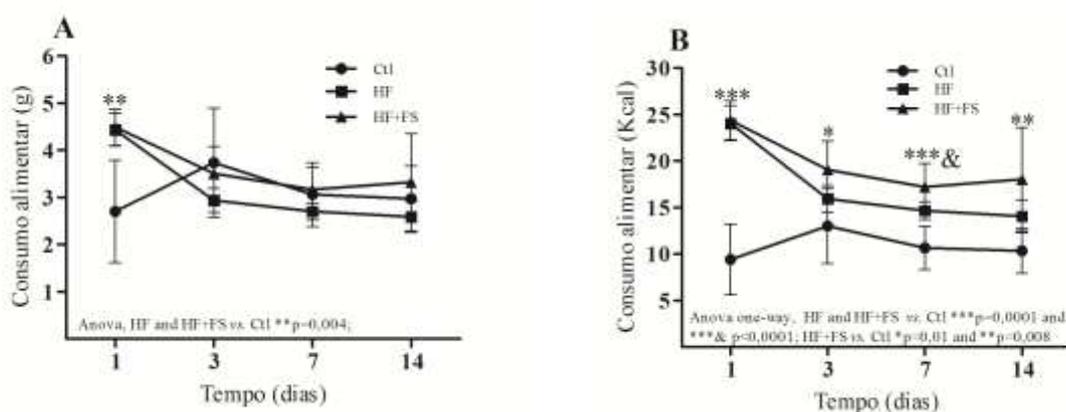


Figure 4 – Consumo alimentar e seu equivalente caloric. (A) – Ingestão alimentar (g) dos camundongos C57BL/6J alimentados com dieta padrão (Ctl), hiperlipídica (HF) e em consumo de dieta hiperlipídica substituída em 10% por óleo de linhaça (HF+FS) durante 14 dias. (A) - Ingestão alimentar em gramas; (B) - Consumo calórico. Os gráficos de linhas representam as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental, n=6 para todos os grupos.

5.2 Perfil glicêmico

O teste de tolerância à insulina demonstra similaridade entre os grupos (Ctl, HF e HF+FS), após três e sete dias de consumo das dietas gordurosas. Contudo, após quatorze dias o grupo HF+FS apresentou maior taxa de remoção de glicose, quando comparado ao grupo Ctl e ao grupo HF ($p < 0,05$) (Figura 5D, E e F).

A glicemia de jejum foi maior nos animais tratados com dieta HF durante três (***) $p < 0,0001$) e sete dias (**) $p = 0,002$) em comparação ao grupo controle (Figura 5A e B). Interessantemente, após sete dias de tratamento os animais que consumiram dieta hiperlipídica com o óleo de linhaça apresentaram valor médio de glicemia de jejum menor que a do grupo HF (***) $p = 0,0002$).

Figura 5 – Perfil Glicêmico

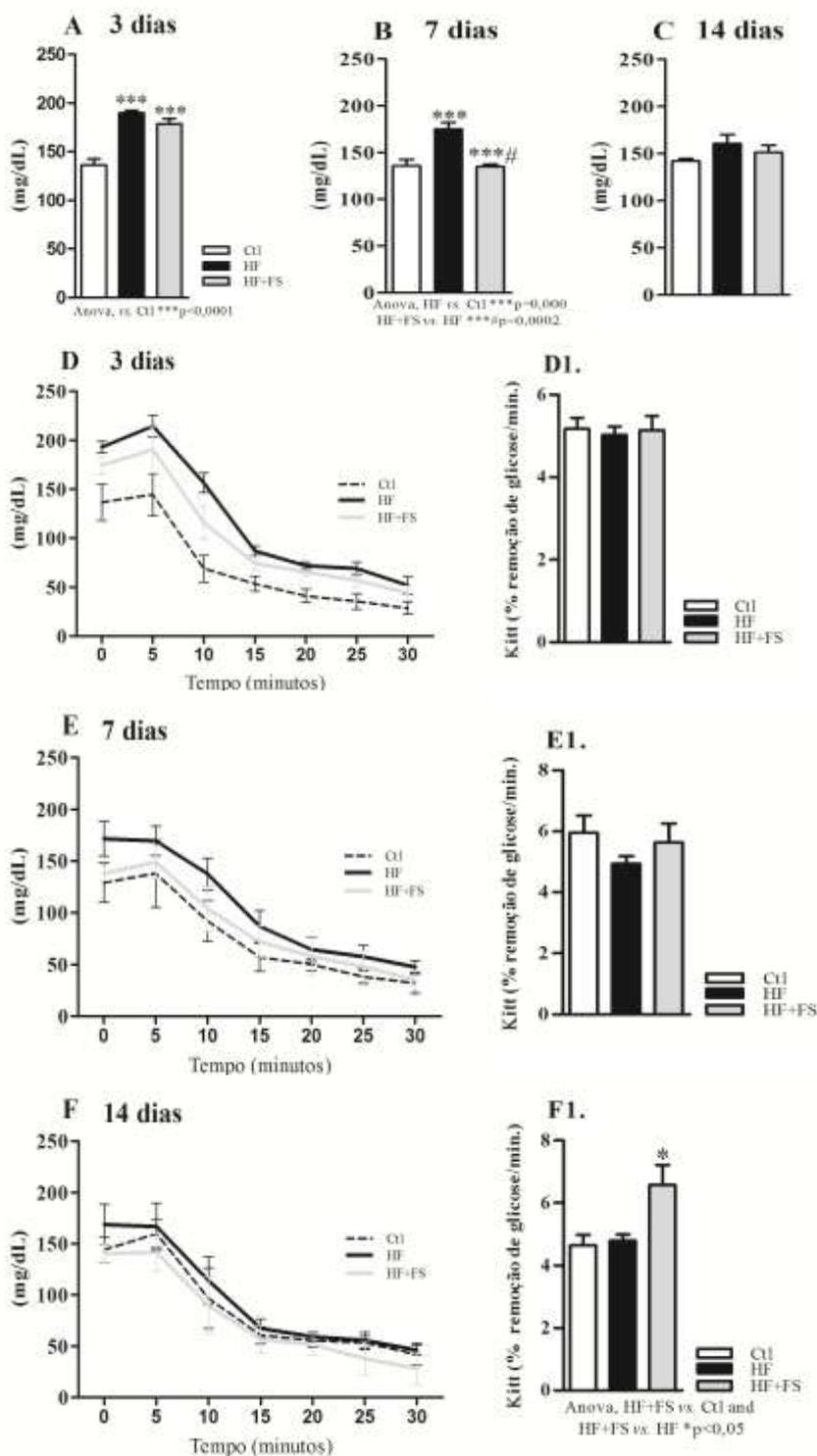


Figura 5 – Perfil Glicêmico. (A) – Glicemia de jejum após três dias de tratamento. (B) – de jejum após sete dias de tratamento. (C) – de jejum após quatorze dias de tratamento. (D) – Níveis de glicose durante teste de intolerância à insulina (D1) – Constante de decaimento da glicose (Kitt) (%min) após três dias de tratamento. (E) Níveis de glicose durante teste de intolerância à insulina (E1) Constante de decaimento da glicose (Kitt) (%min) após sete dias de tratamento. (G) – Níveis de glicose durante teste de intolerância à insulina (G1) – Constante de decaimento da glicose (Kitt) (%min) após quatorze dias de tratamento. Os gráficos de barra e de linhas representam as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental, Ctl (n=6-11); HF (n=6-11); HF+FS (n=7-12).

