

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

BRUNO CLEYTON DA SILVA BARROS

**SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE REDUZ NÍVEIS
PROTEICOS DE MOLÉCULAS INFLAMATÓRIAS E
ESTRESSE DE RETÍCULO EM CÉLULAS MONONUCLEARES
DE PACIENTES COM SOBREPESO OU OBESOS E DIABETES
TIPO 2**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde
para obtenção do título de Mestre
em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Claudio
Teodoro de Souza.

**CRICIÚMA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B277s Barros, Bruno Cleyton da Silva Barros.

Suplementação com óleo de peixe reduz níveis proteicos de moléculas inflamatórias e estresse de retículo em células mononucleares de pacientes com sobrepeso ou obesos e diabetes tipo 2 / Bruno Cleyton da Silva Barros. - 2017.

78 p. : il.; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

Orientação: Claudio Teodoro de Souza.

1. Óleo de peixe – Efeitos colaterais. 2. Ácidos graxos ômega-3 – Efeitos colaterais. 3. Obesidade. 4. Diabetes mellitus tipo 2. 5. Estresse de retículo. I. Título.

CDD 23. ed. 615.1



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado apresentada pelo candidato **Bruno Cleyton da Silva Barros** sob o título **“Suplementação com óleo de peixe reduz níveis proteicos de moléculas inflamatórias e estresse de retículo em células mononucleares de pacientes com sobrepeso ou obesos e diabéticos tipo 2”**, para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela **“APROVAÇÃO”** da Dissertação.

Criciúma, SC, 18 de maio de 2017.


Prof.ª Dra. VANESSA MORAES DE ANDRADE
Membro Relator


Prof.ª Dra. ALEXANDRA IOPPI ZUGNO
Membro Interno


Prof.ª Dra. GISLAINE TEZZA REZIN
Membro Externo


Prof. Dr. Cláudio Teodoro de Souza
Orientador


Prof.ª Dra. Maria Inês da Rosa
Coordenadora do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense.

À minha esposa, Pauliany, amor desde a juventude, companheira das alegrias e dificuldades, o meu muito obrigado por acreditar que eu posso tornar-me melhor a cada dia. Obrigado por nunca ter desistido de mim. Te amo.

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar comigo em todos os momentos.

À UNESC por me proporcionar uma formação digna e acessível e a UniRV pela oportunidade da docência.

À todos os companheiros do Minter, pelo incentivo e cumplicidade e em especial ao Tiago Domingues, companheiro de aulas e viagens e por tornar-se um amigo irmão verdadeiro.

Ao meu orientador Claudio Teodoro por ter me conduzido magnificamente, e sempre prestativo e amigo. Ao grupo do laboratório lafibe pela prestatividade sempre

Ao pró reitor de administração da UniRV Alberto Barella Netto pela confiança, pelo apoio, pela amizade sincera e pelos conselhos

Ao reitor da UniRV Sebastiao Lázaro Pereira pelo apoio sempre aos docentes da instituição

À professora Maria de Fatima pelo carinho e pelos ensinamentos

À meus pais Manoel Cardoso De Barros e Romilda Antonia Da Silva Barros que não medirão esforços para realização desse mestrado e pelo exemplo de caráter sempre, e ter me ensinado que o estudo é a única forma de nos tornarmos pessoas melhores. À meu irmão Will Heumeer Da Silva Barros por ter sempre me apoiado nos momentos que precisei

Ao coordenador do curso de educação física da UniRV Mauro Feliciano Barbos Mulati pela amizade e pela experiência como docente.

Aos meus filhos Lara Cristina Souza Barros e Arthur Souza Barros pela compreensão quando estive fora para a realização do mestrado e pelo amor imparcial

A minha esposa Pauliany Souza Rodrigues Barros por estar sempre do meu lado me apoiando em todos os momentos.

Aos meus avos Geraldo Ferreira e Amelia Guilhermina (em memória) que sempre me apoiaram em todas as minhas conquistas

À todos os meus familiares que sempre me apoiaram e sempre mostraram grande satisfação com a conquista do mestrado.

“As pessoas boas merecem o nosso amor, as pessoas ruins precisam dele...”

Madre Tereza de Calcutá

RESUMO

A obesidade está relacionada com o desenvolvimento de processos inflamatórios os quais interferem sobre a via de sinalização da insulina levando à resistência à ação deste hormônio e ao desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Além disso, o estado de inflamação subclínica pode comprometer a função do retículo endoplasmático, um processo conhecido como estresse de retículo endoplasmático. Diante disso, e ciente das determinantes inflamatórias para o surgimento do DM2; torna-se de grande valia explorar os efeitos dos ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 sobre estas vias. Dessa forma, o presente estudo avaliou os efeitos da suplementação com óleo de peixe em pacientes com sobrepeso/obesos e DM2, sobre os níveis proteicos de moléculas marcadoras de inflamação e de estresse de retículo endoplasmático. Para isso, foram recrutados 32 pacientes com sobrepeso ou obesos e diagnosticados com diabetes mellitus tipo 2 há mais de um ano. Esses pacientes foram suplementados por oito semanas com óleo de peixe (2,4g/dia), ingerindo duas cápsulas pela manhã e duas à noite. Não foi orientado nenhuma modificação na alimentação durante o período de estudo, apenas a ingestão das cápsulas de óleo de peixe diariamente. Os pacientes tiveram amostras de sangue periférico coletado antes e após a intervenção. As coletas foram feitas mediante jejum de 12 horas e o não consumo de álcool nas 48 horas anteriores. Células mononucleares do sangue periférico foram isoladas por centrifugação em ficol seguida das preparação de seus extratos protéicos. Os extratos foram submetidos à eletrofose em gel de poliacrilamida e transferência Western blot. Em seguida, foram determinados seus níveis de fosforilação por meio dos anticorpos anti NF- κ B, JNK fosforilados, XBP1, pPERK e pEIF2 α . Observou-se que a suplementação com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, durante oito semanas, reduziu, de modo significativo, os níveis proteicos de NF- κ B e JNK fosforilados indicando menor interferência de sinais inflamatórios sobre a via de sinalização da insulina. O mesmo foi observado para os marcadores de estresse de retículo XBP1, pPERK e pEIF2 α . Em conclusão, a suplementação com ácidos graxos poli-insaturados ômega 3, na dosagem de 2,4 gramas por dia, foi eficaz para reduzir os níveis proteicos de moléculas marcadoras de inflamação e de estresse de retículo endoplasmático em pacientes com sobrepeso/obesos e DM2.

Palavras-chave: diabetes mellitus tipo 2; inflamação; ômega 3; estresse RE.

ABSTRACT

Obesity is related to the development of inflammatory processes that interfere on the insulin-signaling pathway leading to resistance to the action of this hormone and development of type 2 diabetes mellitus (T2DM). In addition, the state of subclinical inflammation may compromise the function of the endoplasmic reticulum, a process known as endoplasmic reticulum stress. Studies have shown that reticulum stress can also lead to the state of inflammation. On this, and knowing the inflammatory determinants for the trigger of DM2; It is of great value to explore the anti-inflammatory effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. Thus, the present study evaluated the effects of fish oil supplementation in overweight / obese and type 2 diabetic patients, on the protein levels of inflammatory and endoplasmic reticulum stress markers. For this, 32 patients with overweight or obese and diagnosed with type 2 diabetes mellitus more than a year ago were recruited. These patients were supplemented for eight weeks with fish oil (2.4g / day), taking two capsules in the morning and two at night. No feed modification was instructed during the study period, only the ingestion daily of the fish oil capsules. Before and after of the intervention the samples of peripheral blood of patients were collected. The samples were taken by fasting for 12 hours and the non-consumption of alcohol in the previous 48 hours. For the analysis of protein levels and phosphorylation the peripheral blood mononuclear cells were isolated, protein extract was prepared and application in polyacrylamide gel (Western blot). Statistically significant reduction was observed in NF κ B and JNK phosphorylation protein levels. Reduction of NF κ B and JNK were also observed. Thus, believed that the endoplasmic reticulum stress marker molecules could it be reduced, too. The data showed that fish oil supplementation was able significantly to reduce the stress reticulum molecules: XBP1, pPERK and pEIF2 β . In conclusion, eight-week supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids at a dosage of 2.4 grams per day was effective in reducing the inflammatory and endoplasmic reticulum stress marker protein levels in overweight / obese and type 2 diabetics.

Key-words: type 2 diabetes; inflammation; omega 3; ER stress.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1 - Proteína ativadora 1
ATF-6 - Fator de ativação transcricional 6
c-Fos - Oncogene cFOS
c-Jun - Oncogene cJUN
COX-2 - Ciclooxygenase 2
DHA - Ácido docosahexaenoico
DM2 - Diabetes Mellitus tipo 2
eIF2 α - Fator de iniciação da tradução α
EPA - Ácido eicosapentaenoico
ERAD - Sistema de degradação associado ao RE
GLUT4 - Transportador de glicose
GPR120 - Receptor acoplado a proteína G
HDL - Lipoproteína de alta densidade
HOMA-IR - Avaliação de modelo de homeostase de resistência à insulina
IKK - Proteína quinase kappa B
IL-1 β - Interleucina 1 *beta*
IL-6 - Interleucina 6
IMC - Índice de Massa Corporal
iNOS - Óxido nítrico sintase induzível
IRE-1 - Enzima ativada por inositol 1
IRS-1 - Substrato receptor de insulina 1
IRS-2 - Substrato receptor de insulina 2
I κ B - Quinase inibitória kappa B
JNK - C-jun N-terminal quinase
LDL - Lipoproteína de baixa densidade
MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos 1
NF κ B - Fator de transcrição nuclear *kappa* B
PERK - Quinase do reticulo endoplasmático semelhante à PKR
PGE - Prostaglandina E2
PGI₂ - Prostaglandina I2
QUICKI - Índice quantitativo de verificação da sensibilidade à insulina
RE - Retículo endoplasmático
TLR-4 - Receptor do tipo Toll 4
TNF α - Fator de necrose tumoral alfa
TXA₂ - Tromboxano A2
UPR - Resposta à proteína não dobrada
XBP1 - Proteína de ligação X-Box 1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de resistência à insulina induzida por inflamação.	28
Figura 2 - Mecanismo de ação dos ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 sobre o receptor GPR120.	30
Figura 3 - Mecanismo de resposta à proteína não dobrada ou mal dobrada UPR.	32
Figura 4 - Esquema do delineamento do estudo.	41
Figura 5 - Efeitos da suplementação com ômega 3 sobre os níveis proteicos de NF- κ B fosforilado em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com sobrepeso/obesos e DM2.	46
Figura 6 - Efeitos da suplementação com ômega 3 sobre os níveis proteicos de JNK fosforilado em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com sobrepeso/obesos e DM2.	47
Figura 7 - Efeitos da suplementação com ômega 3 sobre os níveis proteicos de XBP1 em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com sobrepeso/obesos e DM2.	49
Figura 8 - Efeitos da suplementação com ômega 3 sobre os níveis proteicos de PERK fosforilado em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com sobrepeso/obesos e DM2.	50
Figura 9 - Efeitos da suplementação com ômega 3 sobre os níveis proteicos de EIF2 γ fosforilado em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com sobrepeso/obesos e DM2.	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 OBESIDADE E DIABETES MELLITUS DO TIPO 2	23
1.2 OBESIDADE E INFLAMAÇÃO	25
1.3 ESTRESSE DE RETICULO ENDOPLASMÁTICO	30
1.4 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS OMEGA 3 E EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO	33
2 OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVO GERAL	37
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 DELINEAMENTO	39
3.2 ASPECTOS ÉTICOS	39
3.3 POPULAÇÃO EM ESTUDO	39
3.3.1 Critérios de inclusão	40
3.3.2 Critérios de exclusão	40
3.4 INTERVENÇÕES NUTRICIONAIS	40
3.4.1 Característica da intervenção	40
3.4.2 Suplementação de óleo de peixe	40
3.5 ANÁLISES MOLECULARES	41
3.5.1 Isolamento das células de sangue periférico	42
3.5.2 Análises dos níveis de proteínas e de fosforilação por Western blotting	42
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
4 RESULTADOS	45
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	63
APÊNDICE	73
APÊNDICE A - TCLE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	74
ANEXO	75
ANEXO A – PARECER CEP	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE E DIABETES MELLITUS DO TIPO 2

A obesidade é uma doença crônica não transmissível com maior incidência e prevalência no mundo. Essa doença é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal capaz de acarretar prejuízos à saúde (OMS, 2000). As combinações, alta ingestão calórica e estilo de vida sedentário, levam ao aumento significativo de peso corporal (Stein e Colditz, 2004). Esse aumento leva a menor longevidade e maior morbidade, com grandes propensões ao desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas, destacando o diabetes tipo 2 (DM2).

A obesidade atinge proporções epidêmicas em grande parte do mundo e vem crescendo a cada década. Atualmente verifica-se que o aumento da obesidade se dá em escala global, afetando tanto os países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Ezzati e colegas (2016) estimaram as tendências do índice de massa corporal (IMC), tomando 1.698 estudos com base em medidas de 19,2 milhões de pessoas em 200 países no período de 1975 a 2014. O mesmo apontou o aumento do IMC de 21,7 kg/m² em 1975, para 24,2 kg/m² em 2014 para os homens; e 22,1kg/m² em 1975, para 24,4 kg/m² em 2014 para as mulheres. Segundo o mesmo estudo, a prevalência da obesidade padronizada por idade aumentou de 3,2% em 1975 para 10,8% em 2014 para homens; e de 6,4% para 14,9% para as mulheres; 2,3% dos homens e 5,0% das mulheres são classificados como obesos severos (i.e. IMC \geq 35 kg/m). Globalmente, a prevalência da obesidade mórbida é de 0,64% em homens e 1,6% em mulheres. De acordo com a interpretação do estudo, se esta tendência continuar, até 2025 a prevalência global de obesidade alcançará 18% nos homens e irá ultrapassar os 21% nas mulheres, enquanto que a obesidade severa ultrapassará os 6% nos homens e 9% nas mulheres.

