

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ÂNGELA CAROLINE DA LUZ BERETTA**

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÔMEGA-3 EM  
CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM UMA DIETA CAFETERIA**

**CRICIÚMA**

**2020**

**ÂNGELA CAROLINE DA LUZ BERETTA**

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÔMEGA-3 EM  
CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM UMA DIETA CAFETERIA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador (a): Prof. (a) Dr. Vanessa Moraes de Andrade

**CRICIÚMA**

**2020**

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B492a Beretta, Ângela Caroline da Luz.

Avaliação da suplementação de ômega-3 em camundongos alimentados com uma dieta cafeteria / Ângela Caroline da Luz Beretta. - 2020.

71 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2020.

Orientação: Vanessa Moraes de Andrade.

1. Obesidade. 2. Ácidos graxos Ômega-3. 3. Dieta de cafeteria. 4. Genotoxicidade. 5. Mutagênese. 6. Resistência à insulina. 7. Dano ao DNA. I. Título.

CDD 23. ed. 616.398

Bibliotecária Elisângela Just Steiner - CRB 14/1576

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

---

**ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 369**

Com início às 14h (quatorze horas) do dia quinze de outubro de 2020 (dois mil e vinte), realizou-se, via ferramenta digital *Google Meet*, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **ÂNGELA CAROLINE DA LUZ BERETTA**, sob a orientação da **Profa. Dra. Vanessa Moraes de Andrade** intitulada “**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÔMEGA-3 EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM UMA DIETA CAFETERIA**”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Profa. Dra. Alessandra Peres (Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: APROVADA, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 15h (quinze horas), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, Coordenador do Programa. Criciúma, 15 (quinze) de outubro de 2020 (dois mil e vinte).

**Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol**  
Coordenador do PPGCS

**Fernanda Nunes Peruchi**  
Assistente Administrativo

## **FOLHA INFORMATIVA**

A dissertação foi elaborada seguindo a Resolução nº 07/2015/Colegiado de Coordenação do PPGCS e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Biomedicina Translacional do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

**Dedico esta dissertação aos meus pais, que nunca mediram esforços para que eu pudesse alcançar meus sonhos.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, Ele que me deu o dom da vida e guiou meus passos durante essa jornada.

A minha família, que durante todos esses anos me apoiou e confortou nos momentos de dificuldade. Pai, você que sempre esteve ao meu lado e confiou na minha capacidade. Mãe, você que sempre me impulsionou para que eu pudesse ir mais longe. Jé, você que mais do que uma irmã, foi uma amiga. Tudo que fiz foi por vocês!

Não poderia deixar de agradecer aos maiores presentes que a UNESCO me deu. Giu e Lu, durante todos esses anos vocês foram meu apoio, um verdadeiro suporte nos momentos bons e ruins, com vocês pude vivenciar os melhores momentos, sem vocês eu não teria chão. Pude aprender com vocês o real sentido da amizade. Amo vocês!

Agradeço também a minha amiga Vanessa, que esteve ao meu lado desde o início deste trabalho e sempre me trouxe palavras de apoio. Amiga, te agradeço por sempre abrir as portas de sua casa para ser meu local de apoio. Amo você e sua família.

Ao pessoal do Biomedicina Translacional, agradeço em especial as meninas da pós, que não mediram esforços para ajudar na concretização desse projeto. Além disso, agradeço aos ICs pela disponibilidade para ajudar neste projeto (sei que não foi nada fácil).

Agradeço a minha orientadora Vanessa Andrade, que me deu a oportunidade de ter um crescimento profissional durante todos esses anos e me trouxe ensinamentos inestimáveis.

Faço um agradecimento a CAPES, que durante esses dois anos me deu suporte financeiro para realização do mestrado.

Por fim, agradeço a banca, Alessandra e Eduardo por aceitarem colaborar com meu trabalho, em especial ao Paulo que aceitou ser relator e banca. Obrigada a todos!

## RESUMO

A obesidade é definida como o acúmulo excessivo de gordura, podendo levar ao desenvolvimento de inúmeras doenças, como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e também alguns tipos de câncer. O aumento do número de pessoas obesas no mundo tem sido relacionado com as mudanças dietéticas e o aumento do consumo de alimentos hipercalóricos, associados ao sedentarismo, sendo que essas mudanças levam a inúmeras modificações metabólicas. Estudos dietéticos em modelos animais são importantes para elucidar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da obesidade. Modelos de obesidade induzida por dieta, incluindo dietas ricas em gordura e dieta cafeteria, ou também chamada dieta ocidental, têm sido empregadas para estudar a obesidade em roedores. Atualmente, o foco dos estudos tem sido em estratégias de tratamento para as disfunções metabólicas que a obesidade causa. O ômega-3 auxilia no desenvolvimento do corpo de várias maneiras ao longo de toda a vida. Ele tem papel importante no desenvolvimento e manutenção do cérebro. Além disso, o ômega-3 tem demonstrado agir como mediador inflamatório, auxiliando na saúde cardiovascular, na melhora dos níveis de colesterol e apresenta capacidade de diminuir os danos causados ao DNA, já que reduz as espécies reativas de oxigênio. Desta forma, o objetivo desse trabalho será avaliar o efeito da suplementação de Ômega-3 sobre parâmetros bioquímicos e genotóxicos em camundongos alimentados com uma dieta cafeteria. Foram utilizados 48 animais divididos previamente em 2 grupos, Grupo 1 – Dieta Padrão (n=16), Grupo 2 – Dieta Cafeteria (n=32), após 16 semanas alimentados com dieta cafeteria ou padrão, esses animais foram divididos novamente para iniciar a suplementação com ômega-3, sem os grupos da nova divisão os seguintes: o grupo 1 foi dividido em dois grupos 1 – Dieta Padrão (n=8) e Grupo 3 – DP + Ômega-3 (O3) (n=8), e o grupo 2 dividido em 4 grupos: Grupo 2 – Dieta Cafeteria (n=8), Grupo 4 - CAF + O3 (n=8), Grupo 5 - CAF + DP (n=8) e O3 e Grupo 6 - CAF + DP (n=8). Os animais foram alimentados com dieta cafeteria e/ou dieta padrão por 16 semanas e foram pesados para checagem de mudanças de peso entre os grupos, após iniciaram o tratamento com ômega-3 através de gavagem, sendo que alguns grupos trocaram a dieta e outros permaneceram com a mesma. Na semana 20 os animais passaram novamente por pesagens, por coletas de sangue para testes bioquímicos e Teste de tolerância a insulina e logo após foram eutanasiados para a realização das análises genotóxicas – ensaio cometa e teste do micronúcleo. Na avaliação dos resultados, pode-se observar que os animais suplementados com ômega-3 apresentaram uma diminuição de peso corporal, bem como diminuição do índice de adiposidade. Em relação a glicemia de jejum e ao ITT, a suplementação de ômega-3 também foi eficaz na melhora da hiperglicemia causada pela dieta cafeteria e também na resistência à insulina. Na avaliação dos testes genotóxicos e mutagênicos, a utilização do ômega-3 como intervenção apresentou grande melhora na diminuição da instabilidade genômica causada pela dieta cafeteria. Desta forma, pode-se supor que o ômega-3 tenha ações benéficas ao organismos reduzindo e melhorando as alterações causadas pela obesidade induzida por dieta, através da redução da gordura corporal, vista pelo teste de adiposidade, redução da glicemia e melhora da tolerância a insulina e também melhora nos parâmetros



genotóxicos e mutagênicos, onde o ômega-3 foi capaz de reduzir os danos ao DNA e reverter as mutações causadas pela dieta cafeteria

**Palavras-chaves:** Obesidade; Dieta cafeteria; Ômega-3, Genotoxicidade.

## ABSTRACT

Obesity is defined as the excessive accumulation of fat, which can lead to the development of numerous diseases, such as type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and also some types of cancer. The increase in the number of obese people in the world has been related to dietary changes and the increase in consumption of hypercaloric foods, associated with physical inactivity, and these changes lead to numerous metabolic changes. Dietary studies in animal models are important to elucidate the mechanisms involved in the development of obesity. Models of diet-induced obesity, including high-fat diets and the cafeteria diet, or also called the Western diet, have been employed to study obesity in rodents. Currently, the focus of studies has been on treatment strategies for the metabolic disorders that obesity causes. Omega-3 aids in the development of the body in several ways throughout life. It plays an important role in the development and maintenance of the brain. Besides, omega-3 has been shown to act as an inflammatory mediator, aiding cardiovascular health, improving cholesterol levels, and having the ability to decrease damage to DNA, as it reduces reactive oxygen species. Thus, the objective of this work will be to evaluate the effect of Omega-3 supplementation on biochemical and genotoxic parameters in mice fed a cafeteria diet. 48 animals previously divided into 2 groups will be used, Group 1 - Standard Diet (n = 16), Group 2 - Cafeteria Diet (n = 32), and later these groups were again divided into, Group 1 into two groups 1 - Diet Standard (n = 8) and Group 3 - DP + Omega-3 (O3) (n = 8), and group 2 in 4 groups, Group 2 - Cafeteria Diet (n = 8), Group 4 - CAF + O3 (n = 8), Group 5 - CAF + DP (n = 8) and O3 and Group 6 - CAF + DP (n = 8). The animals were fed a cafeteria and/or standard diet for 16 weeks and were weighed to check for changes in weight between the groups, after starting treatment with omega-3 through gavage, with some groups changing the bed and others remaining with it. At week 20, the animals again underwent weighing, blood collection for biochemical tests, and insulin tolerance tests, and soon after they were euthanized to perform the genotoxic analyzes - comet assay and micronucleus test. In the evaluation of the results, it can be observed that the animals supplemented with omega-3 showed a decrease in body weight, as well as a decrease in the adiposity index. Regarding fasting glycemia and ITT, omega-3 supplementation was also effective in improving hyperglycemia caused by the cafeteria diet and also in insulin resistance. In the evaluation of genotoxic and mutagenic tests, the use of omega-3 as an intervention showed great improvement in reducing genomic instability caused by the cafeteria diet. Thus, it can be assumed that omega-3 has beneficial actions on the organism by reducing and improving the changes caused by diet-induced obesity.

**Keywords: Obesity; Cafeteria diet; Omega-3, Genotoxicity.**

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

<b>Figura 1. Desenho experimental .....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 2. Linha do tempo .....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 3 Teste de Tolerância a Insulina.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 4 - Ensaio Cometa .....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 5 - Índice de adiposidade.....</b>	<b>45</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1. Cardápio semanal dos animais que serão alimentados com dieta cafeteria.....</b>	<b>27</b>
<b>Tabela 2. Composição das dietas.....</b>	<b>27</b>
<b>Tabela 3. Informações nutricionais do Ômega-3 fornecidas pelo fabricante.....</b>	<b>28</b>
<b>Tabela 4 Dados acerca do consumo alimentar, consumo energético, eficiência energética e peso corporal em animais alimentados com uma dieta cafeteria e suplementados com Ômega-3.....</b>	<b>38</b>
<b>Tabela 5 - Glicemia de jejum expressa em média e desvio padrão em 16 semanas e após suplementação, em 20 semanas, com n de 6 animais/grupo.....</b>	<b>40</b>
<b>Tabela 6 – Teste de Micronúcleo com dados expressos em média e desvio padrão em 16 semanas e após suplementação, em 20 semanas, com n de 8 animais/grupo.....</b>	<b>44</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 OBESIDADE .....	15
<b>1.1.1 Resistência à insulina</b> .....	16
<b>1.1.2 Inflamação, Estresse Oxidativo e Danos ao DNA</b> .....	17
1.2 MODELOS ANIMAIS DE OBESIDADE .....	19
1.3 ÔMEGA-3.....	21
<b>1.3.1 Ômega-3 e Obesidade</b> .....	23
1.4 JUSTIFICATIVA .....	24
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	25
2.1 OBJETIVO GERAL .....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	26
3.1 ANIMAIS .....	26
3.2 DIETA CAFETERIA (CAF) .....	26
3.3 SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA-3.....	27
3.4 DESENHO EXPERIMENTAL .....	28
3.5 PESAGENS DOS ALIMENTOS E ANIMAIS.....	32
<b>3.5.1 Pesagens dos animais</b> .....	32
<b>3.5.2 Cálculos de Consumo alimentar em gramas, Consumo Energético e Eficiência Energética</b> .....	32
3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	32
<b>3.6.1 Glicemia de jejum e teste de tolerância à insulina (ITT)</b> .....	33
3.7 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE E MUTAGÊNESE .....	33
<b>3.7.1 Ensaio Cometa</b> .....	34
<b>3.7.2 Micronúcleo</b> .....	35
3.8 ÍNDICE DE ADIPOSIDADE .....	35
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	35
<b>4 RESULTADOS</b> .....	37
4.1 CONSUMO ALIMENTAR, CONSUMO ENERGÉTICO, EFICIÊNCIA ENERGÉTICA E PESO CORPORAL .....	37
4.2 GLICEMIA DE JEJUM E ITT .....	40
4.3 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE E MUTAGÊNESE .....	42
4.4 ÍNDICE DE ADIPOSIDADE .....	44

<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>72</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 OBESIDADE

A obesidade é definida como o acúmulo excessivo de gordura, podendo levar ao desenvolvimento de inúmeras doenças, como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e também alguns tipos de câncer (Kopelman, 2007; WHO, 2018). Segundo a Organização mundial de saúde (WHO), em 2016, 39% dos homens e 39% da mulheres do mundo estava acima do peso, sendo destes, 11% dos homens e 15% das mulheres obesos.

No documento da Vigitel Brasil 2018, que mostra o número de pessoas obesas no ano de 2018 no Brasil, as pesquisas foram realizadas em todas as capitais do país, incluindo o Distrito Federal, e observou-se que a frequência de adultos obesos neste ano foi de 19,8%, sendo a maioria destas pessoas composta por mulheres (Ministério da Saúde, 2019).

A obesidade tem uma etiologia multifatorial, ou seja, existem muitos fatores que influenciam para o desenvolvimento, podendo ser ambientais e/ou genéticos. Entretanto, muitos estudos mostram que dentre os principais fatores, consumir alimentos altamente calóricos de forma excessiva, juntamente com o sedentarismo, são determinantes para o desenvolvimento dessa patologia (Von Deneena, 2011).

O consumo excessivo de alimentos ricos em calorias e açúcares, tem sido observado em pesquisas. Dados do Vigitel Brasil 2018 mostram que 17,7% de adultos consomem refrigerante por pelo menos cinco dias na semana ou mais, sendo que o consumo de alimentos ricos em açúcares de forma excessiva, colabora para o desenvolvimento da obesidade (Ministério da Saúde, 2019; Vasanth et al., 2019).

O diagnóstico da obesidade pode ser feito através da avaliação do índice de massa corporal (IMC), que é um cálculo realizado com base no peso e altura do indivíduo, onde o peso em quilogramas é dividido pela altura em metros. Através do cálculo do IMC, considera-se um indivíduo obeso quando o mesmo possui um  $IMC \geq 30 \text{ kg} / \text{m}^2$ , enquanto indivíduos com obesidade grave ou mórbida tem  $IMC > 35 \text{ kg} / \text{m}^2$  (CFN, 2011). Sendo assim, uma alimentação rica em carboidratos e gorduras, acima do necessário para o

suporte calórico, é um dos principais fatores para o aumento do IMC e consequentemente, desenvolvimento da obesidade (Farooqi, 2012).

A obesidade ocorre basicamente quando o corpo não consegue equilibrar a o aporte e o consumo de energia. Quando a ingestão de energia excede o gasto de energia, o excesso de calorias será armazenado como gordura, levando ao ganho de peso e, eventualmente, à obesidade (Vasanth et al., 2019). Sendo assim, o número de adipócitos normalmente cresce quando se tem uma alimentação com balanço energético positivo por muito tempo (Heymsfield, 2014).

### **1.1.1 Resistência à insulina**

O sedentarismo, em conjunto com a obesidade, pode fazer com que haja alterações hormonais, como por exemplo, no hormônio da insulina, contribuindo assim para o ganho de peso (Brazier, 2018). A insulina é um hormônio secretado pelas células  $\beta$  pancreáticas em resposta ao aumento de glicose sanguínea (Hoang & Thorn, 2015). Além disso, a insulina tem como funções estimular a glicólise, promover a síntese de glicogênio hepático e muscular, além de ter envolvimento no metabolismo de lipídeos e proteínas (Hardie, 2012).

Quando a insulina não exerce bem seu papel no metabolismo, pode-se dizer que há uma resistência à insulina, ou seja, a sensibilidade à insulina nos tecidos onde ela deve desempenhar sua ação está prejudicada (Laakso & Kuusisto, 2014). A resistência à insulina ocorre em vários tecidos, sendo os principais afetados, o hepático, muscular e adiposo. O fígado é o responsável por manter os níveis adequados de glicose sanguínea através da glicogenólise e gliconeogênese. Porém, quando há resistência à insulina a supressão da produção de glicose se torna prejudicada, com níveis altos de produção independente dos níveis sanguíneos de glicoses estarem normais ou elevados (Lee & Lee, 2014).