5.3 Alterações na expressão gênica de citocinas inflamatórias no íleo distal após consumo de dieta HF

Após três dias de consumo da dieta gordurosa, o grupo HF apresentou aumento de 50% no conteúdo de transcritos de TNF α quando comparado ao grupo Ctl, porém esse aumento não apresentou diferença significativa (Figura 6A). Curiosamente, o grupo que recebeu a dieta gordurosa com o óleo de linhaça, após três dias de consumo não apresentou aumento no TNF α , mas uma tendência em 46% menos desses transcritos quando comparados ao grupo HF (Figura 6A). Seguindo o período do tratamento, observou-se uma redução significativa na expressão do TNF α tanto no grupo HF quanto no HF+FS (**p=0,001) após sete dias de consumo. Ao final de quatorze dias de exposição às dietas experimentais, a expressão do TNF α no íleo distal dos animais dos grupos HF e HF+FS não apresentou alterações quando comparados ao grupo controle (Figura 6A).

Os animais em consumo de dieta hiperlipídica apresentaram diferentes níveis de expressão gênica de IL1 β no intestino. Observou-se aumento significativo e progressivo desses transcritos no grupo HF, quando comparados ao grupo controle, após sete (*p=0,02) e quatorze dias (**p=0,003). Contudo, o grupo HF+FS apresentou redução nos níveis de IL1 β no 14º dia de consumo da dieta, quando comparado ao grupo HF (*#p<0,05) (Figura 6B).

Em relação aos níveis gênicos da IL6, apesar do grupo HF ter apresentado tendência em reduzir 40% após 3 dias, aumentar 25% após 7 dias e reduzir novamente em quase 30% após 14 dias de consumo da dieta gordurosa, essas alterações não foram significativas. No grupo HF+FS foi observado perfil semelhante ao grupo HF após 3 e 7 dias de exposição à dieta experimental, entretanto, após 14 dias houve aumento significativo do conteúdo gênico de IL6 (*p=0,03) quando comparado ao grupo HF (Figura 6C).

Observou-se considerável redução dos níveis da IL10 no íleo distal em animais que consumiram dieta gordurosa após três dias, tanto no grupo HF (**p<0,0001) quanto no grupo HF+FS (**p<0,005) quando comparados aos níveis do grupo controle. Apesar da tendência no aumento do conteúdo gênico da IL10 após 7 dias e redução após 14 dias de consumo das dietas experimentais, essas variações não apresentaram diferenças significantes comparado ao grupo controle (Figura 6D).

Figura 6 – Marcadores de transcritos inflamatórios

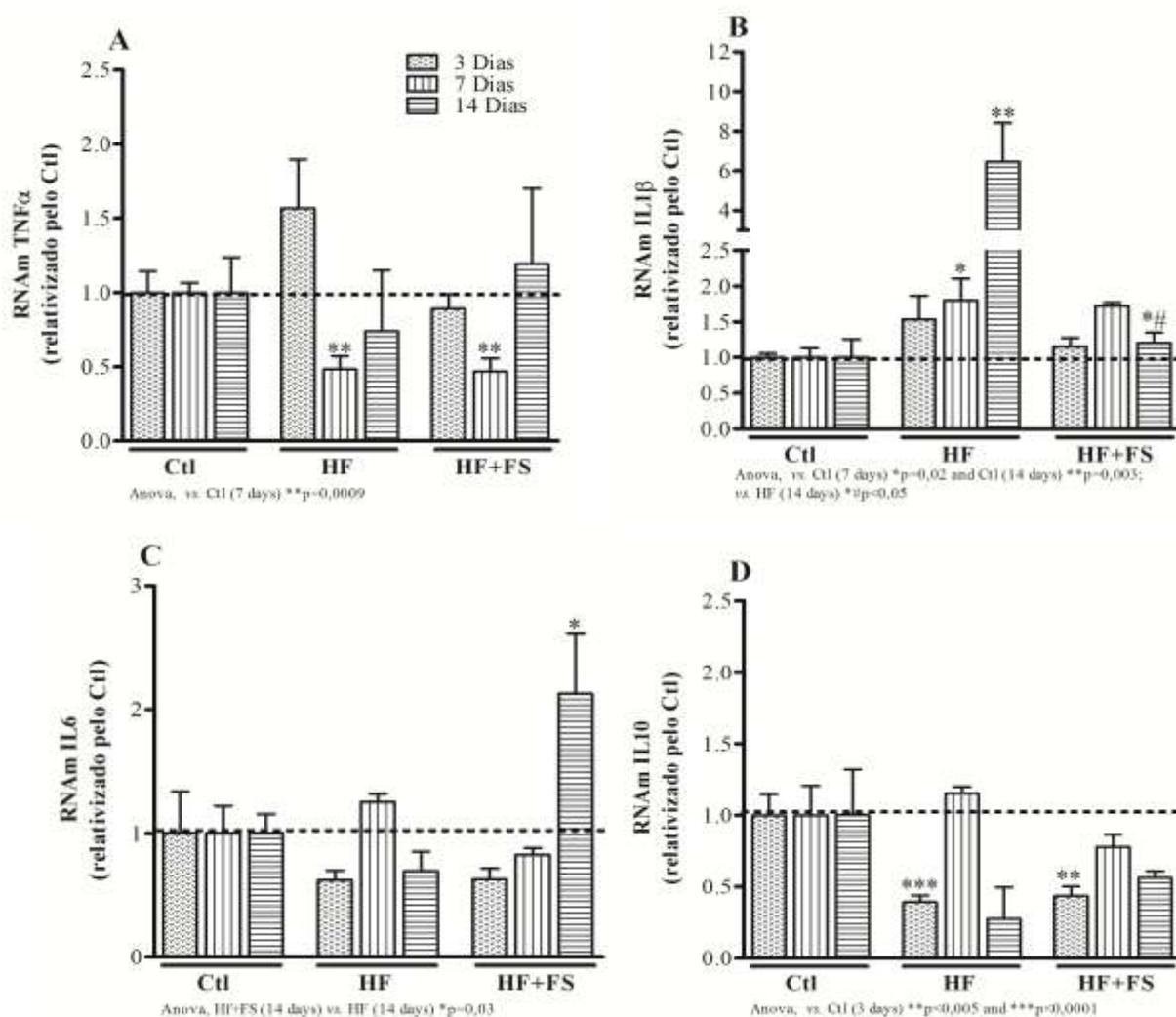


Figura 6 – Marcadores de transcritos inflamatórios. Quantificação de RNA mensageiro que codifica citocinas inflamatórias (A) TNF α , (B) IL1 β ou (C) IL6 e anti-inflamatórias (D) IL10 após 3, 7 ou 14 dias de consumo de HF ou HF+FS. Os gráficos de barras representam as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental, Ctl (n=4-6); HF (n=5-6); HF+FS (n=4-6).

5.4 Expressão gênica intestinal dos receptores de ácidos graxos GPR120 e GPR40

Não houve modulação da expressão gênica do receptor de ácidos graxos GPR120 durante o consumo de dieta hiperlipídica nos tempos de três, sete ou quatorze dias (Figura 7A). Contudo, após quatorze dias de consumo o grupo HF apresentou uma tendência em expressar 36% mais GPR120 quando comparado ao grupo Ctl.