No Brasil, nas últimas quatro décadas, o número de indivíduos classificados como obesos aumentou (NCD-RisC, 2016). Em 1975, do total de obesos no mundo, o Brasil representava 2,6% (0,9 milhões) dos homens e 2,6% (1,9 milhões) das mulheres. No ano de 2014 esses números passaram para 4,5% (11,9 milhões) nos homens e 4,8% (18 milhões) nas mulheres. Ainda mais impactante, é o aumento dos

indivíduos classificados como obesos severos, que passou de 1,5% (0,1 milhão) para 3,8% (2,2 milhões) nos homens e de 2% (0,3 milhão)

para 5,3% (6,7 milhões) nas mulheres (NCD-RisC, 2016). Outro dado preocupante é a prevalência de sobrepeso e obesidade entre crianças e adolescentes, onde 10% da população brasileira entre 5 e 17 anos estão acima do peso, e destes, 2 a 3% são obesos (NCD-RisC, 2016).

Uma das explicações para o aumento da incidência e prevalência de obesidade baseia-se nas mudanças demográficas e as alterações no padrão alimentar e de atividade física. Por exemplo, a substituição de frutas e verduras por alimentos processados, refinados, ricos em carboidratos, gorduras e conservantes tem como desdobramento o aumento do peso corporal e vários outros desfechos desfavoráveis à saúde, que incluem resistência à insulina e diabetes (Grundy et al., 2004; SBC, 2005).

Atualmente, existem diversos tratamentos para a perda de peso, dentre os quais se destaca uma variedade de dietas, psicoterapias, medicamentos e programas de atividades físicas, bem como diferentes métodos cirúrgicos. No entanto, no que se refere aos métodos para o tratamento da obesidade, sem exceção, todos apresentam alguma inconveniência ou efeito colateral, em algumas situações até tornam-se ineficientes. Praticamente em sua grande maioria, apresentam custo financeiro elevado (NCD-RisC, 2016).

É notável a epidemia de obesidade e DM2 no planeta. Observa-se um súbito e rápido aumento da prevalência destas duas conexas doenças nas últimas décadas e que, indubitavelmente, continuam em franco crescimento até o momento. A prevalência de DM2 está aumentando em nível mundial em um ritmo alarmante (Meigs, 2010). Estima-se que no ano de 2030, aproximadamente 366 milhões de pessoas sejam diabéticos, sendo mais de 90% deles portadores de DM2 (Wild et al., 2004).

O aumento da prevalência de DM2 está fortemente relacionado ao estilo de vida modernizado (supernutrição, alterações ambientais e sedentarismo), que resulta em aumento do número de indivíduos com sobrepeso e obesidade (Khunti et al., 2007). A prevalência de DM2 é aproximadamente sete vezes maior em adultos obesos quando comparados àqueles dentro do peso adequado, principalmente em adultos com $IMC > 35 \text{ kg/m}^2$, que são 20 vezes mais propensos a desenvolverem DM2 do que adultos com IMC entre $18,5 \text{ kg/m}^2$ e $24,9 \text{ kg/m}^2$ (Mokdad et al., 2003). Estima-se também que para cada 1 kg ganho de peso corporal há 4,5% a mais de risco de desenvolver DM2 (Ford et al., 1997).

Considerando-se não haver tempo suficiente para alterações no patrimônio genético da espécie humana em um curto intervalo de tempo, certamente os fatores ambientais devem explicar a epidemia, ou pelo menos em sua maior parte (Hill, 2006; Fretts et al., 2009). Por outro lado, estudos mostram que a adoção de um estilo de vida saudável com ênfase na prática regular de exercícios físicos e adequações nutricionais, possibilita a prevenção, o retardo da progressão da obesidade e diabetes ou mesmo na reversão do quadro, principalmente como adjuvante da terapia medicamentosa (Knowler et al., 2002; Laaksonen et al., 2005; Carnethon et al., 2009).

Embora haja o reconhecimento, pelo meio científico, de que mudanças pontuais no estilo de vida sejam eficazes para a promoção da saúde e prevenção ou tratamento de doenças, ainda se faz necessário investigar, sobretudo, os efeitos de suplementações nutricionais, principalmente aquelas com ações anti-inflamatória, uma vez que o mecanismo molecular que liga obesidade e DM2, mais aceito atualmente, é a inflamação subclínica de baixo grau. Esta pode ser indicada por biomarcadores como, por exemplo, níveis da citocina MCP-1, da proteína C reativa, dentre outras (Volp, et al. 2008).

1.2 OBESIDADE E INFLAMAÇÃO

De longa data, estudos têm demonstrado que a obesidade apresenta-se relacionada a processos inflamatórios crônicos de baixo grau (ou subclínico), sugerindo que o estado inflamatório é um fator importante no desenvolvimento da resistência à insulina e consequentemente DM2 (Colditz et al., 1995; Dandona et al., 2004; Waki, 2007). As complicações decorrentes da obesidade estão associadas, em parte, com alterações no tecido adiposo. Inicialmente, o papel do tecido adiposo branco é fornecer energia para o corpo, garantindo a homeostase energética através da mobilização dos estoques de triglicerídeos ou ácidos graxos, conforme as necessidades metabólicas. No entanto, os adipócitos também produzem uma variedade de moléculas biologicamente ativas denominadas adipocinas (como o fator de necrose tumoral alfa - TNF α e a interleucina 6 - IL-6), demonstrando o potencial endócrino deste tecido (Saltiel e Kahn, 2001).

O aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, desempenha importante função nas complicações metabólicas induzidas pela obesidade. Foi demonstrado que em roedores e humanos ocorre superexpressão de TNF α e da IL-6 (Hotamisligil et al., 1993; Tateya et al., 2013). Nos adipócitos, assim como em outras células, TNF α induz a

expressão de várias citocinas inflamatórias, como as interleucinas IL-1 α , IL-6 e IL-8. Além disso, na obesidade ocorre um aumento na infiltração de macrófagos no tecido adiposo, os quais também liberam quantidade excessiva de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF α , IL-6, MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos 1) e proteínas de fase aguda. Esses fatores exercem ações parácrinas, que perpetuam a inflamação local no tecido adiposo, e também endócrinas, que induzem resistência à insulina em outros tecidos (Hotamisligil et al., 1993; Tilge e Moschen, 2006).

A ingestão elevada de gordura saturada ativa os receptores *Tool like receptors* (principalmente o receptor 4 - TLR4), os quais desempenham uma conexão importante entre o sistema imune inato e o sistema metabólico. Alguns ácidos graxos ao se ligarem a esses receptores de membrana celular, acionam proteínas de respostas inflamatórias como c-jun quinase N-terminal (JNK) e Indutor *KappaB* quinase (IKK) que podem interferir na ação da insulina (Dandona et al., 2004; Tsukumo et al., 2007).

A ativação da serina quinase JNK pode interferir na funcionalidade dos substratos do receptor de insulina que, uma vez fosforilados em serina pela JNK, fica comprometida a possibilidade de serem fosforilados em tirosina pelo receptor de insulina, contribuindo para a resistência à transdução do sinal da insulina através dessa via (Hirosumi et al., 2002; Tuncman et al., 2006). Experimentos realizados com roedores relatam que camundongos com mutação genética da JNK apresentam melhor captação de glicose, menor depósito de gordura e não desenvolvem resistência à insulina mesmo quando submetidos a uma dieta rica em gordura (Dandona et al., 2004; Tsukumo et al., 2007). Outra via pró- inflamatória que também pode levar à fosforilação em serina de substratos do receptor de insulina é a via IKK/I κ B/NF κ B (quinase inibidora do fator *kappa*/fator nuclear *kappa* B) (Barbeau et al., 2002). Esta via é considerada uma das vias centrais mediadoras da resposta inflamatória, uma vez que regula a expressão de numerosos genes pró-inflamatórios imunomoduladores e anti-apoptóticos (Tsukumo et al; 2007) (Figura 1).

A ingestão elevada de gordura saturada ativa os receptores *Tool like receptors* (principalmente o receptor 4-TLR4), os quais desempenham uma conexão importante entre o sistema imune inato e o sistema metabólico. Alguns ácidos graxos ao se ligarem a esses receptores de membrana celular, acionam proteínas de respostas inflamatórias como c-jun quinase N-terminal (JNK) e Indutor *KappaB* quinase (IKK) que podem interferir na ação da insulina (Dandona et al., 2004; Tsukumo et

al., 2007). A ativação da serina quinase JNK pode interferir na funcionalidade dos substratos do receptor de insulina que, uma vez fosforilados em serina pela JNK, fica comprometida a possibilidade de serem fosforilados em tirosina pelo receptor de insulina, contribuindo para a resistência à transdução do sinal da insulina através dessa via (Hirosumi et al., 2002; Tuncman et al., 2006).

Experimentos realizados com roedores relatam que camundongos com mutação genética da JNK apresentam melhor captação de glicose, menor depósito de gordura e não desenvolvem resistência à insulina mesmo quando submetidos a uma dieta rica em gordura (Dandona et al., 2004; Tsukumo et al., 2007). Outra via pró-inflamatória que também pode levar à fosforilação em serina de substratos do receptor de insulina é a via IKK/I κ B/NF κ B (quinase inibidora do fator *kappa*/fator nuclear *kappa* B) (Barbeau et al., 2002). Esta via é considerada uma das vias centrais mediadoras da resposta inflamatória, uma vez que regula a expressão de numerosos genes pró-inflamatórios imunomoduladores e anti-apoptóticos (Tsukumo et al; 2007) (figura 1).

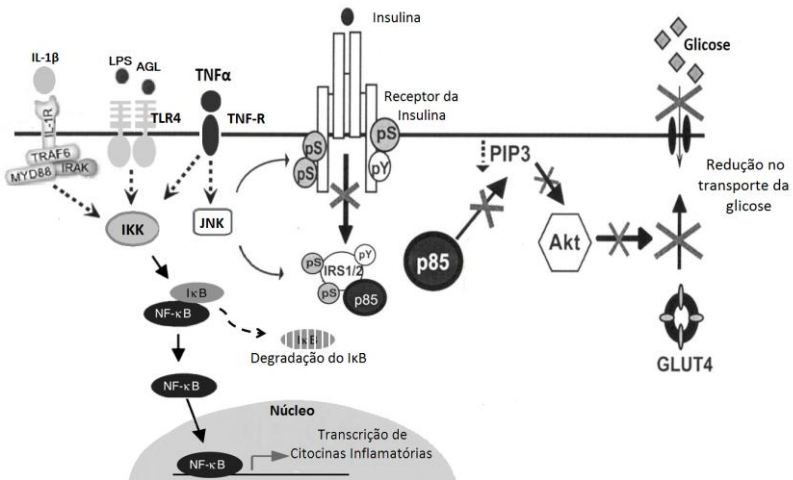


Figura 1 - Mecanismo de resistência à insulina induzida por inflamação.

Para que ocorra os efeitos fisiológicos da insulina é necessário que esse hormônio se ligue ao seu receptor e fosforile os substratos (IRS-1 e IRS-2) em tirosina (pY). Assim IRS-1 recruta a subunidade regulatória p85 de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), resultando em fosforilação de fosfolípidos de membrana (PIP3) para posterior ativação da proteína quinase B (Akt). A enzima Akt, dentre outras funções, estimula o transportador de glicose (que no caso do tecido muscular e adiposo é o GLUT4) a se deslocar até a membrana celular e realizar a captação de glicose. Porém, se o receptor da insulina ou seus substratos forem fosforilados em serina (pS), impossibilita a fosforilação em tirosina e, assim, compromete a transdução do sinal insulínico. Um dos principais inibidores da via da insulina é a JNK, uma enzima serina quinase ativada por TNF α . A molécula TNF α se liga ao receptor TNFR1 e além de ativar JNK, ativa outra proteína inflamatória IKK, que também é ativada por lipopolissacarídeos (LPS) e ácidos graxos livres (AGL), através da ligação ao receptor TLR4, ou ainda por IL-1 β , através da ligação ao receptor IL-1R1. Todas essas vias fosforilam e ativam IKK, que promove a dissociação do NF κ B de I κ B, uma proteína com função de manter NF κ B ancorado no citosol. A molécula I κ B é ubiquitinada via proteossoma e o NF κ B induz a transcrição de vários mediadores inflamatórios, que poderão atuar sinergisticamente na inibição da via de sinalização da insulina.

Fonte: Souza (2016).