O aumento da gordura corporal, sendo essa principalmente a visceral, tem grande ligação com o desenvolvimento da resistência à insulina (Neeland, 2018). O tecido adiposo além de ser uma reserva de energia, também funciona como um órgão endócrino, onde citocinas e quimiocinas são secretadas, muitas dessas de origem



inflamatória (Ahima & LazaR, 2008). Burhans e colaboradores (2019), trazem em seu estudo de revisão a inflamação crônica de baixo grau presente na obesidade, juntamente com o aumento do tecido adiposo como um dos principais fatores para o desenvolvimento da resistência à insulina. Através disso, vê-se uma relação entre a Diabetes tipo 2 e a obesidade, onde estudos mostram que 90% dos portadores de Diabetes tipo 2 estão com obesidade ou sobrepeso (Sartorelli & Franco, 2003; Li et al., 2015).

Em estudos comparando indivíduos obesos e magros pode-se observar que os indivíduos obesos se tornam mais dependentes de glicose para a produção de energia. Em contrapartida, os indivíduos obesos apresentaram uma menor taxa de gasto energético, além da presença de marcadores inflamatórios (Rogge, 2009; Hernández-Aguilera et al. 2013)

No estudo de Amor e colaboradores (2018), onde eles avaliaram vários parâmetros bioquímicos de indivíduos adultos magros e obesos, em seus resultados os pesquisadores não encontraram diferenças significativas na secreção de insulina entre os grupos, porém o grupo obeso apresentava um tendência a ter maior secreção deste hormônio, além disso, os indivíduos obesos apresentaram maior resistência e menor sensibilidade a insulina, sendo necessário maior quantidade de insulina para que a glicose se mantivesse estáveis.

### **1.1.2 Inflamação, Estresse Oxidativo e Danos ao DNA**

A inflamação é uma resposta fisiológica do corpo a alterações das condições normais do mesmo, como por exemplo, patógenos, danos nas células etc. (Chen et. al, 2017). Durante o processo de inflamação, citocinas pro-inflamatórias são secretadas, recrutando macrófagos ao local da inflamação, e com isso, há a criação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), sendo essas utilizadas como uma forma de defesa do corpo (Dan et. al, 2015).

O adipócitos são células que secretam um número grande de citocinas, adipocinas envolvidas na regulação do apetite, funções inflamatórias e imunológicas, metabolismo de glicose e lipídios, homeostase cardiovascular e reprodução, entre outras funções biológicas e fisiológicas importantes (Rodríguez et al., 2015). Em doenças inflamatórias crônicas, como a obesidade, se encontra uma alta produção de espécies

reativas de oxigênio e nitrogênio, levando ao estresse oxidativo (Hussain et al., 2016). O estresse oxidativo ocorre quando há um desbalanço entre a formação e a remoção dessas espécies reativas e também pela diminuição das defesas antioxidantes (Echtay, 2007; Matsuzawa-nagata et al., 2008). Esse desbalanço que ocorre entre as espécies reativas e os antioxidantes, pode levar a danos em macromoléculas, como lipídeos, proteínas e DNA (Duracková, 2010).

O excesso de tecido adiposo faz com que uma maior quantidade de citocinas pro-inflamatórias seja secretada pelos adipócitos, o que leva a um desequilíbrio entre citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, o que resulta em uma inflamação crônica de baixo grau, e com isso, a geração de espécies reativas de oxigênio acaba sendo maior também. Desta forma, vê-se uma correlação entre o estresse oxidativo e a obesidade (Rudich et al., 2007; Jung e Choi, 2014). O tecido adiposo de indivíduos obesos sofre diferentes processos de remodelação celular e estrutural para se adaptar ao ingestão calórica excessiva, incluindo: (a) expansão do tecido adiposo através da regulação da hiperplasia dos adipócitos (aumento no número de células) e hipertrofia (aumento no tamanho das células), (b) infiltração de células imunes no tecido adiposo e (c) a matriz extracelular sofre remodelação para permitir a expansão adequada do tecido (Ferrante, 2013; Sun et al., 2013; Wang et al., 2013; Pellegrinelli et al., 2016).

Sendo assim, no estudo de Zalewska e colaboradores (2020), onde ele avaliou parâmetros de estresse oxidativo e danos ao DNA na saliva de adolescentes obesos e com peso normal, pode-se observar que os adolescentes que possuíam obesidade apresentaram maiores níveis de radicais livres e uma diminuição das enzimas antioxidantes, mostrando assim um desbalanço entre a produção e o sistema de defesa, que leva ao estresse oxidativo. Além disso, os adolescentes obesos apresentaram maiores níveis de danos oxidativos ao DNA, avaliados através da análise da 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG).

As alterações encontradas no DNA, juntamente com aumento do estresse oxidativo, ocorrem pois quando em excesso, essas moléculas interagem facilmente com os ácidos nucleicos, que são moléculas mais frágeis, podendo assim levar essas moléculas a quebras e rupturas de suas ligações, e assim formar os danos ao DNA. Além disso, com a diminuição das defesas antioxidantes, os danos as macromoléculas se

tornam mais fáceis, já que é esse sistema o responsável por eliminar o excesso de espécies reativas do organismo (Roberts e Sindhu, 2009; Talukder, 2011).

Com o objetivo de estudar melhor as alterações causadas pela obesidade, Gasparotto e colaboradores (2018) alimentaram ratos Wistar com uma dieta rica em gordura, como uma maneira de induzir a obesidade nos animais. Em seus resultados eles puderam observar que os animais que foram alimentados com a dieta rica em gorduras apresentaram maiores níveis de citocinas inflamatórias, danos à molécula de DNA, como também maior número de micronúcleos (um marcador de mutações no DNA) do que os animais que consumiram somente a dieta padrão.

No estudo de Donmez-Altuntas e colaboradores (2014), onde o genoma de indivíduos com sobrepeso (IMC >25) e indivíduos normais (IMC <25) foram comparados, avaliando níveis de danos oxidativos ao DNA e a frequência de micronúcleos, não foi encontrada uma correlação entre os danos oxidativos e o IMC. Contudo, foi possível observar uma correlação positiva entre o IMC e a frequência de micronúcleos, mostrando assim, que indivíduos com sobrepeso tendem a ter uma maior instabilidade genômica, podendo ter um risco aumentado para o desenvolvimento de doenças como o câncer. Da mesma forma, no estudo realizado por Tomasello e colaboradores (2011), onde mulheres com obesidade e com peso normal tiveram seu genoma comparado para avaliar os danos ao DNA através do ensaio cometa, foram encontradas correlações positivas em relação a obesidade e o aumento de danos ao DNA.

Os hábitos alimentares são um dos fatores que estão envolvidos na alteração do material genético, aumentando assim a instabilidade genômica. Com a avaliação dos hábitos alimentares de crianças com obesidade e com peso normal, associando com o aparecimento de micronúcleos e alterações celulares epiteliais da mucosa, Espinosa Arreola e colaboradores (2019), observaram em seu estudo que o padrão nutricional de crianças pode alterar não somente o peso, como também aumentar a frequência de mutações ao DNA de células da mucosa oral, apresentando assim maiores números de micronúcleos.

## 1.2 MODELOS ANIMAIS DE OBESIDADE

O estudo sobre os mecanismos e as alterações biológicas causadas pelo desenvolvimento da obesidade, tem se tornado cada vez mais importante, e a utilização de modelos animais para mimetizar essa patologia, tem facilitado muito as investigações sobre essa doença (Rosini et al., 2012). Desta forma, pode-se compreender melhor alguns mecanismos que em humanos, tornam a pesquisa mais difícil, além de facilitar a busca por tratamentos comportamentais, alimentares e farmacológicos (Convit, 2012).

Para se estudar a obesidade em animais, existem diferentes modelos para a indução da doença, podendo ser eles através de modificações genéticas ou indução através de dieta hipercalórica (Lutz & Woods, 2012; Nilsson et al., 2012).

Estudos animais com modelos genéticos, tem sido muito utilizado para a avaliação de novas terapias e também para os estudos de vias específicas que sofrem mutações na obesidade. Sendo assim, modelos de indução genéticos, podem ser por mutações espontâneas em genes específicos, como por exemplo o gene da leptina, ou podem ser transgênicos, onde uma parte do genoma no animal sofre modificações (Lutz e Woods, 2012)

Mas, para que haja um modelo fidedigno com as alterações existentes no corpo humano, a indução através da modificação da dieta, tornando-a hipercalórica e com alto valor energético, tem sido vista como a melhor opção, já que dessa forma, consegue-se avaliar o mesmo padrão de comportamento nutricional de um humano com obesidade (Cesaretti; Kohlmann, 2006; Rosini et al., 2012). Nesse sentido, modelos de obesidade induzida por dieta são um dos modelos mais utilizados para o estudo da obesidade (Giles et al., 2016).

Estudos dietéticos em modelos animais são importantes para elucidar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da obesidade (Bagnol et al., 2012). Modelos de obesidade induzida por dieta, incluindo dietas ricas em gordura e dietas tipo cafeteria, ou também chamada dieta ocidental, têm sido empregadas para estudar a obesidade em roedores (Crew et al., 2016; Nguyen et al., 2017; Xia et al., 2018).

A dieta cafeteria consiste em alimentos consumidos por humanos, altamente enérgicos e altamente palatáveis, para desencadear a obesidade induzida pela dieta em animais de laboratório (Sclafani & Springer, 1976). Leffa e colaboradores (2014), alimentaram camundongos com uma dieta cafeteria, e conseguiram observar

comportamento metabólico semelhante ao encontrado em humanos obesos. Desta forma, a dieta cafeteria tem sido vista como uma boa alternativa para induzir a obesidade e para que possa ser possível estudar os mecanismos envolvidos nessa patologia.

### 1.3 ÔMEGA-3

Os lipídeos participam de importantes funções no corpo humano, como na estrutura das membranas celulares e em processos metabólicos (Arbex et al., 2015). Como o corpo humano não é capaz de sintetizar alguns desses ácidos graxos, é necessário adquiri-los através da dieta, podendo ser eles de origem vegetal, como alguns grãos e oleaginosas, ou através do consumo de peixes como salmão, atum e sardinha (Surette, 2008; Arbex et al., 2015).

Os ácidos graxos são classificados conforme a presença de duplas ligações em sua cadeia estrutural. Sendo assim, os que possuem a dupla ligação são denominados insaturados, e os que não possuem, são denominados saturados. Os ácidos graxos poli-insaturados são aqueles que possuem mais de uma dupla ligação em sua cadeia, e o ácido graxo que possui destaque nesta categoria é o Ômega-3 (Youdim & Martin, 2000).

O ômega-3 é constituído por ácidos graxos poli-insaturados, sendo esses ácidos fundamentais para o funcionamento do organismo humano (Gómez Candela, 2011). Os principais ácidos graxos presentes no ômega-3 são o ácido alfa-linolênico, o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenoico (DHA) (Anderson & Ma, 2009; Arbex et al., 2015). O consumo de alimentos que contém EPA e DHA, tem grande importância, já que esses lipídeos têm utilização não somente nas membranas celulares, bem como influenciam nas respostas fisiológicas do organismo (Farooqui, 2012).

O ômega-3 auxilia no desenvolvimento do corpo de várias maneiras, ao longo de toda vida. Ele tem papel importante no desenvolvimento do cérebro além de ter demonstrado agir como mediador inflamatório, auxiliando na saúde cardiovascular (Janssen & Kiliaan, 2014). O EPA e o DHA presentes no ômega-3, possuem uma ação anti-inflamatória, já que esses ácidos interagem com as vias inflamatórias, agindo como supressor das citocinas inflamatórias (Chapkin et al., 2009; Yates et al., 2014; Ellulu et al., 2015; Lorente-Cebrián et al., 2015).

O DHA é um dos lipídeos estruturais mais abundantes no cérebro e esse ácido graxo possui funções vitais para as funções deste órgão (Agrawal & Gomez-Pinilla, 2012). Esse ácido graxo tem a capacidade de ativar e modular a transcrição de alguns genes, e supõe-se que através dessa capacidade, o DHA possa baixar as concentrações plasmáticas de triglicerídeos em jejum, para aumentar a sensibilidade à insulina e reduzir a inflamação (Zapata-Gonzalez et al., 2008; Bhaswant et al., 2015; Calder, 2015).

Já o EPA, é um dos ácidos graxos responsáveis pela síntese de alguns mediadores inflamatórios de origem lipídica (Calder, 2006). No estudo de Oikawa e colaboradores (2009), onde pacientes com metabolismo da glicose afetado, hipercolesterolemia e diabetes mellitus foram suplementados com EPA, com o objetivo de diminuir problemas cardiovasculares, observou-se que os pacientes suplementados possuíam um menor índice de problemas cardíacos, como infartos do miocárdio e arritmias cardíacas, quando comparado com os pacientes que não foram suplementados.

Uma dieta rica em ômega-3 pode diminuir os níveis de triglicerídeos, como também, arritmias cardíacas e diminuir a agregação plaquetária, diminuindo as chances de formação de coágulos sanguíneos. Além disso, estudos mostram que o ômega-3 tem capacidade de diminuir o estresse oxidativo e a apoptose celular (Lee et al, 2008; Bermúdez & Sinclair, 2009; Farooqui, 2012). Estudos mostram que ácidos graxos poli-insaturados, como ômega-3 induzem a produção de moléculas antioxidantes através da produção de mRNAs, reduzindo assim, as EROs e os danos ao DNA (Arnér & Holmgren, 2000; Orino & Watanabe, 2008).

A alimentação com ômega-3 tem demonstrando ter uma grande importância para a diminuição de alterações genéticas. O estudo de Vande-Loock e colaboradores (2014), avaliou a frequência alimentar de mulheres grávidas, sendo essa rica ou não em ômega-3, associando com a frequência de micronúcleos. Em seus resultados, os pesquisadores observaram que o maior consumo de ômega-3 estava ligado com uma menor frequência de micronúcleos nessas mulheres.

O ômega-3 demonstrou ter uma ação antígenotóxica e antimutagênica, ação essa avaliada através do estudo de Turkez e Aydin (2013), onde os pesquisadores avaliaram *in vitro* a capacidade do ômega-3 de reverter danos ao DNA, micronúcleos e

também de reduzir as aberrações cromossômicas induzidas através da utilização de um agente químico que possui ação genotóxica e mutagênica em linfócitos.

### **1.3.1 Ômega-3 e Obesidade**

O tratamento para a obesidade tem se mostrado cada vez mais importante, não somente para a perda de peso, mas para diminuir os danos metabólicos causados por essa doença (Paumgarten, 2011). O ômega-3 é um composto natural que tem potencial de ser útil para melhorar as alterações metabólicas causadas pela obesidade (Buckley & Howe, 2010).

Em estudos com humanos, o ômega-3 foi capaz de trazer benefícios como a redução da adiposidade, redução da inflamação sistêmica e também dos níveis de triglicerídeos séricos, bem como foi capaz de reduzir os níveis de EROs, reduzindo assim o estresse oxidativo (Itariu et al., 2012; Kiecolt-Glaser et al., 2013).

No estudo de Peres e colaboradores (2018), onde indivíduos obesos foram suplementados com 2000mg de ômega-3, e posteriormente passaram por um treinamento de exercícios físico exaustivo, foram avaliados os níveis de citocinas pró-inflamatórias e os níveis de danos ao DNA, e os indivíduos que receberam a suplementação de ômega-3, apresentaram menores níveis de citocinas pró-inflamatórias, como também, redução dos níveis de danos ao DNA.

Em estudos com animais, o ômega-3 também tem demonstrado vários benefícios quando se trata de obesidade, como a redução do ganho de gordura corporal, melhora no perfil lipídico, além de redução da resistência à insulina, como também a intolerância à glicose e a redução da inflamação dos tecidos periféricos (Rokling-Andersen et al., 2009; Samane et al., 2009; Kalupahana et al., 2010; Liu et al., 2013; Rossmeisl et al., 2014; Bargut et al., 2015). Além disso, um potencial do ômega-3 em reduzir o índice de adiposidade em animais obesos suplementados com óleos ricos em ômega-3 também tem sido observado por pesquisadores (De Souza et al., 2020).

Com o objetivo de melhorar a resistência à insulina causada por uma dieta hiperlipídica em ratos, Chacińska e colaboradores (2019), suplementaram ratos com ômega-3, após indução de obesidade com dieta hiperlipídica. Em seus resultados, observaram uma melhora na resistência à insulina, além de uma diminuição dos

depósitos de gordura nos animais suplementados. Corroborando com isso, o estudo de De Castro e colaboradores (2012), que tratou ratos Wistar com alto teor de frutose, observou que a suplementação com ômega-3 melhorou a tolerância a glicose no organismo desses ratos.

No estudo de Mellouk e colaboradores (2016), onde foi estudada a obesidade induzida através de dieta cafeteria, os pesquisadores utilizaram como forma de intervenção a suplementação de óleo de krill, um crustáceo rico em ômegas-3 e 6. Em seus resultados, eles puderam observar uma melhora dos danos ao DNA, diminuição do estresse oxidativo e melhora nas enzimas antioxidantes.

Desta forma, pode-se sugerir que o ômega-3 tenha um bom potencial para ser utilizado como um tratamento na redução das alterações metabólicas causadas pela obesidade.