Apesar do aumento em quase 50% dos transcritos de GPR40 nos grupos HF e HF+FS após 3 dias do tratamento, esse aumento não foi significativo (Figura 9B). Conquanto, após 7 dias de consumo das dietas experimentais, foi observado um aumento de 83% de GPR40 no grupo HF ($p < 0,0001$) e de 124% no grupo HF+FS ($p < 0,0001$) quando comparados ao grupo Ctl (Figura 9B). Não foi encontrada diferença nos níveis gênicos do GPR40 após 14 dias, entretanto, o grupo HF+FS demonstrou uma tendência em manter maiores quantidades desses transcritos (Figura 7B).

Figura 7 – Transcritos dos receptores GPR120 e GPR40

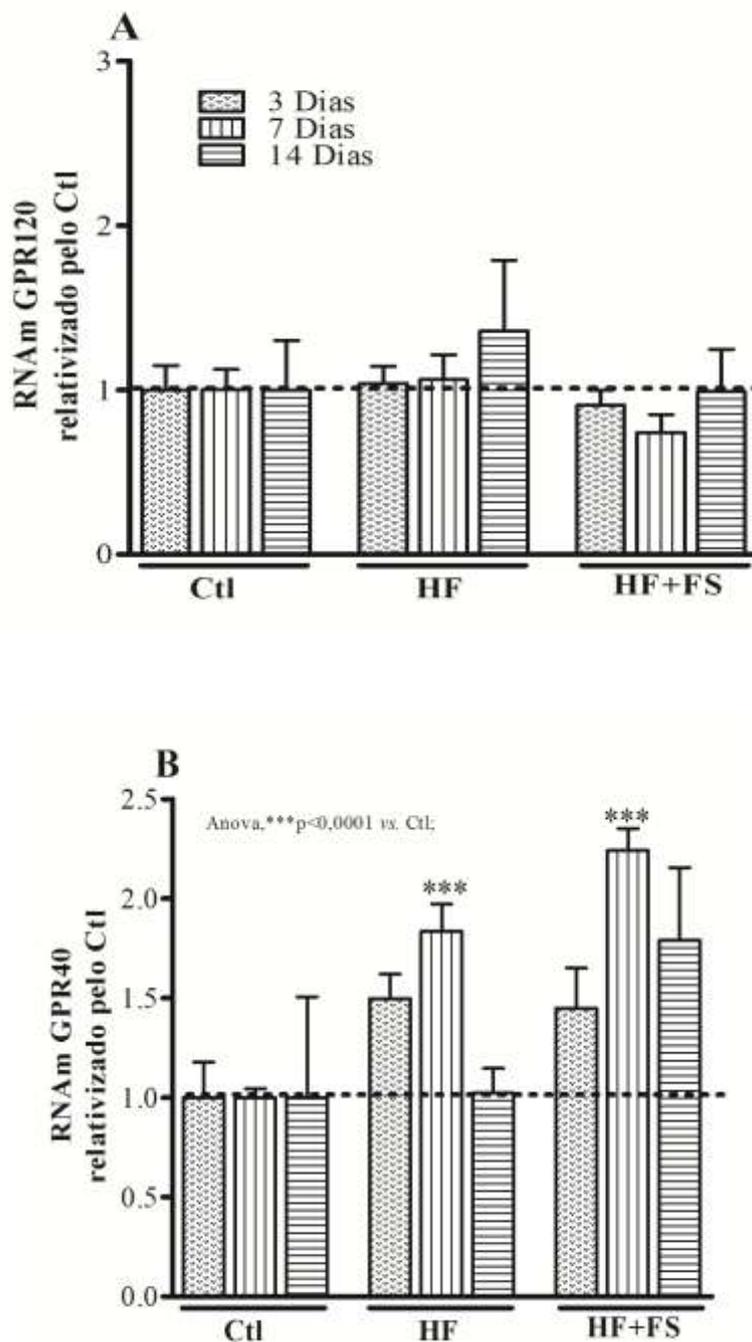


Figura 7 – Transcritos dos receptores GPR120 e GPR40. Quantificação dos RNA mensageiros que codificam (A) GPR120 (B) GPR40 após 3, 7 ou 14 dias de consumo de HF ou HF+FS. Os gráficos de barras representam as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental, $n=5-6$ para todos os grupos.

5.5 Expressão gênica de componentes da junção celular ZO-1 (Tjp1) e claudina-7 (Cldn-7)

A permeabilidade intestinal foi avaliada de forma indireta, realizando-se a mensuração da expressão gênica de dois componentes envolvidos na adesão celular (ZO-1 e claudina 7) (Figura 8A e B).

Curiosamente, após três dias de consumo das dietas gordurosas, os grupos HF e HF+FS aumentaram a quantidade de transcritos de ZO-1 em 43% ($p<0,05$) e 60% ($p<0,01$), respectivamente, quando comparados ao grupo Ctl (Figura 8A). Entretanto, após sete dias de exposição, apenas o grupo HF+FS manteve maiores níveis gênicos de ZO-1 versus o grupo controle ($p<0,001$) (Figura 8A). Ao término de quatorze dias de tratamento, não foram observadas diferenças significativas nas quantidades de ZO-1 entre os grupos.

Em relação à claudina 7, após três dias de tratamento, os animais do grupo HF e HF+FS apresentaram considerável redução na quantidade de transcritos de claudina-7 ($p<0,05$) (Figura 8B). Apesar de não ter havido diferenças significativas após sete dias de consumo, o grupo HF+FS apresentou tendência em manter níveis de claudina 7 mais próximos aos níveis do grupo controle (Figura 8B). Por fim, ao final de quatorze dias de ingestão das dietas, não foi verificada diferenças na expressão de Cldn7 entre os grupos.