Em se tratando do processo inflamatório, o receptor TLR4 é crucial. O estímulo desse receptor é capaz de induzir o recrutamento de moléculas intracelulares a fim de formarem um complexo. A associação do receptor *Toll* com a proteína de resposta primária à diferenciação

mielóide 88 (MyD88) transloca para a superfície interna da membrana celular a proteína quinase 4 associada ao receptor de interleucina 1 (IRAK4), que se associa a outra quinase semelhante, a IRAK1. Portanto, IRAK4 induz a fosforilação da IRAK1 (Takeda et al., 2003, Dunne et al., 2003). Não obstante, a proteína TRAF6 (fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral) também é recrutada no intuito de compor o complexo, ao se associar à IRAK1, que a ativa. As proteínas IRAK1 e TRAF6 depois de ativadas se dissociam do receptor e integram-se num novo complexo formado justaposto à proteína TAK1 (fator de crescimento transformador- β ativado por quinase) (Bradley et al., 2003). Quando unidas são capazes de recrutarem para si as proteínas citoplasmáticas TAB1 (proteína ligadora1 TAK1), TAB2 e TAB3. A proteína IRAK1 é desligada do complexo e degradada junto à membrana plasmática, permanecendo ligadas as proteínas TRAF6, TAK1, TAB1,2 e 3, que unidas são translocadas para o citosol (Wang et al., 2001; Shibuya et al., 1996) (figura 2). A alteração na atividade da TAK1 é capaz de ativar proteínas pertencentes a diferentes vias como as do NF κ B e as das MAP quinases (proteína quinase ativada por mitógeno). No que tange a inflamação, a TAK1 fosforila e ativa o IKK, à qual, do contrário, fosforila e inibe a proteína subsequente, o I κ B, que mantinha sob seu domínio as proteínas P50 e P65, formadoras do fator nuclear *kappa* B. Liberados no citoplasma o NF κ B, atua como fator de transcrição, ao migrar até o núcleo, ligando-se em regiões específicas do DNA para transcrever genes controladores de moléculas pró-inflamatórias como as citocinas TNF α , IL-1 β e IL-6, proteína de quimiotaxia para monócitos (MCP1), entre outras (Senftleben et al., 2001) (figura 2).

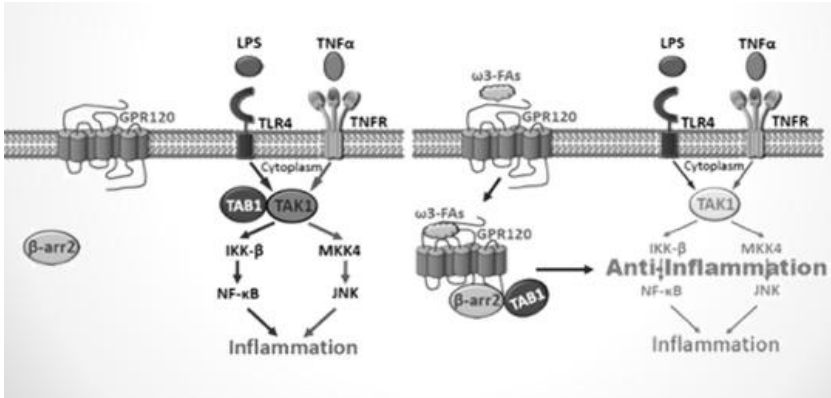


Figura 2 - Mecanismo de ação dos ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 sobre o receptor GPR120.

Quando TNF α ou LPS sinalizam em seus receptores, as proteínas quinase 1 ativada por fator de crescimento transformador β (TAK1) e proteína ligadora da TAK1 (TAB1) formam um complexo que desencadeia a resposta inflamatória principalmente por ativação das moléculas JNK e NF κ B. Com a ligação do ácido graxo poli-insaturado ômega 3 no receptor GPR120, a proteína adaptadora β arrestina se liga ao TAB1 impedindo a formação do complexo TAB1/TAK1, interrompendo o sinal inflamatório.

Fonte: Souza DR (2016)

A potência do processo inflamatório pode ser ainda maior quando outras quinases são ativadas pela TAK1, de forma paralela à sinalização do NF κ B, como as proteínas decorrentes da via da JNK (c-Jun N-terminal quinase) e da proteína 38 (P38). Tais proteínas apresentam-se ativadas quando fosforiladas, às quais são capazes de, forma semelhante ao NF κ B, migrarem até o núcleo e atuarem como fatores de transcrição, transcrevendo genes relacionados ao crescimento, diferenciação ou inflamação, dependendo do estímulo inicial. A JNK ainda é capaz de controlar os fenômenos de estresse de retículo e apoptose, ao aumentar a permeabilidade da membrana mitocondrial (Verma et al., 2010).

1.3 ESTRESSE DE RETICULO ENDOPLASMÁTICO

Atualmente é consenso que citocinas inflamatórias atuam sobre a via de sinalização de insulina, levando resistência a esse hormônio. Além disso, as evidências atuais têm demonstrado que um dos mecanismos patológicos da resistência à insulina é derivado de comprometimento da função do RE (Retículo endoplasmático), um processo conhecido como

estresse de RE. Distúrbios na síntese proteica no RE, em particular o aumento da síntese de proteínas imaturas, também conhecidas como proteínas *unfolded* (não dobradas) e *misfolded* (mal dobradas), acionam uma resposta adaptativa elaborada conhecida como UPR (resposta à proteína não dobrada ou mal dobrada) (Ozcan et al., 2004). A UPR é caracterizada por uma cascata de sinalização com finalidade de resgatar a qualidade da síntese proteica, atenuando a síntese global de proteínas, aumentando a expressão de chaperonas e quinases dobradoras de proteínas e ativando o ERAD (sistema de degradação associado ao RE) (figura 3). Desequilíbrios na sinalização da UPR podem ocasionar o “estresse de retículo”, ocorrência que pode estar associada à doenças, tais como obesidade e DM2 (Boden et al., 2008).

Nas células eucarióticas, o monitoramento da função reticular e sinalização da UPR são mediados por três proteínas associadas à membrana do RE: PERK (quinase do retículo endoplasmático semelhante à PKR), IRE-1 (enzima ativada por inositol 1) e ATF-6 (fator de ativação transcricional 6) (figura 3). A ativação destas proteínas promove uma cascata de sinalização intracelular que pode resultar na redução dos fatores de iniciação de tradução, assim como elevação da transcrição gênica (Calfon et al., 2002; Chen et al., 2002). Essas alterações têm por finalidade reverter o estado de estresse de retículo por reduzir a atividade ribossomal. Os mecanismos supracitados ocorrem com a finalidade de proteger as células da morte, reduzindo a síntese de proteínas em geral e aumentando a produção de chaperonas que atuam no dobramento de proteínas no lúmen da organela. Porém, com a persistência do quadro de UPR, os mecanismos citados não são suficientes para a diminuição de proteínas mal formadas, resultando em apoptose (Ma et al., 2002).

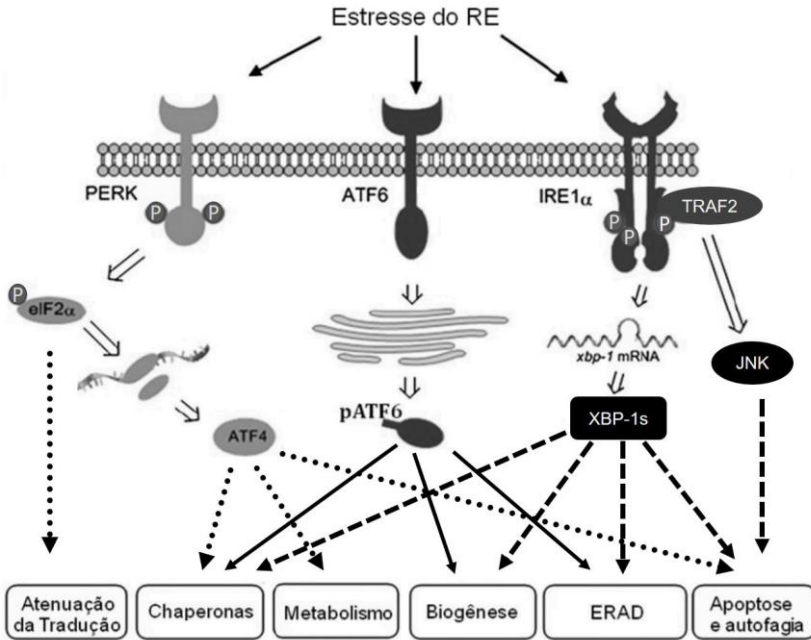


Figura 3 - Mecanismo de resposta à proteína não dobrada ou mal dobrada UPR.

Acúmulo de proteína mal dobradas dentro do lumen desencadeia UPR. Existem, pelo menos, três principais sensores de estresse na membrana do RE: IRE-1 \square , PERK e ATF6. Em células com estresse do RE, IRE1 \square é autofosforilado, levando a ativação de seu domínio endonucleásico. Esta atividade medeia o processamento do mRNA codificador para XBP1, que é um fator de transcrição que regula positivamente a expressão de muitos genes essenciais da UPR envolvidos no dobramento e controle de qualidade de proteínas, além de regular a biogênese do RE/Golgi. IRE-1 \square ativo se liga a proteína adaptadora TRAF2, desencadeando ativação de JNK, que pode participar do regulamento de autofagia e apoptose. Em alternativa, PERK ativo, fosforila o fator iniciador eIF2 \square e inibe a tradução, diminuindo a síntese de proteínas e a sobrecarga de proteínas mal dobradas no RE. Além disso, este evento permite a tradução específica de ATF4, um fator de transcrição que induz a expressão de genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos, incluindo CHOP. Uma terceira via da UPR é mediada pelo ATF6, uma proteína transmembrana do RE tipo II. Após indução de estresse do RE, ATF6 é processado, aumentando a expressão de algumas chaperonas do RE e genes relacionados ao ERAD. Na parte inferior, são indicadas as funções celulares abrangidas por cada ramo de sinalização da via UPR.

Fonte: adaptado de Leão (2013).

É proposto que as vias JNK/AP-1 e IKK/I κ B/NF κ B são intensamente ativadas pela UPR. Estudo de Nakamura (2010), ao relacionar nutrientes, estresse de RE e inflamação, demonstrou que a eIF2 α (fator de iniciação da tradução alfa), que é ativada pela PERK, desempenha uma função importante neste processo. No contexto da inflamação crônica, evidências apontam que células como adipócitos e hepatócitos podem estar ligadas a um conjunto diversificado de respostas do estresse de RE, que podem ocasionar respostas imunes aumentadas. Da mesma forma, em roedores com obesidade resultante de deficiência de leptina (ob/ob), os tecidos adiposo e hepático apresentam características do quadro de estresse RE, incluindo aumento dos níveis de PERK e IRE-1 α fosforiladas, assim como aumento da atividade da JNK (Tuncman et al., 2006) (figura 3). Em adição, foi demonstrado que a NF κ B pode ser ativado pela UPR por meio da supressão de transcrição de I κ B, por um mecanismo que envolve a PERK, resultando na regulação de mediadores da inflamação, como IL-6 e TNF α (Deng et al., 2000). Dessa forma, percebe-se que relação entre estresse de RE e inflamação não é unilateral (Urano et al., 2000). O estresse de RE é capaz de ativar a via inflamatória por meio da UPR, assim como evidências demonstram que os mediadores inflamatórios, tais como a JNK e IKK podem ter um impacto negativo sobre a função do RE. No contexto da inflamação crônica, evidências apontam que células como adipócitos e hepatócitos podem estar ligadas a um conjunto diversificado de respostas do estresse de RE, que podem ocasionar em respostas imunes aumentadas. De fato, em tecidos adiposo e hepático de ratos alimentados com dieta hiperlipídica a expressão da JNK está significativamente aumentada em comparação à animais magros (Ozcan et al., 2004).

1.4 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS OMEGA 3 E EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO

Sabendo-se da alta relação entre obesidade e DM2 (90% dos pacientes DM2 são obesos) e que a inflamação subclínica é o mecanismo biológico mais aceito mundialmente para explicar tal relação; o uso de anti-inflamatório poderia ser de grande valia nas intervenções terapêuticas para portadores de DM2. De fato, estudos mecanísticos prévios demonstraram que alimentos e substâncias extraídas de vegetais ou animais com potencial anti-inflamatório possui efeitos bastante promissores (Shehzad et al., 2011; LeMieux et al., 2015). Entre as

substâncias naturais mais conhecidas com potencial anti-inflamatório estão os ácidos graxos da família ômega 3. Esses ácidos graxos poliinsaturados podem ser divididos quanto a sua origem, a saber: origem vegetal (linolênico (C18:3) e origem animal (os eicosapentaenoico – EPA (C20:5) e docosahexaenóico - DHA (C22:6), sendo os dois últimos de maior atividade biológica (de Roos et al., 2009). Enquanto o ácido linolênico é o precursor do EPA e do DHA, o ácido linoléico (18:2) - ômega 6, é o principal precursor do ácido araquidônico (20:4). Descrito com esta finalidade por Dyerberg e Bang em 1979, o provável mecanismo de ação foi postulado pela capacidade que estes ácidos graxos apresentavam em inibir a conversão do ácido araquidônico (20:0) em prostaglandinas (PGE₂, PGI₂ e TXA₂), por intermédio da ciclooxigenase 2 (COX-2), as quais são as responsáveis pelas características clínicas da inflamação clínica (dor, calor, rubor e tumor). Esta hipótese foi sustentada durante quase três décadas até o surgimento das técnicas de acesso genômico, as quais proporcionaram novas compreensões sobre os mecanismos moleculares envolvidos na inflamação. Nesse ínterim, percebeu-se que tais gorduras eram capazes de atuar em pontos anteriores (do inglês, *upstream*) à COX-2.