#### 1.4 JUSTIFICATIVA

A obesidade tem aumentado sua prevalência nos últimos anos, se tornando assim um grave problema de saúde pública. Com isso, vê-se a necessidade de estudar mais sobre as alterações causadas pela obesidade, e assim, conseguir desenvolver melhores métodos de tratamento para amenizar as disfunções causadas por essa patologia, podendo assim trazer uma melhora à saúde dos indivíduos que sofrem com essa patologia. Através dos estudos que utilizaram Ômega-3, pode-se observar melhora em vários parâmetros relacionados à obesidade, como melhora na resistência à insulina, perfil inflamatório, diminuição da instabilidade genômica, etc. Sendo assim, acredita-se que o Ômega-3 seja um bom método de intervenção para a redução das alterações metabólicas e genotóxicas causadas pela obesidade, além de uma boa alternativa como forma de tratamento para essa doença.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação de Ômega-3 em camundongos alimentados com uma dieta cafeteria.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Investigar se a dieta cafeteria altera consumo alimentar, peso corporal e eficiência energética e se o ômega-3 é capaz de reverter estes efeitos;

2) Avaliar se a dieta cafeteria leva a resistência à insulina e hiperglicemia e se o Ômega-3 tem a capacidade de reverter esse quadro.

3) Analisar se a dieta cafeteria altera parâmetros de genotoxicidade e mutagenicidade em sangue periférico e medula óssea dos camundongos e se a suplementação de ômega-3 é capaz de reverter estas alterações.

4) Avaliar se a dieta cafeteria é capaz de aumentar o índice de adiposidade e se a suplementação com ômega-3 consegue diminuir esse índice.

### 3 METODOLOGIA

Os testes e procedimentos técnicos foram realizados no Laboratório de Biomedicina Translacional da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), pelo Grupo de Pesquisa em Genética Toxicológica (GPGTOX). O experimento aqui descrito teve sua aprovação pela Comissão de ética em uso de animais – CEUA, com o protocolo 035/2018-2 (ANEXO I).

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados no total 48 camundongos *Swiss* machos adultos, com 30 dias de vida. Os animais foram obtidos do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense e alojados em caixas de polietileno, com comida e água *ad libitum* e mantidos em um ciclo de 12 horas claro-escuro, com temperatura controlada de  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2 DIETA CAFETERIA (CAF)

A dieta cafeteria foi descrita por Shafat et al. (2009) e sofreu adaptações para esse experimento, sendo ela composta por alimentos como waffer, bolachas de chocolate recheada, bolacha amanteigada, goiabada, mortadela, salsichas, salgadinhos de queijo, bacon e Doritos®, paçoca de amendoim, geleia de abóbora com coco, chocolate ao leite, doce de leite, pão, bolacha salgada, barrinha de cereal, marshmallow, bolo e goma. Além da dieta cafeteria, os animais também obtiveram acesso a dieta padrão e a água a vontade. O fornecimento de alimentos de ambas as dietas, dieta padrão e dieta cafeteria, foi renovado nas segundas, quartas e sextas-feiras até complementar as 20 semanas de experimento. Os cardápios semanais estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1. Cardápio semanal dos animais que serão alimentados com dieta cafeteria.**

<b>Dias da semana</b>	<b>Alimentos</b>
Segunda-feira e terça-feira	Geleia de coco e abóbora, goma, salsicha, bolo, pão, salgadinho de bacon, <i>marshmallow</i> e biscoito amanteigado.
Quarta-feira e quinta-feira	Doce de leite, goma, goiabada, <i>wafer</i> de morango, Mortadela, pão, salgadinho de queijo, barrinha de cereal.
Sexta-feira, sábado e domingo	Bolacha recheada, geleia de coco e abóbora, paçoca, bolacha salgada, Salgadinho de queijo nacho, <i>marshmallow</i> , chocolate ao leite, pão e salgadinho de bacon.

Fonte: Autor, 2020.

Na tabela 2 estão descritos os constituintes de cada dieta, sendo que, os cálculos foram feitos baseados nas informações fornecidas pelos fabricantes nos rótulos das embalagens dos alimentos industrializados, bem como, conforme as informações fornecidas pelo fabricante da ração.

**Tabela 2. Composição das dietas.**

	<b>Dieta padrão (3,36 kcal/g)</b>		<b>Dieta cafeteria (3,83 kcal/g)</b>	
	g/100g	kcal/100g	g/100g	kcal/100g
Proteínas	22	88	6	24
Carboidratos	53	212	65	260
Gorduras	4	36	11	99

Legenda: g – gramas; kcal – quilocalorias.

Fonte: Autor, 2020.

### 3.3 SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA-3

O Ômega-3 que foi utilizado como tratamento neste estudo e dado aos animais através de gavagem. Ele foi proveniente de capsulas de óleo de peixe, contendo cerca de 350 mg de Ácido eicosapentaenoico (EPA) e 250 mg de Ácido docosahexaenoico (DHA), somando assim cerca de 600 mg de Ácidos graxos poli-insaturados. A concentração administrada aos animais, foi de 2,3 g/kg, conforme o trabalho de Silva e colaboradores (2017). Os animais que não receberam ômega-3, receberam gavagem com água mineral, para passarem pelo mesmo processo de estresse dos animais suplementados, evitando assim viés nos resultados. Segue abaixo tabela 3 com as informações nutricionais do Ômega-3 fornecidas pelo fabricante.

**Tabela 3. Informações nutricionais do Ômega-3 fornecidas pelo fabricante.**

<b>Informações Nutricionais – Porção de 2,0g (2 cápsulas)</b>		
	<b>Quantidade por porção</b>	<b>Valor diário – VD(*)</b>
<b>Valor energético</b>	18kcal = 76kj	1
<b>Gorduras totais</b>	2,0g	4
<b>Gorduras saturadas</b>	0g	0
<b>Gorduras trans</b>	0g	-
<b>Gorduras monossaturadas</b>	0,1g	**
<b>Gorduras Poli-Insaturadas, das quais:</b>	1,7g	**
Ômega-3	1,3g	**
EPA	720mg	**
DHA	480mg	**
<b>Colesterol</b>	3,0g	1
<b>Vitamina E</b>	3,2g	32

\*% valores diários com base em uma dieta de 2000kcal ou 8400KJ. Seus valores diários podem ser menores dependendo das suas necessidades energéticas. \*\*VD não estabelecido.

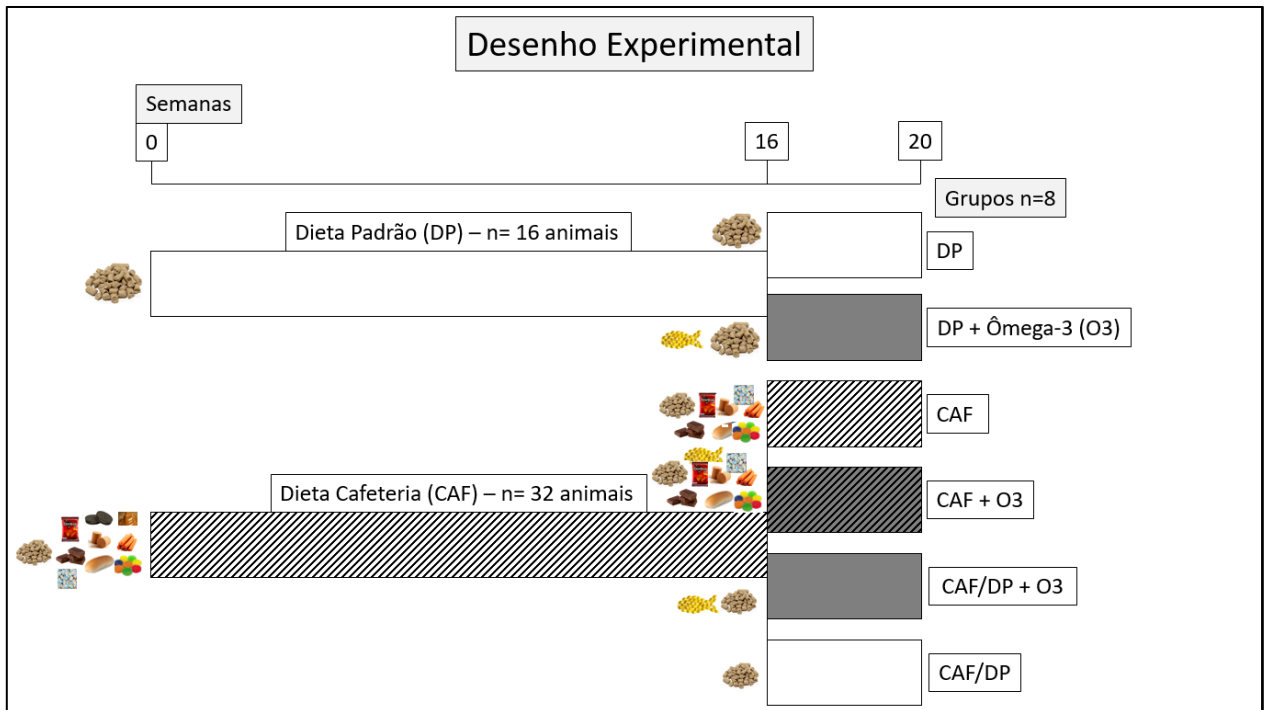
**Ingredientes:** Óleo de peixe (Ômega-3) e Vitamina E (dl-alfa-tocoferil acetato). Cápsula – gelificante gelatina, veículo – água purificada e umectante – glicerina. **ALERGICOS:** Contém derivados de peixe. **NÃO CONTÉM GLUTÉM. NÃO CONTÉM FENILALANINA.**

Informações fornecidas pelo fabricante.

Legenda: g – gramas; mg – miligramas; kcal – quilocalorias, KJ – quilojoules.

### 3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Para a realização desse experimento, foram utilizados 48 camundongos machos swiss. Os animais foram divididos inicialmente em dois grandes grupos, sendo eles: grupo alimentado com dieta padrão, com n de 16 animais, e grupo alimentado com dieta cafeteria, com n de 32 animais. Após 16 semanas, os dois grandes grupos foram divididos em 6 grupos, com 8 animais cada, e a partir da 16ª semana, os animais passaram por mudanças de dietas e/ou suplementação com ômega-3, conforme apresentado na figura 1.



**Figura 1. Desenho experimental**

Legenda: DP – Dieta padrão; CAF – Dieta cafeteria; O3 – Ômega-3; n – Número de animais.

Fonte: Autor, 2020.

Abaixo estão descritos os grupos mostrados na Figura 1:

Grupo 1 – Dieta Padrão (DP) – Animais que receberam somente a dieta padrão, com 16 animais.

Grupo 2 – Dieta Cafeteria (CAF) – Animais que receberam a dieta cafeteria e a dieta padrão, com 32 animais.

Após 16 semanas, os grupos 1 e 2 passaram por uma divisão com 8 animais em cada grupo (como mostrado na figura 1), e os grupos passaram a ser:

Grupo 1 – Dieta Padrão (DP) – Animais que receberam somente a dieta padrão durante todo o tratamento, e receberam água via gavagem.

Grupo 2 – Dieta Cafeteria (CAF) – Animais que receberam a dieta cafeteria durante todo o tratamento, e receberam água via gavagem.

Grupo 3 – DP + Ômega-3 (O3) – Animais que receberam a dieta padrão durante todo o período do tratamento, mas a partir da 16<sup>o</sup> semana, passaram a receber Ômega-3 também via gavagem.

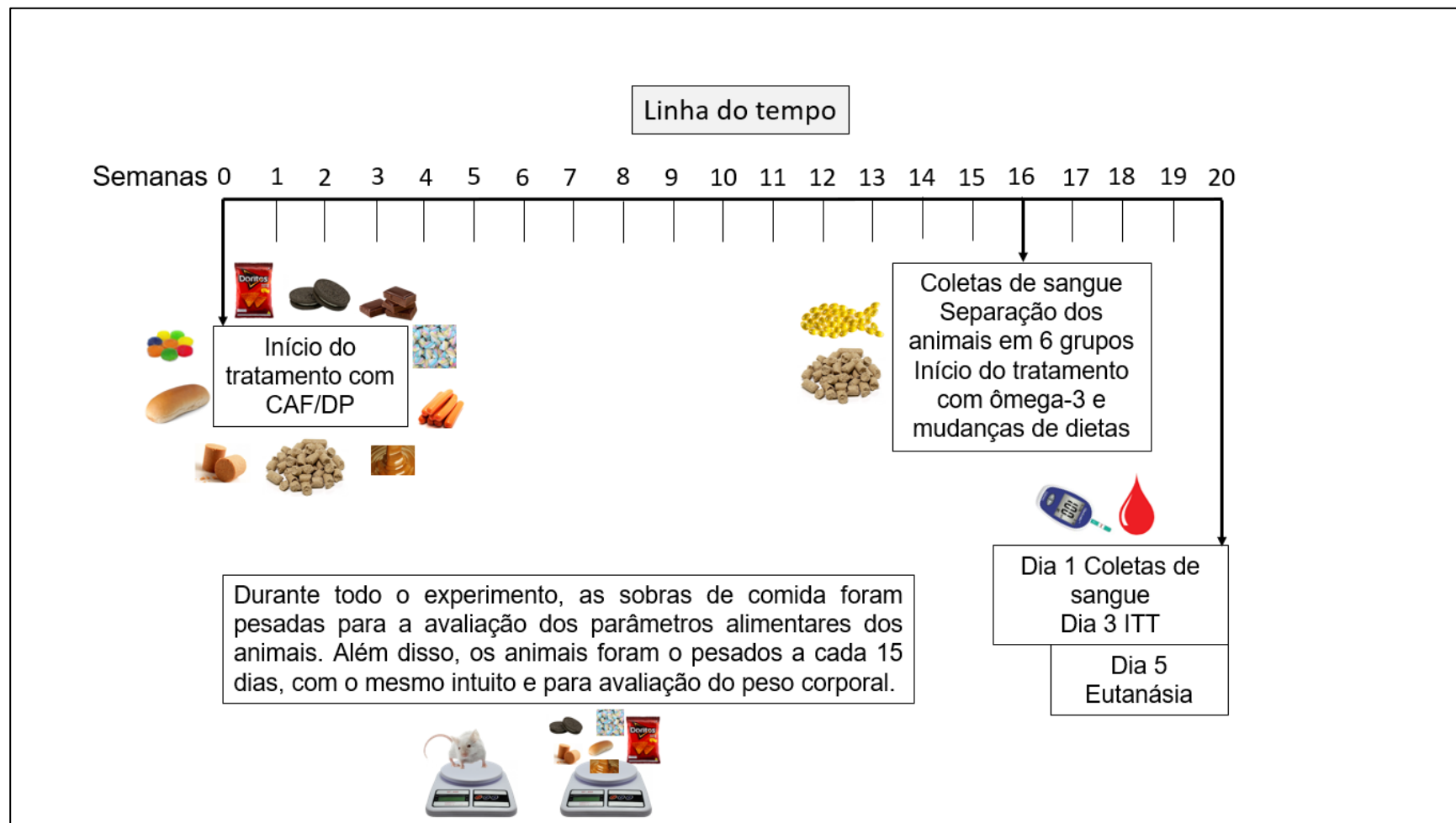
Grupo 4 - CAF + O3 – Animais que receberam dieta cafeteria durante todo o tratamento, mas a partir da 16<sup>o</sup> semana, passaram a receber Ômega-3 via gavagem.

Grupo 5 - CAF + DP e O3 – Animais que receberam a dieta cafeteria até a 16<sup>o</sup> semana, e a partir da 17<sup>o</sup> semana, passaram a receber a somente a dieta padrão e o Ômega-3 via gavagem.

Grupo 6 - CAF + DP – Animais que receberam a dieta cafeteria até a 16<sup>o</sup> semana, e a partir da 17<sup>o</sup> semana, passaram a receber a somente a dieta padrão, além de água mineral via gavagem.

\*Os grupos que receberam a dieta cafeteria também obtiveram acesso a ração padrão.

O experimento teve duração de 20 semanas, sendo que durante esse período, os animais sofreram uma coleta de sangue após as 16 semanas, para as análises genotóxicas e bioquímicas (ensaio cometa, glicemia de jejum e ITT). Ao completarem 20 semanas, os animais passaram novamente por análises bioquímicas e por análises genotóxicas. No final das 20 semanas os animais foram eutanasiados por decapitação para a dissecação do tecido adiposo, utilizado para o índice de adiposidade e também para a retirada de medula óssea, utilizada no teste de micronúcleo. Segue abaixo a linha do tempo, mostrando os momentos onde ocorreram as análises:



**Figura 2. Linha do tempo**

Legenda: DP – Dieta padrão; CAF – Dieta cafeteria; ITT – Teste de tolerância a insulina.

Fonte: Autor, 2020.

### 3.5 PESAGENS DOS ALIMENTOS E ANIMAIS

Durante todo o período de experimento, as comidas ofertadas aos animais passaram por controle, sendo esse realizado através de pesagens das quantidades de alimentos colocados e também das sobras dos alimentos ofertados aos animais. Os animais passaram por pesagens, com o objetivo de avaliar se a dieta cafeteria altera o peso dos animais e também, se a suplementação de Ômega-3 ou as mudanças de dietas podem alterar esse peso. Através das pesagens das comidas e suas sobras, em conjunto com as pesagens dos animais, foram realizados cálculos do consumo em gramas, consumo energético e também a eficiência energética dos animais.