Figura 8 – Transcritos dos componentes de adesão celular

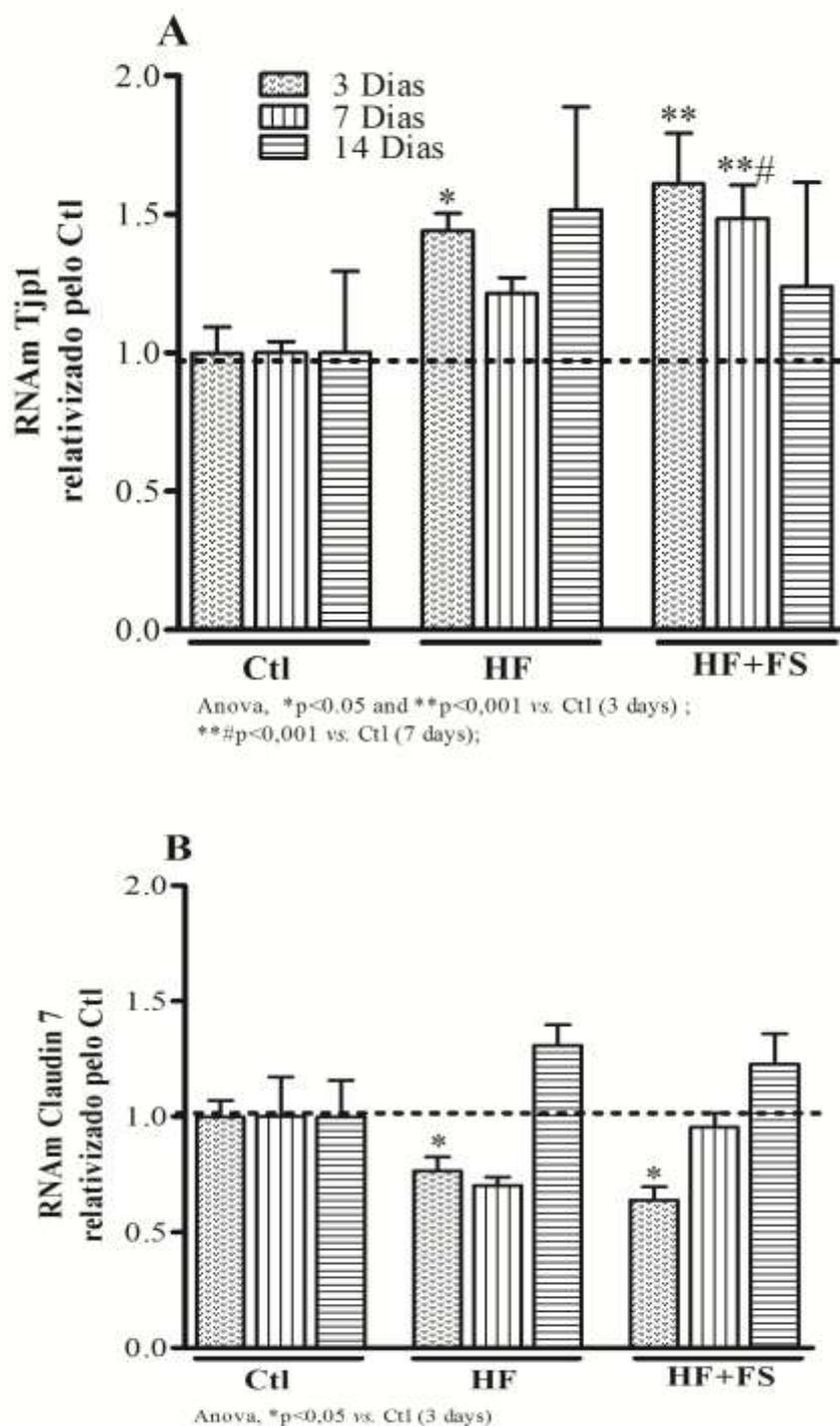


Figura 8 – Transcritos dos componentes de adesão celular. Quantificação dos RNA mensageiros que codificam (A) ZO1 (B) Claudina 7 após 3, 7 ou 14 dias de consumo de HF ou HF+FS. Os gráficos de barras representam as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental, n=5-6 para todos os grupos.

6. DISCUSSÃO

Há mais de 70 anos tem se discutido os efeitos do consumo de dietas ricas em gordura e os prejuízos ao organismo humano e animal, principalmente quando esse desequilíbrio é mantido por longo prazo (Himsworth 1940). A instalação do processo inflamatório crônico e de baixo grau cursa com interferência em diversas vias de sinalização, assim como a da insulina, causando resistência à transdução do hormônio. Contudo, estudos mais recentes demonstraram os efeitos deletérios do consumo de HFD, que antecedem o surgimento da obesidade (Lanthier et al. 2010; Lee 2011; Patrone et al. 2012) e podem estar presentes mesmo sob o consumo agudo de quantidades excessivas desse nutriente. Em 2012, Thaler et al., verificaram que consumo de dieta rica em gordura por um período de três dias já seria capaz de aumentar marcadores inflamatórios no hipotálamo de animais (Thaler et al. 2012). Outros estudos observaram ativação de células de Kupffer, resistência hepática à insulina (Lanthier et al. 2010), e aumento da permeabilidade intestinal associada com depleção de eosinófilos no intestino (Johnson et al. 2015) após consumo de HFD em curto prazo.

Após curtos períodos de consumo de HF, os resultados deste trabalho, no que tange os achados fisiológicos, evidenciaram influências no peso corporal, adiposidade e consumo alimentar de forma semelhante aos observados na literatura. Nesse contexto, houve aumento da massa corporal com considerável hipertrofia do tecido adiposo, além de um pico de ingestão após o primeiro dia de oferta da dieta, mas que gradualmente foi reduzido (Ji 2012; Lanthier et al. 2010; Lee 2011; Williams et al. 2014).

Williams e colaboradores, ao avaliarem camundongos que consumiram dieta rica em gordura, porém com ingestão calórica controlada, verificaram que após curto período de exposição à dieta, os animais apresentaram aumento na massa de tecido adiposo, mesmo sem alterar a massa corporal total. Interessantemente, no presente estudo foi observado que, após três dias de ingestão, o grupo que consumiu a dieta hiperlipídica contendo óleo de linhaça aumentou sua massa corporal, porém a massa do tecido adiposo epididimal foi menor que a do grupo que recebeu a dieta hiperlipídica. Sugere-se uma avaliação mais detalhada da composição corporal por análise por DEXA e massa dos compartimentos de gordura (tecidos adiposos subcutâneo, mesentérico,

supra renal, epididimal e marrom), de animais em consumo de dietas hiperlipídicas com e sem a substituição em 10% da gordura animal por óleo de semente de linhaça.

Em estudos que avaliaram os efeitos da substituição em 10% da fração saturada da dieta hiperlipídica, por óleo de linhaça em animais obesos, observaram que esses animais apresentavam menor ganho de peso e adiposidade corporal em relação aos seus controles obesos. Esses efeitos biológicos foram relacionados à redução na ingestão alimentar e em marcadores inflamatórios em órgãos periféricos e hipotálamo (Cintra et al. 2012; V Oliveira et al. 2015).

Quanto ao perfil glicêmico, foi observado aumento nos níveis basais de glicose circulante, entretanto com quadro de resistência à insulina ausente. De forma consistente aos dados observados neste estudo, outros que avaliaram o metabolismo glicídico pelo teste de *clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico* em roedores após curto consumo de HFD, também não observaram resistência periférica à insulina, mas resistência hepática ao hormônio e aumento significativo nos níveis basais de glicemia (Lanthier, 2009 e Lee, 2011). Juntamente a tais observações, acredita-se que o aumento na produção hepática de glicose (Lee, 2011) seja também efeito do consumo agudo de dieta rica em gordura e que pode justificar o aumento na glicemia de jejum, mesmo sob ausência da sensibilidade periférica à insulina. No presente trabalho, verificou-se que a presença do óleo de linhaça na dieta hiperlipídica, foi capaz de modificar a resposta glicídica dos animais após sete dias, por manter os níveis da glicemia de jejum semelhantes ao do grupo controle e após quatorze dias de ingestão por apresentar maiores taxas de decaimento da glicose em teste de tolerância à insulina.

Os ácidos graxos poli-insaturados além de atuarem na geração de lipídios bioativos envolvidos em atividade anti-inflamatória, como as resolvinas, eles podem também ativar receptores presentes na membrana plasmática de diversos tecidos (White 2014). Em modelo de obesidade a melhora na homeostasia do metabolismo glicídico após tratamento com ácidos graxos poli-insaturados dietéticos tem sido atribuída à ativação de receptores GPR120 presentes no fígado, músculo e tecido adiposo (V. Oliveira et al. 2015).

Além disso, muito se tem discutido a respeito do papel do GPR40 no controle glicêmico, pois sua ativação está fortemente ligada ao aumento da secreção de insulina, independente da glicose (Moran, Flatt, and McKillop 2016). O GPR40 é amplamente distribuído em tecidos que controlam a homeostase glicêmica, como as células β pancreática e enteroendócrinas do tipo I, K e L, que são responsáveis pela secreção dos

hormônios colecistoquinina (CCK), peptídeo inibidor gástrico (GIP) e GLP-1, respectivamente (Mancini and Poitout 2013). Nesse contexto, apesar de haver evidências demonstrando mecanismos envolvidos no aumento da secreção de insulina por ativação das subunidades $G\alpha_{q11}$ gerando aumento da concentração intracelular de cálcio, via ativação da fosfolipase C (PLC), ainda não são claras todas as etapas nessa sinalização celular que estimula a exocitose dos grânulos de insulina (Moran et al. 2016; L. Wang et al. 2011).