O mecanismo pelo qual o ômega 3 exerce sua ação é através de sua ligação direta ao GPR120 (receptor acoplado a proteína G), um receptor sensível a lipídeos, altamente expresso em macrófagos (Tanaka et al., 2008) (figura 2). Em estudos realizados *in vitro* e *in vivo*, os ácidos graxos ômega 3 (especialmente o DHA) inibiram o NF- κ B através de sua ligação ao GPR120 (Tanaka et al., 2008; Oh et al., 2010). O GPR120 pode ser expresso em macrófagos e adipócitos e é capaz de se ligar a ácidos graxos de cadeia longa, como o ômega 3. Estes ácidos graxos promovem sinalização anti-inflamatória nas células através da inibição da resposta dos macrófagos às endotoxinas, efeito que envolve a manutenção do I κ B citosólico e diminuição na produção de TNF- α e IL-6 (Oh et al., 2010) (figura 3). Vários estudos vêm demonstrando os efeitos benéficos do ômega 3 no processo inflamatório (Oh et al., 2010; Flachs et al., 2011; LeMieux et al., 2015). Os ácidos graxos poliinsaturados como o EPA e DHA são encontrados nos óleos de peixes e possuem um potencial para alterar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Dessa maneira, mediante interferências na regulação gênica e no metabolismo, esses lipídeos podem desempenhar um papel modulador das reações inflamatórias sejam elas agudas ou crônicas. Estudo do nosso grupo, utilizando camundongos tratados com dieta rica em gordura saturada (do inglês – high fat diet) mostrou a capacidade desses ácidos graxos em reduzir a expressão gênica de peptídeos pró-

inflamatórios como TNF α , IL-6, iNOS (óxido nítrico sintase induzível) e outros (Cintra et al., 2012). Contudo, a maioria dos dados é de caráter observacional ou de correlação e merecem maiores investigações, principalmente seu efeito em humanos.

Por fim, a obesidade é uma doença que agrega a si uma constelação de distúrbios metabólicos como resistência à insulina e diabetes, dislipidemias e aterosclerose, hipertensão, entre outras. O excesso de massa adiposa corrobora o desenvolvimento de doenças de cunho metabólico, como as mencionadas anteriormente, e surge como base estatística para a maioria dos casos de invalidez ou afastamentos do trabalho e morte; o que resulta em perdas socioeconômicas. Diante tal cenário, e sabendo-se das determinantes ambientais sobre o surgimento dessas doenças; torna-se de grande valia explorar os efeitos dos ácidos graxos ômega 3 como intervenção não farmacológica de fácil acesso e baixo custo, de forma isolada ou como adjuvante do tratamento farmacológico. No entanto, o conhecimento científico atual sobre esse processo carece de resultados mais robustos e fidedignos acerca de tais intervenções, maiores testes em humanos e principalmente possíveis de realizar a níveis sanguíneos. No presente estudo, buscou-se contribuir com o conhecimento acerca dos efeitos terapêuticos da suplementação do ômega 3 sobre os níveis inflamatórios e de estresse de retículo em células mononucleares de pacientes com sobrepeso ou obesos e DM2.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETVO GERAL

Avaliar os efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre os níveis inflamatórios e de estresse de retículo em células mononucleares de pacientes com sobrepeso ou obesos e DM2.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre os níveis proteicos de moléculas marcadoras de inflamação, tais como NF- κ B e JNK em células mononucleares de pacientes com sobrepeso ou obesos e DM2.
- Avaliar os efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre os níveis proteicos de moléculas marcadoras de estresse de RE, tais como XBP1, pPERK e pEIF2 α em células mononucleares de pacientes com sobrepeso ou obesos e DM 2.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO

Estudo clínico, de caráter quantitativo, com temporalidade longitudinal e amostragem aleatória simples, que avaliou os efeitos da suplementação com óleo de peixe em pacientes com sobrepeso/obesos e diabéticos sobre as moléculas marcadoras de inflamação e de estresse de retículo.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Extremo Sul Catarinense, sob o parecer de número 473.654. As diferentes análises realizadas nos sujeitos foram apresentadas em três estudos diferentes; a saber: uma dissertação da aluna Daniela Roxo de Souza (Efeitos da suplementação com óleo de peixe em pacientes com sobrepeso ou obesos e DM2: avaliação de parâmetros fisiológicos e bioquímicos), um trabalho de conclusão de curso – TCC do aluno Vitor Hugo Comin (Avaliação dos efeitos da suplementação de ômega 3 sobre parâmetros de estresse oxidativo no plasma de indivíduos obesos portadores de diabetes mellitus tipo 2), e a presente dissertação.

3.3 POPULAÇÃO EM ESTUDO

Para o desenvolvimento da pesquisa os pacientes foram recrutados através dos registros das clínicas integradas da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) os quais foram indivíduos adultos com sobrepeso ou obesos e diagnosticados com DM2 há mais de um ano, que estavam catalogados e que aceitaram participar da pesquisa. O recrutamento obedeceu os critérios estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Diabetes para o diagnóstico da doença. O estudo foi realizado de acordo com os princípios da declaração de Helsinque sendo previamente submetido ao Comitê de ética da UNESC. Os voluntários foram incluídos no estudo após a assinatura do termo de consentimento livre esclarecido (Apêndice). O Protocolo baseou-se em acompanhamento clínico e nutricional (suplementação com óleo de peixe) por período de oito semanas. Todos os testes e análises utilizados no estudo foram realizados antes (pré-teste) e após o período específico

de intervenção (pós-teste). A amostra do estudo foi composta por 32 indivíduos, sendo dezoito mulheres e quatorze homens; no entanto, nem todas as bandas foram possíveis de se verificar nos géis e esse tamanho amostral, então, tornou-se variável. Dessa forma, o tamanho amostral está sendo indicado na legenda de cada figura.

3.3.1 Critérios de inclusão

Como critérios de inclusão foram utilizados os seguintes itens: homens e mulheres entre 35 e 55 anos com capacidade de fornecer o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; IMC acima de $24,9\text{kg/m}^2$; ausência de qualquer evidência de doença arterial coronariana conforme definido por qualquer um dos seguintes critérios (histórico de angina, histórico de infarto do miocárdio ou síndrome coronariana aguda); presença do diagnóstico de DM2 de acordo com os critérios estabelecidos (diagnóstico médico prévio ou glicemia de jejum ≥ 126 mg/dl ou hemoglobina glicada $\geq 6,5\%$).

3.3.2 Critérios de exclusão

Como critérios de exclusão foram utilizados os seguintes itens: glicemia de jejum superior a 350 mg/dL, uso abusivo de álcool e drogas, gravidez e lactação. Expectativa de vida menor do que 6 meses (exemplo: neoplasia maligna metastática), insuficiência renal com indicação para diálise, insuficiência cardíaca congestiva, uso de suplementos vitamínicos/alimentares, perda de peso nos últimos 3 meses (voluntária ou involuntária), participação em outro estudo experimental na data do arrolamento.

3.4 INTERVENÇÕES NUTRICIONAIS

3.4.1 Característica da intervenção

Durante o período experimental, os pacientes foram orientados a permanecerem com seus hábitos dietéticos e estilo de vida regularmente. Não foi pedido qualquer alteração alimentar aos pacientes, além da inclusão da suplementação de óleo de peixe.

3.4.2 Suplementação de óleo de peixe

Os pacientes foram suplementados durante 8 semanas. Os pacientes receberam cápsulas de óleo de peixe adequadamente acondicionadas e suficientes para metade do tratamento (quatro semanas), juntamente com material educativo acerca do uso e conservação do suplemento. Ao término das quatro semanas, os pacientes receberam as cápsulas para o restante do tratamento e as orientações de consumo foram reforçadas.

O óleo de peixe utilizado nesse estudo foi avaliado por análise cromatográfica (utilizando cromatografia à gás) para identificação do teor de nutrientes potencialmente anti-inflamatórios (Souza, 2016, p. 52), realizado no Laboratório de Genômica Nutricional (LabGeN) da Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Limeira/SP, e comparado com o laudo de controle de qualidade fornecido pelo fabricante. A dosagem diária de ômega 3 utilizada foi de 1440mg de EPA e 960mg de DHA (Nature's Bounty® - New York, EUA), totalizando 4 cápsulas ao dia (Lovegrove et al., 2004). (Figura 4).

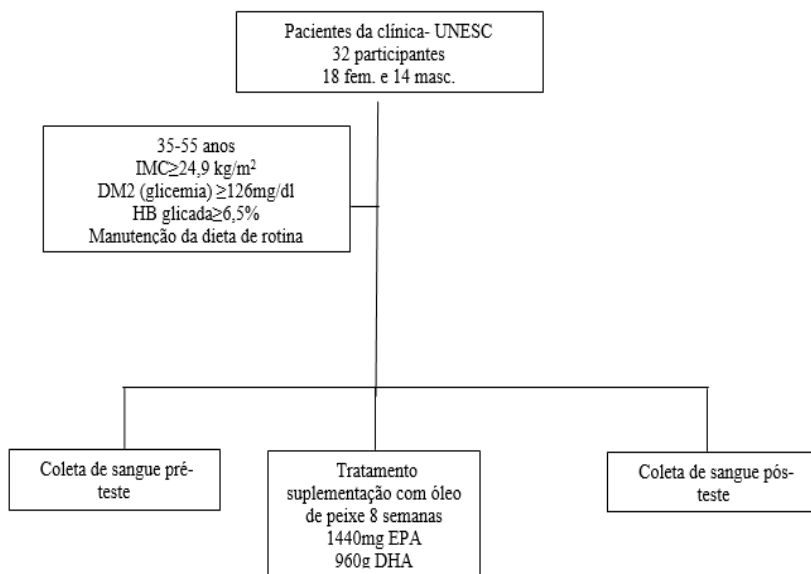


Figura 4 - Esquema do delineamento do estudo

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

3.5 ANÁLISES MOLECULARES

Os pacientes tiveram amostras de sangue periférico coletado antes e após a intervenção. As coletas foram feitas mediante jejum de 12 horas e o não consumo de álcool nas 48 horas anteriores. Para realização da análise dos níveis proteicos e de fosforilação foram adotados os seguintes procedimentos: Isolamento das células de sangue periférico, preparação do extrato proteico e aplicação em gel de poliacrilamida (Western blot).

3.5.1 Isolamento das células de sangue periférico

Foram coletados 10 mL de sangue da veia braquial em tubo contendo heparina. A seguir as amostras foram transferidas para tubos tipo Falcon de 50 mL e imediatamente centrifugadas (5804R, Eppendorf®, Hamburg, Alemanha) 1500 rpm, por 10 minutos em temperatura ambiental. Na sequência, nesse tubo falcon contendo o plasma sanguíneo foi adicionado 5 mL de solução de PBS, homogeneizado e transferido para um novo tubo falcon contendo 5 mL de Ficol. Então, nova centrifugação foi realizada a 1200 rpm por 40 minutos em temperatura ambiente. Após isso, as células mononucleares foram coletadas com o auxílio de uma pipeta pasteur. Após, verificou-se que o pellet de leucócitos estava livre de hemácias (coloração totalmente branca) e duas lavagens foram realizadas com o objetivo de eliminar possível presença de Ficol junto as células. Por fim, resgatou-se o pellet e iniciou-se o protocolo de extração proteica tradicional (conforme abaixo).

3.5.2 Análises dos níveis de proteínas e de fosforilação por Western blotting

As células mononucleares foram processadas (conforme acima) e imediatamente homogeneizados em tampão específico contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de vanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C. O homogeneizado foi então centrifugado a 11000 rpm por 30 minutos. No sobrenadante foi determinada a concentração de proteínas totais (por teste colorimétrico), utilizando-se para isso o método de Lowry, as proteínas foram ressuspensas e conservada em tampão de Laemmli, contendo 100 mmol/L de DTT e posteriormente foi realizada a determinação do imunoblot com anticorpo específico. Para isso, alíquotas contendo 250µg de proteína por amostra foram aplicadas sobre

gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da *BioRad* (Mini-Protean), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. As proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência de minigel da *Bio Rad*. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora por 2 horas, a temperatura ambiente, para diminuir as ligações protéicas inespecíficas. A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpos específicos, sob agitação constante, *overnight* e a 4°C. A seguir, as membranas foram incubadas em solução com anticorpo secundário conjugado com peroxidase, durante 2 horas à temperatura ambiente. Após, as membranas foram incubadas por dois minutos com substrato enzimático e expostas ao filme de RX em cassete de revelação. As imagens foram escaneadas (HP G2710) e a intensidade das bandas foi determinada através do programa ImageJ (National institute of Health - NIH, Estados Unidos da América). As membranas originais foram reblotadas com β -actina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) como proteína controle.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média e erro padrão da média (média \pm EPM). Os resultados obtidos com as análises pré intervenção e pós intervenção foram testados quanto a normalidade por teste de Shapiro-Wilk. Os valores médios foram comparados por teste de t student para amostras pareadas. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Conforme citado em materiais e métodos no item aspectos éticos, o presente projeto foi dividido em dois estudos que se complementam, utilizando para isso os mesmos sujeitos. Dessa forma, os dados antropométricos foram publicados na dissertação de Daniela Roxo de Souza (Souza, 2016, p. 52). Conforme dados de Souza (2016, p. 52), não foram observados alterações significativas na frequência e distribuição do IMC dos pacientes antes e após a suplementação com óleo de peixe, ou seja, pacientes suplementados por oito semanas com ômega 3 não reduzem a adiposidade corporal.

Ainda, essa autora, mostrou que após oito semanas de suplementação com óleo de peixe, não houve alterações significativas da massa corporal, IMC, percentual de gordura corporal e circunferência da cintura. O óleo de peixe utilizado neste estudo, foi avaliado quanto sua composição de ácidos graxos para certificar se o laudo fornecido pela empresa era mesmo confiável. No laudo constava que o percentual de EPA + DHA aproximava-se de 50%. Segundo as análises realizadas por pesquisadores da Universidade Estadual de Campinas, SP; (Souza, 2016, p. 52), 56,42% da composição é de EPA + DHA, sugerindo que os principais ativos estudados encontram-se em quantidades adequadas e até mesmo acima do indicado no laudo da empresa fornecedora.