#### 3.5.1 Pesagens dos animais

Os animais foram pesados a cada 15 dias, para a realização dos cálculos de consumo alimentar dos animais (cálculo detalhado no item abaixo – 3.5.2). Além disso, o peso dos animais foi aferido na 16ª semana de experimento e na 20ª semana (antes da eutanásia), sendo o peso na 16ª semana uma das características utilizadas para a caracterização do modelo animal de obesidade, e ao final do experimento (20ª semana), como uma forma de verificar a ação do Ômega-3 no peso em gramas dos animais.

#### 3.5.2 Cálculos de Consumo alimentar em gramas, Consumo Energético e Eficiência Energética

Com base na ingestão de alimentos e na quantidade correspondente de energia, os seguintes parâmetros foram calculados: consumo total energético (kcal/dia) = média do consumo alimentar/calorias da dieta por dia e eficiência energética (g/kcal) = média do ganho de peso corporal/média do consumo energético (Diniz et al., 2004; Diniz et al., 2005).

### 3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS



Com o intuito de avaliar se o consumo da dieta cafeteria leva a alterações metabólicas, foram avaliados a glicemia de jejum e a tolerância à insulina. Para tanto, foram realizadas coletas de sangue após as 16 semanas e na 20ª semana de acordo com as especificações abaixo:

Foram realizado uma coleta de sangue no meio do experimento nos grupos G1, G2, onde 6 animais de cada grupo foram submetidos a uma coleta de 100 uL de sangue da extremidade da veia caudal (quantidade de sangue suficiente para realizar um total de sete coletas, que ocorreu em sete tempos diferentes: 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos) dos animais após 12 horas de jejum, para avaliar a glicemia de jejum e realizar o teste de tolerância à insulina (ITT). Ao completarem 20 semanas, os animais (todos os 6 grupos) passaram novamente pela mesma coleta de sangue com o objetivo de realizar novamente os mesmos testes, mas desta vez, avaliando a suplementação de Ômega-3.

### **3.6.1 Glicemia de jejum e teste de tolerância à insulina (ITT)**

O alimento foi retirado seis horas antes do teste e a primeira coleta de sangue equivaleu ao tempo zero do teste. Após isso, a insulina (2U/Kg de peso corporal) foi injetada intraperitonealmente e amostras do sangue foram coletadas através de incisão na cauda dos animais nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, para a determinação da glicose sérica através de glicosímetro. A velocidade constante do decaimento da glicose (Kitt) foi calculada usando a fórmula  $0,693/t_{1/2}$ . O  $t_{1/2}$  da glicose foi calculado a partir da curva da análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose sérica durante a fase de decaimento linear. Esse teste foi realizado para comprovação da instalação da resistência à insulina nos camundongos (Wajchenberg et al., 1999). Foram utilizados 6 animais/grupo.

### **3.7 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE E MUTAGÊNESE**

Com o intuito de avaliar se o consumo da dieta cafeteria afeta a estabilidade genômica dos camundongos e se o ômega-3 é capaz de atenuar essa alteração foram feitas análises de Genotoxicidade nestes animais em dois momentos:

- Momento 1: Para as análises de Genotoxicidade foram utilizados 8 animais/grupo, onde foi coletado cerca de 30uL de sangue da veia caudal (figura 2), após 16 semanas.

- Momento 2: Ao final das 20 semanas de experimento, para realização dos testes de Genotoxicidade e Mutagênese, foram coletadas amostras de sangue para o Cometa e medula óssea para o Teste do Micronúcleo de 8/animais/grupo.

### **3.7.1 Ensaio Cometa**

O ensaio cometa foi realizado sob condições alcalinas, conforme descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações sugeridas por Tice et al. (2000). As amostras de sangue foram colocadas em epperforfs com herapina, para evitar a coagulação do sangue. As células sanguíneas (alíquotas de 5  $\mu$ L) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0.75%, w/v, 115  $\mu$ L ) e a mistura foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), cobrindo posteriormente com uma lamínula e levando, então, à geladeira por aproximadamente 5 minutos a 4°C para solidificação. Logo após, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 1 semanas.

Após este período, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH>13) por 30 minutos para o desenovelamento do DNA e a corrida eletroforética, foi realizada no mesmo tampão nas seguintes condições: a 30v e 300mA por 20 minutos. Todas estas etapas foram realizadas sob luz indireta fraca amarela. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado com 10 mg/mL de solução de Sybrgold (Invitrogen, USA) para posterior análise em microscópio de fluorescência com aumento de 400x. Foi realizada avaliação de 100 células por indivíduo e por tecido (50 células em cada lâmina duplicada). Tais células foram avaliadas pelo software CometAssay IV e o parâmetro utilizado foi o tail intensity. Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a

confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas.

### **3.7.2 Micronúcleo**

O teste de micronúcleos foi realizado de acordo com o programa Gene-Tox da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (Mavournin et al., 1990; Krishna & Hayashi, 2000).

Após a extração da medula óssea, um esfregaço foi preparado diretamente na lâmina com uma gota de soro bovino fetal. As lâminas foram coradas com Giemsa 5%, secas e codificadas para análises às cegas.

Como uma medida de toxicidade na medula óssea, a relação entre eritrócitos policromáticos (células imaturas) e eritrócitos normocromáticos (células maduras) (EPC/ENC) foram analisadas em 200 eritrócitos/animal.

A incidência de micronúcleos (MN) foi observada em 2000 EPCs e ENCs para cada animal (ou seja, 1000 a partir de cada uma das duas lâminas preparadas em duplicata), usando microscópio óptico de luz branca com ampliação de 1000x. O número médio de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMn) individual foi utilizado como unidade experimental

## **3.8 ÍNDICE DE ADIPOSIDADE**

Para avaliar o índice de adiposidade dos animais, após a eutanásia, foram extraídos o tecido adiposo epididimal, mesentérico, retroperitoneal e perirrenal para o cálculo do índice de adiposidade (grama de gordura /grama peso corporal x 100), de 6 animais por grupo (Luciano, 2018).

## **3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram expressos como média e desvio padrão da média (média  $\pm$  DP). Para a análise estatística a normalidade das variáveis foi analisada através do teste de Bartlett's. Assumindo que os dados tenham uma distribuição normal, para a comparação entre duas médias, foi utilizado para as análises de 16 semanas o teste

t de Student para amostras independentes e, para a comparação entre os grupos de 20 semanas, a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do post hoc de Bonferroni. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Foram consideradas diferenças significativas quando o  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CONSUMO ALIMENTAR, CONSUMO ENERGÉTICO, EFICIÊNCIA ENERGÉTICA E PESO CORPORAL

O consumo alimentar e peso dos animais submetidos ao experimento foi avaliado com o objetivo de verificar se a Dieta CAF poderia alterar os padrões alimentares e peso dos animais alimentados com a mesma. Além disso, as análises foram divididas em duas partes, sendo em 16 semanas uma caracterização do modelo animal de obesidade, e em 20 semanas a verificação dos efeitos do Ômega-3 sobre as alterações que a obesidade induzida por esta dieta poderia causar.

Na Tabela 4 estão apresentados os dados de Consumo total em gramas, Consumo total energético, eficiência energética e peso corporal em gramas, dados esses apresentados em 16 semanas e 20 semanas de experimento.

**Tabela 4 Dados acerca do consumo alimentar, consumo energético, eficiência energética e peso corporal em animais alimentados com uma dieta cafeteria e suplementados com Ômega-3.**

Grupos	16 semanas						20 semanas					
	Consumo total (g)			Consumo total energético	Eficiência energética	Peso corporal (g)	Consumo total (g)			Consumo total energético	Eficiência energética	Peso corporal (g)
	DP	CAF	TOTAL				DP	CAF	TOTAL			
<b>DP</b>	5,2	-	5,2 ± 0,1	17,7 ± 0,3	1,9 ± 0,04	36,6 ± 0,8	4,75	-	4,75 ± 0,3	17,5 ± 1,6	2,0 ± 0,1	38,0 ± 1,4
<b>DP+O3</b>	-	-	-	-	-	-	4,8	-	4,8 ± 0,6	15,7 ± 2,4	2,4 ± 0,2	38,3 ± 0,3
<b>CAF</b>	1,25	4,35	5,6 ± 0,05 <sup>a</sup>	20,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,9 ± 0,03	46,5 ± 0,9 <sup>a</sup>	0,87	4,83	5,7 ± 0,6 <sup>a</sup>	20,7 ± 1,3 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,2	46,2 ± 3,0 <sup>a</sup>
<b>CAF+O3</b>	-	-	-	-	-	-	0,67	4,03	4,7 ± 0,5 <sup>b</sup>	18,7 ± 2,3	2,1 ± 0,2	40,8 ± 2,2 <sup>b</sup>
<b>CAF/DP+O3</b>	-	-	-	-	-	-	4,5	-	4,5 ± 0,4 <sup>b</sup>	15,6 ± 2,1 <sup>c</sup>	2,5 ± 0,1 <sup>c</sup>	38,6 ± 2,1 <sup>b</sup>
<b>CAF/DP</b>	-	-	-	-	-	-	6,6	-	6,6 ± 1,4 <sup>d</sup>	20,7 ± 2,0 <sup>d</sup>	1,8 ± 0,2 <sup>d</sup>	40,2 ± 2,9 <sup>b</sup>

DP – Dieta padrão; CAF – Dieta cafeteria; O3 – Ômega-3. Os dados foram expressos em média e desvio padrão, onde realizou-se uma média dos dados de consumo das 16 semanas de alimentação, e posteriormente a média do período de suplementação (4 semanas de suplementação, totalizando 20 semanas de experimento). No caso do peso em gramas, foi realizada a média e desvio padrão do peso dos animais na semana de análise, sendo elas em 16 semanas e 20 semanas de experimento. <sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao grupo DP no mesmo período de tempo; <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao grupo CAF 20 semanas; <sup>c</sup> Diferença significativa em relação ao grupo CAF+O3 no mesmo período de tempo; <sup>d</sup> diferença significativa em relação ao grupo CAF/DP+O3 no mesmo período de tempo. Teste *t* em 16 semanas e Anova de uma via com post-hoc de bonferroni em 20 semanas, foram considerados significativos os resultados com  $p < 0,05$ .

A análise dos padrões alimentares demonstrados na tabela 4 em 16 semanas, mostram que os animais do grupo CAF possuíam maior consumo alimentar em gramas do que o grupo DP. O mesmo comportamento foi visto no consumo total energético dos animais, sendo o grupo CAF apresentou valores maiores que o grupo DP. Em relação a eficiência energética, não houve diferença significativa entre os grupos. Para a caracterização do modelo animal, avaliou-se também o peso em gramas, demonstrado na tabela 4, onde observou-se que em 16 semanas, o grupo CAF possuía um peso em gramas significativamente maior que o grupo DP.

Após a suplementação de Ômega-3 por 4 semanas, as análises de padrões alimentares foram realizadas novamente (20 semanas; Tabela 4). Os grupos CAF e DP continuaram com o mesmo comportamento alimentar visto em 16 semanas, apresentando diferenças significativas entre o consumo em gramas e consumo energético, onde o grupo CAF apresentou ambos maiores, sem alterações no que se refere à eficiência energética. O mesmo aumento em relação ao peso em gramas visto em 16 semanas, foi observado em 20 semanas, quando comparados os grupos CAF e DP, onde os animais alimentados com CAF possuíam maior peso em gramas.

No que se refere aos grupos que agora sofreram diferentes tipos de intervenção, podemos observar inicialmente que o grupo DP + O3, controle da suplementação de Ômega-3, não demonstrou nenhuma diferença significativa em relação ao grupo DP, demonstrando assim que a suplementação com O3 não altera os padrões alimentares, bem como o peso dos animais. Já o grupo CAF + O3, apresentou menor consumo em gramas, em relação ao grupo CAF, mas não apresentou diferença em relação consumo total energético e eficiência energética. No entanto, no que se refere ao peso, podemos observar uma diminuição significativa no grupo CAF que recebeu O3 por 4 semanas. Quando realizada a comparação entre o grupo CAF+O3 e CAF/DP + O3, o grupo CAF+O3 apresentou um maior consumo total energético, porém uma menor eficiência energética. Porém, os grupos CAF+O3 e CAF/DP+O3 não apresentaram diferenças entre si no consumo total em gramas nem em relação ao peso corporal, mas ambos apresentaram valores menores de peso corporal e consumo total em gramas em relação ao grupo CAF.

Na comparação realizada entre os dois grupos que tiveram mudanças de dieta, suplementados ou não com O3, grupos CAF/DP+O3 e CAF/DP, o grupo CAF/DP, que não foi suplementado com Ômega-3, mas apenas passou a receber uma dieta padrão, apresentou diferença significativa em todos os parâmetros alimentares em relação ao grupo CAF/DP+O3, sendo o consumo total em gramas e o consumo energético maiores, e a eficiência energética menor, apenas não apresentado diferença significativa no que se refere ao peso corporal. Além disso, o grupo CAF/DP apresentou diferenças significativas em relação ao grupo CAF, também nas 20 semanas, sendo o consumo em gramas maior e a eficiência energética menor (Tabela 4).

#### 4.2 GLICEMIA DE JEJUM E ITT

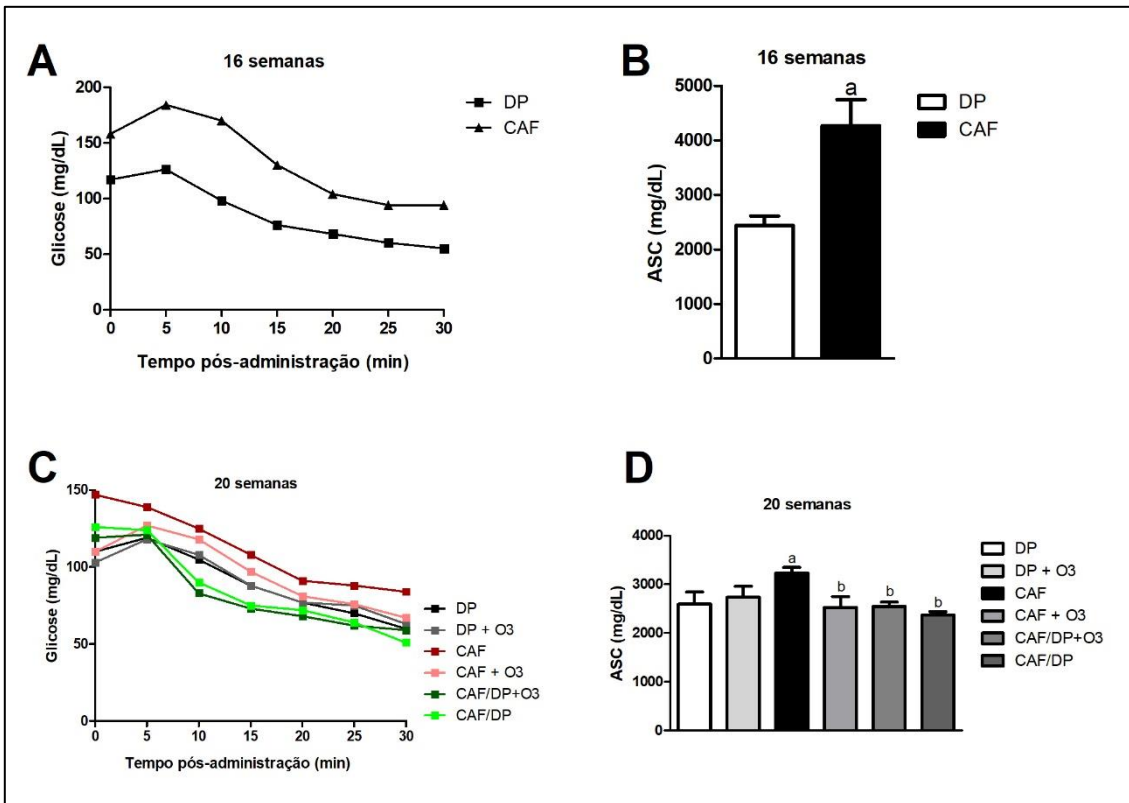
A glicemia de jejum, demonstrada na tabela 5, juntamente com o ITT (figura 3), foram utilizados para a avaliação de parâmetros metabólicos que sofrem alterações com a obesidade, e com o intuito de verificar a capacidade do modelo animal em desenvolver essas alterações, como por exemplo, resistência à insulina e hiperglicemia.

**Tabela 5 - Glicemia de jejum expressa em média e desvio padrão em 16 semanas e após suplementação, em 20 semanas, com n de 6 animais/grupo.**

Grupos	16 semanas	20 semanas
	Glicemia de jejum (mg/dL)	
DP	112,3 ± 4,2	105,6 ± 12,12
DP+O3	-	96,6 ± 13,5
CAF	162,5 ± 6,8 <sup>a</sup>	144,0 ± 15,2 <sup>a</sup>
CAF+O3	-	106,2 ± 17,5 <sup>b</sup>
CAF/DP+O3	-	111,3 ± 9,2 <sup>b</sup>
CAF/DP	-	123,0 ± 7,6

DP – Dieta padrão; CAF – Dieta cafeteria; O3 – Ômega-3. <sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao grupo DP no mesmo período de tempo; <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao grupo CAF 20 semanas. Teste *t* em 16 semanas e Anova de uma via com post-hoc de bonferroni em 20 semanas, foram consideradas significativos os resultados com  $p < 0,05$ .