Além dos tecidos metabólicos que controlam a homeostase glicêmica os tecidos de barreira, como o epitélio, também responde aos estímulos inflamatórios oriundos da alimentação (Ménard, Cerf-Bensussan, and Heyman 2010). O epitélio não atua apenas como barreira física da mucosa, mas como integrante ativo na regulação do sistema imune inato e adaptativo (Kurashima, Goto, and Kiyono 2013). As células do epitélio intestinal expressam uma grande variedade de receptores de moléculas pró e anti-inflamatórias, incluindo $TNF\alpha$ e IL10. O $TNF\alpha$, além de outras moléculas pró-inflamatórias como a IL13 e o $IFN\gamma$ (interferon gama), podem afetar a função de barreira do epitélio por alterarem o padrão de expressão de proteínas componentes do sistema de adesão e junção celular, porém, a IL10 pode atuar de maneira contrária, normalizando a expressão das *tight junctions* (Pitman and Blumberg 2000).

O tipo e as quantidades de citocinas inflamatórias expressas no intestino em resposta ao consumo de dieta hiperlipídica, parece ser dependente do tempo de exposição. Wang e colaboradores observaram por técnica de imunohistoquímica aumento progressivo dos níveis intestinais de $TNF\alpha$ em roedores durante nove dias de consumo de HF (N. Wang et al. 2013). Em estudo de caracterização do perfil imunológico intestinal após consumo de dieta hiperlipídica, verificou-se que após sete dias o íleo distal apresentou redução nos níveis de $TNF\alpha$ e da MCP-1 (Johnson et al. 2015). O consumo mais prolongado de seis e dezesseis semanas parece retomar os elevados níveis de $TNF\alpha$ expressos no intestino (Ding et al. 2010), de maneira dependente à microbiota intestinal. Além disso, outros componentes do processo inflamatório intestinal como o $IFN\gamma$ e a interleucina 17 (IL-17) também mantiveram altos níveis de expressão após consumo de dieta hiperlipídica por doze a dezesseis semanas (Luck et al. 2015). Alguns trabalhos com modelos mais agressivos de inflamação intestinal apontam a IL6 como tendo importante papel no processo de disfunção da barreira do epitélio intestinal (Q. Wang et al. 2013; Yang et al. 2003). No presente trabalho, observamos significativo aumento nos transcritos de IL6 no íleo distal

apenas dos animais em consumo de HF contendo o óleo de linhaça após 14 dias. Contudo, nesses animais não foi observado redução dos transcritos de proteínas constituintes da adesão celular ou mesmo aumento nos transcritos pró-inflamatórios. Não há um consenso sobre o papel da IL-6 em mecanismos pró (Nullens et al. 2016; Yang et al. 2003), anti-inflamatório (Ropelle et al. 2010; Starkie et al. 2003) ou de regulação da permeabilidade intestinal (Suzuki, Yoshinaga, and Tanabe 2011). Maiores investigações sobre o papel da citocina IL6, de acordo com suas concentrações, tecido ou células alvo se fazem necessárias.

Os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias expressas no íleo distal dos animais no presente estudo, com exceção da IL1 β que apresentou aumento progressivo, parecem demonstrar alterações de *upregulation* após três dias, seguidas de *downregulation* ou retorno dos níveis basais após sete dias e por fim, novamente uma possível *upregulation* após quatorze dias de consumo de HF, como um processo de “*on-off-on*”. É possível que as alterações observadas no presente estudo, durante os três períodos de consumo agudo da HF sejam reflexos de resposta inata, e efeitos deletérios do consumo mais prolongado, observados em outros trabalhos, sejam reflexos de respostas do sistema imune inato e adaptativo em conjunto. Thaler e colaboradores (2012) observou algo semelhante no sistema nervoso central de roedores que consumiram HFD, e sugeriu que o desaparecimento temporário de marcadores inflamatórios, possa ser um mecanismo neuroprotetor para limitar os danos, porém, se o estímulo agressor persistir a resposta seria novamente “ligada”.

A ativação do processo inflamatório intestinal envolve muitos processos celulares, como alteração dos receptores nucleares PPARs, LXRs e FXRs (Wit et al. 2008), e em marcadores do estresse de retículo endoplasmático, causado pela produção exacerbada de mucina 2 (Gulhane et al. 2016). Esses processos celulares parecem estar presentes durante o consumo de dietas gordurosas. A ativação do NF- κ B em diferentes tipos celulares no intestino (Ding et al. 2010), o aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO) (de La Serre et al. 2010) bem como alterações nas proporções dos filamentos de bactérias presentes na microbiota intestinal (Lam et al. 2015) são mecanismos propostos como responsáveis pelo estado inflamatório de baixo grau induzido pela dieta hiperlipídica. Além disso, elevados níveis de TNF α , em cólon de ratos com obesidade induzida por dieta gordurosa, tem sido apontado como fator chave na ativação da via Wnt, que está relacionada ao desenvolvimento de câncer no cólon (Z. Liu et al. 2012).

Sabe-se que ômega 3 (ácido linolênico) exerce efeitos anti-inflamatórios em diversos tecidos em modelo animal com inflamação induzida pelo consumo de dieta rica em gordura saturada (Bashir et al. 2015; V Oliveira et al. 2015). Recentemente foram demonstrados os efeitos do consumo do óleo de linhaça na obesidade, como tendo possível papel imunomodulador, reduzindo a infiltração de macrófagos no tecido adiposo e fígado, além de reduzir a expressão de TNF α e INF γ pelas células adiposas (Bashir et al. 2015). No presente estudo foi observada possível proteção ao aumento do TNF α e da IL1 β no íleo distal dos animais que receberam dieta hiperlipídica contendo óleo de linhaça. Outros trabalhos observaram redução nos níveis de TNF α após tratamento com ômega 3, tanto em linfócitos intraperitoneal do intestino de animais com obesidade induzida por dieta (Wang et al. 2008), quanto em modelo animal de inflamação intestinal (Y. Liu et al. 2012; Zhao et al. 2015).

Em relação à modulação da quantidade de receptores de ácidos graxos acoplados à proteína G expressos no intestino, quando induzidos pelo consumo de dieta rica em gordura, o observado na literatura tem sido o aumento da expressão apenas após longos períodos de consumo (Paulsen et al. 2014). Além disso, maiores níveis de GPR120 e GPR40 expressos no intestino parecem estar positivamente correlacionados com maiores valores de índice de massa corporal em seres humanos (Little et al. 2014). Um curto período de exposição à dieta hiperlipídica não alterou as quantidades expressas de GPR120 no íleo distal dos animais experimentais no presente estudo. Porém, os níveis de GPR40 foram significativamente maiores no sétimo dia de consumo. Curiosamente, foi também após sete dias de consumo, que os animais do grupo HF+FS apresentaram diferenças glicemia de jejum quando comparados ao grupo HF. Sugerem-se maiores investigações sobre o papel do GPR40, não apenas em vias de secreção de grânulos de hormônios incretínicos, mas também na imunologia da mucosa intestinal, já que a secreção de peptídeos pelas células de Paneth é regulada pela mobilização de cálcio citosólico oriundo dos estoques intracelulares ou pelo influxo de cálcio extracelular (Davis and Dickey 2008; Groblewski et al. 1999).