O óleo de peixe vem destacando-se de longa data pela sua ação anti-inflamatória. De acordo com as análises realizadas, oito semanas de suplementação foi eficaz em reduzir significativamente os níveis proteicos de fosforilação de NF κ B (figura 5). Além disso, a suplementação com óleo de peixe também foi eficaz em reduzir os níveis proteicos de fosforilação da JNK (figura 6).

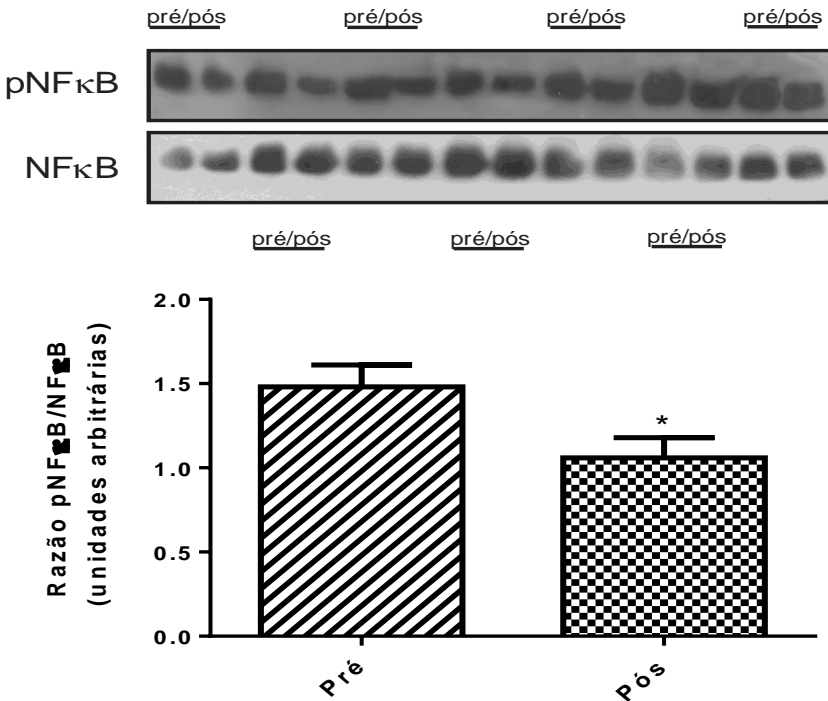


Figura 5 - Efeitos da suplementação com ômega 3 sobre os níveis proteicos de NFκB fosforilado em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com sobrepeso/obesos e DM2.

Uma coleta inicial de sangue periférico (Pré) foi realizada. As células mononucleares foram separadas e então armazenadas em ultrafreezer -80°C . Após suplementação por 8 semanas, nova coleta sanguínea foi realizada (Pós) e então ambas amostras Pré e Pós foram analisadas por Western blot. Todas as amostras foram aplicadas em gel SDS, mas somente as visualizadas compõem o tamanho amostral (anotado abaixo entre parênteses) Os resultados estão expressos como média \pm EPM. (n=18). * representa diferença estatística ($p < 0,05$) em comparação ao grupo Pré-teste. Foi utilizado o teste T de student para amostras pareadas. No painel superior constam as bandas representativas de 7 sujeitos, totalizando 14 bandas (7 pré e 7 pós) representativas. No painel inferior constam as bandas representativas da proteína NFκB não fosforilada. Cada unidade arbitrária de NFκB fosforilada de cada sujeito foi dividido pela respectiva unidade arbitrária da proteína não fosforilada tanto na análise pré quanto na análise pós para o sujeito 1; depois para o sujeito 2; e assim por diante, ou seja, as análises foram pareadas.

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

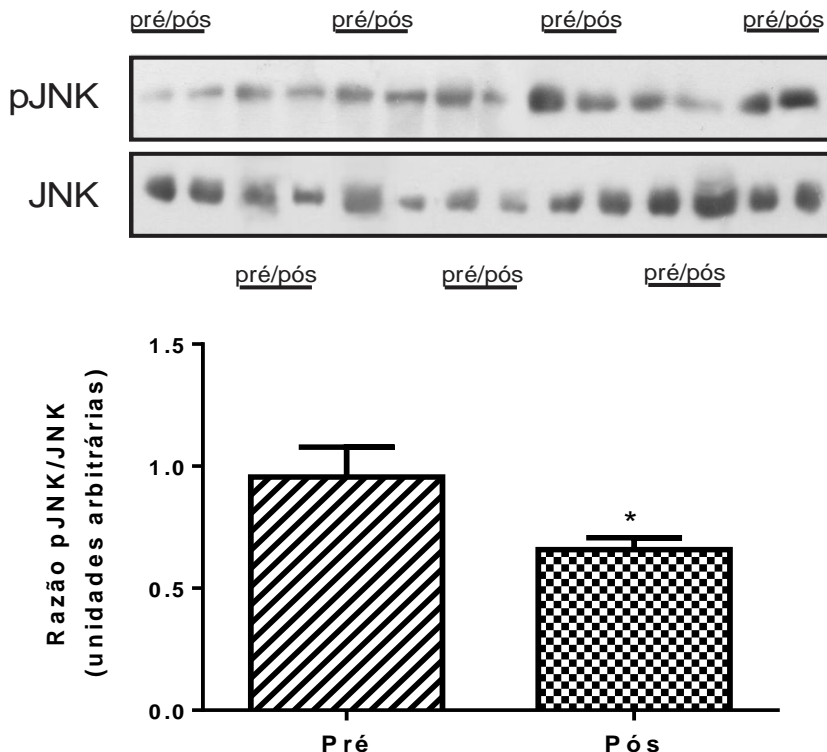


Figura 6 - Efeitos da suplementação com ômega 3 sobre os níveis proteicos de JNK fosforilado em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com sobrepeso/obesos e DM2.

Uma coleta inicial de sangue periférico (Pré) foi realizada. As células mononucleares foram separadas e então armazenadas em ultrafreezer -80°C . Após suplementação por 8 semanas, nova coleta sanguínea foi realizada (Pós) e então ambas amostras Pré e Pós foram analisadas por Western blot. Todas as amostras foram aplicadas em gel SDS, mas somente as visualizadas compõem o tamanho amostral (anotado abaixo entre parênteses). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. ($n=19$). * representa diferença estatística ($p<0,05$) em comparação ao grupo Pré-teste. Foi utilizado o teste T de student para amostras pareadas. No painel superior constam as bandas representativas de 7 sujeitos, totalizando 14 bandas (7 pré e 7 pós) representativas. No painel inferior constam as bandas representativas da proteína JNK não fosforilada. Cada unidade arbitrária de JNK fosforilada de cada sujeito foi dividida pela respectiva unidade arbitrária da proteína não fosforilada tanto na análise pré quanto na análise pós para o sujeito 1; depois para o sujeito 2; e assim por diante, ou seja, as análises foram pareadas.

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

A obesidade está estritamente associada com um quadro inflamatório crônico e essa pode levar a um situação onde as proteínas não são dobradas ou são mal dobradas, chamada de estresse de retículo endoplasmático. Como no presente estudo observou redução de NF- κ B e JNK, acreditou-se que as moléculas marcadoras de estresse de retículo endoplasmático poderiam estar reduzidas, também. Observou-se que a suplementação com óleo de peixe foi capaz de reduzir significamente as moléculas de estresse de retículo XBP1 (figura 7), pPERK (figura 8) e pEIF2 α (figura 9).

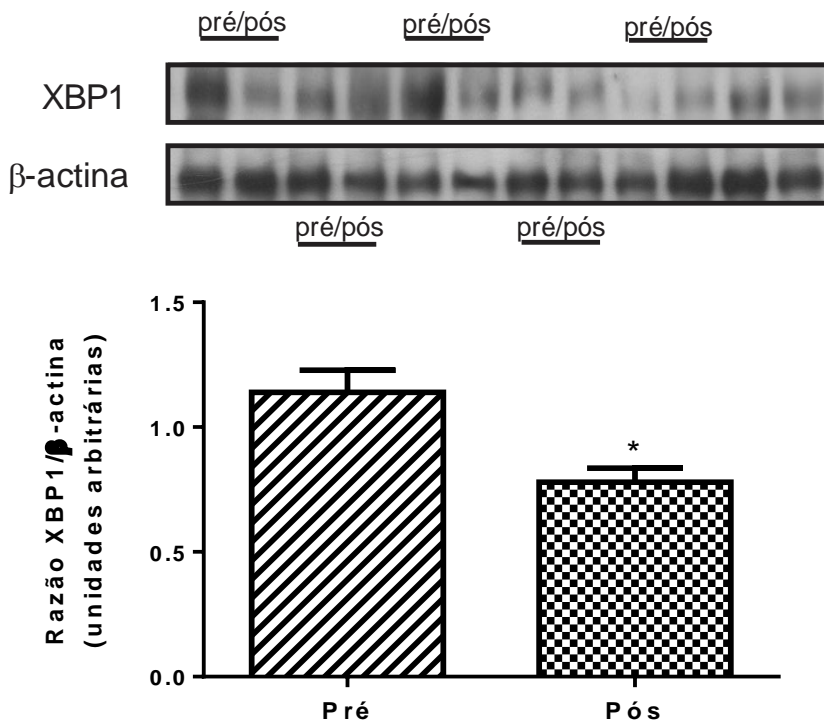


Figura 7 - Efeitos da suplementação com ômega 3 sobre os níveis proteicos de XBP1 em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com sobrepeso/obesos e DM2.

Uma coleta inicial de sangue periférico (Pré) foi realizada. As células mononucleares foram separadas e então armazenadas em ultrafreezer -80°C . Após suplementação por 8 semanas, nova coleta sanguínea foi realizada (Pós) e então ambas amostras Pré e Pós foram analisadas por Western blot. Todas as amostras foram aplicadas em gel SDS, mas somente as visualizadas compõem o tamanho amostral (anotado abaixo entre parênteses) Os resultados estão expressos como média \pm EPM. (n=13). * representa diferença estatística ($p < 0,05$) em comparação ao grupo Pré-teste. Foi utilizado o teste T de student para amostras pareadas. No painel superior constam as bandas representativas de 6 sujeitos, totalizando 12 bandas (6 pré e 6 pós) representativas. No painel inferior constam as bandas representativas da proteína β -actina. Cada unidade arbitrária de XBP1 de cada sujeito foi dividida pela respectiva unidade arbitrária da proteína β -actina tanto na análise pré quanto na análise pós para o sujeito 1; depois para o sujeito 2; e assim por diante, ou seja, as análises foram pareadas.

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

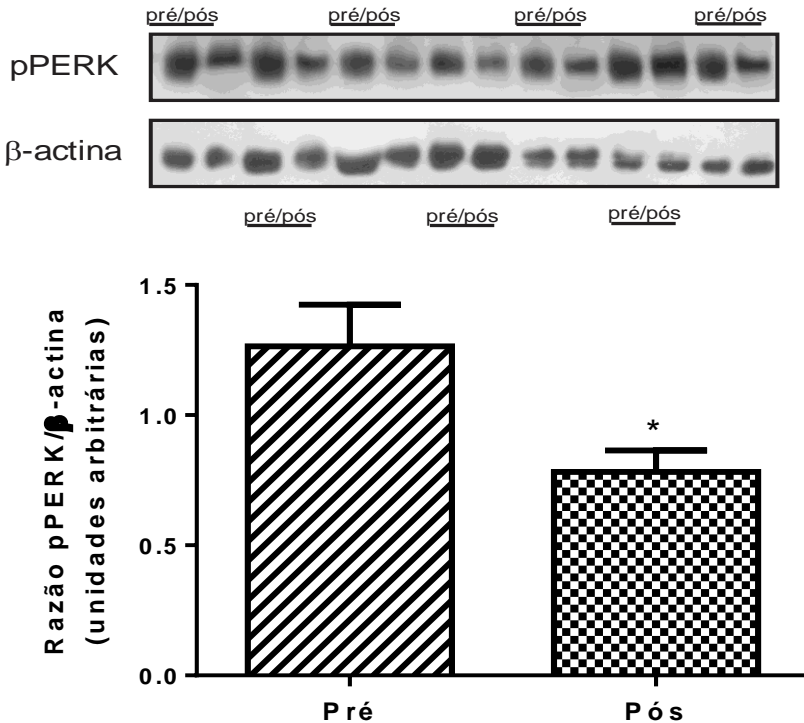


Figura 8 - Efeitos da suplementação com ômega 3 sobre os níveis proteicos de PERK fosforilado em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com sobrepeso/obesos e DM2.

Uma coleta inicial de sangue periférico (Pré) foi realizada. As células mononucleares foram separadas e então armazenadas em ultrafreezer -80°C . Após suplementação por 8 semanas, nova coleta sanguínea foi realizada (Pós) e então ambas amostras Pré e Pós foram analisadas por Western blot. Todas as amostras foram aplicadas em gel SDS, mas somente as visualizadas compõem o tamanho amostral (anotado abaixo entre parênteses). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. (n=16). * representa diferença estatística ($p < 0,05$) em comparação ao grupo Pré-teste. Foi utilizado o teste T de student para amostras pareadas. No painel superior constam as bandas representativas de 7 sujeitos, totalizando 14 bandas (7 pré e 7 pós) representativas. No painel inferior constam as bandas representativas da proteína β -actina. Cada unidade arbitrária de PERK fosforilada de cada sujeito foi dividido pela respectiva unidade arbitrária da proteína β -actina tanto na análise pré quanto na análise pós para o sujeito 1; depois para o sujeito 2; e assim por diante, ou seja, as análises foram pareadas.