**Figura 3** Teste de Tolerância a Insulina

Dados expressos em média e desvio padrão em 16 semanas e após suplementação, em 20 semanas, com n de 6 animais/grupo. DP – Dieta padrão; CAF – Dieta cafeteria; O3 – Ômega-3; ASC – Área sobre a curva. <sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao grupo DP; <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao grupo CAF 20 semanas; Teste t em 16 semanas e Anova de uma via com post-hoc de bonferroni em 20 semanas, foram consideradas significativos os resultados com  $p < 0.05$ .

Em 16 semanas, os resultados da glicemia de jejum (tabela 5) demonstraram diferença significativa entre os grupos CAF e DP, onde o grupo CAF apresentou uma glicemia de jejum maior que o grupo DP. Da mesma forma, os resultados do ITT mostraram uma diferença significativa entre os grupos CAF e DP, onde o grupo CAF apresentou uma diminuição mais lenta dos níveis de glicose (Figura 3 A), dado esse comprovado pelo gráfico que apresenta a área sobre a curva, sendo essa maior no grupo CAF (Figura 3 B).

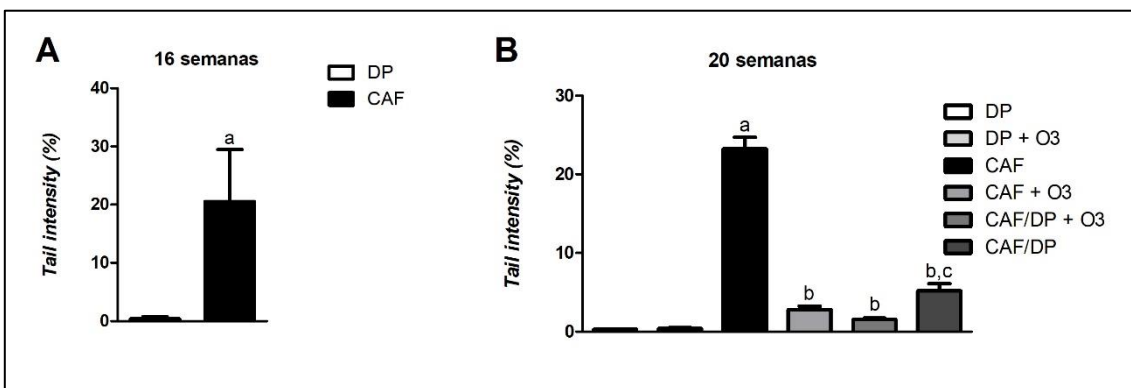
Comparando o grupo CAF com o grupo CAF+O3, que recebeu a suplementação de Ômega-3 por quatro semanas a partir da 16<sup>a</sup> semana, pode-se observar uma diferença significativa entre esses grupos ao final das 20 semanas, tanto na glicemia de jejum, quanto no ITT, onde o grupo CAF apresentou maior glicemia de

jejum e um menor decaimento da glicose, comprovado pela área sobre a curva maior (dados demonstrados na tabela 5 e na Figura 3 A e C).

Em relação aos grupos CAF+O3 e CAF/DP+O3, não foram observadas diferenças significativas, tanto na glicemia de jejum, quanto no ITT. O mesmo ocorreu com os grupos controles, DP e DP+O3, onde estes não apresentaram diferenças entre si. Da mesma forma, o grupo CAF/DP não apresentou diferença significativa em relação aos grupos suplementados com Ômega-3 (CAF+O3 e CAF/DP+O3), no que se refere à glicemia de jejum. A mudança alimentar realizada no grupo CAF/DP não foi eficaz na redução da glicemia de jejum quando comparado ao grupo CAF, dado esse demonstrado na Tabela 5, porém, no ITT (Figura 3 C e D), pode-se observar uma melhora na tolerância à insulina, onde o grupo apresentou redução da glicemia em relação ao grupo CAF.

#### 4.3 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE E MUTAGÊNESE

O Ensaio cometa foi realizado com o objetivo de avaliar os danos ao DNA dos camundongos alimentados com dieta CAF, e avaliar o potencial do Ômega-3 em reduzir esses danos. O teste foi realizado em duas fases, sendo a primeira na caracterização do modelo animal, após 16 semanas das duas dietas, e a segunda ao final do experimento, em 20 semanas, após 4 semanas de diferentes intervenções.



**Figura 4 - Ensaio Cometa**

Dados expressos em média e desvio padrão em 16 semanas e após suplementação, em 20 semanas, com n de 8 animais/grupo. DP – Dieta padrão; CAF – Dieta cafeteria; O3 – Ômega-3. <sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao grupo DP; <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao grupo CAF 20 semanas; <sup>c</sup> Diferença significativa em relação ao grupo CAF/DP+O3. Teste *t* em 16 semanas e Anova de uma via com post-hoc de bonferroni em 20 semanas, foram consideradas significativos os resultados com  $p < 0,05$ .

Em 16 semanas (Figura 4 A), o grupo alimentado com a dieta CAF apresentou maiores níveis de danos ao DNA do que grupo DP, demonstrando assim que a dieta CAF leva a danos ao DNA nos camundongos. Na avaliação após 20 semanas, os animais do grupo CAF continuaram a apresentar maiores níveis de dano ao DNA em relação ao grupo DP (Figura 4B).

Quando as comparações foram feitas entre os grupos em 20 semanas do experimento podemos observar que o grupo DP+O3 demonstrou níveis de danos ao DNA semelhantes ao grupo DP, mostrando assim, que a suplementação de Ômega-3 não aumenta os níveis de danos. Em relação a suplementação com Ômega-3, o grupo CAF+O3 quando comparado com o grupo CAF, apresentou menores níveis de danos ao DNA. Já o grupo CAF/DP+O3, em comparação com o grupo CAF+O3, que não mudou de dieta e apenas recebeu O3, mostrou que a mudança de dieta apenas não leva a mudanças nos níveis do DNA, já que ambos os grupos apresentaram níveis semelhantes (Figura 4B), mas ambos menores que os valores encontrados no grupo CAF no mesmo período, bem como em 16 semanas.

Quando realizada a comparação entre os grupos CAF/DP+O3 e CAF/DP, o grupo CAF/DP apresentou maiores níveis de danos ao DNA em relação ao grupo CAF/DP+ O3, porém os níveis de danos ao DNA apresentaram-se menores que o grupo apenas com dieta CAF, demonstrando assim, que a mudança de dieta reduz os danos o DNA, contudo a suplementação de Ômega-3 torna a redução de danos mais eficaz (Figura 4B).

Para a análise da mutagênese, foi realizado o teste de micronúcleo ao final do experimento, após as 20 semanas de experimento (Tabela 6). A dieta CAF e a suplementação de Ômega-3 não causaram nenhuma alteração na produção de eritrócitos e também não houve citotoxicidade nestas células, causados pela dieta CAF ou pelo Ômega-3, dado comprovado pela análise da proporção das células, onde nenhum grupo apresentou diferença significativa em relação ao grupo DP.

**Tabela 6 – Teste de Micronúcleo com dados expressos em média e desvio padrão em 16 semanas e após suplementação, em 20 semanas, com n de 8 animais/grupo.**

<b>Micronúcleo</b>			
<b>Grupos</b>	<b>EPC</b>	<b>ENC</b>	<b>Proporção</b>
<b>DP</b>	0,8 ± 0,7	0,3 ± 0,5	0,52 ± 0,05
<b>DP + O3</b>	0,7 ± 0,8	0,8 ± 0,4	0,56 ± 0,06
<b>CAF</b>	4,6 ± 1,8 <sup>a</sup>	4,8 ± 1,9 <sup>a</sup>	0,51 ± 0,05
<b>CAF + O3</b>	0,4 ± 0,6 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,5 <sup>b</sup>	0,52 ± 0,07
<b>CAF/DP + O3</b>	1,0 ± 1,2 <sup>b</sup>	1,2 ± 1,6 <sup>b</sup>	0,55 ± 0,03
<b>CAF/DP</b>	1,8 ± 1,2 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	0,53 ± 0,03

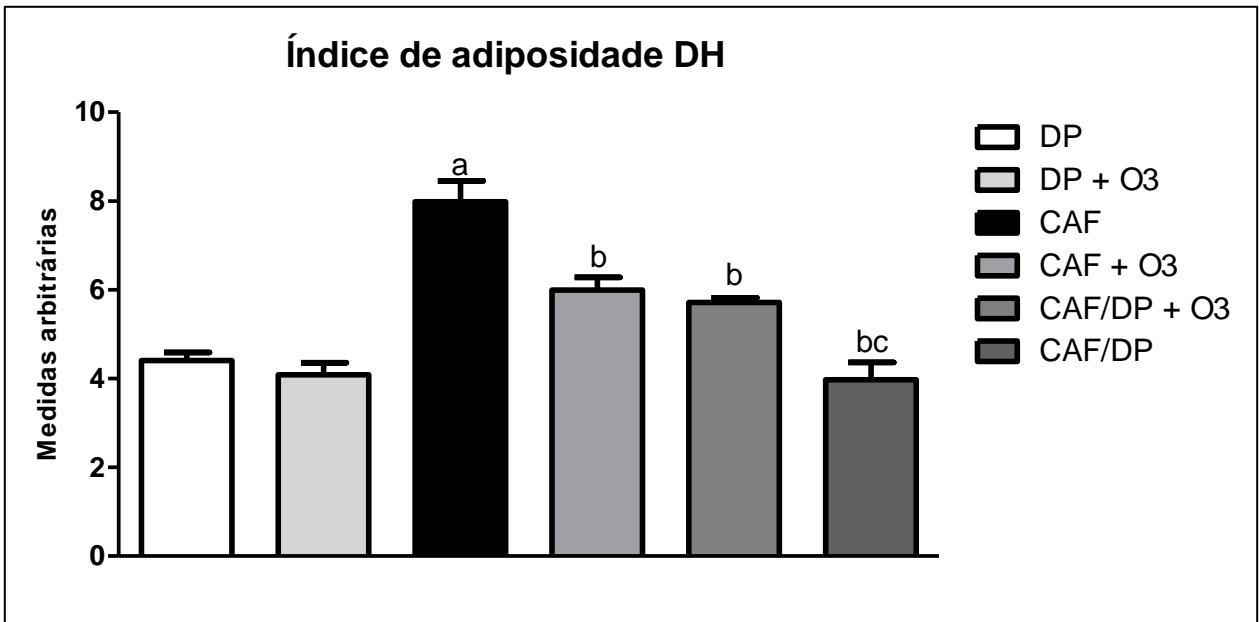
DP – Dieta padrão; CAF – Dieta cafeteria; O3 – Ômega-3. <sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao grupo DP; <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao grupo CAF. Anova de uma via com post-hoc de bonferroni  $p < 0,05$ .

A alimentação com dieta cafeteria, demonstrou ter uma ação mutagênica sobre as células da medula óssea dos camundongos, já que conforme os dados de eritrócitos micronucleados apresentados na Tabela 6, o grupo CAF, alimentado com essa dieta, apresentou aumento no número de MNs, tanto em eritrócitos imaturos, quanto maduros (EPC e ENC, respectivamente), quando comparado ao grupo DP.

O grupo DP+O3 demonstrou números de células micronucleadas semelhantes ao grupo DP, mostrando assim, que a suplementação com Ômega-3 não é mutagênica. Em relação a suplementação de Ômega-3, todos os grupos que receberam suplementação apresentaram menores números de MNs (em EPC e ENC), sendo esses semelhantes aos valores do grupo DP. Os grupos CAF+O3, CAF/DP+O3 e CAF/DP não apresentaram diferenças entre si em relação ao número de MNs, demonstrando assim que a suplementação com ômega-3 é capaz de diminuir ou reverter essas mutações causadas pela dieta cafeteria.

#### 4.4 ÍNDICE DE ADIPOSIDADE

O Índice de adiposidade foi realizado para avaliar se a quantidade de tecido adiposo sofre alterações após alimentação com dieta cafeteria por 20 semanas ou suplementação com ômega-3.



**Figura 5 - Índice de adiposidade**

Dados expressos em média e desvio padrão em 16 semanas e após suplementação, em 20 semanas, com n de 6 animais/grupo. DP – Dieta padrão; CAF – Dieta cafeteria; O3 – Ômega-3. <sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao grupo DP; <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao grupo CAF; <sup>c</sup> Diferença significativa em relação ao grupo CAF/DP. Anova de uma via com post-hoc de bonferroni  $p < 0,05$ .

O grupo alimentado com CAF apresentou um maior Índice de adiposidade que o grupo DP, demonstrando que a dieta cafeteria aumenta a quantidade do tecido adiposo. O grupo DP+O3 não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo DP, mostrando assim que o Ômega-3 não altera este índice. Em relação à suplementação com Ômega-3, o grupo CAF+O3 apresentou diferença significativa em relação ao grupo CAF.

Na comparação entre os grupos CAF+O3 e CAF/DP+O3, não se observou diferenças significativas entre os grupos, demonstrando que a mudança de dieta não influencia na redução do tecido adiposo. Porém, na comparação entre os grupos CAF/DP+O3 e CAF/DP, observa-se que o grupo CAF/DP possui um menor índice de adiposidade que o grupo CAF/DP+O3.

## 5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a obesidade tem se tornado um dos maiores problemas de saúde no mundo, sendo também uma das patologias que mais traz gastos para as organizações de saúde (Vasanth et al., 2019). Além disso, a morbidade dessa doença tem crescido cada vez mais (Kinlen et al., 2017).

Com o aumento de pessoas obesas no mundo, o estudo dessa doença tem crescido cada vez mais, principalmente pela utilização de modelos animais (Kleinert et al., 2018). A obesidade induzida por dieta tem se mostrado efetiva para o estudo de obesidade e também da resistência à insulina, já que nesses estudos é dado aos animais livre acesso a comidas altamente calóricas, com altos níveis de carboidratos, gorduras e sódio, sendo esses alimentos em sua maioria industrializados (Nilsson et al., 2012).

A dieta cafeteria é um dos modelos de indução de obesidade por dieta muito utilizado. É composto por alimentos ricos principalmente em carboidratos e gorduras, e altamente palatáveis, composta por alimentos como salgadinhos, biscoitos e doces entre outros (Leigh et al., 2019). A palatabilidade da dieta cafeteria pode ser comprovada através dos dados expostos na tabela 3, onde nos dados do consumo em gramas por animal, pode-se ver a preferência dos animais pelo consumo da dieta cafeteria em detrimento do consumo da dieta padrão que também era oferecida junto.

O consumo de dieta cafeteria pelos animais também induz hiperfagia e aumento da ingestão de energia (Lalanza et al., 2014; Gomez-Smith et al., 2016). A dieta cafeteria costuma conter uma grande quantidade de açúcar, aumentando assim o apetite (Oliva et al., 2017), ou seja, os animais sentem mais vontade de comer esses alimentos em maiores quantidades, como visto na tabela 3. Na comparação entre os animais dos grupos DP e CAF, pode-se observar que houve o maior consumo em gramas pelos animais que consumiram a CAF, e o mesmo comportamento foi observado no consumo total energético.

Após 16 semanas de alimentação com dieta cafeteria, os animais do grupo CAF apresentaram maior peso corporal em gramas que os animais do grupo DP, dado esse semelhante ao visto no estudo de Gil-Cardoso e colaboradores (2017), onde ratas foram alimentadas com uma dieta cafeteria por 17 semanas, e os animais do grupo CAF

apresentaram maior peso corporal em gramas. Além disso, o estudo de Leffa e colaboradores (2014), após alimentar os animais com uma dieta cafeteria, também observaram aumento de peso nos camundongos. A razão pela qual os animais que consomem a dieta cafeteria tem um maior aumento de peso dá-se pelo fato de a dieta cafeteria possuir alimentos mais calóricos e mais palatáveis que a dieta padrão, o que contribui para o aumento do seu consumo (Martire et al., 2013).

O aumento de peso dos animais está associado também ao aumento de gordura corporal, dado esse apresentado na figura 5, onde os animais do grupo CAF possuem maior índice de adiposidade que os animais do grupo DP. O aumento da gordura corporal está altamente associado ao alto consumo de alimentos calóricos, como os alimentos fornecidos na dieta cafeteria (Marecki et al., 2011).

O comportamento alimentar dos animais também pode estar associado ao aumento de gordura corporal, principalmente a visceral, já que hormônios de regulação da saciedade, como a leptina são secretados principalmente por esses adipócitos. A leptina desempenha um papel importante na regulação da ingestão de alimentos, consumo de energia, metabolismo da glicose e secreção de insulina (Ahima e Flier, 2000; Cottrell e Mercer, 2012). Estudos que encontram altos níveis de leptina sérica associam esses altos níveis ao sobrepeso ou obesidade encontrada nos animais, já que a mesma sofre desregulação com o aumento do tecido adiposo (Myers Jr et al., 2010; Böhm et al., 2012; Macedo et al., 2012).

A obesidade é uma condição patológica de origem multifatorial resultante de um desequilíbrio entre o consumo energético e o gasto total de energia, associada a alterações de muitas vias metabólicas (Goni et al., 2015). Pensando nisso, a intervenção nutricional, através da suplementação de nutrientes na dieta, tem sido visto como uma maneira de melhorar o quadro de alterações metabólicas existentes na obesidade (FDA, 2015; Ríos-Hoyo e Gutiérrez-Salmeán, 2016).

A utilização do ômega-3 como intervenção nutricional tem sido vista como uma boa alternativa, já que o mesmo possui propriedades que podem auxiliar na melhora das alterações metabólicas causadas pela obesidade (Siriwardhana et al., 2012). Desta forma, neste estudo avaliou-se a utilização de ômega-3 como intervenção nutricional em camundongos alimentado com uma dieta cafeteria, com o objetivo de simular obesidade.

Os grupos suplementados com ômega-3 apresentaram menor peso em gramas em relação ao grupo CAF, sendo que, o grupo que além da suplementação com O3 sofreu troca de dieta (CAF/DP+O3), apresentou uma diminuição do peso ainda mais expressiva, porém não diferindo dos outros grupos suplementados. A redução do índice de adiposidade (Figura 5) dos animais suplementados com ômega-3 está associada a diminuição de peso observada nos animais. No estudo de Liu e colaboradores (2018), onde estudos de coorte foram avaliados para comparar as mudanças durante a vida com a dieta rica ou não em ácidos graxos poli-insaturados, como o ômega-3, os autores chegaram à conclusão que as pessoas que faziam maior consumo de ácidos graxos poli-insaturados apresentavam menores aumentos de peso durante a vida adulta e também menores riscos para o desenvolvimento de doenças.

No estudo de Keshavarz e colaboradores (2018), onde pacientes obesos e com depressão foram suplementados com ômega-3 por 12 semanas, os pacientes apresentaram redução de peso e melhora nos sintomas de depressão. Além disso, o estudo traz a hipótese que o ômega-3 possa ter a capacidade de controlar o apetite, reduzindo assim o peso corporal. A teoria descrita pelos autores tem semelhança com os resultados encontrados nesse estudo, onde os animais suplementados com ômega-3 apresentaram menor consumo em gramas e também redução do peso corporal em gramas quando comparado ao grupo CAF.

Colaborando com o exposto acima, a meta-análise de Zhang e colaboradores (2017), que avaliou 11 estudos contendo no total mais de 600 indivíduos suplementados com ômega-3, encontrou como resultados uma diminuição na circunferência abdominal das pessoas suplementadas com ômega-3 em relação ao grupo que recebeu placebo, além disso, os pesquisadores encontraram uma correlação com a utilização do ômega-3 e diminuição dos níveis séricos de triglicérides.

Os estudos citados acima trazem resultados muito semelhantes aos encontrados no grupo CAF+O3, onde os animais continuaram se alimentando com a dieta cafeteria e foram suplementados com ômega-3, porém vale ressaltar que o grupo CAF/DP+O3, onde os animais interromperam o consumo da cafeteria ao iniciar a suplementação do ômega-3 apresentaram melhoras ainda maiores em vários parâmetros avaliados, quando comparados ao grupo CAF+O3, como por exemplo, os danos ao DNA,



o peso corporal e o índice de adiposidade. Apesar de os dados não apresentarem diferenças significativas entre estes dois grupos, vale ressaltar a importância da mudança de dieta para a melhora das alterações causadas pela obesidade e pela dieta cafeteria. Corroborando com este fato, o estudo de Annesi (2017), onde mulheres obesas passaram por aconselhamentos e intervenções nutricionais e psicológicas, mostra a importância da intervenção nutricional para a atenuação das alterações causadas pela obesidade, sendo elas não somente físicas, como também emocionais.

A dieta cafeteria também alterou os níveis de glicose e a sensibilidade a insulina (tabela 5 e figura 3), onde os animais do grupo CAF possuíam maior níveis de glicose e uma menor sensibilidade à insulina, podendo ser associado a uma resistência à insulina. O estudo de Sampey e colaboradores (2011) encontrou resultados semelhantes nos animais que consumiam somente a dieta cafeteria, onde os mesmos apresentaram maiores níveis de glicose e menor sensibilidade à insulina pelo ITT, além disso, os animais também apresentaram alterações como maior índice de adiposidade e esteatose hepática.

O excesso de tecido adiposo leva a uma inflamação de baixo grau, o que resulta na infiltração de macrófagos para o tecido adiposo, fazendo assim com que a inflamação se perpetue levando também a problemas na sensibilidade à insulina (Anderson et al., 2010). Além disso, Maffei e Morandi (2018) em seu estudo de revisão sobre resistência à insulina, observaram que o aumento da gordura visceral, ou seja, aumento do índice de adiposidade, contribuiu para diminuir a sensibilidade à insulina e levou a resistência à mesma.

A utilização de ômega-3 também se demonstrou eficaz nas avaliações de glicose de jejum nos animais e no ITT, onde os grupos suplementados com ômega-3 apresentaram níveis de glicose mais baixos e também maior sensibilidade à ação da insulina, comprovado pelo IT, quando comparados ao grupo CAF. Nos estudos de Thota e colaboradores (2019) e Ebrahimi e colaboradores (2017), onde ambos estudos utilizaram o ômega-3 com o objetivo de melhorar a sensibilidade à insulina e também reduzir a glicemia de pacientes com ovário policístico e DM2, respectivamente, foram encontrados resultados positivos na melhora da sensibilidade à insulina com a utilização

do ômega-3, como observado neste estudo, porém na diminuição da glicose, o ômega-3 não demonstrou ser efetivo, resultados esses que diferem do encontrado nesse estudo.

Lanza e colaboradores (2013), em seu estudo, onde animais foram alimentados com uma dieta rica em gordura para a indução de obesidade, utilizaram o ômega-3 como forma de suplementação. Em seus resultados, os pesquisadores observaram que a utilização de ômega-3 atenuou a resistência à insulina e também aumentou a expressão de genes que regulam o metabolismo da glicose. O aumento da expressão gênica pode ser então visto como um dos mecanismos ao qual o ômega-3 teve comportamento semelhante em relação a sensibilidade à insulina e de glicemia de jejum mais baixas neste estudo.

Em muitos estudos sobre a obesidade o acúmulo de danos ao DNA tem sido relatado, a frequência desses danos ao DNA vem sendo relacionada ao desenvolvimento de outras doenças decorrentes da obesidade, como o câncer, por exemplo (Cerdeira et al., 2014; Zaki et al., 2018). Além disso, uma correlação positiva entre o IMC e a frequência de danos ao DNA tem sido encontrada (Wlodarczyk et al., 2018). No estudo aqui apresentado, os resultados de análise de danos ao DNA demonstraram que os animais que faziam consumo da dieta cafeteria possuíam mais danos que os animais que não consumiam, além disso, os animais do grupo CAF apresentaram aumento de peso e maior índice de adiposidade, o que, segundo os estudos, está relacionado ao aumento de danos.

Algumas alterações metabólicas e celulares tem sido associadas a instabilidade genética na obesidade, podendo levar ao desenvolvimento de tipos de câncer. Dentre essas alterações, pode-se citar a inflamação sistêmica crônica de baixo grau devido a níveis elevados de citocinas (Fenton et al., 2009); resistência à insulina devido a altos níveis de insulina, resultando em sinalização alterada (Kaaks, 2004); desregulação de adipocinas, por exemplo, leptina e adiponectina (Booth et al., 2015); aumento de lipídios e alterações na sinalização lipídica (Louie et al., 2013); e estresse oxidativo levando a alterações celulares e moleculares, incluindo danos ao DNA (Cerdeira et al., 2014).

Conforme o exposto acima, quando avaliadas as alterações presentes neste estudo, pode-se observar que os animais possuem várias alterações vistas como pré-

disposição para o aumento de danos ao DNA, como o aumento de peso e consequentemente o aumento do tecido adiposo, altos níveis de glicose de jejum e também a baixa sensibilidade à insulina vista pelo ITT. Estas alterações podem ter levado à instabilidade genômica vista nos animais do grupo CAF, onde os resultados demonstraram tanto maiores danos ao DNA no teste cometa, quanto maior frequência de MNs no teste de Micronúcleo.

Leffa e colaboradores (2014), viram em seu estudo utilizando dieta cafeteria como forma de indução da obesidade, que após o consumo por 14 semanas desta dieta, os animais apresentaram maiores frequências de danos ao DNA, bem como também maiores frequências de mutações, vistas essas pelo teste de Micronúcleos. Os resultados encontrados corroboram com o deste estudo, onde os animais do grupo CAF apresentaram as mesmas alterações genotóxicas e mutagênicas.

Na obesidade, a sobrecarga crônica de energia resulta em maior produção de EROs e inflamação (Setayesh et al., 2018). Nos estágios iniciais da obesidade, o aumento da captação de glicose e ácidos graxos pelos adipócitos ativa o NOX4, a principal isoforma da NADPH oxidase nos adipócitos e induz a produção de EROs (Han, 2016). O acúmulo excessivo de gordura nos adipócitos promove a produção pró-inflamatória de adipocinas, citocinas pró-inflamatórias induzem invasão do tecido alvo pelas células imunes e o desenvolvimento de inflamação crônica (Han et al., 2012). O acúmulo de linfócitos T e macrófagos no tecido adiposo durante o desenvolvimento da obesidade promove a produção de EROs (Weisberg et al., 2003; Gao et al., 2010). Com isso, o aumento da produção de EROs, sendo que, quando essas encontram-se em excesso, leva a lesões no DNA, ou seja, maiores frequências de danos a essa macromolécula (Yu et al. 2016).

Estudos tem mostrado também que o estresse oxidativo e a desregulação lipídica em indivíduos obesos podem resultar em níveis elevados de EROs, que por sua vez podem causar danos oxidativo ao DNA, quebras simples ou duplas na fita do DNA diretamente ou através da formação de subprodutos reativos da peroxidação lipídica (por exemplo, malondialdeído [MDA], 4-hidroxinonenal [4-HNE] e acroleína [Acr]) e metabólitos do ácido biliar secundário (BA) (Furukawa et al., 2004; Bernstein et al, 2005; Cerdá et al., 2014). Além disso, o reparo ineficiente ou falha do sistema de reparo em

reparar as lesões causadas por EROs e outras moléculas associadas à obesidade, também fazem com que a instabilidade genômica aumente na obesidade (Setayesh et al., 2018).

Segundo os resultados encontrados nesse estudo, o ômega-3 apresenta potencial em reduzir os danos e também mutações causadas no DNA, visto pelo teste cometa e teste de micronúcleo, respectivamente. Mellouk e colaboradores (2016) encontraram em seu estudo resultados semelhantes quanto à redução de danos ao DNA causados pela dieta cafeteria com a utilização de ômega-3, derivado do óleo de kril, além disso, os pesquisadores observaram uma melhora nas enzimas antioxidantes dos animais suplementados com ômega-3.

Barros e colaboradores (2011), utilizaram óleo de peixe, rico em ômega-3 em animais com colite ulcerativa, doença inflamatória que leva a danos ao DNA. A ação do ômega-3 nesses animais além de reduzir os danos ao DNA causados pela doença, ainda aumentou os níveis de IL-10, uma interleucina anti-inflamatória. Com a redução da inflamação através do aumento de IL-10, os pesquisadores acreditam que os danos foram atenuados graças a diminuição da inflamação causada pela ação do ômega-3.

A utilização de ômega-3 também foi vista por Loock e colaboradores (2014), onde os pesquisadores avaliaram os níveis de micronúcleos em mulheres grávidas, associando a frequência alimentar de alimentos ricos em ômega-3. Em seus resultados, observou-se que quanto mais ômega-3 estava presente na alimentação das gestantes, menor era a frequência de MNs nas mesmas, mostrando assim que o ômega-3 está associado a uma menor instabilidade genômica.

Outro fato a ser abordado é que os animais que receberam ômega-3 como suplementação apresentaram redução no peso corporal, podendo ser essa associada também aos danos ao DNA menores nesses animais, já que a diminuição ou perda de peso tem demonstrado resultar também em diminuição dos danos ao DNA (Heilbronn et al., 2006). Pode-se observar que o grupo CAF/DP+O3 mostrou menores danos ao DNA que o grupo CAF+O3, podendo esse fato estar associado também ao peso corporal, já que o grupo que trocou de dieta também apresentou uma tendência de menor peso quando comparado ao grupo que continuou se alimentando com a dieta cafeteria. Além disso, como citado anteriormente, a diminuição ou perda de peso tem sido associada a

melhora dos danos ao DNA, podendo então ser esse o motivo pelo qual o grupo CAF/DP+O3 apresentou essa tendência de danos menores ainda que o grupo que recebeu a dieta cafeteria até o final do experimento, porém era também suplementado com o ômega 3.

Através do exposto, supõe-se que o ômega-3 possa ser uma boa alternativa para ser utilizado como complemento nutricional com o objetivo de melhorar as alterações causadas pela obesidade ou pelo alto consumo de alimentos industrializados.

## CONCLUSÃO

A utilização de dieta cafeteria para a indução de obesidade é um modelo animal que trás muitas semelhanças com a alimentação humana, e por esse motivo considera-se um bom modelo de estudos. Pode-se observar sua eficácia na indução de obesidade através da comparação com os animais que se alimentaram somente com a dieta padrão durante todo o experimento (grupo DP).

Desta forma, avaliando os parâmetros alterados no grupo CAF, observou-se que essa dieta foi capaz de modificar desde os parâmetros alimentares dos animais, até causar uma instabilidade genômica. Essa dieta foi eficiente para elevar o peso corporal dos animais, e conseqüentemente o índice de adiposidade, levou os animais a uma possível resistência à insulina, além da hiperglicemia e também levou os animais a apresentarem altos níveis de danos ao DNA. Sendo assim, pode-se afirmar que a dieta cafeteria realmente possui potencial para simular a obesidade nos animais de forma semelhante aos humanos, já que os estudos demonstraram as mesmas alterações em humanos com sobrepeso ou obesidade.

A utilização de ômega-3 neste estudo demonstrou muitos potenciais de uso para esse ácido graxo. Avaliando todos os parâmetros analisados neste trabalho, pode-se observar que a utilização do ômega-3 apresentou melhoras em muitos deles. A redução de índice de adiposidade dos animais após a suplementação de ômega-3 foi um dos parâmetros que apresentou grande significância, já que com a redução da gordura corporal, observou-se também a redução de peso corporal.

Além disso, a redução de danos ao DNA após a utilização do ômega-3 também foi bem acentuada, dado esse que é comprovado pelo grupo CAF/DP, que não foi suplementado com ômega-3, e apesar da redução de danos através da mudança de deita, a utilização do ômega-3 nos demais grupos tornou a redução de danos ao DNA ainda maior, semelhante ao controle.

A análises da glicemia de jejum, bem como o ITT foram outros dois testes que demonstraram que somente a mudança de dieta não é o suficiente para a melhora dos

parâmetros, já que o grupo CAF/DP por vezes não apresentou diminuição significativa em relação ao grupo CAF, diferentemente dos grupos suplementados com ômega-3.

Desta forma, sugere-se que a utilização de ômega-3 como intervenção nutricional tem grande importância para a melhora de parâmetros alterados pela obesidade, como peso corporal, adiposidade, glicemia de jejum e também os danos ao DNA. Porém, ressalta-se a importância de aprofundar os estudos sobre o mesmo, para que assim as funções desse ácido graxo possam ser esclarecidas de forma mais aprofundadas.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

O estudo de obesidade através de modelos animais por muitas vezes pode ser um meio mais fácil de estudos mais específicos das alterações biológicas causadas por essa doença. Desta forma, a partir dos resultados obtidos aqui apresentados, novas perguntas surgiram e a necessidade de sua resposta também.

Durante todo o processo de experimentação animal, pensou-se no quanto poderia ser investigado em um experimento deste porte, e as oportunidades de procura de respostas são muitas. Sendo assim, pretende-se dar continuidade ao estudo aqui iniciado em busca de melhores esclarecimentos em relação ao ômega-3 e seus possíveis benefícios.

Durante o período do mestrado, planejou-se realizar alguns testes bioquímicos, porém a pandemia vigente no momento tornou inviável sua finalização para esta dissertação. Os testes que estão dentro do planejamento para serem realizados são:

- Perfil lipídico: comendo colesterol total, colesterol HDL e Triglicerídeos.
- Perfil hepático: comendo TGO e TGP.
- Perfil renal: comendo ureia e creatinina.

Outra investigação ao qual planeja-se realizar são os parâmetros inflamatórios. Como exposto por vezes nesta dissertação, o ômega-3 possui muitas propriedades anti-inflamatórias e a obesidade é uma doença com caráter inflamatório. Desta forma, pretende-se investigar as interleucinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 e IL-6, sendo essas interleucinas anti e pro inflamatórias importantes para a investigação das ações do ômega-3.

Para a realização de todos os testes ao qual pretende-se realizar, pensou-se previamente no processo de eutanásia dos animais, sendo assim, amostras foram congeladas com este intuito, bem como soro sanguíneo foi coletado para os testes bioquímicos.



## REFERÊNCIAS

- Agrawal R, Gomez-Pinilla F. 'Metabolic syndrome' in the brain: deficiency in omega-3 fatty acid exacerbates dysfunctions in insulin receptor signalling and cognition. *J Physiol*. 2012; 590:2485-99.
- Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol*. 2000; 62:413-37.
- Ahima RS, Lazar MA. Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. *Mol Endocrinol*. 2008 May;22(5):1023-31.
- Amor M, Itariu BK, Moreno-Viedma V, Keindl M, Jürets A, Prager G, Langer F, Grablowitz V, Zeyda M, Stulnig TM. Serum Myostatin is Upregulated in Obesity and Correlates with Insulin Resistance in Humans. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2019 Sep;127(8):550-556.
- Anderson BM, Ma DW. Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal? *Lipids Health Dis*. 2009; 8(33):1-20.
- Anderson EK, Gutierrez DA, Hasty AH. Adipose tissue recruitment of leukocytes. *Curr Opin Lipidol*. 2010;21:172–177.
- Anja Böhm 1, Anna-Maria Ordelheide, Jürgen Machann, Martin Heni, Caroline Ketterer, Fausto Machicao, Fritz Schick, Norbert Stefan, Andreas Fritsche, Hans-Ulrich Häring, Harald Staiger. Common genetic variation in the SERPINF1 locus determines overall adiposity, obesity-related insulin resistance, and circulating leptin levels. **PLoS One**. 2012;7(3):e34035.
- Annesi JJ. Mediation of the relationship of behavioural treatment type and changes in psychological predictors of healthy eating by body satisfaction changes in women with obesity. *Obes Res Clin Pract*. Jan-Feb 2017;11(1):97-107.
- Arbex AK, Bizarro VR, Santos JCS, Araújo LMM, de Jesus ALC, Fernandes MSA, et al. The impact of the essential fatty acids (EFA) in human health. *OJEMD*. 2015; 5:98-104.
- Arnér ESJ, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem*. 2000; 267(20):6102-9.
- Bagnol D, Al-Shamma HA, Behan D, Whelan K, Grottick AJ. Diet-induced models of obesity (DIO) in rodents. *Curr Protoc Neurosci*. 2012; 9:9.38.1-13.
- Bargut TC, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. A high-fish-oil diet prevents adiposity and modulates white adipose tissue inflammation pathway in mice. *J Nutr Biochem*. 2015; 26(9):960-9.

Bermúdez MMG, Sinclair AJ. Fatty acids and obesity. *Curr Pharm Des.* 2009; 15(36):4117-25.

Bernstein H, Bernstein C, Payne CM, Dvorakova K, Garewal H. Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutat Res.* 2005 Jan;589(1):47-65.

Bhaswant M, Poudyal H, Brown L. Mechanisms of enhanced insulin secretion and sensitivity with n-3 unsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem.* 2015;26:571-584.

Booth A, Magnuson A, Fouts J, Foster M. Adipose tissue, obesity and adipokines: role in cancer promotion. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2015;21(1):57-74.

Brazier Y. What is obesity and what causes it? *Medical News Today.* 2018. Disponível em: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/323551.php>. Acesso em 20 agosto de 2018.

Buckley JD, Howe PR. Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids may be beneficial for reducing obesity-a review. *Nutrients.* 2010; 2(12):1212-30.

Burhans MS, Hagman DK, Kuzma JN, Schmidt KA, Kratz M. Contribution of Adipose Tissue Inflammation to the Development of Type 2 Diabetes Mellitus. *Compr Physiol.* 2018 Dec 13;9(1):1-58.

Calder P. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83:1505S-19S.

Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1851:469-484.

Cerda C, Sanchez C, Climent B, Vazquez A, Iradi A, El Amrani F, Bediaga A, Saez GT. Oxidative stress and DNA damage in obesity-related tumorigenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014;824:5–17.

Cerdá C, Sánchez C, Climent B, Vázquez A, Iradi A, El Amrani F, Bediaga A, Sáez GT . Oxidative stress and DNA damage in obesity-related tumorigenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2014;824:5-17.

Cesaretti MLR, Kohlmann Junior O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006; 50(2):190-7.

Chacińska M, Zabielski P, Książek M, Szałaj P, Jarząbek K, Kojta I, Chabowski A, Błachnio-Zabielska AU. The Impact of OMEGA-3 Fatty Acids Supplementation on Insulin Resistance and Content of Adipocytokines and Biologically Active Lipids in Adipose Tissue of High-Fat Diet Fed Rats. *Nutrients.* 2019 Apr 12;11(4).

Chapkin RS, Kim W, Lupton JR, McMurray DN. Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: emerging mediators of inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2009; 81(2-3):187-91.

Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2017 Dec 14;9(6):7204-7218.

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

Collins A, Dusinská M, Franklin M, Somorovská M, Petrovská H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslová K, Vaughan N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen*. 1997;30:139-146.

Conselho federal de nutrição (CFN). *Obesidade*. 2011. Disponível em: <http://www.cfn.org.br/index.php/legacy-98/> Acessado em 23 de julho de 2019.

Convit A. Obesity is associated with structural and functional brain abnormalities: where do we go from here? *Psychosom Med*. 2012; 74(7):673-4.

Cottrell EC, Mercer JG. Leptin receptors. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;(209):3-21.

Crew RC, Waddell BJ, Mark PJ. Maternal obesity induced by a 'cafeteria' diet in the rat does not increase inflammation in maternal, placental or fetal tissues in late gestation. *Placenta*. 2016; 39:33-40.

Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci*. 2002 May;23(5):238-45.

Dan JD, Berm, Alvarez LA, Zhang X, Soldati T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol*. 2015 Dec;6:472-485.

De Barros KV, De Abreu GG, Xavier RAN, Martinez CAR, Ribeiro ML, Gambero A, Carvalho PO, Silveira VLF. Effects of a high fat or a balanced omega 3/omega 6 diet on cytokines levels and DNA damage in experimental colitis. *Nutrition*. 2011 Feb;27(2):221-6.

de Castro GS, dos Santos RA, Portari GV, Jordão AA, Vannucchi H. Omega-3 improves glucose tolerance but increases lipid peroxidation and DNA damage in hepatocytes of fructose-fed rats. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2012 Apr;37(2):233-40.

de Souza T, Vargas da Silva S, Fonte-Faria T, Nascimento-Silva V, Barja-Fidalgo C, Citelli M. Chia oil induces browning of white adipose tissue in high-fat diet-induced obese mice. *Mol Cell Endocrinol*. 2020 Feb 27:110772.

Deacon G, Kettle C, Hayes D, Dennis C, Tucci J. Omega 3 polyunsaturated fatty acids and the treatment of depression. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017; 2;57(1):212-223.

Del-Río-Navarro BE, Miranda-Lora AL, Huang F, Hall-Mondragon MS, Leija-Martínez JJ. Effect of supplementation with omega-3 fatty acids on hypertriglyceridemia in pediatric patients with obesity. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2019 Aug 27;32(8):811-819.

Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature.* 2006 Dec 14;444(7121):881-7.

Diniz YS, Faine LA, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GX, Burneiko RC, Cicogna AC, Novelli EL. Monosodium glutamate in standard and high-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. *Nutrition.* 2005; 21(6):749-55.

Diniz YS, Fernandes AA, Campos KE, Mani F, Ribas BO, Novelli EL. Toxicity of hypercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue. *Food Chem Toxicol.* 2004; 42(2):313-19.

Donmez-Altuntas H, Sahin F, Bayram F, Bitgen N, Mert M, Guclu K, Hamurcu Z, Aribas S, Gundogan K, Diri H. Evaluation of chromosomal damage, cytostasis, cytotoxicity, oxidative DNA damage and their association with body-mass index in obese subjects. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2014 Sep 1;771:30-6.

Duracková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res.* 2010;59(4):459-69.

Ebrahimi FA, Samimi M, Foroozanfard F, Jamilian M, Akbari H, Rahmani E, Ahmadi S, Taghizadeh M, Memarzadeh MR, Asemi Z. Epub 2017 Apr 13. The Effects of Omega-3 Fatty Acids and Vitamin E Co-Supplementation on Indices of Insulin Resistance and Hormonal Parameters in Patients with Polycystic Ovary Syndrome: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2017 Jun;125(6):353-359.

Echtay KS. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic Biol Med.* 2007; 43(10):1351-71.

Ellulu MS, Khaza'ai H, Abed Y, Rahmat A, Ismail P, Ranneh Y. Role of fish oil in human health and possible mechanism to reduce the inflammation. *Inflammopharmacology.* 2015; 23(2-3):79-89.

Espinosa Arreola M, Ortega Martínez LD, Pérez Armendáriz B, Marqués Maldonado ADP, Baños Lara MDR. Evaluation of genetic damage and eating habits in children with normal weight and obesity in school age. *Nutr Hosp*. 2019 Apr 10;36(2):309-314.

Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*. 2004;20:218–224.

Farooqi SI. Genetic, molecular and physiological mechanisms involved in human obesity : Society for Endocrinology Medal Lecture 2012. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2015; 82: 23-8.

Farooqui AA. n-3 fatty acid-derived lipid mediators in the brain: new weapons against oxidative stress and inflammation. *Curr Med Chem*. 2012; 19(4):532-43.

Fenton JI, Nunez NP, Yakar S, Perkins SN, Hord NG, Hursting SD. Diet-induced adiposity alters the serum profile of inflammation in C57BL/6N mice as measured by antibody array. *Diabetes Obes Metab*. 2009;11(4):343-354.

Ferrante Jr AW. Macrophages, fat, and the emergence of immunometabolism. *J Clin Invest*. 2013; 123: 4992- 4993.

Food and Drug Administration. What is a dietary supplement? [Internet]. 2015. Available from: .

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004 Dec;114(12):1752-61.

Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*. 2010; 316(2):129-39.

Gao CL, Zhu C, Zhao YP, Chen XH, Ji CB, Zhang CM, Zhu JG, Xia ZK, Tong ML, Guo XR Mitochondrial dysfunction is induced by high levels of glucose and free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell Endocrinol*. 2010;320:25–33.

Gasparotto J, Chaves PR, da Boit Martinello K, da Rosa-Siva HT, Bortolin RC, Silva LFO, Rabelo TK, da Silva J, da Silva FR, Nordin AP, Soares K, Borges MS, Gelain DP, Moreira JCF. Obese rats are more vulnerable to inflammation, genotoxicity and oxidative stress induced by coal dust inhalation than non-obese rats. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2018 Dec 15;165:44-51.

Gierach M, Gierach J, Ewertowska M, Arndt A, Junik R. Correlation between Body Mass Index and Waist Circumference in Patients with Metabolic Syndrome. *ISRN Endocrinol*. 2014 Mar 4;2014:514589.

Giles ED, Jackman MR, MacLean PS. Modeling diet-induced obesity with obesity-prone rats: implications for studies in females. *Front Nutr.* 2016; 24:3:50.

Gómez Candela C, Bermejo López LM, Loria Kohen V. Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health: nutritional recommendations. *Nutr Hosp.* 2011; 26(2):323-9.

Gomez-Smith M, Karthikeyan S, Jeffers MS, Janik R, Thomason LA, Stefanovic B, Corbett D. 2016. A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. ***Physiol Behav.*** 2016 Dec 1;167:382-391.

Goni L, Cuervo M, Milagro FI, Martínez JA. Future Perspectives of Personalized Weight Loss Interventions Based on Nutrigenetic, Epigenetic, and Metagenomic Data. *J Nutr.* 2015 Apr 1;146(4):905S-912S.

Han CY Roles of Reactive Oxygen Species on Insulin Resistance in Adipose Tissue. *Diabetes Metab. J.* 2016;40:272–279.a

Han CY, Umemoto T, Omer M, den Hartigh LJ, Chiba T, LeBoeuf R, Buller CL, Sweet IR, Pennathur S, Abel ED, et al. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species increases expression of monocyte chemotactic factor genes in cultured adipocytes. *J. Biol. Chem.* 2012;287:10379–10393.b

Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1984 Aug;327(1):1-5.

Hardie DG. Organismal carbohydrate and lipid homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 May 1;4(5).

Heilbronn LK, de Jonge L, Frisard MI, DeLany JP, Larson-Meyer DE, Rood J, Nguyen T, Martin CK, Volaufova J, Most MM, et al. Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: A randomized controlled trial. *JAMA.* 2006;295:1539–1548.

Hernández-Aguilera A, Rull A, Rodríguez-Gallego E, Riera-Borrull M, LucianoMateo F, Camps J, Menéndez JA, Joven J. Mitochondrial dysfunction: a basic mechanism in inflammation-related non communicable diseases and therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013:135698.

Heymsfield SB, Gonzalez MC, Shen W, Redman L, Thomas D. Weight loss composition is one-fourth fat free mass: a critical review and critique of this widely cited rule. *Obes Rev* 2014; 15:310-21.

Hoang Do O, Thorn P. Insulin secretion from beta cells within intact islets: location matters. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2015; 42(4):406-14.

Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MC, Rahu N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:7432797.

Itariu BK1, Zeyda M, Hochbrugger EE, Neuhofer A, Prager G, Schindler K, Bohdjalian A, Mascher D, Vangala S, Schranz M, Krebs M, Bischof MG, Stulnig TM. Long-chain n-3 PUFAs reduce adipose tissue and systemic inflammation in severely obese nondiabetic patients: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2012; 96(5):1137-49.

Janssen CI, Kiliaan AJ. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. *Prog Lipid Res*. 2014; 53:1-17.

Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(4):6184-223.

Kaaks R. Nutrition, insulin, IGF-1 metabolism and cancer risk: a summary of epidemiological evidence. *Novartis Found Symp*. 2004;262:247-260. discussion 260-268.

Kalupahana NS, Claycombe K, Newman SJ, Stewart T, Siriwardhana N, Matthan N, Lichtenstein AH, Moustaid-Moussa N. Eicosapentaenoic acid prevents and reverses insulin resistance in high-fat diet induced obese mice via modulation of adipose tissue inflammation. *Metabolism*. 2009; 58(7):909-19.

Keshavarz Sa, Mostafavi S, Akhondzadeh S, Mohammadi Mr, Hosseini S, Eshraghian Mr, Chamari M. Omega-3 supplementation effects on body weight and depression among dieter women with co-morbidity of depression and obesity compared with the placebo: a randomized clinical trial. *Clin Nutr ESPEN*. 2018 Jun;25:37-43.

Kiecolt-Glaser JK, Epel ES, Belury MA, Andridge R, Lin J, Glaser R, Malarkey WB, Hwang BS, Blackburn E. Omega-3 fatty acids, oxidative stress, and leukocyte telomere length: a randomized controlled trial. *Brain Behav Immun*. 2013; 28:16-24.

Kinlen D, Cody D, O'Shea D. Complications of obesity. *QJM*. 2018 Jul 1;111(7):437-443.

Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann Sm, Moore Mc, Renner S, Woods Sp, Huypens P, Beckers J, Angelis Mh, Schürmann A. Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 14, n. 3, p. 140-162, 19 jan. 2018.

Kopelman P. Health risks associated with overweight and obesity. *Obes Rev* 2007; 8: 13–17.

Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res.* 2000 Nov 20;455(1-2):155-66.

Kumar S, Alagawadi KR, Rao MR. Effect of *Argyrea speciosa* root extract on cafeteria diet-induced obesity in rats. *Indian J Pharmacol.* 2011;43:163–167.

Kusminski CM, Scherer PE. Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab.* 2012; 23(9):435-43.

Laakso M, Kuusisto J. Insulin resistance and hyperglycaemia in cardiovascular disease development. *Nat Rev Endocrinol.* 2014 May;10(5):293-302.

Lalanza JF, Caimari A, Bas JMdel, Torregrosa D, Cigarroa I, Pallàs M, Capdevila L, Arola L, Escorihuela RM. Effects of a post-weaning cafeteria diet in young rats: metabolic syndrome, reduced activity and low anxiety-like behaviour. **PLoS One.** 2014; 9(1): e85049.

Lanza IR, Blachnio-Zabielska A, Johnson ML, Schimke JM, Jakaitis DR, Lebrasseur NK, Jensen MD, Nair KS, Zabielski P. Influence of fish oil on skeletal muscle mitochondrial energetics and lipid metabolites during high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013 Jun 15;304(12):E1391-403.

Lee BC, Lee J. Cellular and Molecular Players in Adipose Tissue Inflammation in the Development of Obesity-Induced Insulin Resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1842 (3), 446-62.

Lee JH, O'Keefe JH, Lavie CJ, Marchioli R, Harris WS. Omega-3 fatty acids for cardioprotection. *Mayo Clin Proc.* 2008; 83(3):324-32.

Leffa DD, da Silva J, Daumann F, Dajori AL, Longaretti LM, Damiani AP, Lira F, Campos F, Ferraz Ade B, Côrrea DS, Andrade VM. Corrective effects of acerola (*Malpighia emarginata* DC.) juice intake on biochemical and genotoxic parameters in mice fed on a high-fat diet. *Mutat Res.* 2014 Dec;770:144-52.

Leigh SJ, Kendig MD, Morris MJ. Palatable Western-style Cafeteria Diet as a Reliable Method for Modeling Diet-induced Obesity in Rodents. **J Vis Exp**, 2019 Nov 1;(153). v

Li L, Chen J, Wang J, Cai D. Prevalence and risk factors of diabetic peripheral neuropathy in Type 2 diabetes mellitus patients with overweight/obese in Guangdong province, China. *Prim Care Diabetes.* 2015; 9(3):191-5.

Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl).* 1987;92(2):180-5.



Liu X, Li Y, Tobias DK, Wang DD, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Changes in Types of Dietary Fats Influence Long-term Weight Change in US Women and Men. *J Nutr*. 2018 Nov; 148(11): 1821–1829

Liu X, Xue Y, Liu C, Lou Q, Wang J, Yanagita T, Xue C, Wang Y. Eicosapentaenoic acid-enriched phospholipid ameliorates insulin resistance and lipid metabolism in diet-induced-obese mice. *Lipids Health Dis*. 2013; 12:109.

Loock KV, Botsivali M, Zangogianni M, Anderson D, Baumgartner A, Fthenou E, Chatzi L, Marcos R, Agramunt S, Namork E, Granum B, Knudsen LE, Nielsens JKS, Meltzer HM, Haugen M, Kyrtopoulos SA, Decordier I, Plas G, Roelants M, Merlo F, Kleinjans J, Kogevinas M, Kirsch-Volders M. The effect of dietary estimates calculated using food frequency questionnaires on micronuclei formation in European pregnant women: a NewGeneris study. *Mutagenesis*. 2014 Nov;29(6):393-400

Lorente-Cebrián S, Costa AG, Navas-Carretero S, Zabala M, Laiglesia LM, Martínez JA, et al. An update on the role of omega-3 fatty acids on inflammatory and degenerative diseases. *J Physiol Biochem*. 2015; 71(2):341-9.

Louie SM, Roberts LS, Nomura DK. Mechanisms linking obesity and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831(10):1499-1508.

Luciano, TF. Efeitos da suplementação com extrato de *Zingiber officinale* sobre parâmetros metabólicos e genotóxicos em camundongos obesos induzidos por dieta [tese de doutorado]. Programa de Pós graduação em Ciências da Saúde. Criciúma. Universidade do Extremo Sul Catarinense. 2018.

Lutz TA, Woods SC. Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol*. *Curr Protoc Pharmacol*. 2012; 5:5.61.

Macedo IC, Medeiros LF, Oliveira C, Oliveira CM, Rozisky JR, Scarabelot VL, Souza A, Silva FR, Santos VS, Cioato SG, Caumo W, Torres ILS. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. **Peptides**. 2012 Nov;38(1):189-96.

Maffeis C, Morandi A. Body composition and insulin resistance in children. *Eur J Clin Nutr*. 2018 Sep;72(9):1239-1245.

Mansur RB1, Brietzke E2, McIntyre RS3. Is there a "metabolic-mood syndrome"? A review of the relationship between obesity and mood disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015 May;52:89-104.

Marecki JC, Ronis MJJ, Shankar K, Badger TM. Hyperinsulinemia and ectopic fat deposition can develop in the face of hyperadiponectinemia in young obese rats. *J Nutr Biochem*. 2011 Feb;22(2):142-52.

Martire SI, Holmes N, Westbrook RF, Morris MJ. Altered feeding patterns in rats exposed to a palatable cafeteria diet: increased snacking and its implications for development of obesity. *PLoS One*. 2013;8:60407.

Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, Ota T, Yokoyama M, Honda M, Miyamoto K, Kaneko S. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism*. 2008 Aug;57(8):1071-7.

Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. and Heddle, J.A. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mut. Res.* 1990. 239: 29-80.

Mellouk Z, Agustina M, Ramirez M, Pena K, Arivalo J. The therapeutic effects of dietary krill oil (*Euphausia superba*) supplementation on oxidative stress and DNA damages markers in cafeteria diet-overfed rats. *Ann Cardiol Angeiol*. 2016 Jun;65(3):223-8.

Ministerio da Saúde (BR). 2019, *Vigitel Brasil 2018: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/25/vigitel-brasil-2018.pdf> > Acessado dia 11 de agosto de 2019.

Myers MG J, Leibel RL, Seeley RJ, Schwartz MW. Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. *Trends Endocrinol Metab*. 2010 Nov;21(11):643-51.

Neeland IJ, Poirier P, Després JP. Cardiovascular and Metabolic Heterogeneity of Obesity: Clinical Challenges and Implications for Management. *Circulation*. 2018 Mar 27;137(13):1391-1406.

Nguyen JC, Ali SF, Kosari S, Woodman OL, Spencer SJ, Killcross AS, Jenkins TA. Western Diet Chow Consumption in Rats Induces Striatal Neuronal Activation While Reducing Dopamine Levels without Affecting Spatial Memory in the Radial Arm Maze. *Front Behav Neurosci*. 2017; 11:22.

Nilsson C, Raun K, Yan F, Larsen MO, Tang-Christensen M. Laboratory animals as surrogate models of human obesity. ***Acta Pharmacologica Sinica***, v. 33, n. 2, p. 173-181, fev. 2012.

Nilsson C, Raun K, Yan FF, Larsen MO, Tang-Christensen M. Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacol Sin*. 2012; 33(2):173-81.

Oikawa S, Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Saito Y, Ishikawa Y, Sasaki J, Hishida H, Itakura H, Kita T, Kitabatake A, Nakaya N, Sakata T, Shimada K, Shirato K; JELIS Investigators, Japan. Suppressive effect of EPA on the incidence of coronary events in hypercholesterolemia with impaired

glucose metabolism: Sub-analysis of the Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS). *Atherosclerosis*. 2009 Oct;206(2):535-9.

Oliva L, Aranda T, Caviola G, Fernández-Bernal A, Alemany M, Fernández-López JA, Remesar X. In rats fed high-energy diets, taste, rather than fat content, is the key factor increasing food intake: a comparison of a cafeteria and a lipid-supplemented standard diet. *PeerJ*. 2017 Sep 13;5:e3697.

Orino K, Watanabe K. Molecular, physiological and clinical aspects of the iron storage protein ferritin. *Vet J*. 2008; 178(2):191-201.

Osellame LD, Blacker TS, Duchen MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2012; 26(6):711- 23.

Paumgarten FJR. Tratamento farmacológico da obesidade: a perspectiva da saúde pública. *Cad. Saúde Pública*. 2011; 27(3):404-5.

Pellegrinelli V, Carobbio S, Vidal-Puig A. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia*. 2016; 59: 1075- 1088.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985 Aug;14(3):149-67.

Peres A, Dorneles GP, Boeira MCR, Schipper LL, Beretta Â, Vilela T, Andrade VM, Romão PRT. Acute fish oil supplementation modulates the inflammatory response after strenuous exercise in obese men: A cross-over study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2018 Oct; 137:5-11.

Petry NM, Barry D, Pietrzak RH, Wagner JA. Overweight and obesity are associated with psychiatric disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Psychosom Med*. 2008;70(3):288-97.

Pimentel GD, Lira FS, Rosa JC, Oller do Nascimento CM, Oyama LM, Harumi Watanabe RL, Ribeiro EB. High-fat fish oil diet prevents hypothalamic inflammatory profile in rats. *ISRN Inflamm*. 2013; 2013:419823.

Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463(1-3): 3-33 (2003).

Ríos-Hoyo A, Gutiérrez-Salmeán G. New Dietary Supplements for Obesity: What We Currently Know. *Curr Obes Rep*. 2016 Jun;5(2):262-70.

Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci*. 2009; 84(21-22):705-12.

Rodríguez A, Ezquerro S, Méndez-Gimenez L, Becerril S, Frühbeck G. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015; 309: E691- E714.

Rogge MM. The role of impaired mitochondrial lipid oxidation in obesity. *Biol Res Nurs.* 2009; 10(4):356-73.

Rokling-Andersen MH, Rustan AC, Wensaas AJ, Kaalhus O, Wergedahl H, Røst TH, Jensen J, Graff BA, Caesar R, Drevon CA. Marine n-3 fatty acids promote size reduction of visceral adipose depots, without altering body weight and composition, in male Wistar rats fed a high-fat diet. *Br J Nutr.* 2009; 102(7):995-1006.

Rosini TC, Silva ASR, Moraes C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. *Rev Assoc Med Bras.* 2012; 58(3):383-7.

Rossmesl M, Medrikova D, van Schothorst EM, Pavlisova J, Kuda O, Hensler M, Bardova K, Flachs P, Stankova B, Vecka M, Tvrzicka E, Zak A, Keijer J, Kopecky J. Omega-3 phospholipids from fish suppress hepatic steatosis by integrated inhibition of biosynthetic pathways in dietary obese mice. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1841(2):267-78.

Rudich A, Kanety H, Bashan N. Adipose stress-sensing kinases: linking obesity to malfunction. *Trends Endocrinol Metab.* 2007; 18(8):291-9.

Samane S, Christon R, Dombrowski L, Turcotte S, Charrouf Z, Lavigne C, Levy E, Bachelard H, Amarouch H, Marette A, Haddad PS. Fish oil and argan oil intake differently modulate insulin resistance and glucose intolerance in a rat model of dietary-induced obesity. *Metabolism.* 2009; 58(7):909-19.

Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, Newgard CB, Makowski L. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 2011;19:1109–1117.

Sartorelli DS, Franco LJ. Trends in diabetes mellitus in Brazil: the role of the nutritional transition. *Cad. Saúde Pública.* 2003; 19(1):29-36.

Sclafani A, Springer D. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol Behav.* 1976; 17(3):461-71.

Setayesh T, Nersesyan A, Mišik M, Ferk F, Langie S, Andrade VM, Haslberger A, Knasmüller S Impact of obesity and overweight on DNA stability: few facts and many hypotheses. *Mutat Res.* 2018; 777:64-91.

Shafat A, Murray B, Rumsey D. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. *Appetite*. 2009 Feb;52(1):34-8.

Silva RV, Oliveira JT, Santos BLR, Dias FC, Martinez AMB, Lima CKF, Miranda ALP. Long-Chain Omega 3 Fatty Acids Supplementation Accelerates Nerve Regeneration and Prevents Neuropathic Pain Behavior in Mice. *Front Pharmacol*. 2017 Oct 17;8:723.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175:184-191.

Singla P, Bardoloi A, Parkash AA. Metabolic effects of obesity: A review. *World J Diabetes*. 2010; 1(3): 76–88.

Siriwardhana N, Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N. Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Adv Food Nutr Res*. 2012;65:211-22.

Sun K, Tordjman J, Clement K, Scherer PE. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab*. 2013; 18: 470- 477.

Surette ME. The science behind dietary omega-3 fatty acids. *CMAJ*. 2008; 178(2):177-80.

Talukder MA, Johnson WM, Varadharaj S, Lian J, Kearns PN, El-Mahdy MA, Liu X, Zweier JL. Chronic cigarette smoking causes hypertension, increased oxidative stress, impaired NO bioavailability, endothelial dysfunction, and cardiac remodeling in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 300(1):H388-96.

Thota RN, Acharya SH, Garg ML. Curcumin and/or omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation reduces insulin resistance and blood lipids in individuals with high risk of type 2 diabetes: a randomised controlled trial. *Lipids Health Dis*. 2019 Jan 26;18(1):31.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu, J. C.; Sasaki, Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000; 35(3):206-21.

Tomasello B, Malfa G, Galvano F, Renis M. DNA damage in normal-weight obese syndrome measured by Comet assay. *Mediterr J Nutr Metab* (2011) 4:99–104.

Turkez H, Aydin E. Anti-genotoxic role of eicosapentaenoic acid against imazalil-induced DNA damage in vitro. *Toxicol Ind Health*. 2013 Aug;29(7):584-90.

Van Hall G, Steensberg A, Sacchetti M, Fischer C, Keller C, Schjerling P, Hiscock N, Moller K, Saltin B, Febbraio MA, Pedersen BK. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3005-3010.

Vande Loock K, Botsivali M, Zangogianni M, Anderson D, Baumgartner A, Fthenou E, Chatzi L, Marcos R, Agramunt S, Namork E, Granum B, Knudsen LE, Nielssen JK, Meltzer HM, Haugen M, Kyrtopoulos SA, Decordier I, Plas G, Roelants M, Merlo F, Kleinjans J, Kogevinas M, Kirsch-Volders M. The effect of dietary estimates calculated using food frequency questionnaires on micronuclei formation in European pregnant women: a NewGeneris study. *Mutagenesis*. 2014 Nov;29(6):393-400.

Vasanth dan VRB, Candasamy M, Bhattamisra SK. Obesity an overview: Genetic conditions and recent developments in therapeutic interventions. *Diabetes Metab Syndr*. 2019 May - Jun;13(3):2112-2120.

Viggiano E, Mollica MP, Lionetti L, Cavaliere G, Trinchese G, De Filippo C, Chieffi S, Gaita M, Barletta A, De Luca B, Crispino M, Monda M. Effects of an high-fat diet enriched in lard or in fish oil on the hypothalamic amp-activated protein kinase and inflammatory mediators. *Front Cell Neurosci*. 2016; 10:150.

Von Deneena K M, Liub Y. Obesity as an addiction: Why do the obese eat more? *Maturitas*. 2011 Apr;68(4):342-5.

Wadden TA, Foster GD. Behavioral treatment of obesity. *Med Clin North Am* 2000; 84:441–61.

Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med*. 2013; 19: 1338- 1344.

Wajchenberg BL, Santomauro ATMG, Nery M, Santos RF, Silva MELR, Ursich MJM, Rocha DM. Resistência à Insulina: Métodos Diagnósticos e Fatores que Influenciam a Ação da Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 1999;43:76-85.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Investig*. 2003;112:1796–1808.

Wlodarczyk M, Jablonowska-Lietz B, Olejarz W, Nowicka G. Anthropometric and dietary factors as predictors of DNA damage in obese women. *Nutrients*. 2018;10:578.

Woodman RJ, Mori TA, Burke V, Puddey IB, Watts GF, Beilin LJ. Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on glycemic control, blood pressure, and serum lipids in type 2 diabetic patients with treated hypertension. *Am J Clin Nutr*. 2002;76:1007-1015.

World Health Organization (WHO). Obesity and overweight. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> Acessado dia 11 de junho de 2019.

Xia X, Li G, Song J, Zheng J, Kan J. Hypocholesterolaemic effect of whole-grain highland hull-less barley in rats fed a high-fat diet. *Br J Nutr.* 2018 May;119(10):1102-1110.

Yates CM, Calder PC, Ed Rainger G. Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. *Pharmacol Ther.* 2014; 141(3):272-82.

Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int J Dev Neurosci.* 2000; 18(4/5):383-99.

Yu Y, Cui Y, Niedernhofer LJ, Wang Y. Occurrence, biological consequences, and human health relevance of oxidative stress-induced DNA damage. *Chem. Res. Toxicol.* 2016;29:2008–2039.

Zaki M, Basha W, El-Bassyouni HT, El-Toukhy S, Hussein T. Evaluation of DNA damage profile in obese women and its association to risk of metabolic syndrome, polycystic ovary syndrome and recurrent preeclampsia. *Genes Dis.* 2018;5:367–373.

Zalewska A, Kossakowska A, Taranta-Janusz K, Zięba S, Fejfer K, Salamonowicz M, Kostecka-Sochoń P, Wasilewska A, Maciejczyk M. Dysfunction of Salivary Glands, Disturbances in Salivary Antioxidants and Increased Oxidative Damage in Saliva of Overweight and Obese Adolescents. *J Clin Med.* 2020 Feb 17;9(2).

Zapata-Gonzalez F, Rueda F, Petriz J, Domingo P, Villarroja F, Diaz-Delfin J, de Madariaga MA, Domingo JC. Human dendritic cell activities are modulated by the omega-3 fatty acid, docosahexaenoic acid, mainly through PPAR( $\gamma$ ):RXR heterodimers: comparison with other polyunsaturated fatty acids. *J Leukoc Biol.* 2008;84:1172-1182.

Zhang YY, Liu W, Zhao TY, Tian HM. Efficacy of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Supplementation in Managing Overweight and Obesity: A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. 2017;21(2):187-192. doi: 10.1007/s12603-016-0755-5.

## ANEXOS

Certificado comprovando o aceite do CEUA para a execução do projeto aqui referido.





**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **11/12/2018**.

<b>Título do projeto</b>	Avaliação da suplementação do ômega-3 sobre parâmetros comportamentais, genéticos, e bioquímicos em camundongos alimentados com uma dieta cafeteria.
<b>Project title</b>	Evaluation of supplementation of ômega-3 about behavioral, genetic and biochemical parameters in mice fed a diet cafeteria.
<b>Número do protocolo Protocol number</b>	035/2018-2 versão 3
<b>Pesquisador principal Principal Investigator</b>	Vanessa Moraes de Andrade
<b>Pesquisadores Researchers</b>	Angela Caroline Da Luz Beretta, Giulia Strapazzon, Luiza Martins Longaretti, Maiara Pereira, Gabriel Paulino Luiz, Marina Lummertz Magenis, Isadora de Oliveira Monteiro, Lígia Salvan Dagostin e Giulia Fantini Malavazi Camargo.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	19/12/2018 a 27/04/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico/ Swiss
No de animais	72
Idade/Peso	30 dias / 30g
Gênero	Masculino
Origem	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.  
May you have further questions, please contact us by e-mail [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).



**Samira da Silva Valvassori**  
Coordenadora do CEUA

Criciúma, 11 de Dezembro de 2018.

CARTA-RESPOSTA – Parecer Aprovado Página 1 de 1