As claudinas pertencem a uma família de moléculas de adesão celular localizadas principalmente na região apical das *tight junctions* (Furuse and Tsukita 2006). Diferentemente das outras claudinas, a claudina 7 está presente na região basolateral e sua ausência pode gerar danos à morfologia do epitélio, principalmente por reduzir a interação da sub-unidade $\alpha 2$ da integrina com a Claudina-1 gerando danos ao tecido relacionados ao processo inflamatório (Ding et al. 2012).

Em relação às quantidades gênicas dos componentes das *tight junctions* avaliadas neste trabalho, é possível que os efeitos moleculares observados sejam também em resposta de uma interação entre o sistema imune da mucosa e os mecanismos morfofisiológicos do epitélio intestinal frente à presença de grandes quantidades de ácidos graxos. O processo de absorção de gorduras *per se* pode estar relacionado à ativação de células do enterócito e do sistema imune (ex. macrófagos e linfócitos intra-epiteliais), estimulando-as a produzirem citocinas pró-inflamatórias (Ji, Sakata, and Tso 2011).

Os ácidos graxos poli-insaturados do tipo ômega 3 tem sido propostos como alvo de estratégia terapêutica para doenças inflamatórias intestinais, por promoverem efeitos anti-inflamatórios e melhorarem a função de barreira do epitélio (Generoso et al. 2015; Xiao et al. 2015). A melhora na função de barreira intestinal promovida pelo ômega 3, parece estar relacionada ao aumento da expressão de proteínas de junção celular ZO-1 e Ocludina (Zhao et al. 2015). Além disso, o GLP-2 tem sido proposto como atuante no controle da permeabilidade e homeostase da barreira intestinal (Cani et al. 2008; Dong et al. 2014). Johnson e colaboradores (2015) demonstraram aumento na permeabilidade intestinal durante três dias de consumo de dieta hiperlipídica. Sugere-se realizar maiores investigações sobre o papel dos receptores GPR120 e GPR40 em células enteroendócrinas do intestino de animais frente ao consumo agudo e crônico de HF e HF contendo diferentes quantidades de óleo rico em ácidos graxos poli-insaturados, bem como sua possível modulação na secreção dos hormônios incretínicos.

Portanto, é proposto que o ácido graxo alfa-linolênico, oriundo do óleo de linhaça, considerado das fontes economicamente mais acessíveis de ômega 3, possa participar em processos de regulação de mecanismos inflamatórios atenuar o processo inflamatório agudo intestinal induzido pelo consumo de dieta rica em gordura saturada.

7. CONCLUSÃO

Com base nas observações obtidas no presente estudo, conclui-se que a substituição de 10% do conteúdo de gordura rica em ácidos graxos saturados presentes na dieta hiperlipídica por óleo rico em ácidos graxos do tipo poli-insaturado foi capaz de:

1. Atenuar a hipertrofia dos coxins adiposos, além de manter melhores respostas na ação da insulina.
2. Modificar as quantidades gênicas de parâmetros inflamatórios no intestino delgado, reduzindo os níveis de IL1 β e aumentando os níveis de IL6.
3. Aumentar os níveis de transcritos do receptor GPR40, sendo necessárias maiores investigações sobre as vias celulares que estão envolvidas com a ativação desse receptor de acordo com o tipo celular da mucosa intestinal, bem como seu papel no controle metabólico e imunológico.
4. Manter maiores níveis de expressão de ZO-1 no íleo distal ao longo do tratamento quando comparados ao dos animais que receberam HFD.

Portanto, sugerem-se mais estudos envolvendo o consumo dessa fonte economicamente acessível de ômega 3, o óleo de semente de linhaça, em modelos de consumo agudo e recorrente de dieta hiperlipídica rica em gordura saturada, como forma de mimetizar o perfil alimentar humano, e assim verificar possíveis atenuações de alterações envolvidas na gênese da obesidade e conseqüentemente gerar novas prescrições dietéticas deste nutriente que possam contribuir com a prevenção e terapia da obesidade e suas patologias associadas.

8. REFERÊNCIAS

- Al-Disi, Dara A. et al. 2015. “Postprandial Effect of a High-Fat Meal on Endotoxemia in Arab Women with and without Insulin-Resistance-Related Diseases.” *Nutrients* 7(8):6375–89.
- Amar, Jacques et al. 2008. “Energy Intake Is Associated with Endotoxemia in Apparently Healthy Men.” *Am J Clin Nutr* 87(5):1219–23.
- Anbazhagan, Arivarasu N. et al. 2016. “A Novel Anti-Inflammatory Role of GPR120 in Intestinal Epithelial Cells.” *American Journal of Physiology - Cell Physiology* ajpcell.00123.2015. Retrieved (<http://ajpcell.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpcell.00123.2015>).
- Balakumar, Mahalingam et al. 2016. “Improvement in Glucose Tolerance and Insulin Sensitivity by Probiotic Strains of Indian Gut Origin in High-Fat Diet-Fed C57BL/6J Mice.” *European Journal of Nutrition* 1–17. Retrieved (<http://link.springer.com/10.1007/s00394-016-1317-7>).
- Bashir, Samina et al. 2015. “Partial Reversal of Obesity-Induced Insulin Resistance Owing to Anti-Inflammatory Immunomodulatory Potential of Flaxseed Oil Partial Reversal of Obesity-Induced Insulin Resistance Owing to Anti-Inflammatory Immunomodulatory Potential of Flaxseed Oil.” 0139(November).
- Beaurepaire, Cécile, David Smyth, and Derek M. McKay. 2009. “Interferon- γ Regulation of Intestinal Epithelial Permeability.” *Journal of Interferon & Cytokine Research* 29(3):133–44. Retrieved (<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/jir.2008.0057>).
- Cani, Patrice D. et al. 2007. “Resistance.” 56(July):1761–72.
- Cani, Patrice D., Rodrigo Bibiloni, Claude Knauf, Audrey M. Neyrinck, and Nathalie M. Delzenne. 2008. “Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Diet-induced Obesity and Diabetes in Mice.” *Diabetes* 57(6):1470–81.
- Cintra, Dennys E. et al. 2012. “Unsaturated Fatty Acids Revert Diet-Induced Hypothalamic Inflammation in Obesity.” *PLoS ONE* 7(1).
- de Courten, Barbora et al. 2016. “Contrasting Association of Circulating sCD14 with Insulin Sensitivity in Non-Obese and Morbidly Obese Subjects.” *Molecular Nutrition and Food Research* 60(1):103–9.
- D. Oh, S. Talukdar, E. Bae, T. Imamura, and Morinaga. 2011. “GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-Inflammatory and Insulin Sensitizing Effects.” *Cell* 142(5):687–98.
- Davis, C. William and Burton F. Dickey. 2008. “Regulated Airway Goblet Cell Mucin Secretion.” *Annual review of physiology* 70(1):487–512. Retrieved (<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.physiol.70.113006.10063>

8).