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

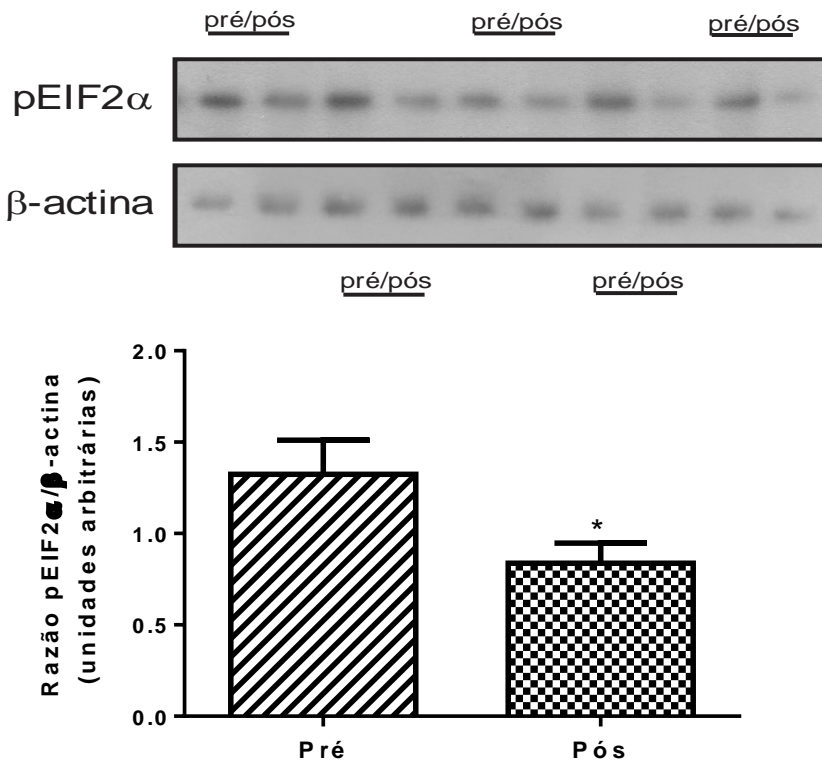


Figura 9 - Efeitos da suplementação com ômega 3 sobre os níveis proteicos de EIF2 fosforilado em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com sobrepeso/obesos e DM2.

Uma coleta inicial de sangue periférico (Pré) foi realizada. As células mononucleares foram separadas e então armazenadas em ultrafreezer -80°C . Após suplementação por 8 semanas, nova coleta sanguínea foi realizada (Pós) e então ambas amostras Pré e Pós foram analisadas por Western blot. Todas as amostras foram aplicadas em gel SDS, mas somente as visualizadas compõem o tamanho amostral (anotado abaixo entre parênteses). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. (n=11). * representa diferença estatística ($p < 0,05$) em comparação ao grupo Pré-teste. Foi utilizado o teste T de student para amostras pareadas. No painel superior constam as bandas representativas de 5 sujeitos, totalizando 10 bandas (5 pré e 5 pós) representativas. No painel inferior constam as bandas representativas da proteína β -actina. Cada unidade arbitrária de EIF2 fosforilada de cada sujeito foi dividido pela respectiva unidade arbitrária da proteína β -actina tanto na análise pré quanto na análise pós para o sujeito 1; depois para o sujeito 2; e assim por diante, ou seja, as análises foram pareadas.

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

5 DISCUSSÃO

A transição nutricional moderna transformou o cenário de fome em um quadro de pandemia de obesidade, que acomete milhões de pessoas, principalmente nos países ocidentais. Além dos diversos aspectos psicossociais, esta doença está relacionada ao aumento de morbidade e mortalidade em decorrência de sua frequente associação com diversas doenças, destacando o DM2 (Kopelman, 2000). De fato, de longa data sabe-se que 90 por cento dos pacientes com DM2 são obesos ou sobrepesos (Kopelman, 2000). O indivíduo obeso apresenta fenótipo complexo que inclui, em diferentes graus, hiperinsulinemia e hiperglicemia. Embora nem todos os mecanismos moleculares estejam completamente elucidados, é consenso que o elo entre obesidade e DM2 é a resistência a insulina. A resistência à insulina é definida como reduzida eficiência da insulina em desempenhar suas ações fisiológicas. Também, é aceito que a via inflamatória, mais especificamente a exacerbação dela, é o mecanismo responsável pela instalação e progressão da resistência a insulina (Colditz et al., 1995; Dandona et al., 2004; Waki, 2007).

A ingestão elevada de gordura saturada e/ou adiposidade corporal em excesso determina os maiores níveis da inflamação crônica de baixo grau ou subclínica (Dandona et al., 2004). Também, nas últimas décadas o estresse de retículo vem emergindo como uma ligação entre a inflamação e a resistência a insulina (*para revisão ver* Hotamisligil, 2006). Apesar dos avanços das pesquisas nessa área, o conhecimento permanece limitado. Sabendo-se da alta relação entre obesidade e DM2 e que a inflamação subclínica é o mecanismo molecular mais aceito mundialmente para explicar tal relação; o uso de anti-inflamatório poderia ser de grande valia nas intervenções terapêuticas. De fato, estudos mecanísticos prévios demonstraram que alimentos e substâncias extraídas de vegetais ou animais com potencial anti-inflamatório possui efeitos bastante promissores (Shehzad et al., 2011; LeMieux et al., 2015). Com base nesse conhecimento, o presente estudo buscou avaliar o potencial anti-inflamatório do ômega 3 em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com sobrepeso e obesos e DM 2. Observou-se que a suplementação com ômega 3 por 8 semanas reduziu os níveis proteicos das principais proteínas marcadoras de inflamação e de estresse de retículo endoplasmático. O consumo de alimentos que contém ácido graxos poli-insaturados ômega 3 a partir do óleo de peixe é amplamente recomendado para reduzir inflamação e doenças crônicas

associadas (Fenton et al., 2013). No entanto, a ingestão de peixe permanece muito baixa de acordo com estudos realizados nos Estados Unidos (Lowther, 2012) e no Brasil (Sartori e Amancio, 2012), e consequentemente, a ingestão de EPA e DHA torna-se deficiente. De acordo com esses dados, a suplementação tem sido uma importante alternativa para aumentar o consumo de EPA e DHA pela população.

A obesidade foi apontada como uma condição de inflamação crônica de baixo grau no início da década de 1990, quando foi constatado o aumento da expressão do gene que codifica para a citocina TNF α , no tecido adiposo (Hotamisligil et al., 1993). Em indivíduos obesos, o tecido adiposo aumenta a capacidade de síntese de moléculas com ação pró-inflamatória (Heber, 2010; Emanuela et al., 2012; Tateya et al., 2013). Diversos mecanismos inflamatórios podem estar envolvidos na patogênese da resistência à insulina nos tecidos periféricos. É consenso que alguns dos mecanismos moleculares envolvem alterações na ação de moléculas chaves da via inflamatória JNK e NF κ B (Shoelson et al., 2003). No presente estudo pôde-se observar que, em células mononucleares de sangue periférico de pacientes sobrepeso/obesos com diabetes do tipo 2, a fosforilação tanto de NF κ B quanto da JNK foram reduzidas após suplementação com ômega 3, permitindo concluir um efeito anti-inflamatório desse ácido graxo poliinsaturado. Em adição, estudo de Souza (2016, p. 52) mostrou que níveis séricos de TNF α , IL-1 β e IL-6 de 32 pacientes sobrepeso/obesos DM2 suplementados com ômega 3 por 8 semanas reduziu significativamente. Os ácidos graxos ômega 3 parecem ter importante ação anti-inflamatória. Diversos estudos corroboram com os resultados do presente estudo, apontando que a suplementação com ômega 3 é capaz de reduzir significativamente as citocinas TNF α (Ferrucci et al., 2006; Dangardt et al., 2010), IL-1 β (Dangardt et al., 2010; Al-Safi et al., 2016) e IL-6 (Ferrucci et al., 2006; Itariu et al., 2012). Conforme já citado, o estudo de Souza (2016, p. 52) observou redução dos níveis séricos de citocinas pro-inflamatórias, como também melhora da sensibilidade à insulina (comprovada pelo HOMA-IR) em pacientes sobrepeso/obesos DM2 suplementados com ômega 3 por 8 semanas; no entanto, como no presente estudo, essa autora também não investigou o mecanismo molecular pelo qual o ômega 3 reduz inflamação; mas o mais aceito tem sido defendido por Oh e colegas (2010). No entanto, parece que os receptores GPR120 estão envolvidos nesse processo.

Um importante trabalho desenvolvido por Oh *et al.*, (2010) demonstrou que em células estimuladas com LPS bacteriano e posteriormente tratadas com ω 3, o receptor GPR120 ativa-se e recruta

para si, justaposto à membrana celular, a proteína β -arrestina-2 (Oh et al., 2010). Esta proteína, ao deixar o citoplasma em direção à membrana, se agrega e traz consigo as proteínas TAB-1, 2 e 3, às quais estavam anteriormente presentes na cascata inflamatória, associadas à TAK-1. Com a TAK-1 desagregada das proteínas TAB, ocorre interrupção do processo inflamatório. O trabalho de Oh e colegas (2010) demonstrou desta forma que o estado inflamatório periférico foi melhorado e, além disso, pode ter repercutido positivamente na resistência à insulina, já que proteínas inflamatórias com atividade de serina-quinases prejudicam a transdução do sinal de insulina. No entanto, Oh e seus colaboradores demonstraram um mecanismo paralelo, relativo à melhora da resistência à insulina, de forma independente da resolução da inflamação (Oh et al., 2010).

Estudo de Souza (2016) mostrou que suplementação com ômega 3, por oito semanas, em sujeitos com sobrepeso/obesos com DM2 reduz significativamente os níveis de ácidos graxos plasmáticos. Ácidos graxos ω 3 reduzem a deposição de ácidos graxos livres, oriundos do tecido adiposo, em células musculares, além de reverterem a resistência à insulina nessas células, melhorando a captação de glicose no organismo (Lam et al., 2011). De forma semelhante, animais e humanos tratados com ω 3 apresentaram melhora na síntese hepática de glicogênio, bem como aumento na taxa de oxidação de triacilgliceróis presentes no parênquima hepático em decorrência do consumo de dietas ricas em gordura saturada (Pachikian et al., 2011). O mecanismo proposto para a conquista de tais benefícios está em torno da modulação da expressão de genes lipogênicos como o fator de transcrição SREBP-1c (Pachikian et al., 2011). Contudo, é bastante pertinente o fato de que esta melhora seja mera repercussão da redução do estado inflamatório local, após o tratamento com ω 3, sendo o receptor GPR120 a via de acesso para esta sinalização. Também, a capacidade imunomodulatória, bastante reconhecida, desses ácidos graxos deve-se à capacidade que o ômega 3 possui em reduzir tanto a maturação de células dendríticas, mantendo o fenótipo de células imaturas (Kong et al., 2011), quanto capacidade em reduzir a migração de células do tipo Th1 e na modulação de células T regulatórias CD4, as quais atenuam o processo inflamatório Yessoufou et al., 2009).

Uma vez observado que o óleo de peixe foi eficaz em reduzir as citocinas pró-inflamatórias, foi avaliado se essa suplementação poderia, também, melhorar o estresse de retículo endoplasmático nos pacientes com excesso de peso e diabéticos. Um outro mecanismo relacionado tanto a resistência a insulina quanto a inflamação é o estresse de retículo

endoplasmático. Obesidade induz estresse de RE, e este, por sua vez, desempenha um papel central no desenvolvimento da resistência à insulina e diabetes (Ozcan et al., 2004). O estado de fosforilação da PERK e eIF2 α é, portanto, um indicador-chave da presença de estresse de RE. No presente estudo, observou-se redução de 36,3 por cento (33,6%) nos níveis proteicos de fosforilação da eIF2 α . Até o momento, diversas pesquisas apontam a PERK como uma quinase que, em caso de estresse de RE, sofre autofosforilação, oligomerização e ativação, promovendo a fosforilação da subunidade alfa do eIF2, resultando na ativação do fator de transcrição ATF4. Diante do exposto, é de claro entendimento que a PERK passou a ser alvo de estudos na obesidade e DM2. No presente estudo, observou-se redução de 38 por cento (38%) nos níveis proteicos da fosforilação da PERK. Assim, o presente estudo demonstraram que o ômega 3 foi capaz de reduzir o quadro de estresse de RE em células mononucleares, verificado por meio das análises moleculares de PERK e eIF2 α que se apresentaram significativamente reduzidas após suplementação com o ômega 3.

Acúmulo de proteína mal dobradas dentro do lumen desencadeia UPR. Existem, pelo menos, três principais sensores de estresse na membrana do RE: IRE1, PERK e ATF6. Em células com estresse do RE, IRE1 é autofosforilada, levando a ativação de seu domínio endoribonuclease. Esta atividade medeia o processamento do mRNA codificador para XBP1, que é um fator de transcrição que regula positivamente a expressão de muitos genes essenciais envolvidos no restabelecimento do processo de enovelamento e degradação de proteínas mal enoveladas (ERAD), além de regular a biogênese do RE/Golgi. No presente estudo observou-se redução nos níveis proteicos de XBP1 em 30,9 por cento (30,9%) após suplementação com ômega 3. Esses dados sugerem uma redução na ocorrência de proteínas não dobradas ou mal dobradas, uma vez que a XBP1 tem importante função controlar genes que irão tentar restabelecer o processo ERAD; no entanto, como o processo melhorou e muito com o uso do ômega 3, pode-se observar redução os níveis dessa proteína. Esse redução nos níveis proteicos de XBP1 sugere, também, menores níveis de IRE1, importante marcadora de estresse RE. Os resultados do presente estudo mostra que tanto a via de defesa UPR PERK quanto a via IRE1 são reduzidas com a suplementação de ômega 3, sugerindo menor estresse de retículo endoplasmático. Notavelmente, está claro que a inflamação per se pode prejudicar a função do RE. Em camundongos obesos geneticamente, o aumento na produção de óxido nítrico leva a modificações pós-tradução dos componentes de UPR, como a IRE-1, o

que reduz sua capacidade de clivar o RNA mensageiro do XBP1. Em geral, a ativação do XBP-1 é importante para a homeostase metabólica no fígado, entretanto isto tem sido reportado que a falta de XBP-1 no fígado pode também ser protetivo contra resistência à insulina (Ozcan et al., 2004).

A compreensão das funções da PERK e eIF2 α são fundamentais para o planejamento de novas formas de tratamento dessas doenças. A diminuição do estresse de RE (presente estudo) ocorreu de forma paralela a maior sensibilidade à insulina (Souza, 2016, p. 52). Embora o presente estudo não comprove a ação direta da via PERK sobre a sinalização insulínica, muitos trabalhos na literatura têm observado esse desfecho (Wellen e Hotamisligil, 2005). Demonstrou-se que o estresse de retículo, induzido pela obesidade, está associado à inflamação, por meio da sinalização da JNK e IKK (Hotamisligil et al., 2008). A exacerbação do quadro inflamatório e do estresse de RE vem sendo considerada um evento crucial nas alterações da via da insulina em obesos. Ozcan e colaboradores (2004) descreveram que a obesidade está relacionada a indução de estresse de RE crônico, predominantemente no fígado e tecido adiposo. Jiang e colaboradores (2003) mostraram que, durante o estresse de RE, a fosforilação da subunidade alfa do eIF2 por PERK é necessária para ativação do NF κ B. Além disso, trabalhos recentes sugerem que a ativação da via inflamatória é decorrente do estresse de RE, assim como a inflamação induz o estresse de RE – de maneira vice e versa (Urano et al., 2000; Ozcan et al., 2004). No presente estudo observou-se redução similar nas fosforilação da JNK (30,5%) e NF κ B (29%).

Apesar de nenhum estudo da literatura ter mostrado ação direta do ômega 3 sobre as moléculas marcadoras de estresse de retículo, não pode-se descartar essa possibilidade. No entanto, acredita-se que as reduções nos níveis proteicos das moléculas marcadoras de estresse de retículo no presente estudo pode estar relacionando a redução da inflamação, como observado através de menores níveis de JNK (30,5%) e NF κ B (29%). Estes resultados confirmam a hipótese e demonstram que a via inflamatória e o estresse de RE ativados pela obesidade podem ser reduzidos pelo ômega 3 e pode ser uma ótima estratégia não farmacológica para reversão da resistência à insulina. Dessa forma, classificamos estresse de RE como um importante alvo terapêutico para manipulação por meio de nutrientes.

Estudo muito interessante realizado recentemente por Miranda (2017) investigou os efeitos do ômega 3 sobre as algumas proteínas marcadoras de estresse de retículo. A tese de doutorado desse autor avaliou os

efeitos da suplementação do ácido alfa-linolênico (ALA, um n-3 PUFA) no estresse do retículo endoplasmático e no estado inflamatório no tecido adiposo subcutâneo abdominal em pacientes com DM2. Foi conduzido um estudo duplo-cego, prospectivo, placebo-controlado com vinte pacientes com DM2 que foram suplementados com 3g/dia de ALA ou placebo durante 60 dias. O tecido adiposo foi coletado através de punção aspirativa por agulha fina do abdome antes e após a suplementação e os genes e proteínas foram avaliados através de PCR em tempo real e western blot. Foi encontrada, após suplementação, uma redução da expressão gênica do XBP1 (20%), sXBP1 (70%) e aumento da expressão gênica do GRP78 (150%), confirmado na expressão proteica. Além disso, foi encontrado aumento da expressão gênica da adiponectina (90%) e redução da expressão gênica do IL-6 (80%) e IRS-1 (60%), sem correlação com a expressão proteica, no tempo pós-suplementação com ALA. Esse estudo mostrou que o ALA pode modular o estresse de RE através da via da IRE1/XBP, levando ao aumento das chaperonas (BIP/GRP78), além de um efeito adicional na expressão gênica da adiponectina, IL-6 e IRS-1, o que pode demonstrar um potencial terapêutico do ALA em pacientes com DM2 (Rodrigues de Holanda Miranda, 2017).

Um outro interessante estudo sobre o assunto foi o realizado por Gonçalves (2014) durante sua dissertação de mestrado. Essa autora demonstrou que a suplementação com ALA reduz a resistência à insulina e a inflamação em modelo animal de obesidade. Foram divididos 40 camundongos machos (C57/BL6) em 4 grupos: controle (C), controle + ômega 3/ALA (CW), obesos (O) e obesos + ômega 3/ALA (OW). Por um período de oito semanas, os grupos O e OW receberam uma dieta hiperlipídica com 60% de lipídeos, enquanto o C e CW receberam ração padrão. Depois, os grupos CW e OW receberam suplementação de 10% de ômega 3/ALA liofilizado, extraído de semente de linhaça, diariamente, por mais 8 semanas. Observou-se uma diminuição na resistência insulínica nos animais obesos e ômega 3 comparado ao grupo obesos. A avaliação da ativação do estresse do retículo endoplasmático mostrou que as proteína BIP, a chaperona HSP70, CHOP e XBP-1 tiveram aumento importante nos grupo suplementados com ômega 3 (controle com ômega 3 e obeso com ômega 3). A autora conclui que a suplementação de ômega 3/ALA mostrou ser eficaz na redução de resistência insulínica, diminuição do processo inflamatório, e redução da ativação do estresse do retículo endoplasmático em tecido hepático de camundongos.

No presente estudo não se avaliou melhoras na sensibilidade à insulina, mas baseado nos estudo de Souza (2016, p. 52) acredita-se que uma melhora possa ter ocorrido. Em adição estudo realizado com pacientes diabéticos demonstrou que a suplementação com ômega 3 foi eficaz em melhorar a sensibilidade à insulina, através de resultados significativos do HOMA IR (Avaliação de modelo de homeostase de resistência à insulina) e do QUICKI (Índice quantitativo de verificação da sensibilidade à insulina) (Farsi et al., 2014). Derosa et al. (2016) suplementou pacientes intolerantes à glicose com 3g/dia de ômega 3 e observou melhora significativa na glicemia de jejum e no HOMA IR, o mesmo resultado foi observado quando pacientes com sobrepeso e diabéticos foram suplementados por 12 semanas (Sarbolouki et al., 2013).

Estudos têm apontado que os principais efeitos da suplementação de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 em relação a melhora no controle glicêmico é eficaz antes dos pacientes desenvolverem o diabetes mellitus tipo 2, sendo uma importante alternativa para retardar ou prevenir tal doença (Muley et al., 2014; Chen et al., 2015; Derosa et al., 2016). Os resultados do presente estudo sugerem que o óleo de peixe é muito eficiente na redução da inflamação crônica de baixo grau relacionada a obesidade, e que a ação do ômega 3 reduz também os níveis de estresse de retículo endoplasmático em células mononucleares de pacientes sobrepeso/obesos e DM2

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a suplementação por oito semanas com ácidos graxos poli-insaturados ômega 3, na dosagem de 2,4 gramas por dia, foi eficaz em reduzir os níveis proteicos de moléculas marcadoras de inflamação e de estresse de retículo endoplasmático em pacientes com sobrepeso/obesos e DM2.

REFERÊNCIAS

- Al-Safi ZA, Liu H, Carlson NE, Chosich J, Harris M, Bradford AP, Robledo C, Eckel RH, Polotsky AJ. Omega-3 Fatty Acid Supplementation Lowers Serum FSH in Normal Weight But Not Obese Women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(1):324-33.
- Boden G, Duan X, Homko C, Molina EJ, Song W, Perez O, Cheung P, Merali S. Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes.* 2008;57:2438-44.
- Bradley JR, Pober JS. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene.* 2001; 20(44):6482-91.
- Calton M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature.* 2002;415:92-6.
- Carnethon MR, Sternfeld B, Schreiner PJ, Jacobs DR, Lewis CE, Liu K et al. Association of 20 year changes in cardiorespiratory fitness with incident type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2009;32:1284-8.
- Chen C, Yu X, Shao S. Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation on Glucose Control and Lipid Levels in Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015;10(10):e0139565.
- Chen X, Shen J, Prywes R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem.* 2002;277:13045-52.
- Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, Pauli JR, Morari J, Souza CT, Grimaldi R, Stahl M, Carvalheira JB, Saad MJ, Velloso LA. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One.* 2012;7(1):30571.
- Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A, Manson JE. Weight gain as risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Annu Intern Med.* 1995;122:481-6.

Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *TRENDS immunol.* 2004;25:4-7.

Dangardt F, Osika W, Chen Y, Nilsson U, Gan LM, Gronowitz E, Strandvik B, Friberg P. Omega-3 fatty acid supplementation improves vascular function and reduces inflammation in obese adolescents. *Atherosclerosis.* 2010;212(2):580-5.

de Roos B, Mavrommatis Y, Brouwer IA. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids: new insights into mechanisms relating to inflammation and coronary heart disease. *Br J Pharmacol.* 2009;158(2):413-28.

Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell.* 2000;103(2): 351-61.

Derosa G, Cicero AF, D'Angelo A, Borghi C, Maffioli P. Effects of n-3 pufas on fasting plasma glucose and insulin resistance in patients with impaired fasting glucose or impaired glucose tolerance. *Biofactors.* 2016;42(3):316-22.

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

Dyerberg J, Bang HO. Lipid metabolism, atherogenesis, and haemostasis in Eskimos: the role of the prostaglandin-3 family. *Haemostasis.* 1979; 8(3-5):227-33.

Emanuela F, Grazia M, Marco de R, Maria Paola L, Giorgio F, Marco B. Inflammation as a Link between Obesity and Metabolic Syndrome. *J Nutr Metab.* 2012;2012:476380.

Ezzati, M. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19,2 million participants. *Lancet.* 2016;387:1377-96.

Farsi PF, Djazayeri A, Eshraghian MR, Koohdani F, Saboor-Yaraghi AA, Derakhshanian H, Zarei M, Javanbakht MH, Djalali M. Effects of supplementation with omega-3 on insulin sensitivity and non-esterified free fatty acid (NEFA) in type 2 diabetic patients. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014;58(4):335-40.

Fenton JI, Hord NG, Ghosh S, Gurzell EA. Immunomodulation by dietary long chain omega-3 fatty acids and the potential for adverse health outcomes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2013;89(6):379-90.

Ferrucci L, Cherubini A, Bandinelli S, Bartali B, Corsi A, Lauretani F, Martin A, Andres-Lacueva C, Senin U, Guralnik JM. Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(2):439-46.

Flachs P, Ruhl R, Hensler M, Janovska P, Zouhar P, Kus V, Macek Jilkova Z, Papp E, Kuda O, Svobodova M, Rossmeisl M, Tsenov G, Mohamed-Ali V, Kopecky J. Synergistic induction of lipid catabolism and anti-inflammatory lipids in white fat of dietary obese mice in response to calorie restriction and n-3 fatty acids. *Diabetologia.* 2011;54(10):2626-38.

Ford ES, Williamson DF, Liu S. Weight change and diabetes incidence: findings from a national cohort of US adults. *Am J Epidemiol.* 1997;146:214-222.

Fretts AM, Howard BV, Kriska AM, Smith NL, Lumley T, Lee ET, Russell M, Siscovick D. Physical activity and incident diabetes in American Indians: the Strong Heart Study. *Am J Epidemiol.* 2009;170:632-9.

Gonçalves, NB. Efeitos do ácido alfa linolênico em modelo animal de resistência insulínica. 2014, Ribeirão Preto, SP, p. 90.

Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:415-45.

Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome report of the National Heart, Lung, and Blood

Institute/American Heart Association Conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004; 109:433-8.

Heber D. An integrative view of obesity. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(1):280S-283S.

Hill JO. Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. *Endocr Rev*. 2006;27: 750-61.

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002; 420(6913):333-6.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993; 259(5091):87-91.

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

Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG, Willett WC. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med*. 2001;345:790-7.

Itariu BK, 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.

Khunti K, Stone MA, Bankart J, et al. Physical activity and sedentary behaviours of South Asian and white European children in inner city secondary schools in the UK. *Fam Pract* 2007; 24: 237-44.

Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med*. 2002;346: 393-403.

Kong W, Yen JH, Ganea D. Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation, inhibits antigen-specific Th1/Th17 differentiation and

suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun.* 2011; 25(5):872-82.

Laaksonen DE, Lindström J, Lakka TA, Eriksson JG, Niskanen L, Wikström K, Aunola S, Keinänen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Valle TT, Ilanne-Parikka P, Louheranta A, Hämäläinen H, Rastas M, Salminen V, Cepaitis Z, Hakumäki M, Kaikkonen H, Härkönen P, Sundvall J, Tuomilehto J, Uusitupa M. Finnish diabetes prevention study. Physical activity in the prevention of type 2 diabetes: the Finnish diabetes prevention study. *Diabetes.* 2005;54:158-65.

Lam YY, Hatzinikolas G, Weir JM, Janovská A, McAinch AJ, Game P, Meikle PJ, Wittert GA. Insulin-stimulated glucose uptake and pathways regulating energy metabolism in skeletal muscle cells: the effects of subcutaneous and visceral fat, and long-chain saturated, n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1811(7-8):468-75.

Leão TL. Indução do estresse do retículo endoplasmático celular pelo *vaccinia virus*: modulação da via upr durante a infecção viral. Belo Horizonte, MG, 2013, p. 93.

LeMieux MJ, Kalupahana NS, Scoggin S, Moustaid-Moussa N. Eicosapentaenoic acid reduces adipocyte hypertrophy and inflammation in diet-induced obese mice in an adiposity-independent manner. *J Nutr.* 2015;145(3):411-7.

Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araújo EP, Vassallo J, Curi R, Velloso LA, Saad MJ. *Diabetes.* 2007; 56(8):1986-98.

Lovegrove JA, Lovegrove SS, Lesauvage SV, Brady LM, Saini N, Minihane AM, Williams CM. Moderate fish-oil supplementation reverses low-platelet, long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid status and reduces plasma triacylglycerol concentrations in British Indo-Asians. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(6):974-82.

Lowther A. Fisheries of the United States 2011. National Oceanic and Atmospheric Organization, Silver Spring, MD, 2012.

Ma Y, Brewer JW, Diehl JA, Hendershot LM. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol.* 2002;318:1351-65.

Meigs JB. Epidemiology of type 2 diabetes and cardiovascular disease: translation from population to prevention: the Kelly West award lecture 2009. *Diabetes Care.* 2010; 33(8):1865-71.

Miranda WRH. Efeitos da suplementação do ácido alfa-linolênico no estresse do retículo endoplasmático em tecido adiposo subcutâneo abdominal de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2. 2017, Ribeirão Preto, SP, p. 85.

Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2003. *JAMA.* 2003; 289:76-9.

Muley A, Muley P, Shah M. ALA, fatty fish or marine n-3 fatty acids for preventing DM?: a systematic review and meta-analysis. *Curr Diabetes Rev.* 2014;10(3):158-65.

Nakamura T, Furuhashi M, Li P, Cao H, Tuncman G, Sonenberg N, Gorgun CZ, Hotamisligil GS. Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. *Cell.* 2010;140:338-48.

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet.* 2016; 387(10026):1377-96.

Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM, Olefsky JM. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell.* 2010;142(5):687-98.

Organização Mundial de Saúde (OMS). Technical report series 894: Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Genebra, 2000. (s.n.)

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee A-H, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH & Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004;306:457-461.

Pachikian BD, Essaghir A, Demoulin JB, Neyrinck AM, Catry E, De Backer FC, Dejeans N, Dewulf EM, Sohet FM, Portois L, Deldicque L, Molendi-Coste O, Leclercq IA, Francaux M, Carpentier YA, Fougere F, Muccioli GG, Cani PD, Delzenne NM. Hepatic n-3 polyunsaturated fatty acid depletion promotes steatosis and insulin resistance in mice: genomic analysis of cellular targets. *PLoS One*. 2011;6(8):e23365.

Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:519-29.

Sarbolouki S, Javanbakht MH, Derakhshanian H, Hosseinzadeh P, Zareei M, Hashemi SB, Dorosty AR, Eshraghian MR, Djalali M. Eicosapentaenoic acid improves insulin sensitivity and blood sugar in overweight type 2 diabetes mellitus patients: a double-blind randomised clinical trial. *Singapore Med J*. 2013;54(7):387-90.

Sartori AGO; Amancio RD. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. *Segurança Alimentar e Nutricional*. 2012;19(2):83-93.

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

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

Shehzad A, Ha T, Subhan F, LeeYS. New mechanisms and the anti-inflammatory role of curcumin in obesity and obesity-related metabolic diseases. *Eur J Nutr.* 2011;50(3):151-61.

Shi CS, Kehrl JH. TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced autophagy. *Sci Signal.* 2010; 3(123):ra42. doi: 10.1126/scisignal.2000751.

Shi CS, Kehrl JH. TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced autophagy. *Sci Signal.* 2010;3(123):ra42.

Shibuya H, Yamaguchi K, Shirakabe K, Tonegawa A, Gotoh Y, Ueno N, Irie K, Nishida E, Matsumoto K. TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science.* 1996; 272(5265):1179-82.

Shoelson SE, Lee J & Yuan M. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27:S49 -S52.

Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC). I Diretriz de prevenção da aterosclerose na infância e adolescência. *Arq Bras Cardiol.* 2005(sup6):85.

Souza DR. Efeitos da suplementação com óleo de peixe em pacientes com sobrepeso ou obesos e DM2: avaliação de parâmetros fisiológicos e bioquímicos. 2016, Cuiúma, SC, p. 52.

Stein C, Colditz G. The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(6):2522-5.

Takeda K, Kaisho T, Akira S Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21:335-76.

Tanaka T, Katsuma S, Adachi T, Koshimizu TA, Hirasawa A, Tsujimoto G. Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2008;377(4-6):523-7.

Tateya S, Kim F, Tamori Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol.* 2013;4:1-14.

Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(10):772-83.

Tuncman G, Hirosumi J, Solinas G, Chang L, Karin M, Hotamisligil, GS. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(28):10741-6.

Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science.* 2000;287:664-6.

Verma G, Datta M. IL-1beta induces ER stress in a JNK dependent manner that determines cell death in human pancreatic epithelial MIA PaCa-2 cells. *Apoptosis.* 2010; 15(7):864-76.

Waki H, Tontonoz P. Endocrine functions of adipose tissue. *Annu Rev PatholMech Dis.* 2007;2:31-56.

Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature.* 2001; 412(6844):346-51.

Wellen KE & Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005;5:1111-1119.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004; 27(5):1047-53.

Yessoufou A, Plé A, Moutairou K, Hichami A, Khan NA. Docosahexaenoic acid reduces suppressive and migratory functions of CD4+CD25+ regulatory T-cells. *J Lipid Res.* 2009;50(12):2377-88.

APÊNDICE

APÊNDICE A - TCLE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (a) Sr (a) está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada:

“EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE EM PACIENTES COM SOBREPESO OU OBESOS E DIABÉTICOS TIPO 2: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS”, que tem como objetivo: Avaliar os efeitos da suplementação com óleo de peixe em pacientes com sobrepeso/obesos e diabéticos sobre os parâmetros lipídicos, glicêmicos, insulinêmicos, antropométricos e inflamatórios.

Mesmo aceitando participar do estudo, poderá desistir a qualquer momento, bastando para isso informar sua decisão aos responsáveis. Fica esclarecido ainda que, por ser uma participação voluntária e sem interesse financeiro, o (a) senhor (a) não terá direito a nenhuma remuneração. Declaramos que todos os riscos e eventuais prejuízos foram devidamente esclarecidos. Os dados referentes à sua pessoa serão sigilosos e privados, preceitos estes assegurados pela **Resolução nº 466/2012 do CNS - Conselho Nacional de Saúde**, podendo o (a) senhor (a) solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação dos dados obtidos a partir desta.

Procedimentos detalhados que serão utilizados na pesquisa

Serão realizadas medidas antropométricas, bioimpedância, teste de glicemia capilar, coleta sanguínea e aplicação de questionário (de frequência alimentar). Suplementação com cápsulas de ômega 3.

Benefícios: Possível melhora no perfil lipídico e glicêmico.

A coleta de dados será realizada pela mestrandia Daniela Roxo de Souza (fone: xxxxxxxx) aluna do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da UNESC e orientada pelo professor Claudio Teodoro de Souza (fone: xxxxxxxx). O telefone do **Comitê de Ética é (48) 3431.2723**.

Criciúma (SC) ____ de março de 2016.

Participante:
CPF:

Pesquisador Responsável:
CPF:

ANEXO

ANEXO A – PARECER CEP

UNIVERSIDADE DO EXTREMO
SUL CATARINENSE - UNESC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análises séricas e moleculares de uma intervenção duplo-cego e randomizada em pacientes obesos e diabéticos tipo 2 tratados com ômega 3 em associação com treinamento físico intermitente de alta intensidade

Pesquisador: claudio teodoro de souza

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 24535413.1.0000.0119

Instituição Proponente: Universidade do Extremo Sul Catarinense

Patrocinador Principal: Universidade do Extremo Sul Catarinense

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 473.654

Data da Relatoria: 28/11/2013

Apresentação do Projeto:

Estudo prospectivo, do tipo ensaio clínico que pretende avaliar os efeitos de uma intervenção duplo-cego e randomizada em pacientes obesos e portadores de DM2 tratados com ômega 3 em associação com treinamento físico intervalado de alta intensidade sobre os parâmetros lipêmicos, glicêmicos, insulinêmicos, antropométricos, inflamatórios e moleculares. Espera-se não somente demonstrar os efeitos benéficos de tais intervenções sobre marcadores séricos clássicos (por exemplo, melhor controle glicêmico, melhora do perfil lipídico e sensibilidade à insulina), como também, apontar as alterações moleculares associadas a isso (por exemplo, redução das proteínas pró-inflamatórias e melhora do funcionamento do retículo endoplasmático) em células de sangue periférico. Serão avaliados 58 indivíduos adultos com sobrepeso e diabéticos na faixa etária de 35 a 55 anos, do gênero masculino e feminino, recrutados nas clínicas integradas da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, com diagnóstico de DM tipo 2 a pelo menos 1 ano.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar os efeitos de uma intervenção duplo-cego e randomizada em pacientes obesos e DM2 tratados com ômega 3 em associação com treinamento físico intervalado de alta intensidade sobre os parâmetros lipídicos, glicêmicos, insulinêmicos, antropométricos, inflamatórios e moleculares.

Endereço: Avenida Universidade, 1105

Bairro: Universidade

CEP: 88.206-000

UF: SC Município: CRICIUMA

Telefone: (48)3431-2123

Fax: (48)3431-2150

E-mail: cep@unesccet.cep-unesccet.unesccet.br

Continuação do Protocolo: 473264

Avaliar os efeitos do ômega 3 em associação com treinamento físico intervalado de alta intensidade sobre medidas antropométricas e de composição corporal (altura, peso, obesidade geral;

IMC, obesidade visceral, ultrassonografia, relação cintura-quadril, circunferência de pescoço, bioimpedância tetrapolar e dobras cutâneas) dos pacientes obesos e DM2;

Avaliar os efeitos do ômega 3 em associação com treinamento físico intervalado de alta intensidade sobre o perfil lipídico plasmático (TG, colesterol total, HDLc, LDLc dos pacientes obesos e DM2;

Avaliar os efeitos do ômega 3 em associação com treinamento físico intervalado de alta intensidade sobre o perfil glicêmico plasmático, biomarcadores de glicação e sensibilidade à insulina (glicemia de jejum, insulina de jejum, hemoglobina glicada, isoformas solúveis de RAGE (receptor para produtos da glicação avançada), produtos de glicação avançada (AGEs), sensibilidade à insulina δ HOMA, adiponectina e leptina - ELISA) dos pacientes obesos e DM2;

Avaliar os efeitos do ômega 3 em associação com treinamento físico intervalado de alta intensidade sobre biomarcadores pró e anti-inflamatórios (PCR ultrasensível, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-10, IL-15, IFN- γ , iNOS e MCP-1 plasmático δ ELISA, e TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS, eNOS, MCP-1, JNK, TLR-4, e IL-10, NFkB, IkB, Myd88 e IKK em extrato proteico de células sanguíneas δ Western blot) dos pacientes obesos e DM2;

Avaliar os efeitos do ômega 3 em associação com treinamento físico intervalado de alta intensidade sobre níveis proteicos e fosforilação das moléculas biomarcadoras de estresse de retículo (PERK, IRE1, eIF2 β , ATF4, XBP1, ERAD, e as chaperonas δ CHOP, GRP78, GRP94, HSP70 e HSP90 em extrato proteico de células sanguíneas δ Western blot) dos pacientes obesos e DM2.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Uma das situações que poderiam interferir no estudo, é a possível falta de recurso financeiros, reagente ou droga durante o experimento, situação que está fora do nosso controle.

Benefícios:

Possível melhora nos parâmetros lipídicos, glicêmicos, insulínêmicos, antropométricos, inflamatórios e moleculares de pacientes obesos e diabéticos, resultando em maior qualidade de vida.

Endereço: Avenida União e Liberdade, 1105			
Bairro: União e Liberdade		CEP: 88.806-000	
UF: SC	Município: CRICIUMA		
Telefone: (48)3431-2723	Fax: (48)3431-2750	E-mail: ce.tica@unesoc.net / cep-unesoc@unesoc.br	

UNIVERSIDADE DO EXTREMO
SUL CATARINENSE - UNESC



Continuação do Parecer: 473.654

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, avaliando o impacto de variáveis alimentares/nutricionais e de atividade física no DM II com obesidade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Atende os critérios éticos previstos na Resolução CNS 466/12.

Recomendações:

Quanto ao orçamento, não fica claro a garantia do custeio e a responsabilidade pelos valores apresentados - 385.300,00 Reais: destacar que a busca de fomento para custeio do projeto é de total responsabilidade do pesquisador, ficando a UNESC isenta deste compromisso.

No TC LE, a legislação em vigor é a Resolução CNS 466/12. No último parágrafo: colocar "A coleta de dados será realizada pelos pesquisadores...".

Sugere-se que, se os resultados do uso do W3 e atividade física forem satisfatórios, que todos os pesquisados recebam o suplemento e o acompanhamento da atividade física pelo mesmo tempo de duração da pesquisa, ou seja, 6 meses após o término dos experimentos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovar, com a condição do autor se responsabilizar pela busca de recursos financeiros para desenvolvimento do projeto, sem ônus para a UNESC.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CRICIUMA, 29 de Novembro de 2013

Assinador por:
RENAN ANTONIO CERETTA
(Coordenador)

Endereço: Avenida União Brasileira, 1105
Bairro: União Brasileira CEP: 88.806-000
UF: SC Município: CRICIUMA
Telefone: (48)3431-2723 Fax: (48)3431-2750 E-mail: oetica@unesccat, cep-unescc@unescc.br