- Delzenne, Nathalie M., Audrey M. Neyrinck, Fredrik Bäckhed, and Patrice D. Cani. 2011. "Targeting Gut Microbiota in Obesity : Effects of Prebiotics and Probiotics." *Nature Publishing Group* 7(11):639–46. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2011.126>).
- Ding, Lei et al. 2012. "Inflammation and Disruption of the Mucosal Architecture in Claudin-7-Deficient Mice." *Gastroenterology* 142(2):305–15. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22044670>).
- Ding, Shengli et al. 2010. "High-Fat Diet: Bacteria Interactions Promote Intestinal Inflammation Which Precedes and Correlates with Obesity and Insulin Resistance in Mouse." *PLoS ONE* 5(8):e12191. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2922379&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Dong, Charlotte X. et al. 2014. "The Intestinal Epithelial Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Links Glucagon-like Peptide-2 Action to Gut Barrier Function." *Endocrinology* 155(2):370–79.
- Erridge, Clett, Teresa Attina, Corinne M. Spickett, and David J. Webb. 2007. "A High-Fat Meal Induces Low-Grade Endotoxemia: Evidence of a Novel Mechanism of Postprandial Inflammation." *American Journal of Clinical Nutrition* 86(5):1286–92.
- F. Canonne-Hergaux, S. Gruenheid, P. Ponka, and P. Gros. 1999. "Cellular and Subcellular Localization of the Nramp2 Iron Transporter in the Intestinal Brush Border and Regulation by Dietary Iron." 93(12):4406–17.
- Fincham, Jack E. 2011. "The Expanding Public Health Threat of Obesity and Overweight." *The International journal of pharmacy practice* 19(3):214–16.
- Furuse, Mikio and Shoichiro Tsukita. 2006. "Claudins in Occluding Junctions of Humans and Flies." *Trends in Cell Biology* 16(4):181–88.
- Generoso, Simone De Vasconcelos et al. 2015. "Dietary Supplementation with Omega-3 Fatty Acid Attenuates 5-Fluorouracil Induced Mucositis in Mice." *Lipids in Health and Disease* 14(1):54. Retrieved (<http://www.lipidworld.com/content/14/1/54>).
- Ghoshal, S., J. Witta, J. Zhong, W. de Villiers, and E. Eckhardt. 2009. "Chylomicrons Promote Intestinal Absorption of Lipopolysaccharides." *J Lipid Res* 50(1):90–97. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18815435>).
- Groblewski, G. E. et al. 1999. "Immunolocalization of CRHSP28 in Exocrine Digestive Glands and Gastrointestinal Tissues of the Rat." *The American journal of physiology* 276(1 Pt 1):G219–26. Retrieved

- (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9886999>).
- Gulhane, Max et al. 2016. "High Fat Diets Induce Colonic Epithelial Cell Stress and Inflammation That Is Reversed by IL-22." *Nature Publishing Group* (February):1–17. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/srep28990>).
- Herrera-Covarrubias, Deissy. 2015. "La Obesidad Como Factor de Riesgo En El Desarrollo de Cáncer." *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 32(4):3–4.
- Himsworth, H. P. 1940. "Insulin Deficiency and Insulin Inefficiency." *British medical journal* 1(4139):719–22. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2177399&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Hotamisligil, G. S. and B. M. Spiegelman. 1994. "Tumor Necrosis Factor ??: A Key Component of the Obesity-Diabetes Link." *Diabetes* 43(11):1271–78.
- Hotamisligil, Gökhan S. 2006. "Inflammation and Metabolic Disorders." 444(December).
- Iyer, Abishek, David P. Fairlie, Johannes B. Prins, Bruce D. Hammock, and Lindsay Brown. 2010. "Inflammatory Lipid Mediators in Adipocyte Function and Obesity." *Nature Reviews Endocrinology* 6(2):71–82. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2009.264>).
- Ji, Yewei. 2012. "Short Term High Fat Diet Challenge Promotes Alternative Macrophage Polarization in Adipose Tissue via Natural Killer T Cells and Interleukin-4." *Journal of Biological Chemistry* 287(29):24378–86.
- Ji, Yong, Yasuhisa Sakata, and Patrick Tso. 2011. "Nutrient-Induced Inflammation in the Intestine." *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 14(4):315–21.
- Johnson, Andrew M. F. et al. 2015. "High Fat Diet Causes Depletion of Intestinal Eosinophils Associated with Intestinal Permeability." *PLoS ONE* 10(4).
- Kurashima, Yosuke, Yoshiyuki Goto, and Hiroshi Kiyono. 2013. "Mucosal Innate Immune Cells Regulate Both Gut Homeostasis and Intestinal Inflammation." *European Journal of Immunology* 43(12):3108–15.
- de La Serre, Claire Barbier et al. 2010. "Propensity to High-Fat Diet-Induced Obesity in Rats Is Associated with Changes in the Gut Microbiota and Gut Inflammation." *American journal of physiology - Gastrointestinal and liver physiology* 299(2):G440–48. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2928532&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Lam, Yan Y. et al. 2015. "Effects of Dietary Fat Profile on Gut Permeability and Microbiota and Their Relationships with Metabolic Changes in Mice." *Obesity*

- 00(00):n/a – n/a. Retrieved (<http://doi.wiley.com/10.1002/oby.21122>).
- Lanthier, Nicolas et al. 2010. “Kupffer Cell Activation Is a Causal Factor for Hepatic Insulin Resistance.” *Society*.
- Laugerette, Fabienne et al. 2011. “Emulsified Lipids Increase Endotoxemia: Possible Role in Early Postprandial Low-Grade Inflammation.” *Journal of Nutritional Biochemistry* 22(1):53–59. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.11.011>).
- Lee, Yun Sok. 2011. “Inflammation Is Necessary for Long-Term but Not Short-Term High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance.” *Diabetes* 60(10):2474–83.
- Little, T. J. et al. 2014. “Characterization of Duodenal Expression and Localization of Fatty Acid-Sensing Receptors in Humans: Relationships with Body Mass Index.” *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 307(10):G958–67. Retrieved (<http://ajpgi.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpgi.00134.2014>).
- Liu, Y. et al. 2012. “Fish Oil Enhances Intestinal Integrity and Inhibits TLR4 and NOD2 Signaling Pathways in Weaned Pigs after LPS Challenge.” *Journal of Nutrition* 142(11):2017–24.
- Liu, Zhenhua et al. 2012. “NIH Public Access.” *Biophysical Chemistry* 257(5):2432–37.
- Luck, Helen et al. 2015. “Regulation of Obesity-Related Insulin Resistance with Gut Anti-Inflammatory Agents.” *Cell Metabolism* 21(4):527–42. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413115001047>).
- Mancini, Arturo D. and Vincent Poitout. 2013. “The Fatty Acid Receptor FFA1/GPR40 a Decade Later: How Much Do We Know?” *Trends in Endocrinology and Metabolism* 24(8):398–407. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2013.03.003>).
- Ménard, S., N. Cerf-Bensussan, and M. Heyman. 2010. “Multiple Facets of Intestinal Permeability and Epithelial Handling of Dietary Antigens.” *Mucosal immunology* 3(3):247–59.
- Menezes, Silvânia M. P. Neves Jorge Mancini Filho Elizabete Wenzel De. 2013. “Manual de Cuidados E Procedimentos Com Animais de Laboratório Do Biotério de Produção E Experimentação Da FCF-IQ / USP.” *Usp* 234 p.
- Miyauchi, Satoshi, Akira Hirasawa, Atsuhiko Ichimura, Takafumi Hara, and Gozoh Tsujimoto. 2010. “New Frontiers in Gut Nutrient Sensor Research: Free Fatty Acid Sensing in the Gastrointestinal Tract.” *Journal of pharmacological sciences* 112(1):19–24.
- Moran, Brian M., Peter R. Flatt, and Aine M. McKillop. 2016. “G Protein-Coupled Receptors: Signalling and Regulation by Lipid Agonists for Improved Glucose Homeostasis.” *Acta Diabetologica* 53(2):177–88. Retrieved

(<http://dx.doi.org/10.1007/s00592-015-0826-9>).

- Nullens, Sara et al. 2016. “Beneficial Effects of Anti-Interleukin-6 Antibodies on Impaired Gastrointestinal Motility, Inflammation and Increased Colonic Permeability in a Murine Model of Sepsis Are Most Pronounced When Administered in a Preventive Setup.” *PLoS ONE* 11(4):1–22.
- Oh, Da Young et al. 2010. “GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-Inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects.” *Cell* 142(5):687–98. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.041>).
- Oliveira, V. et al. 2015. “Diets Containing α -Linolenic (ω 3) or Oleic (ω 9) Fatty Acids Rescues Obese Mice From Insulin Resistance.” 156(November):4033–46.
- Oliveira, V. et al. 2015. “Diets Containing Alpha-Linolenic (omega 3) or Oleic (omega 9) Fatty Acids Rescues Obese Mice from Insulin Resistance.” *Endocrinology* (August):en.2014–1880.
- Patrone, Vania et al. 2012. “Short-Term Modifications in the Distal Gut Microbiota of Weaning Mice Induced by a High-Fat Diet.” (2012):983–92.
- Paulsen, Sarah Juel et al. 2014. “Expression of the Fatty Acid Receptor GPR120 in the Gut of Diet-Induced-Obese Rats and Its Role in GLP-1 Secretion.” *PLoS ONE* 9(2):e88227. Retrieved (<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0088227>).
- Pitman, R. S. and R. S. Blumberg. 2000. “First Line of Defense: The Role of the Intestinal Epithelium as an Active Component of the Mucosal Immune System.” *Journal of Gastroenterology* 35(11):805–14.
- Ropelle, Eduardo R. et al. 2010. “IL-6 and IL-10 Anti-Inflammatory Activity Links Exercise to Hypothalamic Insulin and Leptin Sensitivity through IKK β and ER Stress Inhibition.” *PLoS Biology* 8(8):31–32.
- Shi, Hang et al. 2006. “TLR4 Links Innate Immunity and Fatty Acid – Induced Insulin Resistance.” *The journal of clinical investigation* 116(11):3015–25.
- Shoelson, S. E., J. Lee, and A. B. Goldfine. 2006. “Inflammation and Insulin Resistance.” *J Clin Invest* 116(7):1793–1801. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16823477>).
- De Souza, Cláudio T. et al. 2005. “Consumption of a Fat-Rich Diet Activates a Proinflammatory Response and Induces Insulin Resistance in the Hypothalamus.” *Endocrinology* 146(10):4192–99.
- Starkie, Rebecca et al. 2003. “Exercise and IL-6 Infusion Inhibit Endotoxin-Induced TNF- α Production in Humans.” (II).
- Suzuki, T., N. Yoshinaga, and S. Tanabe. 2011. “Interleukin-6 (IL-6) Regulates Claudin-2 Expression and Tight Junction Permeability in Intestinal Epithelium.”

- Journal of Biological Chemistry* 286(36):31263–71. Retrieved (<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M111.238147>).
- Thaler, Joshua P. et al. 2012. “Obesity Is Associated with Hypothalamic Injury in Rodents and Humans.” 122(1).
- The National Academies. 2011. “Guide.” *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* 46(3):267–68. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21595115>).
- Tsukumo, Dm et al. 2007. “Loss-of-Function Mutation in Toll-like Receptor 4 Prevents Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance.” *Diabetes* 56(August):1986–98. Retrieved (<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/56/8/1986.short>).
- Wang, Jian et al. 2008. “Inhibitory Effect of Dietary N-3 Polyunsaturated Fatty Acids to Intestinal IL-15 Expression Is Associated with Reduction of TCRalpha+CD8alpha+CD8beta-Intestinal Intraepithelial Lymphocytes.” *The Journal of Nutritional Biochemistry* 19(7):475–81. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17855067>).
- Wang, Li et al. 2011. “Acute Stimulation of Glucagon Secretion by Linoleic Acid Results from GPR40 Activation and [Ca²⁺]_i Increase in Pancreatic Islet α -Cells.” *Journal of Endocrinology* 210(2):173–79.
- Wang, Ning et al. 2013. “Expression and Activity of the TLR4/NF- κ B Signaling Pathway in Mouse Intestine Following Administration of a Short-Term High-Fat Diet.” *Experimental and Therapeutic Medicine* 6(3):635–40.
- Wang, Quan et al. 2013. “Intestinal Permeability Is Reduced and IL-10 Levels Are Increased in Septic IL-6 Knockout Mice Intestinal Permeability Is Reduced and IL-10 Levels Are Increased in Septic IL-6 Knockout Mice.” 0558:1013–23.
- Wang, Y. Claire, Klim McPherson, Tim Marsh, Steven L. Gortmaker, and Martin Brown. 2011. “Health and Economic Burden of the Projected Obesity Trends in the USA and the UK.” *The Lancet* 378(9793):815–25.
- White, Phillip J. 2014. “Potential Role of Omega-3-Derived Resolution Mediators in Metabolic Inflammation.” (November 2013):1–7.
- Williams, Lynda M. et al. 2014. “The Development of Diet-Induced Obesity and Glucose Intolerance in C57BL/6 Mice on a High-Fat Diet Consists of Distinct Phases.” *PLoS one* 9(8):e106159. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25170916>) (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4149520>).
- Wit, Nicole J. W. De et al. 2008. “Fat-Induced Obesity and Insulin Resistance in C57BL / 6J Mice.” 16:1–16.
- Xiao, Guizhen et al. 2015. “Eicosapentaenoic Acid Enhances Heatstroke-Impaired

Intestinal Epithelial Barrier Function in Rats.” *Shock October* 44(4):348–56.
Retrieved

([http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext
&D=yrovftq&AN=00024382-201510000-00010](http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=yrovftq&AN=00024382-201510000-00010)).

Yang, Runkuan et al. 2003. “IL-6 Is Essential for Development of Gut Barrier Dysfunction after Hemorrhagic Shock and Resuscitation in Mice.” *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 285(3):G621–29. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12773301>).

Yang, Songwei et al. 2014. “Interferon- γ -Induced Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by NF- κ B/HIF-1 α Pathway.” *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 34(3):195–203. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24237301>).

Zhao, Jie et al. 2015. “DHA Protects against Experimental Colitis in IL-10-Deficient Mice Associated with the Modulation of Intestinal Epithelial Barrier Function.” *British Journal of Nutrition* (11):1–8. Retrieved (http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114515001294).

9. ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética no uso de animais



CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Perfil inflamatório no intestino distal de camundongos submetidos a diferentes fontes lipídicas", protocolo nº 3997-1, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Dennys Esper Correa Cintra / Patrícia Brito Rodrigues, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA**, e foi aprovado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em 17 de setembro de 2015.

Vigência do projeto: 10/2015-12/2016

Espécie/Linhagem: Camundongo isogênico / C57BL/6J

No. de animais: 96

Idade/Peso: 04 semanas / 20g

Sexo: machos

Origem: CEMIB/UNICAMP

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

Campinas, 17 de setembro de 2015.

Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva