UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas

Susana Castelo Branco Ramos Nakandakari

A RELAÇÃO ENTRE FONTES DE ÔMEGA-3 E DO RECEPTOR GPR120 EM DIFERENTES ESTADOS INFLAMATÓRIOS

LIMEIRA
2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas

Susana Castelo Branco Ramos Nakandakari

A RELAÇÃO ENTRE FONTES DE ÔMEGA-3 E DO RECEPTOR GPR120 EM DIFERENTES ESTADOS INFLAMATÓRIOS

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo.

Orientador: Prof. Dr. Dennys Esper Correa Cintra

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA SUSANA CASTELO BRANCO RAMOS NAKANDAKARI E ORIENTADA PELO PROF. DR. DENNYS ESPER CORREA CINTRA.

LIMEIRA
2023

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

N145r

Nakandakari, Susana Castelo Branco Ramos, 1993-
A relação entre fontes de ômega-3 e do receptor GPR120 em diferentes estados inflamatórios / Susana Castelo Branco Ramos Nakandakari. – Limeira, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Dennys Esper Cintra.
Coorientador: José Rodrigo Pauli.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. GPR120. 2. Inflamação. 3. Sistema imunológico. I. Cintra, Dennys Esper, 1976-. II. Pauli, José Rodrigo, 1979-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: The relationship between omega-3 sources and the GPR120 receptor in different inflammatory states
Palavras-chave em inglês:
GPR120
Inflammation
Immune system
Área de concentração: Ciências Nutricionais e Metabolismo
Titulação: Doutora em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo
Banca examinadora:
Dennys Esper Cintra [Orientador]
Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira
Eli Mansur
Helen Hermana Miranda Hermsdorff
André Gustavo Vasconcelos Costa
Data de defesa: 01-11-2023
Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0002-4451-2935
- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/3117721594073903

Folha de Aprovação

Autora: Susana Castelo Branco Ramos Nakandakari
Título: A relação entre fontes de ômega-3 e do receptor gpr120 em diferentes estados inflamatórios
Natureza: Tese
Área de Concentração: Ciências Nutricionais e Metabolismo
Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA/Unicamp
Data da Defesa: Limeira-SP, 1 de Novembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Dennys Esper Correa Cintra
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/Unicamp

Prof. Dra. Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/Unicamp

Prof. Dr. Eli Mansur
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Helen Hermana Miranda Hermsdorff
Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. André Gustavo Vasconcelos Costa
Universidade Federal do Espírito Santo

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

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Sadamitsu e Maria Teresa, pelo amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas, por todo acolhimento durante esses anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo nº 2019/13168-3 e 2021/14996-7) pelo suporte financeiro essencial para a realização desta pesquisa de doutorado direto realizado na Faculdade de Ciências Aplicadas da UNICAMP com estágio de pesquisa no exterior (BEPE) na Faculdade de Medicina da Universidade de Yale.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço ao programa de pós-graduação Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo (CNEM) pelo suporte, principalmente ao professores por compartilharem conhecimento e experiências.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro para realização das iniciações científicas e pela oportunidade de participar do programa Ciências Sem Fronteiras na Kent State University. A base científica aprendida durante esse período foram essenciais para preparação do presente trabalho.

À todos os animais utilizados para o desenvolvimento desse trabalho, meu imenso respeito e agradecimento.

Ao professor Dennys, que me ensinou entre tantas outras coisas, o amor pela ciência. Me sinto privilegiada de ter tido a oportunidade de conviver e aprender com você por todos esses anos, e sei que continuarei aprendendo com você sempre. Agradeço por toda paciência em me ensinar tudo o que sei ou como procurar tudo o que quero saber. Por toda confiança e pelas inúmeras oportunidades que me apresentou durante todos esses anos. Por sempre me incentivar, não me deixar desanimar e me ensinar a ser persistente. Por todas as conversas, conselhos, e até pelas broncas. Por estar sempre presente e disponível nesses anos. Por não medir esforços para que eu sempre aprendesse algo novo, pelas ricas discussões científicas e por compartilhar suas experiências e conhecimento. Os

aprendizados científicos e pessoais durante esses oito anos de LabGeN são incalculáveis e muito preciosos, devo isso à sua orientação e amizade. Muito obrigada professor, por tudo!

Ao professor José Rodrigo Pauli, Eduardo Ropelle, Leandro Moura e Adelino Silva, por todo apoio, pelos ensinamentos e pela disponibilidade. A parceria com o LabMEX foi essencial para minha formação, desde a iniciação científica até o doutorado. Especialmente ao professor José Rodrigo Pauli, agradeço pelo apoio essencial na minha formação, pela oportunidade de colaboração com seus alunos, pela confiança e pelos ensinamentos.

Aos alunos do LabGeN (Thaiane, Giovana, Camila Oliveira, Camila Venturini, Lavínia, Ellen, Taís, Alexandre, Marcella, Camila Bertuzzo, Patrícia, Jaqueline, Myliane, Leandro, Julia, Letícia e André) e do LabMEX (Rafael, Vitor, Gabriel, Renan, Barbara, Carlos, Bricola, Renata, Diego e todos os outros) obrigada a todos os alunos que passaram pelo laboratório desde que comecei a iniciação científica, pelos aprendizados e pela convivência. Cada um de vocês contribuíram para minha formação pessoal e profissional, obrigada!

Aos meus amigos e colaboradores Thaiane Rios, Renan Vieira e Giovana Gonçalves, obrigada por todos os momentos que passamos juntos durante a realização desse projeto. Não tenho palavras para agradecer todo o suporte que demos uns aos outros, especialmente durante a pandemia de COVID-19. A amizade e o companheirismo de vocês deixaram os dias mais leves e mais produtivos. Muito obrigada!

Ao professor Fernando Simabuco que me ensinou com muita paciência e muita competência muito sobre RT-qPCR, cultura celular e biologia molecular. Obrigada por estar sempre disponível para tirar minhas dúvidas, por me ensinar tanto, por permitir que eu realizasse os experimentos de cultura celular no seu laboratório, pelas aulas incríveis sobre biologia molecular. Agradeço também todos os membros do LabMAS (Isadora, Luís, Matheus, Nathalia, Maíra, Erika, Mariana Mancini e Mariana Gois) que sempre foram muito atenciosos comigo, especialmente Isadora Pavan, Luiz Salvino e Maíra Costa que me acompanharam e auxiliaram em diversos experimentos.

À professora Rachel Perry e ao professor Andrew Wang pela oportunidade de realizar o estágio de pesquisa no exterior (BEPE) em seus respectivos laboratórios e por me

receberem tão bem. Agradeço a todos os alunos do Perry lab (Andin, Ngozi, Zongyu, Xinyi, Stephan, Yanitza e Isabella) e Wang lab (Eric, Anna, María, Yifan, Mackenzie, Kenneth, Daniel, Tomomi e Gabriel) por toda ajuda, em especial para Eric Elliott que me ensinou muito sobre sepse e sistema imune, se disponibilizou para padronizar comigo a técnica de CLP e outras técnicas presentes no trabalho, e também pela amizade. Também agradeço à Andin Fosam e Ngozi Akingbesote pela parceria durante meu período de estágio no exterior, pela amizade, por sempre estar disponível a ajudar e por me ensinar tanto.

Aos meus pais, Sadamitsu e Maria Teresa, que nunca mediram esforços para que eu tivesse uma boa formação profissional. Junto ao meu irmão, Gustavo, sempre foram meus grandes incentivadores e o maior suporte para mim. Vocês sempre foram exemplos de esforço, superação e dedicação tanto como profissionais quanto como pessoas. Obrigada por todo apoio, pelo incentivo e por serem meu porto seguro sempre. Obrigada por sempre estarem dispostos a ouvir falar sobre meu projeto, minhas apresentações, meus experimentos e por contribuírem sempre.

Ao Rafael, por ser meu grande companheiro e estar sempre presente durante a realização desse trabalho mesmo quando à distância. Pela compreensão nos momentos difíceis, pela parceria, por todo carinho e incentivo. Obrigada!

EPÍGRAFE

"I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale.".

Marie Curie.

RESUMO

Ácidos graxos ômega 3 (ω3) são alvo de estudos constantes, devido a seus efeitos anti-inflamatórios, em que a via de sinalização coordenada pelo receptor GPR120 parece ser uma das mais importantes. O GPR120 quando ativado por ω3 atenua a inflamação por meio da inibição do NFkB, por intermédio da proteína TAB1, reduzindo a inflamação. A presença do GPR120 foi descrita em tecidos periféricos e central, mas também em células do sistema imune, como as células de Kupffer e macrófagos. Pesquisas suplementando ω3 em doenças infecciosas como a sepse tem evoluído, mas ainda sem consenso na melhora a sobrevivência dos pacientes. O objetivo desse estudo é avaliar o comportamento do GPR120 diante diferentes quadros inflamatórios e estabelecer os possíveis mecanismos associados a essas alterações. Para os experimentos *in vivo*, foram utilizados camundongos C57BL/6J, submetidos à inflamação de baixo ou alto grau, em protocolos de consumo de dieta hiperlipídica (HF), septicemia por ligadura e perfuração do ceco (CLP) ou administração de lipopolissacarídeos (LPS). Em experimentos *in vitro*, utilizou-se linhagens celulares de 3T3-L1 e RAW 264.7, de adipócitos e macrófagos, respectivamente, além da cultura primária de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM), adipócitos e fração vascular do estroma (SVF). O padrão de resposta de citocinas e do receptor GPR120 (*Ffar4*) no tecido adiposo epididimal e células foi analisado por meio de RT-qPCR. Tanto nos protocolos *in vivo* quanto *in vitro*, em estímulo com LPS, o *Ffar4* está diminuido em relação ao seu controle, enquanto *in vivo* diante HF o *Ffar4* não se alterou e em macrófagos com tratados com palmitato o *Ffar4* aumentou. Ademais, fontes de ω3, óleo de linhaça (FS) e óleo de peixe (FO) foram oferecidos via gavagem aos camundongos previamente ao desenvolvimento da sepse e parâmetros como a sobrevivência foram avaliados. O grupo FO apresentou menor taxa de sobrevivência em relação aos outros grupos. Os achados sugerem que o GPR120 não é apenas um receptor nutricional, mas também com ação na resposta inflamatória. Contudo, quando utilizada a suplementação de ω3 em quadros de sepse, os grupos com fontes de ω3 não foram capazes de melhorar a taxa de sobrevivência.

Palavras-chave: GPR120, Ômega-3, Inflamação, Sistema imune.

ABSTRACT

Omega 3 fatty acids (ω3) are target of current studies due to their anti-inflammatory effects, once the cellular signaling coordinated by GPR120 receptor appears to be one of the most relevant. When activated by ω3, the GPR120 attenuates the inflammatory process by inhibiting NFkB, through the TAB1 protein, decreasing the inflammation. The presence of GPR120 was shown in central and peripheral tissues, but also in cells of the immune system, such as Kupffer cells and macrophages. Investigations on ω3 supplementation in infectious diseases such as sepsis has evolved, but there is still no consensus on whether its use improves patient survival. The aim of this study is to evaluate the behavior of the GPR120 receptor in different inflammatory conditions and to establish the possible mechanisms associated with these changes. For *in vivo* experiments, C57BL/6J mice subjected to low or high-grade inflammation, through the protocols of high-fat diet (HF) intake, cecal ligation and puncture (CLP) or administration of lipopolysaccharides (LPS). For *in vitro* experiments, 3T3-L1 and RAW 264.7 cell lines, adipocytes and macrophages, respectively, were used, in addition to the primary culture of bone marrow-derived macrophages (BMDM), adipocytes and stromal vascular fraction (SVF). The response pattern of cytokines and the GPR120 receptor (*Ffar4*) in epididymal adipose tissue and cells were analyzed using RT-qPCR. In both *in vivo* and *in vitro* protocols, when stimulated with LPS, *Ffar4* was reduced in relation to its control, while *in vivo* protocols under HF, *Ffar4* did not change and in macrophages treated with palmitate, *Ffar4* increased. Furthermore, sources of ω3, flaxseed oil (FS) and fish oil (FO) were offered via gavage to mice prior to the development of sepsis and parameters such as survival were evaluated. The FO group had a lower survival rate compared to the other groups. Our findings suggest that GPR120 is not only a nutritional receptor, but also has a role in the inflammatory response. However, when ω3 supplementation was used in sepsis, the groups with ω3 sources were not able to improve the survival rate.

Keywords: GPR120, Omega-3, Inflammation, Immune system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. GPR120 (*Ffar4*) diante de outros GPCRs.....26
Figura 2. Mecanismo da via de sinalização inflamatória ativada por *Toll Like Receptor 4* (TLR4).....27
Figura 3. Mecanismo Proposto para Ação Antiinflamatória Mediada por ω3, através do GPR120.....28
Figura 4. Protocolo de dieta hiperlipídica (HF).....37
Figura 5. Protocolo de ligadura e perfuração do ceco (CLP).....38
Figura 6. Protocolo de lipopolissacarídeo (LPS).....39
Figura 7. Desenho experimental dos protocolos de gavagem de ômega-3 prévia à indução a sepse.....40
Figura 8. Animal em contensor de acrílico.....41
Figura 9. Desenho experimental protocolo de diferenciação 3T3.....43
Figura 10. Desenho experimental do ensaio de meio condicionado com LPS.....44
Figura 11. Desenho experimental do ensaio de meio condicionado com IL1β..... 45
Figura 12. Mapeamento do *Ffar4* através de análise *Single Cell*.....50
Figura 13. Somatória do perfil de ácidos graxos da dieta controle e da dieta hiperlipídica.....53
Figura 14. Caracterização fenotípica do modelo experimental de dieta hiperlipídica 3 dias.....54
Figura 15. Caracterização fenotípica do modelo experimental de dieta hiperlipídica 60 dias.....55
Figura 16. Perfil de ácidos graxos do soro HFD 60 dias.....56
Figura 17. Caracterização fenotípica do modelo experimental de sepse induzida por CLP.....57
Figura 18. Caracterização fenotípica do modelo experimental de sepse induzida por LPS.....57

Figura 19. Avaliação da expressão gênica de marcadores inflamatórios *Tnfa* e *Il1b* e do receptor *Ffar4*.....59
Figura 20. Avaliação da expressão gênica do *Ffar4* em modelo overtraining.....60
Figura 21. Ensaio de dose resposta do palmitato em 6 h em células RAW.....61
Figura 22. Ensaio de dose resposta do palmitato em 24 h em células RAW.....61
Figura 23. Ensaio de LPS 10 μg/mL em 6 h e 24 h em células RAW.....62
Figura 24. Ensaio de dose resposta do LPS em 6 h em células RAW.....62
Figura 25. Fotos representativas das células 3T3 diferenciadas em aumentos de 10x (A), 20x (B) e 40x (C).....63
Figura 26. Ensaio de dose resposta do palmitato em 24h em células 3T3.....63
Figura 27. Ensaio de LPS 10 μg/mL em 6 h e 24 h em células 3T3-L1.....64
Figura 28. Ensaio de dose resposta do LPS em 24h em células 3T3.....65
Figura 29. Ensaio de meio condicionado da RAW com LPS adicionado na 3T3.....65
Figura 30. Ensaio de meio condicionado da RAW com IL1β adicionado na 3T3.....66
Figura 31. Ensaio de dose-resposta de LPS em BMDM.....66
Figura 32. Desenho esquemático dos 3 diferentes primers de *Ffar4*.....67
Figura 33. Padronização dos primers de *Ffar4* no WAT e no fígado 24h após LPS.....68
Figura 34. Blast do gene humano do *Ffar4* em relação ao *Ffar4* de *Mus musculus*.....69
Figura 35. Ensaio de adipócitos primários e fração vascular do estroma 24h após LPS.....70
Figura 36. Expressão do *Ffar4* no tecido adiposo de animais com deleção de PPARγ.....70
Figura 37. Cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP).....71
Figura 38. Caracterização fenotípica do modelo experimental de CLP 2.....72
Figura 39. Caracterização do modelo CLP 2 em relação aos parâmetros bioquímicos.....73
Figura 40. Composição corporal após gavagem com fontes de ω3.....73
Figura 41. Caracterização fenotípica do modelo experimental de CLP após gavagem com ω3.....74
Figura 42. Painel de citocinas do experimento de CLP com gavagem prévia de ω3.....75
Figura 43. Composição corporal após gavagem com óleo de peixe.....75
Figura 44. Caracterização fenotípica do CLP após gavagem com MO e FO.....76

Figura 45. Caracterização do modelo CLP após gavagem com MO e FO relação aos parâmetros bioquímicos.....77
Figura 46. Painel de citocinas do experimento de CLP com gavagem prévia de MO e FO.....78
Figura 47. Caracterização fenotípica do LPS após gavagem com fontes de ω3.....79
Figura 48. Caracterização fenotípica do LPS após gavagem com FO.....80
Figura 49. Modulação do *Ffar4* em diferentes gatilhos inflamatórios.....89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dieta modificada para 35% de lipídios.....37

Tabela 2. Sequências dos primers utilizados no RT-qPCR.....47

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos da dieta controle e da dieta hiperlipídica.....51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.C. – Antes de Cristo

Actb – beta actina

AIN - Instituto Americano de Nutrição

ALA – alfa linolênico

ASPEN – Sociedade Americana para nutrição parenteral e enteral

BF_3 - Trifluoreto de boro

BHT – Butil-Hidróxi-Tolueno

BMDM – Macrófagos derivados da medula óssea

CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório

CLP – Ligadura e perfuração do ceco

CT - Controle

DAMP – Padrões moleculares associados a danos

DHA - Docosahexaenóico

DMEM – Meio de Dubelcco: modificado de águia

EPA- Eicosapentaenóico

ESPEN – Sociedade européia para nutrição clínica e metabolismo

Ffar4 ou GPR120 – Receptor de ácido graxo livre 120

FO – Óleo de peixe

FS – Óleo de linhaça

Gapdh – Gliceraldeído-3-fosfato

GPCRs - Receptores de membrana acoplados à proteína G

GPR40 – Receptor de ácido graxo livre 40

HF - Hiperlipídica

IBMX – Isobutil metilxantina

Il1b ou IL1β – Interleucina 1 beta

Il6 – Interleucina 6

IL- 10 – Interleucina 10

IL-17 – Interleucina 17

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade

LPS - Lipopolissacarídeo

LTB_4 - Leucotrienos do tipo B4

LTB_5 – Leucotrienos do tipo B5

MCP1 – Proteína quimiotática de monócitos-1

MO – Óleo mineral

ND – Sem dado

NEFA – Ácidos graxos não esterificados

NFkB - Fator nuclear kappa B

NTC – No template control

OTD – Overtraining down

PAMP – Padrões moleculares associados a patógenos

PBMC – Células mononucleares de sangue periférico

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PPARγ – Receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma

PS - Penicilina e Estreptomicina

RNAm - RNA mensageiro

Rpl13a – Proteína ribossomal 13a

RT-qPCR - Transcriptase reversa – reação de polimerase reversa quantitativa

SBA - Soro Bovino Adulto

scRNA seq – Sequenciamento de RNA Single cell

SED - Sedentário

SFB - Soro Fetal Bovino

SIDA - síndrome da imunodeficiência adquirida

SVF – Fração vascular do estroma

TAB1/2 - Quinase 1/2 ativada por TGF-beta e proteína 1 de ligação a MAP3K7

TLR4 – Receptor Toll Like 4

Tnfa ou TNFα - Fator de necrose tumoral

TRD - Treinado

Tuba1a – Cadeia de tubulina alfa 1

TXA - Tromboxano

UTI – Unidade de terapia intensiva

LISTA DE SÍMBOLOS

α: Alfa

β: Beta

γ: Gama

Δ: Delta

μ: Micro

M: Molar

∑: Somatória

ω: Ômega

°C: Celsius

≅: Aproximadamente

SUMÁRIO

1 Introdução 22

2 Revisão de literatura 23

2.1 Inflamação 23
2.2 Ácidos graxos Ômega-3 24
2.3 GPR120 (*Ffar4*) 25
2.4 Sepse 30

3 Justificativa e hipótese 33

4 Objetivo geral 33

4.1 Objetivos Específicos 33

5 Material e métodos 35

5.1 Análise in silico – Single Cell RNA sequencing data 35
5.2 Animais Experimentais 35
5.3 Protocolos de indução à inflamação 36
5.4 Avaliação da temperatura e massa corporal 39
5.5 Gavagem com óleos (Óleo mineral, óleo de linhaça e óleo de peixe) 40
5.6 Composição corporal 40
5.7 Glicemia 40
5.8 Extração tecidual e coleta sanguínea 41
5.9 Dosagem hormonal e de proteínas séricas 41
5.10 Ácidos graxos não esterificados (NEFA) 42
5.11 Cultura Celular 42
5.12 Tratamento com LPS e Palmitato 43
5.13 Tratamentos com LPS e IL1β recombinante em meios condicionados 43
5.14 Macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) 45
5.15 Cultura primária de adipócitos 45
5.16 RT-qPCR 46
5.17 Espectrometria de Massas das dietas experimentais e soro dos animais 47
5.18 Análise Estatística 48
5.19 Imagens 49

6 Resultados 50

6.1 Etapa 1 50
6.2 Etapa 2 51
6.3 Etapa 3 60
6.4 Etapa 4 71

7 Discussão 81

8 Conclusão 89

9 Referências 91

10 ANEXO 1. Lista de publicações durante o período do doutorado 100

10.1 ARTIGOS DE PRIMEIRA AUTORIA GERADOS COM OS DADOS DESSE TRABALHO 100

10.2 ARTIGOS COMO COLABORADORA 101

11 ANEXO 2. Certificado ceua 105

1 Introdução

A inflamação é uma resposta benéfica do hospedeiro diante de uma lesão ou de uma infecção, cujo objetivo é restaurar a função e a estrutura atingida[1]. Contudo, quando a resposta inflamatória é desregulada pode resultar em doenças inflamatórias agudas ou crônicas. O limite entre os efeitos benéficos e maléficos causados pela inflamação é tênue. Obesidade e diabetes do tipo 2, ambas doenças com números alarmantes e crescentes, são doenças crônicas não transmissíveis caracterizadas com inflamação crônica e de baixo grau. Por outro lado, um quadro de sepse é caracterizado por inflamação sistêmica de alto grau. As consequências causadas pela inflamação desregulada são inúmeras, portanto diversos estudos tem sido feitos com o objetivo de encontrar moléculas com propriedades anti-inflamatórias.

As propriedades anti-inflamatórias dos ácidos graxos ômega 3 (ω3) foram descritas ao longo das últimas décadas. Contudo, com a transição nutricional moderna, o aumento no consumo de alimentos ultra-processados ocorreu, concomitante ao aumento de doenças crônicas e de baixo grau inflamatório, como a obesidade[2]. Em paralelo, a busca por estratégias medicamentosas e nutricionais também aumentou, principalmente nos último anos com a pandemia de COVID-19[3,4].

Por outro lado, grupos de pesquisa por todo o mundo estão buscando entender os mecanismos de ação do ω3. Um dos principais mecanismos propostos foi descrito por meio da ativação do receptor GPR120[5,6]. A partir disso, estudos com os ácidos graxos ω3 e esse receptor foram conduzidos em diversos contextos, principalmente em doenças inflamatórias[7,8]. Estudos prévios demonstraram que o GPR120 está presente também em células do sistema imune, como os macrófagos, os quais apresentam ação fundamental na imunidade inata e são ativados em diversas doenças e quadros infecciosos[6,9].

A principal condição causada por consequências de infecção é a sepse[10]. Apesar de ter sido descrita aproximadamente 400 A.C. continua responsável por aproximadamente 20% das mortes globais por ano[11]. A fisiopatologia da doença é

complexa, já que engloba infecções causadas por bactérias, vírus e fungos, com diferentes consequencias, respectivamente[12,13]. Ademais, cada paciente possui diferentes comorbidades relacionadas que complicam o quadro.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento da expressão do receptor GPR120 (*Ffar4*) perante diferentes tônus inflamatórios *in vitro* e *in vivo*; avaliar a suplementação de ω3 como possível coadjuvante no tratamento da sepse.

2 Revisão de literatura

2.1 Inflamação

A inflamação é uma resposta essencial, benéfica e adaptativa do hospedeiro diante de uma condição ou estímulo, como lesão ou infecção, cujo objetivo é restaurar a função e a estrutura atingida[1,14]. Contudo, quando a resposta inflamatória é desregulada pode resultar em condição aberrante, com degeneração tecidual, e até mesmo avanço ao choque séptico[15]. Apesar disso, a inflamação classificada como patológica possui sua fisiologia clara[15].

O limite entre os efeitos benéficos e maléficos causados pela inflamação é tênue. Obesidade e diabetes do tipo 2, ambas doenças com números alarmantes e crescentes, são doenças crônicas não transmissíveis caracterizadas com inflamação crônica e de baixo grau ou para-inflamação[14,15]. Ambas doenças não possuem inflamação relacionada com papel fisiológico esclarecido[16].

A inflamação é causada por diferentes estímulos indutores, podendo ser exógenos ou endógenos, e então endógenos microbianos ou não microbianos[15]. Dentre os fatores microbianos, há duas classes: padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e fatores virais; enquanto os não microbianos são constituídos por alérgenos, irritantes, corpos estranhos e componentes tóxicos. Além disso, os fatores exógenos se resumem em estresse, dano e tecidos não funcionais[15].

Por outro lado, os indutores inflamatórios ativam a produção de diversos mediadores inflamatórios, divididos em 7 classificações: aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, fragmentos de componentes do complemento, mediadores lipídicos,

citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas[15]. Alguns dos mediadores lipídicos como as resolvinas e as protectinas são derivadas do ácidos graxo ômega-3[15].

2.2 Ácidos graxos Ômega-3

Os ácidos graxos ω3 são caracterizados por serem poli-insaturados, portanto com duas ou mais duplas ligações ao longo de sua cadeia carbônica. São representados principalmente pelo ácido graxo de origem vegetal, α-linolênico (ALA – C18:3) e os de origem marinha, eicosapentaenóico (EPA – C20:5) e docosahexaenóico (DHA– C22:6)[7]. O ALA é um ácido graxo essencial aos mamíferos, que são incapazes de sintetizá-lo endogenamente devido a limitação na produção das enzimas delta-12 e delta-15 dessaturases, devendo o ALA ser adquirido em suas fontes alimentares[17]. As fontes de ALA são representadas pela chia, linhaça, nozes e soja, enquanto EPA e DHA são encontrados peixes como sardinha, arenque, atum, salmão, krill e foca[18].

Em 1976, Dyerberg e Bang descreveram o "paradoxo dinamarquês", que consistia no alto consumo de gorduras pelas populações da Groelândia e Dinamarca em paralelo à menor incidência de doenças cardiovasculares na população groelandesa, comparada aos dinamarqueses[19]. Foi identificado alta concentração de ω3 no conteúdo de gordura total consumida pelos Inuits, uma vez que sua alimentação apresentava elevada presença de espécies marinhas, ricas em ω3. Em 1982, o mesmo grupo de pesquisadores descreveu seus apontamentos para a modulação dos eicosanoides como o possível mecanismo de ação coordenado pelo ω3, capaz de reduzir agregação plaquetária por indução da produção do tromboxano A3 (TXA_3), como o principal fator responsável pela proteção cardíaca nesse contexto[19].

Como consequência dos resultados obtidos por Dyerberg e Bang, outros pesquisadores hipotetizaram em trabalhos seguintes a possibilidade dos ácidos graxos ω3 modularem a resposta imune, como por exemplo em pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA)[20]. Os mecanismos de ação apontados para tais benefícios não estavam esclarecidos, mas apontavam a supressão

da função fagocítica de neutrófilos[21] e redução na produção de leucotrienos do tipo B4 (LTB_4)[22]. Já em situações como as de grande trauma tecidual, como nas cirurgias de remoção intestinal, o processo inflamatório pode ser atenuado parcialmente com a infusão parenteral de ω3, o qual reduz a produção do LTB_4, para espécies menos reativa, como o LTB_5 [23].

Ao longo da década de 1990 foi evidenciada a capacidade do ω3 em controlar também algumas citocinas, em ambiente inflamatório caracterizado, como TNFα e IL1β[24]. Alguns trabalhos demonstram, *in vitro* e *in vivo,* que o ω3 poderia interferir na via do fator nuclear kappa B (NFkB), sendo então esta via a responsável pela redução dos transcritos de *Tnfa* e *Il1b* [25].

Devido a suas propriedades anti-inflamatórias, o ω3 tem sido estudado como possível intervenção em diversas doenças, principalmente através da suplementação. Nas últimas décadas, a suplementação de ω3 foi avaliada em diversas doses e contextos como intervenção para melhorar a resistência à insulina[6], cicatrização de feridas[26], síndrome do olho seco[27], depressão[28], câncer[29], entre outras. Contudo, até o presente momento, os benefícios da utilização de ω3 é consenso apenas na redução da hipertrigliceridemia[30]. De forma interessante, parte dessas ações parecem ser mediadas por um receptor transmembrana, acoplado à proteína G, o GPR120.

2.3 GPR120 (*Ffar4*)

Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) são uma classe de receptores de membrana, que representam os maiores alvos de desenvolvimento de medicamentos, uma vez que possuem a maior família de proteínas em mamíferos. Os GPCRs apresentam como característica em comum sete alfa-hélices transmembrana, com sua porção N-terminal que se acopla à proteína G[31]. A partir dessa ligação, as proteínas G transduzem sinais a outras proteínas, cuja consequência são regulações enzimáticas ou ativação de canais de cálcio.

Em 2003, Fredriksson e colaboradores descreveram pela primeira vez sete novos GPCRs, entre eles o GPR120 (Figura 1)[31]. O gene *Ffar4*, do receptor GPR120, está conservado nos Gnatostomados, cuja classificação reúne animais vertebrados que possuem mandíbula, bem como nos tetrápodes, animais que possuem quatro membros [32]. Isto ilustra a importância do papel do receptor na evolução.

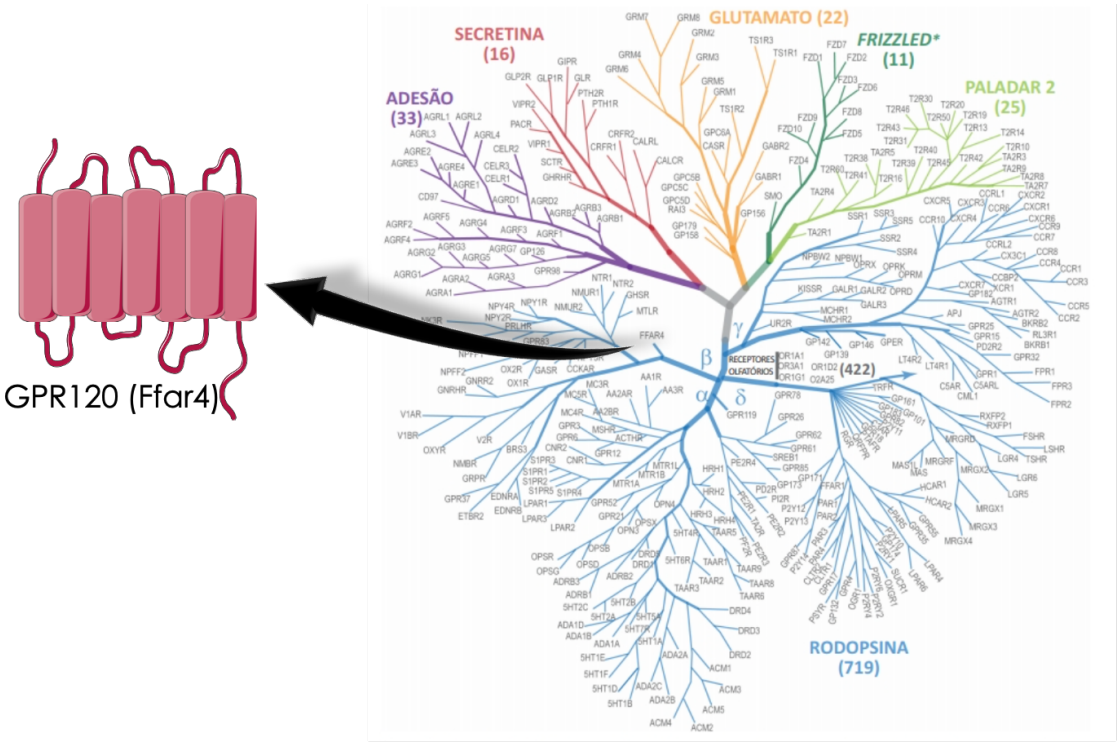


Figura 1. GPR120 (*Ffar4*) diante de outros GPCRs. Figura adaptada do livro As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman, 13º Edição[33].

Em 2005, Hirasawa e colaboradores demonstraram que o GPR120, poderia reconhecer ácidos graxos insaturados e de cadeia longa, e possivelmente alpha-linoleico (ω3) e palmitoleico[5]. Mas foi em 2010 que Oh e colaboradores confirmaram o GPR120 como o principal receptor dos ácidos graxos ω3, ademais, descreveram uma importante via de sinalização intracelular, desempenhada por este receptor quando estimulado por seus ligantes [6].

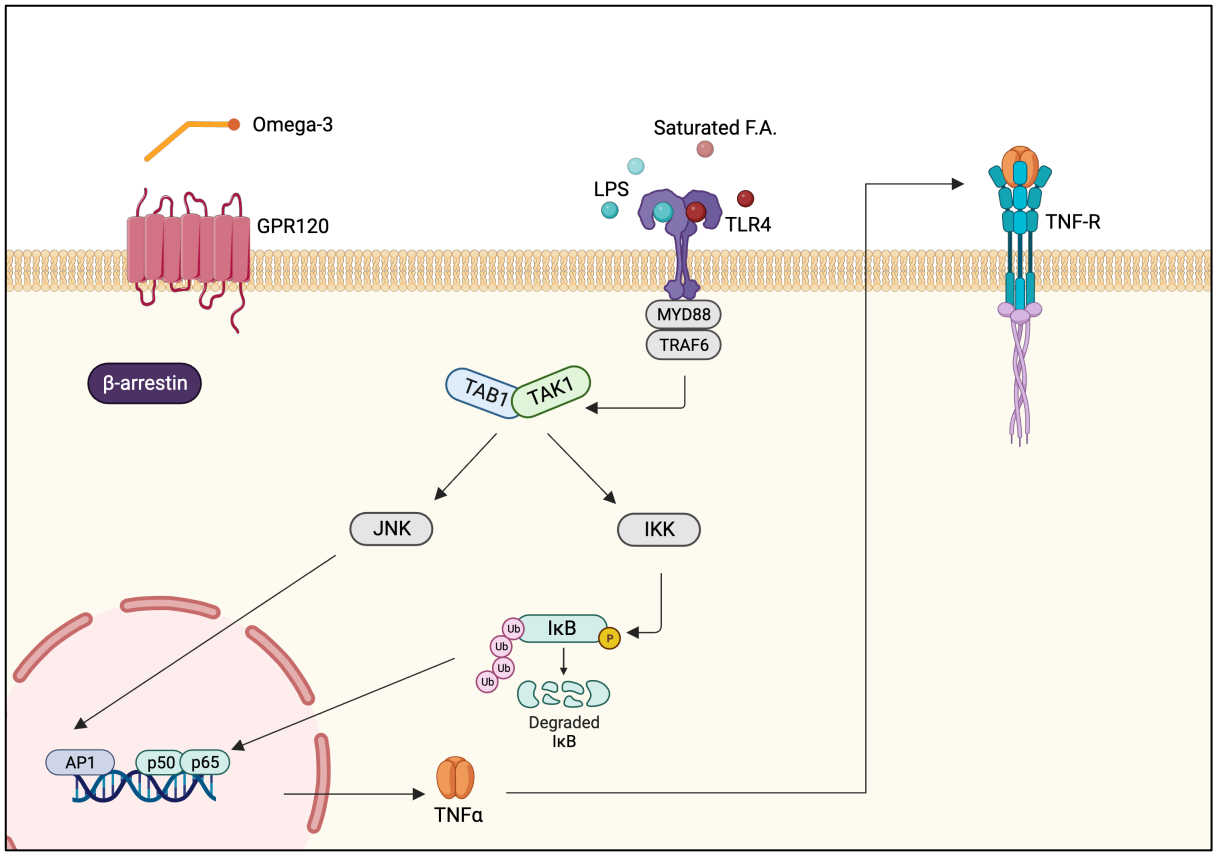


Figura 2. Mecanismo da via de sinalização inflamatória ativada por *Toll Like Receptor 4* (TLR4). O receptor TLR4 reconhece moléculas de LPS e de ácidos graxos saturados, que então ativam a via de sinalização inflamatória através da ativação do receptor TLR4 fazendo com que a associação entre as proteínas TAK1 e TAB1/2 ative a sinalização do sinal inflamatório. Dessa forma, ativam a via da IKK, IKba e NFkB. Consequentemente, a tradução de proteínas pró-inflamatórias como TNFa ocorre.

A mecanística proposta para ação dos ácidos graxos ω3 no contexto anti-inflamatório tem demonstrado que, ao ser ativado pelo ω3, o GPR120 altera sua conformação e atrai a proteína intracelular β-arrestina-2, associando-se a ela. Durante a trajetória da βarrestina-2 ao GPR120, interage com as proteínas TAB1/2, consequentemente inativando a proteína TAK1. De forma interessante, a proteína TAK1 se comporta de maneira nodal, pois pode ser ativada pela via dos receptores tipo TLR4, tanto quanto pelas vias orquestradas pelos receptores de citocinas como TNFα, IL1 e IL6. Com o sequestro das proteínas TAB1/2 pela β-arrestina-2, há o rompimento da sinalização inflamatória oriunda dessess receptores[34] (Figura 2 e 3, adaptada de[6]).

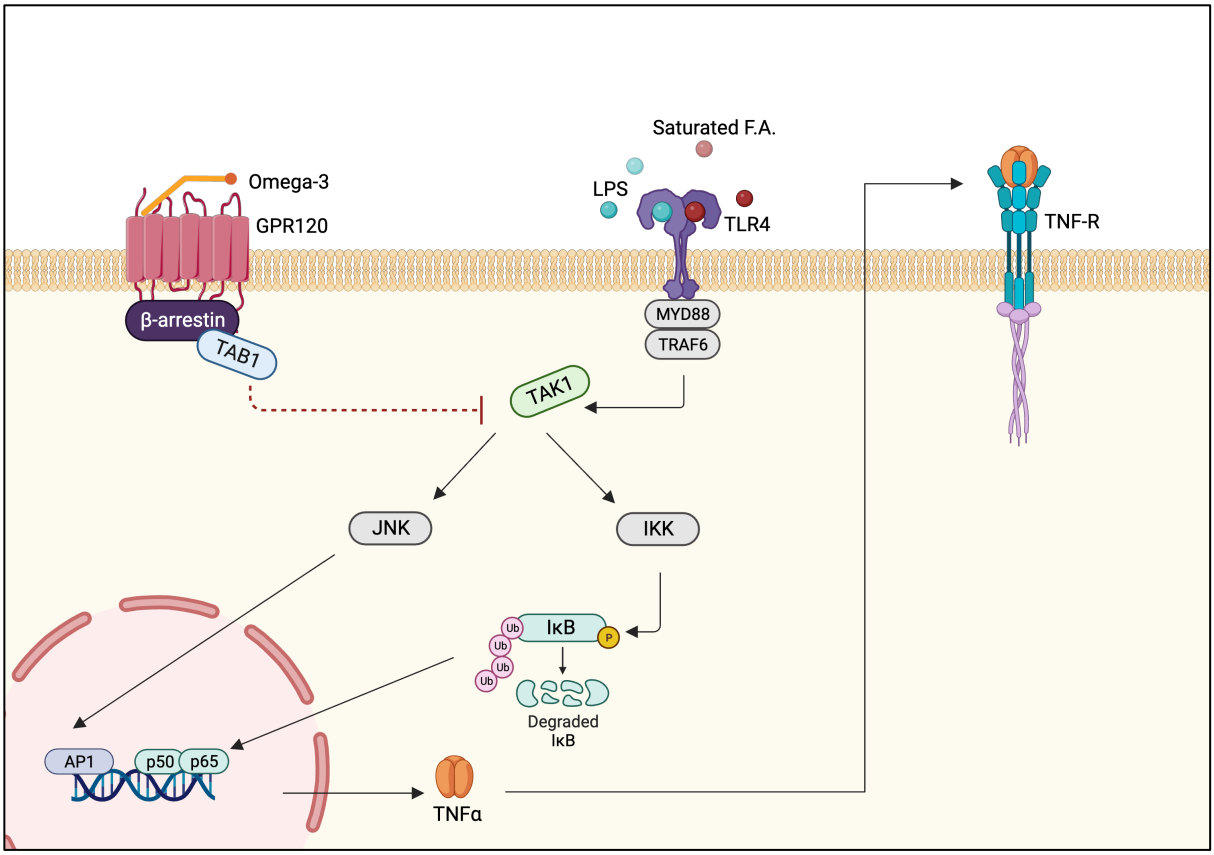


Figura 3. Mecanismo Proposto para Ação Anti-inflamatória Mediada por ω3, através do GPR120. Ácidos graxos ω3 ativam o GPR120 que atrai para si a proteína citosólica βarrestina 2. Durante este processo a βarrestina 2 se associa às proteínas TAB1/2, fundamentais à transdução do sinal inflamatório. Com isso a proteína TAK1 não é fosforilada e, consecutivamente não há sinalização ativadora da via do IKK, IKba e NFkB. Em sistemas onde há a resistência à insulina induzida pelo processo inflamatório de baixo grau, o ω3 participa restabelecendo a sensibilidade à insulina, melhorando quadros de hiperglicemia[35] e mau controle da ingestão alimentar[36].

O GPR120 foi descrito em diversos tecidos como intestino, pulmão, fígado, tecido adiposo, cérebro, entre outros. No intestino, o receptor tem um papel importante na liberação de GLP-1 através da ativação de ácidos graxos insaturados, principalmente ω3[5].

Trabalhos do nosso grupo têm demonstrado que a ativação deste receptor, pelos ácidos graxos ω3, em modelos animais de obesidade e diabetes, contribuem para

o controle do quadro inflamatório e hiperglicêmico em diversos tecidos. Cintra et al. (2012), demonstraram pela primeira vez, em roedores, a presença e funcionalidade do GPR120 no hipotálamo de camundongos obesos. Quando tratados com dietas contendo ω3, apresentaram redução no tônus inflamatório local, com consequente aumento à sensibilidade à insulina e leptina, reduzindo a hiperfagia característica em processos obesogênicos[36]. Oliveira et al. (2015), demonstraram a presença e funcionalidade do receptor em tecidos como fígado, músculo e adiposo, que responderam eficientemente, mas de maneira específica, à insulina, melhorando a hiperglicemia em animais portadores de diabetes do tipo 2[35]. Neste mesmo trabalho foi demonstrado a presença do receptor GPR120 em na superfície de células de Kupper e na superfície dos hepatócitos[35]. Assis-Moura et al. (2018) mostraram pela primeira vez a presença do receptor GPR120 na superfície de células endoteliais e de macrófagos infiltrados na artéria de camundongos com aterosclerose, reduzindo a inflamação local e prevenindo o avanço da doença[9,37]. O trabalho apontou que as ações benéficas dos ácidos graxos ω3, amplamente demonstradas em estudos clínicos e experimentais, possa também ser devido ao controle da função imunológica desempenhada por esses macrófagos. Caso o perfil de ação imunológica desses macrófagos seja alterada para o tipo anti-inflamatório, certamente isso poderia constituir uma nova estratégia de intervenção fármaco/nutricional em processo de aterogênese[9].

Como visto, os mecanismos que explicam a melhora em condições dismetabólicas em sistemas *in vitro* e *in vivo* tratados com ω3 podem ser diversos, desde uma alteração da composição de membranas plasmáticas, um perfil de eicosanoides e alvos moleculares intracelulares. Entretanto, o presente estudo destaca a possibilidade dos receptores GPR120, expressos na superfície de macrófagos, como possível alvo envolvido no controle de parte do sistema imune.

Oliveira et al., demonstraram a presença do receptor GPR120 em hepatócitos e também em células de Kuppfer, infiltradas e ativadas[35]. Contudo, Raptis et al.[38] demonstraram a importante participação deste receptor na resposta imune hepática,

quando induziram animais à lesão isquêmica por reperfusão. Este trabalho comparou animais previamente expostos ao ω3, ou tratados com injeção intraperitoneal de emulsão contendo ω3 após a reperfusão, ou ainda, tratados com GW9508, agonista sintético do receptor GPR120. Ambos os tratamentos induziram proteção, atribuída ao GPR120, mas de forma dose-dependente, onde quanto maior a dose testada do GW9508, maior a proteção. Ao inibirem o GPR120 das células de Kuppfer, o efeito protetivo do ω3 não foi observado. A mecanística celular atribuída aos benefícios exercidos pelos ácidos graxos ω3 mostram sinalização semelhante à descrita por Oh e colaboradores[6], contudo, de forma específica nas células de Kuppfer, e não apenas nos hepatócitos, como postulado por Oliveira et al[35].

Devido ao potencial terapêutico desse receptor, agonistas sintéticos como GW9508, NCG21, TUG-891, GSK137647A e cpdA têm sido desenvolvidos como possível forma de tratamento na resistência à insulina[39]. Ademais, os agonistas sintéticos do GPR120 apresentam potencial para tratamento não apenas na resistência à insulina, mas em outras desordens inflamatórias e metabólicas[40,41]. Contudo, talvez seja possível que doenças de base inflamatória, com diferentes graus de intensidade inflamatória, possam também ser tratadas com agonistas do GPR120, como é o caso da sepse. Assim, entender a relação entre o GPR120 em contexto da sepse pode ser um novo caminho exploratório desta condição.

2.4 Sepse

A sepse é uma síndrome que afeta milhões de pessoas anualmente, e é responsável por 20% da mortalidade mundial[11]. No Brasil, assim como em outros países da América Latina, de baixa e média renda, a incidência e mortalidade pode ser ainda mais devastadora[10]. A sepse é definida por ser uma disfunção orgânica com risco à vida causada por resposta desregulada diante o processo infeccioso; quando a resposta desregulada atinge parâmetros circulatórios, celulares e metabólicos com risco à vida aumentado, caracteriza-se o choque séptico [42].

A descrição da sepse e os estudos sobre os agentes infecciosos (bactérias gram negativas, bácterias gram positivas, fungos) que a causam evoluíram nas últimas décadas, contudo o que se manteve constante foi a presença da inflamação[43]. A ativação da inflamação nos estágios iniciais da sepse ocorre devido a secreção de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) por células células danificadas ou em morte celular, ou através da ativação do sistema imune pela interação de PAMPs[43]. Contudo, a sinalização intracelular na sepse é complexa e a inflamação exacerbada, característica da doença, induz a ocorrência de desordens endócrinas, vasculares e neurológicas[44].

Com a pandemia COVID-19, ficou evidenciado que doenças crônicas não transmissíveis são fatores de risco para pior prognóstico e tratamento da sepse[45–47]. Além disso, foi evidenciado que a sepse é uma condição complexa, com diferentes consequências em diferentes indivíduos, dependendo das doenças associadas, mas também dependendo da causa da infecção. Wang e colaboradores demonstraram que em modelo de sepse bacteriana a anorexia foi protetiva em relação à suplementação com solução glicosada, enquanto em modelo de sepse viral a suplementação com solução glicosada foi protetiva e a anorexia prejudicial[48].

A conduta nutricional em pacientes com sepse ainda não está totalmente consolidade, mas é consenso que a dieta oral deve prevalecer caso o paciente seja capaz de se alimentar[49,50].

Segundo o posicionamento da Sociedade Americana para Nutrição Parenteral e Enteral (ASPEN) a respeito de suporte nutricional para pacientes críticos não há diferença entre consumo energético baixo ou alto para melhorar o prognóstico do paciente crítico, porém com qualidade de evidências moderadas. Tal posicionamento discorre sobre a importância da emulsão intravenosa de lipídios iniciada na primeira semana de admissão do paciente na unidade de terapia intensiva (UTI), porém com qualidade de evidências baixa. Todavia, ainda não há evidências suficientes se a emulsão intravenosa de lipídios deve conter mistura de ácidos graxos, ou 100% de óleo de soja, contendo ou não óleo de peixe (fonte de ω3) [51].

Já a diretriz da Sociedade Européia para Nutrição Clínica e Metabolismo (ESPEN) descreve que altas doses de ω3 (3 a 7 vezes mais do que a dose recomendada para indivíduos saudáveis) não devem ser administradas através de bolus por nutrição enteral, mas que doses adequadas de ω3 podem ser administradas[49]. Doses adequadas se referem à dose de 500 mg de EPA e DHA, recomendadas para indivíduos saudáveis pela Sociedade Internacional de Estudos em ácidos Graxos e Lipídios[49]. A diretriz descreve que doses adequadas podem diminuir a estadia na UTI e até a mortalidade, mas não altera o quadro infeccioso, enquanto altas doses podem trazer complicações[49].

Na versão atualizada da diretriz da ESPEN (2023), foi complementado que, pacientes que apresentaram baixa quantidade de EPA e DHA nas membranas celulares não apresentam melhora após correção com tratamento de ω3[50], contudo o estudo citado foi feito com células sanguíneas coletadas e tratadas *in vitro*[52]. Além disso, discorrem que altas doses de ω3 na dieta enteral não deve ser administrada como rotina, pois estudos mostraram aumento da mortalidade[50].

Portanto, apesar de a sepse ter sido umas das primeiras condições patológicas a ser relatada por Hipócrates aproximadamente 470 A.C.[53], a compreensão sobre a etipotaogênese da sepse ainda carece de investigação e, principalmente, no que tange a conduta nutricional. São várias as inconsistências nos estudos, que acabam por perpetuar a incompreensão na ação do ω3 no contexto de sepse. Até os dias de hoje, os estudos com sepse ainda carecem de mais investigações na área de nutrição pois a seleção dos pacientes nos estudos são feitas sem separar o tipo de agente infeccioso que causou a sepse, quais órgãos foram afetados pela doença e qual o estágio a doença se encontra. Em relação aos nutrientes, macro e micro nutrientes, a maioria dos estudos foram feitos em células e utilizados como recomendação em humanos nas diretrizes[49–51]. Estudos de experimentação básica e ensaios clínicos com diferentes agentes infecciosos (bactéria, vírus e fungos)[48], sob diferentes condutas nutricionais, ainda são necessários para que o tratamento medicamentoso, junto com o acompanhamento nutricional, seja capaz de melhorar o prognóstico dos pacientes.

3 Justificativa e hipótese

Com a transição nutricional moderna, o acesso a alimentos ultraprocessados, ricos em açúcares, gordura e sal, está cada dia mais facilitado, tanto pela disponibilidade quanto pela praticidade ditada pelo marketing. Por outro lado, a busca por suplementos nutricionais com a finalidade de melhorar os parâmetros de saúde em geral é crescente. A suplementação de ácidos graxos ω3 está cada vez mais acessível. Devido às suas propriedades anti-inflamatórias, os benefícios da suplementação, assim como os mecanismos das respectivas vias de sinalizações são alvos de pesquisas em diversos grupos. Dentre as pesquisas desenvolvidas, uma via de sinalização que se destacou foi a via do reconhecimento do ω3 através do GPR120.

A hipótese do estudo realizado é que em diferentes condições inflamatórias, o receptor GPR120 se alteraria de acordo com o grau inflamatório. Além disso, que o GPR120 possa ser um ponto importante no controle do sistema imune. Ademais, hipotetizamos que os ácidos graxos ω3 possam contribuir para melhor o prognóstico na sepse, uma vez que possui propriedades anti-inflamatórias e está envolvido no imunometabolismo.

4 Objetivo Geral

Avaliar o comportamento da expressão do receptor GPR120 (*Ffar4*) perante diferentes tônus inflamatórios *in vitro* e *in vivo*; avaliar a suplementação de ω3 como possível coadjuvante no tratamento da sepse.

4.1 Objetivos Específicos

- Etapa 1. Mapear a distribuição do receptor GPR120 em células do sistema imune.
- Etapa 2. Avaliar a expressão do *Ffar4* em diferentes quadros inflamatórios no tecido adiposo epididimal.
    - Caracterizar os modelos experimentais de (1) dieta hiperlipídica (HF) a curto (3 dias) ou longo prazo (60 dias); septicemia induzida por ligadura

e perfuração do ceco (CLP) e por administração de lipopolissacarídeo (LPS).

- Avaliar o padrão de expressão gênica do *Ffar4* no tecido adiposo, de acordo com os modelos experimentais anteriormente descritos;

♦ Etapa 3 – Avaliação do impacto do palmitato e do LPS em linhagens celulares de adipócitos e macrófagos

- Caracterizar o tratamento com palmitato e com LPS em linhagens RAW 264.7 e 3T3-L1 através da avaliação de TNFα e IL1β por RT-qPCR;
- Avaliar o padrão de expressão gênica do *Ffar4* de acordo com os tratamentos anteriormente descritos;

♦ Etapa 4 – Avaliação do impacto dos ácidos graxos ω3 sobre o quadro de sepse.

- Tratar previamente (5 dias) os camundongos C57BL/6J com fontes alimentares de ω3 (óleo de linhaça e óleo de peixe) e avaliar a probabilidade de sobrevivência;
- Em ambos os modelos de indução inflamatória, avaliar a via de sinalização controlada pelo GPR120.

5 Material e Métodos

5.1 Análise in silico – Single Cell RNA sequencing data

Para a análise de dados de sequenciamento de RNA *Single cell* (scRNAseq) de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), aproveitamos um conjunto de dados composto por 67.688 células de um doador saudável da 10X Genomics (https://doi.org/10.1038/ncomms14049) disponível publicamente em https://www.10xgenomics.com/resources/datasets/. As células dentro dos percentis 5º e 95º do tamanho da biblioteca (número de transcrições detectadas) foram mantidas para análise após controle de qualidade. A análise foi realizada na linguagem de programação científica R utilizando o pacote Seurat (v3) (https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.031). Os dados foram normalizados e estabilizados por variância usando o método SCTransform em Seurat; em seguida, a redução da dimensionalidade foi realizada usando Aproximação e Projeção de Manifold baseada em difusão (dbMAP) (https://doi.org/10.1038/s41598-020-76488-2), uma adaptação de Aproximação e Projeção de Manifold Uniforme (UMAP) mais adequada para dados de *Single cell*. Os principais tipos de células foram apreendidos por transferência de âncora da referência canônica *pbmc3k* usando a função FindTransferAnchors. Os níveis de expressão normalizados de *Ffar4, Tlr4* e *CD14* (um marcador de monócitos) foram visualizados na projeção dbMAP usando a função Seurat DimPlot.

5.2 Animais Experimentais

Camundongos C57BL/6J machos, entre 7 a 10 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e do *The Jackson Laboratory*, com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP – CEUA/UNICAMP (#5421-1/2019) e do Comite de Uso e Cuidados de Animais da Universidade de Yale (#2022-20290), foram utilizados na realização deste trabalho. Para o protocolo de *overtraining*, os animais utilizados foram

provenientes da Universidade de São Paulo (USP), com comitê de ética aprovado sob número I.D. 2016.5.84.90.0. Receberam água e as dietas *ad libitum*, e ficaram acondicionados em ambiente com temperatura (21 °C ± 2) e fotoperíodo (12/12 horas claro/escuro) controlados. Os animais foram submetidos a 4 diferentes protocolos de indução à inflamação. A descrição dos protocolos segue detalhada abaixo.

Para análise da influência do genótipo PPARγ $^{+/-}$ na expressão do gene *Ffar4*, foram utilizadas amostras de tecido adiposo já extraídas e processadas de camundongos com deleção de apenas uma cópia do gene PPARγ, dispensados da apresentação do comitê de ética. As amostras foram gentilmente cedidas pelo laboratório do Prof. William Festuccia da Universidade de São Paulo.

5.3 Protocolos de indução à inflamação

A. Inflamação Induzida por Dieta

Sabendo que a dieta hiperlipídica (HF), rica em gordura saturada, funciona como excelente modelo de indução do processo inflamatório de baixo grau (Figura 4), dois grupos de animais foram submetidos a diferentes tempos de exposição à dieta, sendo um grupo submetido a curto prazo (3 dias) e o outro a longo prazo (60 dias)[54]. A dieta foi baseada no modelo proposto pelo *American Institute of Nutrition* (1993)[55], tendo sido modificado seu conteúdo de gordura de 4% para 35%, de acordo com Moraes e colaboradores[54] (Tabela 1).

Ingredientes	Dieta hiperlipídica (g)
Amido (Q.S.P.) *	115.5
Caseína	200
Amido de milho dextrinizado	132
Sacarose	100
Óleo de soja	40

Banha	312
Celulose	50
Mix de minerais	35
Mix de vitaminas	10
L-cistina	3
Bitartarato de colina	2.5
Total	**1000**

Tabela 1. Dieta modificada para 35% de lipídios. 312 g de banha + 40 g de óleo de soja[54]. *Q.S.P. – Amido adicionado em Quantidade Suficiente Para – completar 1000 g de dieta. **AIN – *American Institute of Nutrition*, segundo Reeves[55].

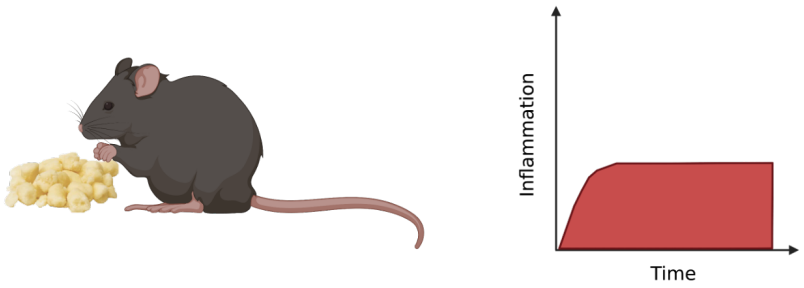


Figura 4. Protocolo de dieta hiperlipídica (HF). Os animais expostos à dieta hiperlipídica apresentam inflamação crônica e de baixo grau.

B. Sepse induzida por ligadura e perfuração do ceco

Para indução de um processo inflamatório de alto grau, animais experimentais foram submetidos a um procedimento cirúrgico para a ligadura e perfuração do ceco (CLP), com subsequente instalação do quadro de sepse (Figura 5)[56]. Neste protocolo, os animais receberam dieta comercial *ad libitum*. Como controle, foi utilizado o grupo Sham, o qual foi submetido à laparotomia porém sem perfuração do ceco. Para isso, todos os animais foram previamente anestesiados com xilazina (10 mg/Kg) e ketamina (80 mg/Kg), seguidos por assepsia. A cirurgia CLP consiste na laparotomia seguida de exposição do ceco. Dois protocolos diferentes foram adotados: 1) Ligadura do ceco com fio de seda no final do ceco, com perfuração de uma ponta a outra (2 perfurações),

seguido de sutura da cavidade abdominal e da pele, também com fio de seda, com sutura descontínua, ponto simples. No pós operatório, o Tramadol (25 mg/Kg) foi utilizado como analgésico em dose única. 2) Ligadura do ceco com fio de seda a 1 cm de distância do final do ceco, com apenas uma perfuração feita com agulha de 20-gauge no final do ceco. Para sutura, utilizou-se fio *chromic gut 4-0* e fio de polipropileno 5-0 para a sutura da pele, com a técnica de sutura contínua, chuleio simples.

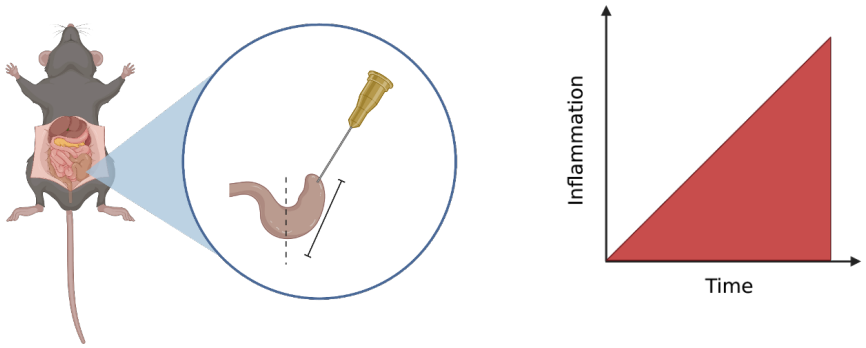


Figura 5. Protocolo de ligadura e perfuração do ceco (CLP). Os animais submetidos à cirurgia CLP apresentam inflamação progressiva e de alta intensidade.

C. Sepse induzida por administração de lipopolissacarídeo

Outro modelo de sepse adotado foi a indução por meio da administração de lipopolissacarídeo (LPS) (Figura 6). Neste protocolo, os animais receberam dieta comercial *ad libitum*. Assim como no protocolo anterior, duas estratégias foram adotadas: 1) Administração via intraperitoneal de LPS (*Escherichia coli* O111:B4 – Sigma #L2630) 10 mg/Kg, diluído em PBS, enquanto o grupo controle recebeu salina 0,9%. Após a administração de LPS, Tramadol 25 mg/Kg, foi utilizado como analgésico. 2) Administração de LPS (*Escherichia coli* O55:B5 - Sigma #L2880) 6 mg/Kg via intraperitoneal, diluído em PBS, com agulha de insulina, enquanto o grupo controle recebeu PBS.

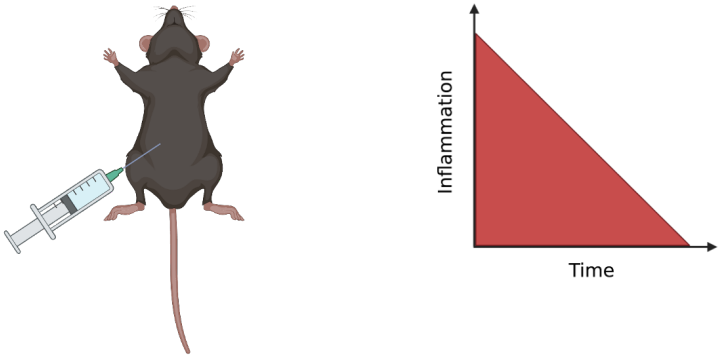


Figura 6. Protocolo de lipopolissacarídeo (LPS). Os animais que recebem LPS via intraperitoneal apresentam inflamação aguda e não progressiva.

D. Protocolo de *overtraining*

Apesar do exercício físico ser considerado benéfico à saúde humana e animal, dependendo da sua carga e intensidade, pode trazer prejuízos ao organismo. Neste protocolo, os animais receberam dieta comercial *ad libitum*. Assim, camundongos C57BL/6J foram distribuídos em 3 diferentes grupos: sedentários (SED), treino moderado *downhill* (TRD) e *overtraining downhill* (ODT). O exercício físico aplicado aos grupos TRD e ODT foi corrida em esteira. Os protocolos foram realizados por 8 semanas, sendo que os treinos moderados foram realizados 3 vezes na semana (segunda, quarta e sexta = 1080 minutos) correspondendo a 52,5% de velocidade de exaustão, enquanto o protocolo de *overtraining* consistiu em 5 dias consecutivos de treino (segunda à sexta = 2475 minutos), correspondendo à 65% de velocidade de exaustão[57].

5.4 Avaliação da temperatura e massa corporal

Após indução da sepse por CLP ou LPS, os camundongos foram mantidos em gaiolas individuais e monitorados duas vezes ao dia. A temperatura do animal foi aferida através de termômetro com sonda retal (Digi-Sense #EW-20250-91) e a massa corporal foi medida com balança de precisão.

5.5 Gavagem com óleos (Óleo mineral, óleo de linhaça e óleo de peixe)

O bolus de ácidos graxos como óleo mineral, óleo de linhaça ou óleo de peixe, indução pré-sepse, foi realizado por gavagem com agulha de alimentação (Cadence Science #9921) e seringa de 1 mL. Os animais foram submetidos a gavagem diária por 5 dias consecutivos antes do início do protocolo de sepse (Figura 7). Os camundongos estiveram agrupados em 5, com grade de alumínio na parte debaixo durante o período de gavagem. A grade de alumínio na parte de baixo da caixa, em cima da maravalha, evitou o comportamento coprofágico.

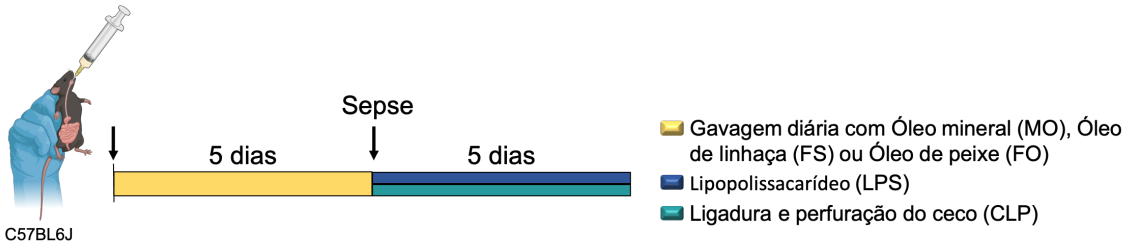


Figura 7. Desenho experimental dos protocolos de gavagem de ω3 prévia à indução a sepse. Os animais receberam gavagem diariamente por cinco dias consecutivos, então foram submetidos aos protocolos de sepse por LPS ou CLP. Após submetidos à sepse, foram acompanhados por mais cinco dias.

5.6 Composição corporal

Para avaliação da composição corporal, utilizou-se o equipamento Echo-MRI (Echo Medical Systems, Houston, TX USA), antes e após a oferta de gavagem. O aparelho consiste em espectroscopia de ressonância magnética nuclear, capaz de criar contraste entre os tecidos moles através da diferença entre os prótons de hidrogênio gerados em momentos de relaxamento. Além disso, pulsos de rádio causam sinais que geram alto contrsaste entre gordura, massa magra e livre e água.

5.7 Glicemia

No intuito de monitorar as possíveis variações glicêmicas, foi utilizado glicosímetro (Accu-chek e iPET PRO). Após jejum de 8 horas, por meio de secção pequena na extremidade da cauda do animal, obteve-se aproximadamente 1 gota de

sangue, a qual foi adicionada à tira reagente já inserida no aparelho. A leitura foi feita em mg/dL.

5.8 Extração tecidual e coleta sanguínea

Para a realização de análises bioquímicas e moleculares em tecidos biológicos, os animais dos protocolos de HF, CLP 1 e LPS 1 ficaram 8 horas em jejum e, em seguida anestesiados por injeção intraperitoneal de Xilazina (10mg/kg) e Ketamina (80mg/kg). Após perda dos reflexos pedal e corneal, foi coletado o sangue através de punção cardíaca, seguida de perfursão com salina 0,9%. Então, foram coletados o tecido adiposo epididimal, armazenados à -80 °C até o momento do processamento.

Para a coleta sanguínea dos animais envolvidos nos protocolos de CLP 2 e LPS 2, os animais foram alocados em contensores de acrílico 2 horas antes da coleta para aclimatação (Figura 8). Em seguida, 500 uL de salina foram injetados via subscapular para aumento da volemia. Então, o sangue foi coletado em tubos capilares heparinizados. Ao final, os animais foram alocados à câmara de isuflurano e, após perderem os reflexos corneal e pedal, os tecidos foram coletados.

Figure 8. Animal em contensor de acrílico. Os animais foram alocados em contensores de acrílico duas horas antes da coleta sanguínea pela veia caudal.

5.9 Dosagem hormonal e de proteínas séricas

Para mensuração da insulina sérica, utilizou-se o kit de ELISA, marca Mercodia® (10-1247-01) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Para citocinas e quimiocinas utilizou-se método de quantificação pela tecnologia Luminex xMAP. A análise de multiplexação foi realizada utilizando-se o sistema Luminex™ 200 (Luminex, Austin, TX, EUA) da Eve Technologies Corp. (Calgary, Alberta).

5.10 Ácidos graxos não esterificados (NEFA)

Como parte das respostas metabólicas, os NEFAs são interessantes indicativos do quadro catabólico. Para isso, o NEFA foi medido pelo kit HR Series NEFA-HR da Fujifilm (#999-34691, # 995-34791, #991-34891, #993-35191, # 276-76491 – Lexington, MA), de acordo com as instruções do fabricante.

5.11 Cultura Celular

Em paralelo às investigações em roedores, linhagens celulares podem ser úteis na identificação de possíveis mecanismos envolvidos nas alterações observadas em animais. Assim, linhagens celulares (originadas de *mus musculus*) RAW 264.7 (macrófago) e 3T3-L1 (adipócitos) foram utilizadas nos experimentos de cultura celular. A linhagem RAW 264.7 foi cultivada com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – Sigma Aldrich) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB – Sigma Aldrich) e 1% Penicilina e Estreptomicina (PS – Sigma Aldrich). Enquanto a linhagem 3T3-L1 foi mantida com DMEM suplementado com 10% de Soro Bovino Adulto (SBA – Sigma Aldrich) e 1% PS até o plaqueamento atingir 100% da confluência. Para a diferenciação da linhagem 3T3-L1, foi utilizado o meio de diferenciação 1 (DMEM 10% SFB, 1% PS, adicionado 1 μg/mL de insulina (#13566 – Sigma Aldrich), 1 μM de dexametasona (#D1756 – Sigma Aldrich) e 0,5 mM de IBMX (#15879 – Sigma Aldrich)) por 48 horas e o meio de diferenciação 2 (DMEM 10% SFB, 1% PS, adicionado 1 μg/mL de insulina) até as células estarem completamente diferenciadas, com evidente formação de vesículas de gordura dentro das células (entre 7 a 15 dias), com troca do meio a cada 2 a 3 dias (Figura 9). Os plaqueamentos foram feitos em placas de 24 poços com concentração de células em $0{,}5x10^5$. As células foram mantidas nas condições de 37 °C, sob atmosfera umidificada, contendo 5% de CO_2.

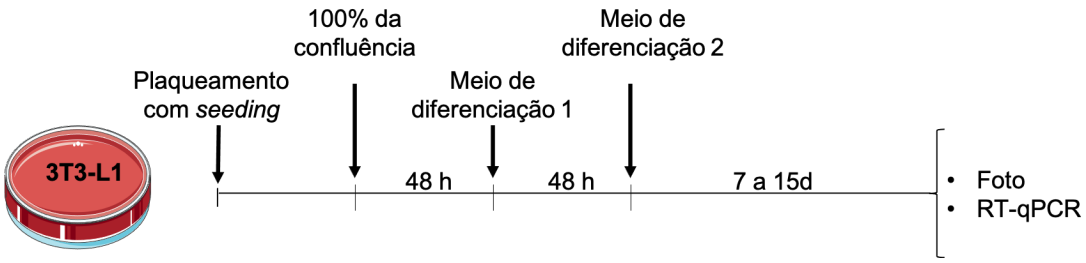


Figura 9. Desenho experimental protocolo de diferenciação 3T3. A linhagem 3T3-L1 foi mantida com DMEM suplementado com 10% de Soro Bovino Adulto (SBA – Sigma Aldrich) e 1% PS até o plaqueamento atingir 100% da confluência. Após atingir 100% da confluência trocou-se o meio (DMEM + 10% SBA + 1%PS). Então, para a diferenciação da linhagem 3T3-L1, foi utilizado o meio de diferenciação 1 por 48 horas e o meio de diferenciação 2 até as células estarem completamente diferenciadas, com evidente formação de vesículas de gordura dentro das células (entre 7 a 15 dias), com troca do meio a cada 2 a 3 dias.

5.12 Tratamento com LPS e Palmitato

No intuito de mimetizar desfechos observados nos roedores após estímulos com LPS e dieta hiperlipídica, células foram tratadas com agentes similares. Primeiramente, utilizou-se a dose de LPS (*Escherichia coli* O111:B4 – Sigma #L2630 ou *Escherichia coli* O55:B5 - Sigma #L2880) 10 µg/mL por 6 h e 24 h nas linhagens RAW 264.7 e 3T3-L1. Para o tratamento dose-resposta com LPS, tanto 6 h quanto 24 h foram utilizadas as seguintes doses 0,5 ng/mL, 5 ng/mL, 50 ng/mL e 500 ng/mL. Para o tratamento com Palmitato, utilizou-se solução de 5 mM de palmitato de sódio (Sigma #P9767) e 3,75% BSA (564,2uM - Sigma #A7030), o que resultou em solução com proporção aproximada de 1:9 de BSA para palmitato de sódio. Tanto em 6 h quanto 24 h, as seguintes concentrações foram utilizadas: 25 µM, 50 µM, 250 µM e 500 µM.

5.13 Tratamentos com LPS e IL1β recombinante em meios condicionados

Dentre as possíveis citocinas envolvidas na modulação da expressão das respostas metabólicas observadas em experimentos anteriores, por conveniência, selecionou-se a IL1β recombinante para continuidade nas investigações. Assim, para o ensaio com meio condicionado com LPS, adotou-se o protocolo a seguir. Células

RAW 264.7 confluentes foram tratadas com LPS em diferentes doses (0,5 ng/mL, 5 ng/mL, 50 ng/mL e 500 ng/mL) por 24 h, com posterior coleta do meio condicionado. Com a cultura de 3T3-L1 confluente, coletou-se metade do meio de cultura da 3T3-L1 e adicionou-se ao meio de cultura condicionado com LPS da linhagem RAW 264.7, totalizando metade do meio condicionado com LPS da RAW e metade do meio condicionado da 3T3-L1 (Figura 10). Após 24 h de exposição aos meios condicionados, as células foram coletadas.

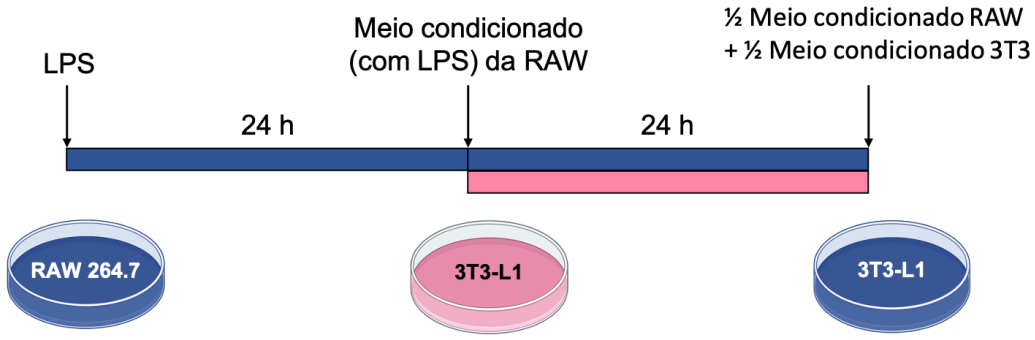


Figura 10. Desenho experimental do ensaio de meio condicionado com LPS. As diferentes doses de LPS foram adicionadas ao meio de cultura da linhagem RAW por 24 h. Após esse período, na linhagem 3T3-L1, metade do meio de cultura foi retirado e posteriormente adicionado metade do meio condicionado da RAW contendo LPS.

Para o ensaio com meio condicionado com o peptídeo da IL1β, adotou-se o mesmo protocolo descrito anteriormente porém com a substituição do LPS por IL1β recombinante nas seguintes concentrações: 0,5 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL e 50 ng/mL. Ao final, os meios de cultura totalizaram metade do meio condicionado com IL1β da linhagem RAW e metade do meio condicionado da linhagem 3T3-L1 (Figura 11). Após 24 h de exposição aos meios condicionados, as células foram coletadas.

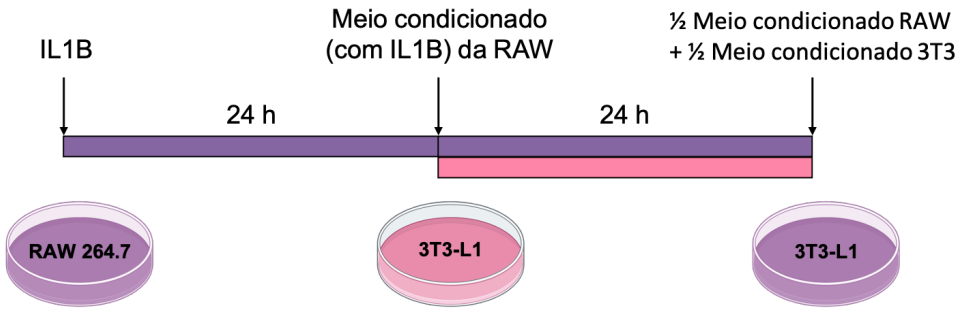


Figura 11. Desenho experimental do ensaio de meio condicionado com IL1β. As diferentes doses de IL1β foram adicionadas ao meio de cultura da linhagem RAW por 24 h. Após esse período, na linhagem 3T3-L1, metade do meio de cultura foi retirado e posteriormente adicionado metade do meio condicionado da RAW contendo IL1β.

5.14 Macrófagos derivados da medula óssea (BMDM)

Para verificar a presença do GPR120 em macrófagos, foi feito o ensaio de isolamento dos macrófagos derivados da medula óssea (BMDM). Assim, com os camundongos anestesiados com Xilazina (10 mg/Kg) e Ketamina (80 mg/Kg), a medula óssea foi coletada da tíbia e fêmur, recolhida a um tubo tipo falcon, com DMEM. Após centrifugação, o pellet foi ressuspenso em meio de cultura celular L929. As células foram incubadas durante 7 dias.

5.15 Cultura primária de adipócitos

Com os camundongos anestesiados com xilazina (10 mg/Kg) e Ketamina (80 mg/Kg) todo o tecido adiposo inguinal foi coletado e reduzidos a fragmentos mínimos com utilização de tesoura com meio DMEM/F12. Aos tecidos adicionou-se solução de HEPES e colagenase tipo 1 (5000 unidades ativas/mL de água destilada). Os tubos tipo falcon permaneceram no agitador por 1 h, a 115 rpm, 37 ºC. Após período de digestão tecidual, a solução foi filtrada em filtro de malha de 240 mm. O tecido adiposo acima do filtro foi homogeneizado e as células (fração vascular do estroma – SVF) abaixo do filtro foram cultivadas ou homogeneizadas[58].

5.16 RT-qPCR

Para analisar o padrão de comportamento gênico em todos os métodos adotados, utilizou-se a técnica da quantificação em tempo real (RT) da reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (PCR). Fragmentos de tecidos ou células foram extraídos e homogeneizados em *PureZOL™ RNA Isolation Reagent* (Bio-Rad) ou com o kit de extração de RNA RNeasy® (Qiagen), com utilização do *Tissue Lyser II* (Qiagen). O RNA total foi isolado de acordo com as recomendações do fabricante, sendo quantificado em Nanodrop 8000 (Thermo Scientific). Uma alíquota de RNA total contendo 2 μg foi utilizada para síntese de cDNA, com o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (ThermoFisher), no *AgileCycler*™ (Avans) ou com o kit SuperScrip IV Reverse Transcriptase (ThermoFisher #18090010), no C1000 Touch Thermal Cycler. Para a reação de qPCR utilizou-se *iTaq Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad) ou *PerfeCTa SYBR® Green FastMix* (QuantaBio), no *7500 Fast Real-Time PCR* (ThermoFisher) ou no *CFX96 Real-Time System* (Bio-Rad). Para as análises, adotou-se a quantificação pelo ΔΔCt, verificação da amplificação das amostras e do NTC (*No Template Control*) na *melt curve*. Os primers utilizados foram os seguintes:

Gene		**Sequência (5′ – 3′)**
***Ffar4* - 1**	Forward	CAACCGCATAGGAGAAATCT
	Reverse	GGACTCCACATGATGAAGAA
***Ffar4* - 2**	Forward	TCATATGGGGTTACTCGGCG
	Reverse	ATCACAATGACCAGTCCCGG
***Ffar4* - 3**	Forward	CCATCCCTCTAGTGCTCGTC
	Reverse	TGCGGAAGAGTCGGTAGTCT
Tnfa	Foward	GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT
	Reverse	GCCATAGAACTGATGAGAGGGAG
Il1b	Foward	GCCACCTTTTGACAGTGATGA
	Reverse	GATGTGCTGCTGCGAGATTT
Il-6	Forward	CCAGTTTGGTAGCATCCATCATTTCT

Gapdh	Reverse	GACTTCCATCCAGTTGCCTTCTTGG
	Foward	AACTTTGGCATTGTGGAAGG
Actb	Reverse	ACACATTGGGGGTAGGAACA
	Foward	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
Tuba1a	Reverse	GGCTGTATTCCCCTCCATCG
	Foward	CGGGCAGTGTTTGTAGACTTGG
Rpl13a	Reverse	CTCCTTGCCAATGGTGTAGTGC
	Forward	GAGGTCGGGTGGAGTACCA
	Reverse	TGCATCTTGGCCTTTTCCTT

Tabela 2. Sequências dos primers utilizados no RT-qPCR.

5.17 Espectrometria de Massas das dietas experimentais e soro dos animais

No intuito de identificar a presença, composição e o comportamento por síntese ou degração, dos ácidos graxos em dietas ou tecidos biológicos, as frações lipídicas das amostras foram extraídas utilizando-se a técnica de Folch (1957)[59], em que 1 mL de Clorofórmio:Metanol (2:1) foi adicionado em um eppendorf com aproximadamente 0,6 g de cada tipo de dieta/tecido. O conteúdo foi homogeneizado por vórtex e posteriormente centrifugado. O sobrenadante foi coletado (150 μL) e utilizado para as análises. Os lipídios das dietas e do soro dos animais foram metilados pelo método proposto por Shirai, Suzuki e Wada (2005)[60], utilizando 150 μL das frações lipídicas da dieta e do soro. As amostras foram transferidas para tubos de ensaios com tampa, posteriormente foi adicionado 1 mL de NaOH metanólico, 50 μL de padrão interno (#91988 – Sigma-Aldrich) e 30 μL de BHT (Sigma-Aldrich). As amostras foram agitadas no vórtex e aquecidas em banho maria por 15 minutos, à 100 ºC. Para o soro, foi adicionado 2 mL de BF_3 (trifluoreto de boro, Sigma-Aldrich), posteriormente foram agitadas e aquecidas por 20 segundos. Para a dieta, adicionou-se 2 mL de reagente de esterificação, foram agitadas e aquecidas por 5 minutos. Em seguida, para todas as amostras, adicionou-se 1 mL de isoctano, agitou-se as amostras e adicionou-se 5 mL de NaCl saturado. O sobrenadante do tubo foi utilizado para a

análise. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram analisados no espectrômetro de massas modelo GCMS-QP2010-Ultra (Shimadzu). Para análise, seguiu-se as seguintes condições de operação: coluna Stabilwax de 30 m, com diâmetro interno de 0,25 mm e espessura de 0,25 μm (Restek, EUA). Como gás de arraste foi utilizado o hélio de alta pureza, com fluxo constante de 1 mL/min. Injetou-se 1.0 μL da amostra, com razão de divisão do injetor de 1:15, com temperatura do injetor em 80 °C. As condições do massa foram: voltagem de ionização de 70eV; temperatura da fonte do íon 200 °C, com modo de varredura completo nos intervalos de massa entre 35-500, com 0,2 s/varredura de velocidade. A temperatura da máquina inicial foi de 80 °C, por 2 minutos, com aumento até 150 °C e depois 180 °C, durante 10 minutos. Em seguida, a temperatura foi aumentada para 240 °C e assim permaneceu durante 50 minutos[60].

5.18 Análise Estatística

Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade por Shapiro Wilk, seguido pelo teste de igualdade de variância Bartlett´s. Para os grupos expostos à dieta hiperlipídica foi utilizado o teste *t* de Student. Para os dados não normais, foi utilizado o teste de Mann Whitney. Enquanto que nos protocolos de LPS e CLP, para dados normais foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com post-test de Bonferroni. Para dados com distribuição não normal, foi usado o teste de Kruskal Wallis. O número amostral para cada análise variou de 4 a 9 por grupo, dependendo do protocolo, nos experimentos com animais. Enquanto nos experimentos com células, o número amostral variou de 3 a 4 por grupo e o teste estatístico utilizado foi *One-Way* ANOVA com post-test Bonferroni. Os *outliers* foram retirados quando indicados pelo teste de *Grubbs*. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão da média. O nível de significância adotado foi de 5% ($p<0,05$).

5.19 Imagens

Todas as imagens do trabalho são originais, criadas pela autora, por meio da ferramenta Power Point (Microsoft®) ou no site BioRender.com.

6 Resultados

6.1 Etapa 1

A análise *in silico* do projeto consistiu na avaliação em sistema de célula única (Single Cell) para mapeamento do gene do GPR120 (*Ffar4*) em células do sistema imune do sangue periférico. Dessa forma, primeiramente, foi realizada tal análise para identificar quais tipos celulares do sistema imune poderiam apresentar o receptor GPR120 em sua superfície (Figura 12A). Posteriormente, o mapeamento do *Ffar4* identificou a localização predominante em monócitos e células dendríticas (Figura 12B). A fim de confirmar a especificidade do mapeamento do *Ffar4*, foi realizado o mapeamento do gene do TLR4 e de CD14 (Figura 12C e 12D).

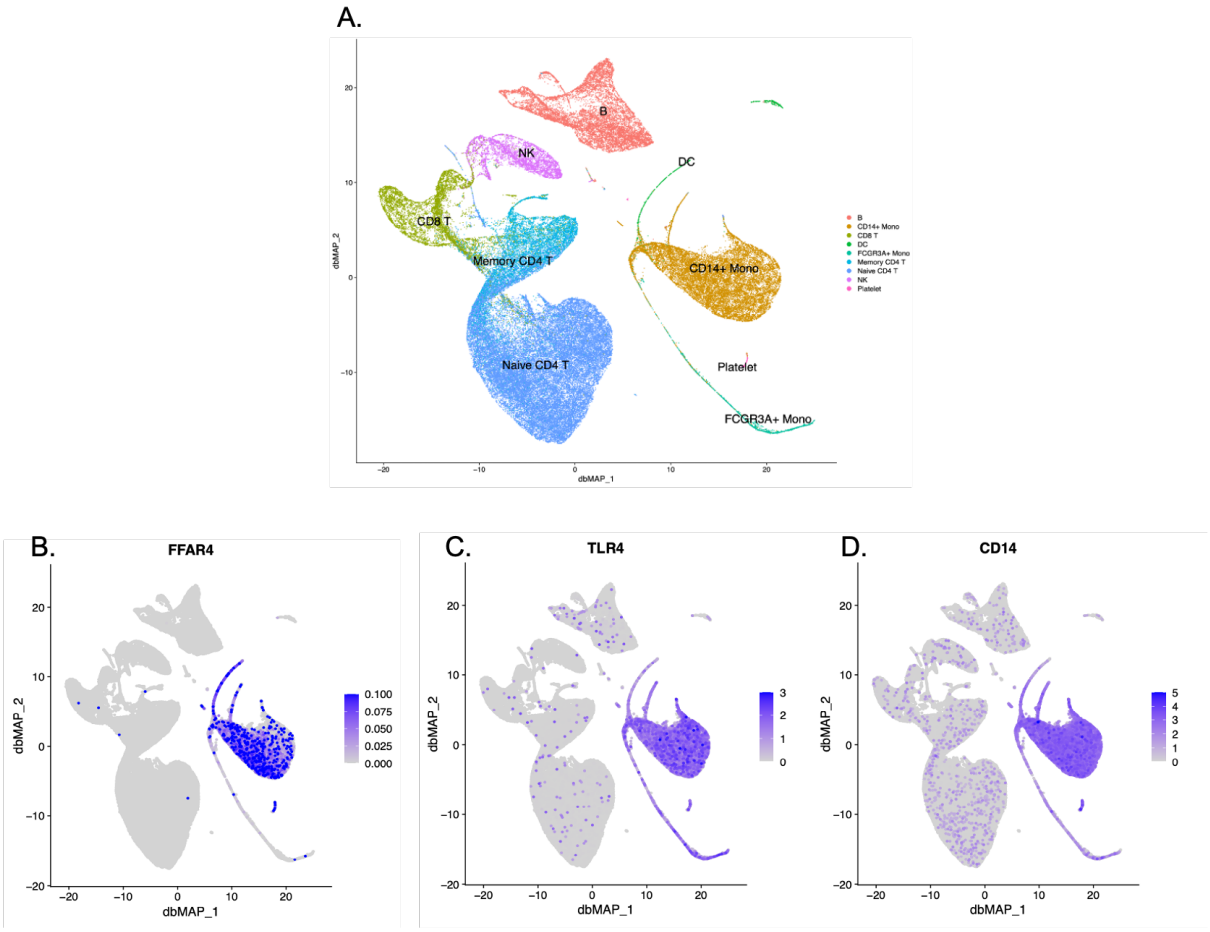


Figura 12. Mapeamento do *Ffar4* através de análise *Single Cell*. A. Marcadores específicos de células imunes. B. Mapeamento do *Ffar4*. C. Mapeamento do TLR4. D. Mapeamento do CD14.

6.2 Etapa 2

A Etapa 2 do presente trabalho consistiu na caracterização dos modelos experimentais bem como a avaliação da expressão de *Ffar4* (GPR120) no tecido adiposo epididimal, na presença de diferentes estímulos inflamatórios, em animais C57BL/6J machos. Assim, o primeiro protocolo verificado foi o de exposição à dieta hiperlipídica. Previamente ao início dos protocolos, realizou-se análise do perfil de ácidos graxos das dietas dos roedores (Tabela 3). Verificou-se que a dieta hiperlipídica contêm ≅ 45% mais gordura saturada, ≅ 28,64% mais ácidos graxos monoinsaturados, ≅ 42% menos ácidos graxos poli-insaturados, ≅ 60,56% menos ω3, ≅ 51,72% menos ω6, mas a razão ω6 para ω3 (ω6:ω3) está maior ≅ 18,81% ($12_{\omega6}$:$1_{\omega3}$) quando comparado à dieta controle ($9_{\omega6}$:$1_{\omega3}$) (Figura 13).

Ácido graxo	Denominação	Dieta controle	Dieta hiperlipídica
C10:0	Cáprico	ND	0.083 ± 0.032
C12:0	Láurico	ND	0.1 ± 0.017
C13:0	Tridecanóico	1.44 ± 0.099	0.467 ± 0.163
C14:0	Mirístico	0.105 ± 0.007	1.44 ± 0.078
C14:1	Miristoleico	ND	0.020
C15:0	Pentadecanóico	0.045 ± 0.007	0.083 ± 0.006
C16:0	Palmítico	14.495 ± 0.431	20.953 ± 0.047
C16:1	Palmitoleico	0.115 ± 0.007	2.443 ± 0.076
C17:0	Heptadecanóico	0.115 ± 0.007	0.43 ± 0.017
C17:1	Cis-10-Heptadecenóico	0.055 ± 0.007	0.31 ± 0.010
C18:0	Esteárico	3.68 ± 0.071	11.303 ± 0.071
C18:1	Oleico	25.73 ± 0.622	33.987 ± 1.641
C18:1	Oleico	2.275 ± 1.195	3.44 ± 0.297
C18:1	Oleico	ND	0.105 ± 0.021
C18:2	Linoleico	46.125 ± 0.997	21.653 ± 0.061

C18:3	γ-Linolênico	ND	0.0467 ± 0.029
C19:0	Nonadecanóico	ND	0.017 ± 0.012
C19:1	Cis-10-Nonadecanóico	ND	0.037 ± 0.012
C18:3	α-Linolênico	4.69 ± 0.226	1.853 ± 0.075
C20:0	Eicosanóico	0.380	0.257 ± 0.015
C20:1	Cetoléico	0.290	0.757 ± 0.032
C20:1	Erúcico	0.340	0.030
C20:2	11,13-Eicosadienóico	ND	1.005 ± 0.092
C20:2	Cis-11,14-eicosadienóico	0.030	ND
C20:3	Cis-5,8,11-Eicosatrienóico	ND	0.035 ± 0.007
C20:3	Di-homo-γ-Linolênico	ND	0.177 ± 0.038
C20:4	Araquidônico	ND	0.3 ± 0.010
C22:0	Docosanóico	0.37 ± 0.028	0.087 ± 0.012
C22:4	6,9,12,15-Docosatetraenóico	0.100	ND
C22:4	Cis-7,10,13,16-Docosatetraenóico	ND	0.11 ± 0.010
∑Saturados		19.19 ± 0.552	34.773 ± 0.176
∑Monoinsaturados		28.49 ± 1.768	39.927 ± 0.542
∑Poli insaturados		50.88 ± 1.315	24.833 ± 0.520
∑ω3		4.69 ± 0.226	1.853 ± 0.075
∑ω6		46.14 ± 1.018	22.287 ± 0.032
∑ω6:ω3		9.84 + 0.258	12.038 ± 0.484

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos da dieta controle e da dieta hiperlipídica. As análises foram feitas em duplicata para dieta controle e triplicata para dieta hiperlipídica. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão da média.

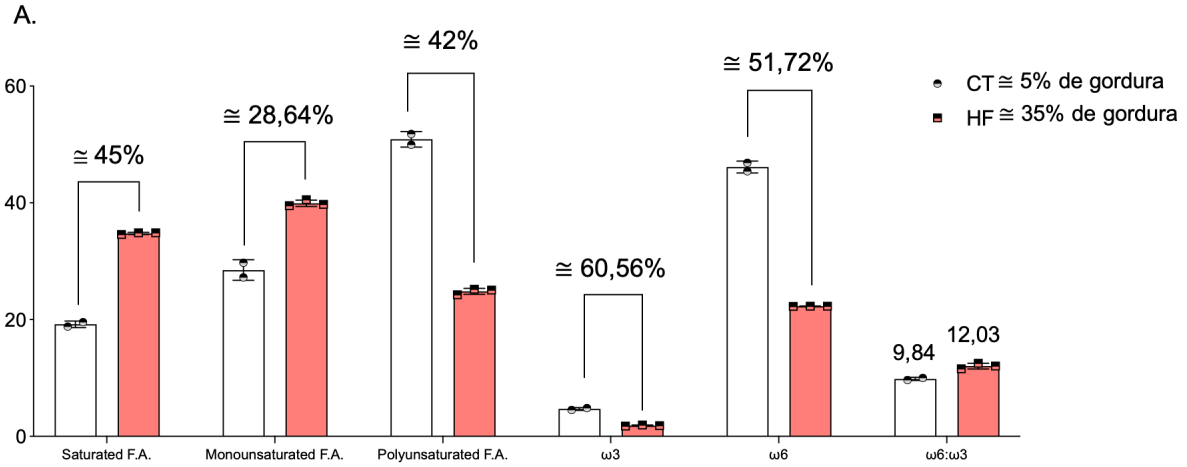


Figura 13. Somatória do perfil de ácidos graxos da dieta controle e da dieta hiperlipídica . As análises foram feitas em duplicata para dieta controle e em triplicata para dieta hiperlipídica. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão da média.

Posteriormente, essas dietas foram oferecidas *ad libitum* aos roedores dos protocolos de indução à inflamação de baixo grau por exposição à dieta hiperlipídica (HF), por curto (3 dias) e longo prazo (60 dias). Após 3 dias de consumo de dieta hiperlipídica, os animais mantiveram a massa corporal (Figura 14A) e a glicemia de jejum em relação ao grupo CT (Figura 14B).

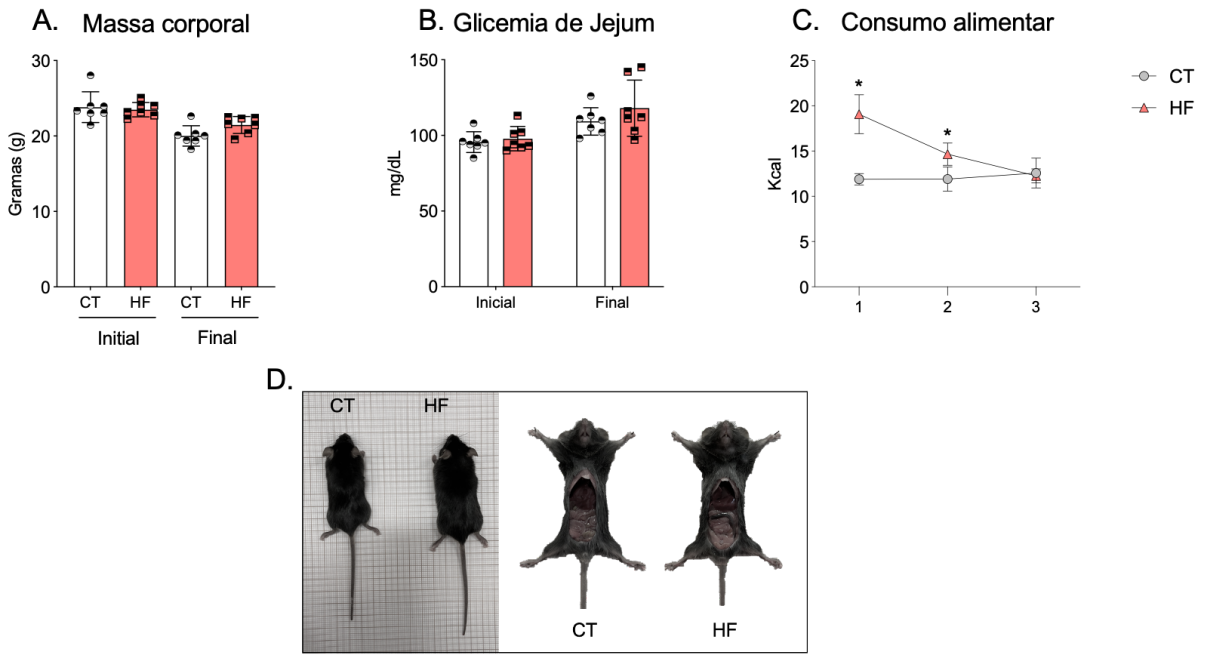


Figura 14. Caracterização fenotípica do modelo experimental de dieta hiperlipídica 3 dias. A. Massa corporal inicial e final. B. Glicemia de jejum. C. Análise do consumo alimentar. D. Foto representativa do grupo CT e grupo HF. Cada grupo foi representado por 7 animais. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão da média. O teste utilizado foi teste T, para os dados normais e o teste de Kruskal Wallis para os dados não normais. Para diferença significativa ($p < 0,05$) foi adotado "*".

Após 60 dias de consumo de dieta hiperlipídica, os animais do grupo HF mantiveram a progressão de aumento da massa corporal em relação ao grupo CT, com diferença significativa a partir da quinta semana do experimento (Figura 15A-B). O consumo alimentar foi avaliado semanalmente, porém sem diferença significativa entre os grupos (Figura 15C), entretanto, a dieta HF foi eficiente em elevar a glicemia de jejum dos animais em relação ao CT (Figura 15D). Por fim, antes e durante a eutanásia dos animais, fotos representativas foram adquiridas (Figura 15E).

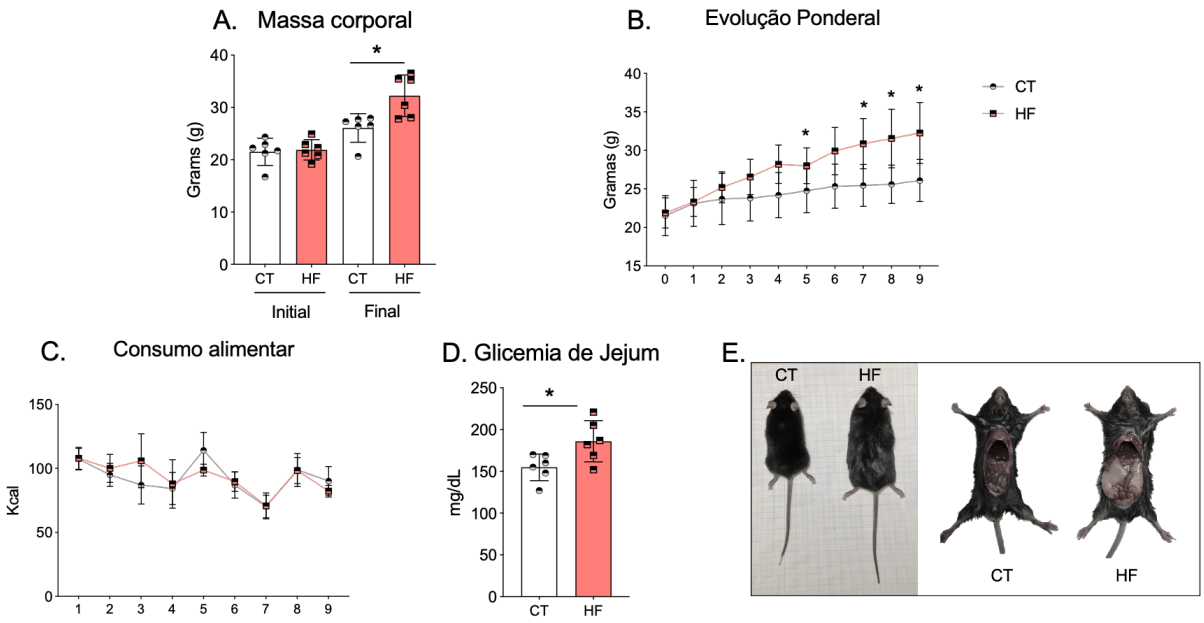


Figura 15. Caracterização fenotípica do modelo experimental de dieta hiperlipídica 60 dias. A. Massa corporal inicial e final. B. Evolução da massa corporal semanal. C. Consumo alimentar avaliado semanalmente. D. Glicemia de jejum. E. Foto representativa do grupo CT e grupo HF. Cada grupo foi representado por 6 animais. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão da média. O teste utilizado foi teste *t*, para os dados normais e o teste de Kruskal Wallis para os dados não normais. Para diferença significativa (p <0,05) foi adotado "*".

Após 60 dias de consumo de dieta HF, o perfil de ácidos graxos do soro dos animais foi avaliado. Houve aumento no total de ácidos graxos saturados, e poli-insaturados (Figura 16O e 16Q), associados ao aumento específico dos ácidos graxos C16:0 e C18:0 (Figura 16C e 16F) para saturados e C18:3, C20:4 e C22:6 (Figura 16I, 16M e 16N) para poli-insaturados. O total de ácidos graxos ω3 e ω6 também se mostrou aumentado no grupo HF em relação ao CT, com respectiva diminuição na razão entre ω6: ω3 no soro dos animais HFD (Figura 16R-T).

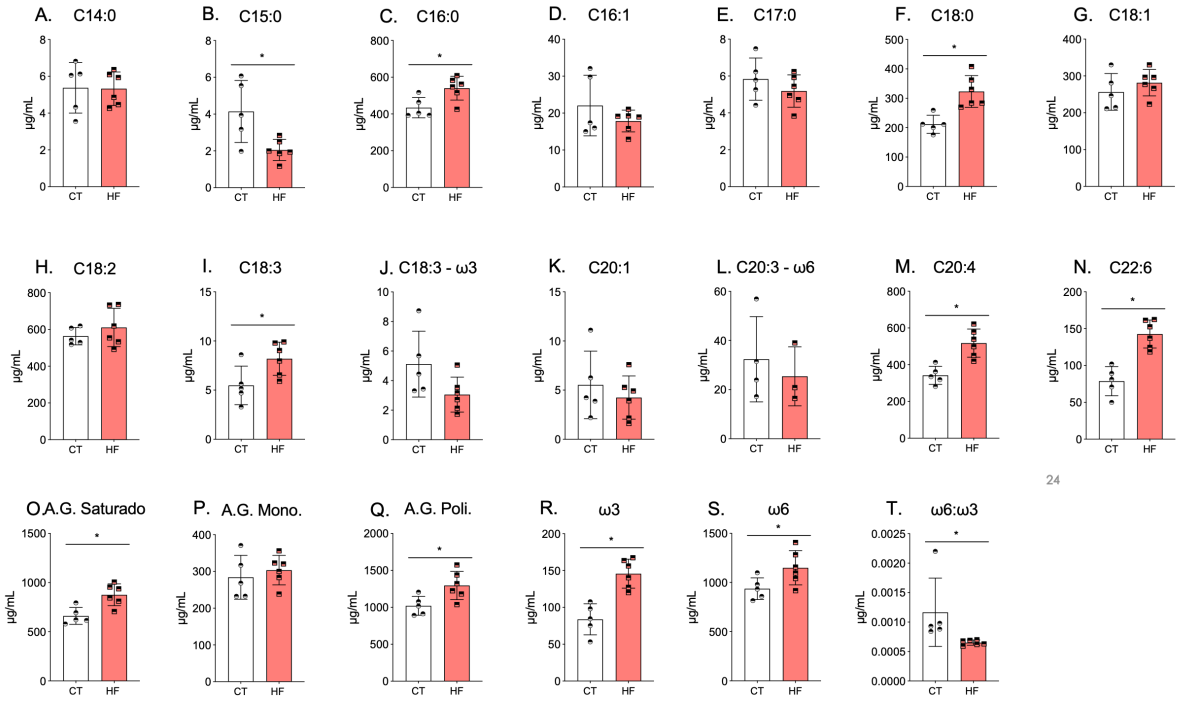


Figura 16. Perfil de ácidos graxos do soro HFD 60 dias. A. C14:0 – Ác. Mirístico. B. C15:0 – Ác. Pentadecanóico. C. C16:0 – Ác. Palmítico. D. C16:1 – Ác. Palmitoleico. E. C17:0 – Ác. Heptadecanoico. F. C18:0 – Ác. Esteárico. G. C18:1 – Ác. Oleico. H. C18.2 – Ác. Linoleico. I. C18:3 – Ác. γ-Linolênico. J. C18:3 – Ác. α-Linolênico. K. C20:1 – Ác. Gadoleico. L. C20:3 – Ác. Di-homo-γ-Linolênico. M. C20:4 – Ác. Araquidônico. N. C22:6 – Ác. Docosa-hexaenóico. O. Somatória dos ácidos graxos saturados. P. Somatória dos ácidos graxos monoinsaturados. Q. Somatória dos ácidos graxos Poli-insaturados. R. Somatória dos ácidos graxos ω3. S. Somatória dos ácidos graxos ω6. T. Razão ω6: ω3. Cada grupo foi representado por 5 amostras. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão da média. Para diferença significativa (p <0,05) foi adotado "*".

No intuito de se investigar modelos experimentais em alto grau de inflamação, foram iniciados protocolos de indução de sepse através do protocolo de CLP. Após o período experimental houve diminuição da glicemia de jejum dos grupos CLP 24 h e CLP 48h em relação aos grupos Sham 24 h e 48 h, respectivamente (Figura 17B).

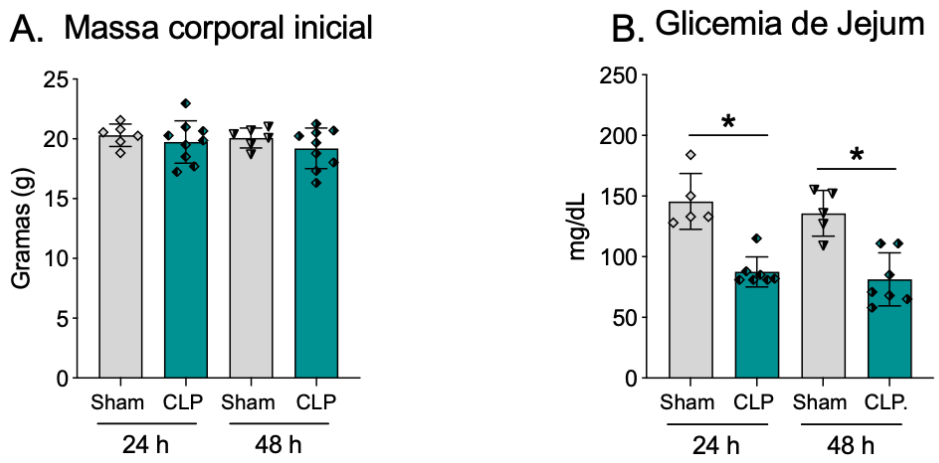


Figura 17. Caracterização fenotípica do modelo experimental de sepse induzida por CLP. A. Massa corporal inicial 24 h e 48 h. B. Glicemia de jejum realizada com 8 h de jejum. O grupo Sham foi representado por 6 animais e o grupo CLP por 9 animais. Valores expressos em média ± desvio padrão. O teste utilizado foi One-Way ANOVA, seguido de pos teste de Bonferroni. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado "*" .

A indução de sepse por meio da administração de LPS também foi utilizada. Ao final dos períodos experimentais, notou-se diminuição da massa corporal no grupo LPS 48 h em relação ao CT 48 h (Figura 18B-C). O grupo LPS 24 h teve redução da glicemia de jejum comparado ao grupo CT 24 h (Figura 18D).

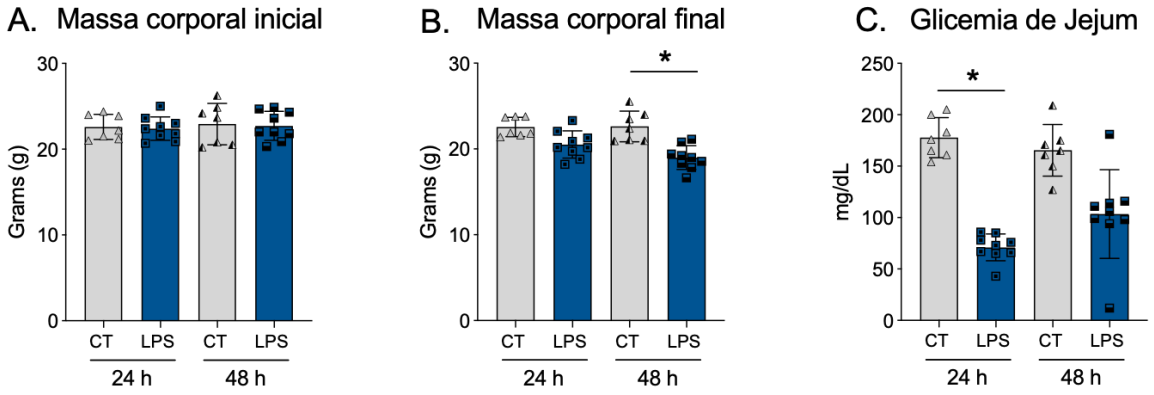


Figura 18. Caracterização fenotípica do modelo experimental de sepse induzida por LPS. A. Massa corporal inicial dos grupos. B. Massa corporal após o protocolo de LPS. C. Glicemia de jejum realizada com 8 h de jejum. O grupo Sham foi representado por 9 animais e o grupo CLP por 9 animais. Valores

expressos como média ± desvio padrão. O teste utilizado foi One-Way ANOVA, seguido do pós teste de Bonferroni. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado, sendo "*".

Posteriormente às caracterizações fenotípicas dos diversos protocolos de indução inflamatória de baixo e alto grau, foi avaliada por RT-qPCR a presença de transcritos inflamatórios, como *Tnfa* e *Il1b*. Houve aumento do conteúdo de RNA mensageiro de *Tnfa* nos grupos LPS 24 h e CLP 48 h em relação ao CT 24 h e Sham 48 h respectivamente (Figura 19A). Em relação ao gene *Il1b*, houve aumento nos grupos LPS 24 h e 48 h, CLP 24 h e 48 h, em relação aos seus respectivos controles (Figura 19B). Nos grupos HF 3 dias e 60 dias não houve diferença em relação ao *Tnfa* ou *Il1b* (Figura 19A-B). Além dos marcadores inflamatórios, foi observado o padrão do comportamento do receptor GPR120, por meio da expressão de seu gene, o *Ffar4*. Houve redução na expressão de *Ffar4* nos grupos LPS 24 h, CLP 24 h e 48 h comparados aos seus grupos controles respectivamente (Figura 19C).

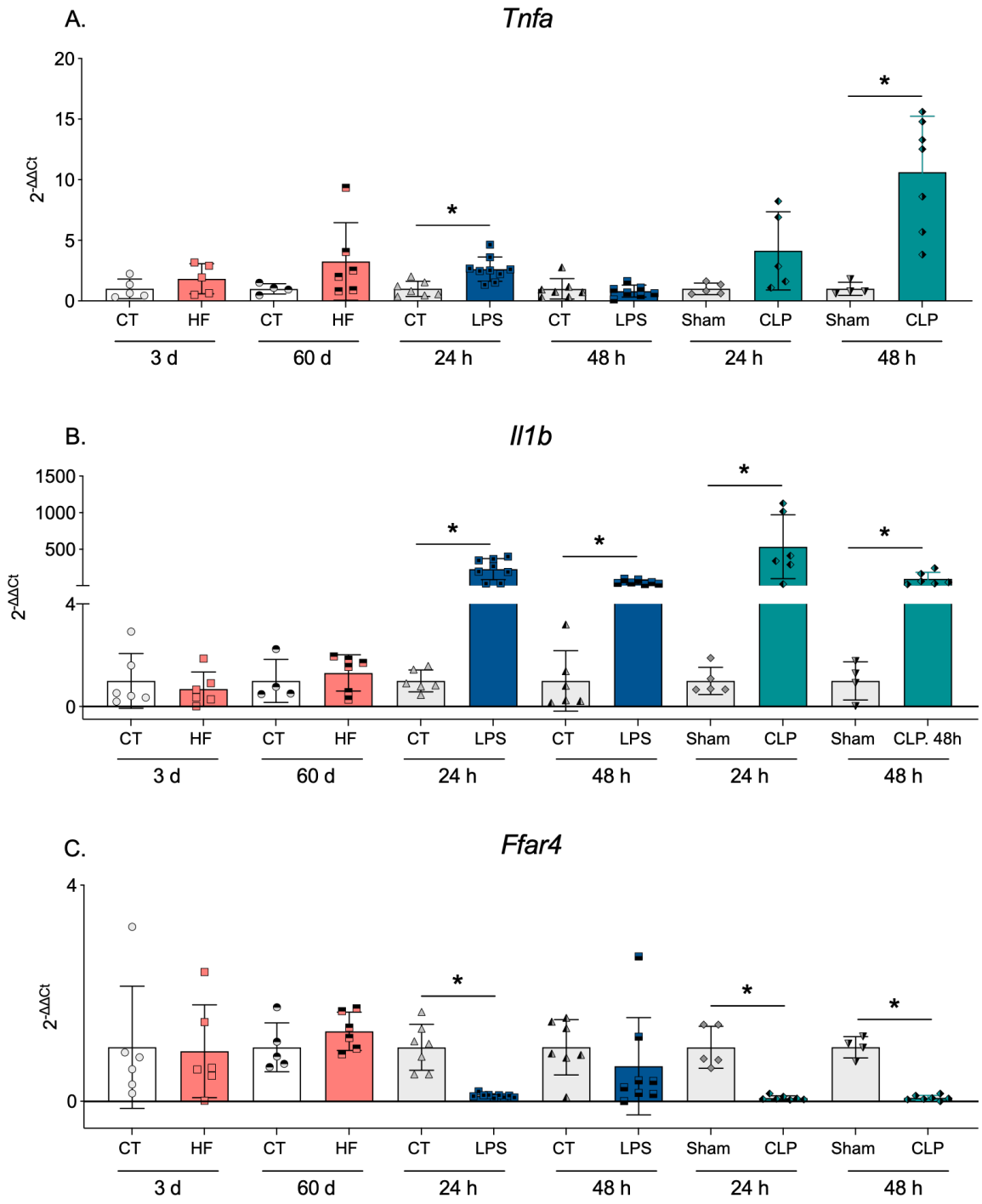


Figura 19. Avaliação da expressão gênica de marcadores inflamatórios *Tnfa* e *Il1b* e do receptor *Ffar4*. A. Níveis de RNA mensageiro de *Tnfa*. B. Níveis de RNA mensageiro de *Il1b*. C. Níveis de RNA mensageiro de *Ffar4*. Valores expressos como média ± desvio padrão. Para os protocolos HFD foram utilizados os endógenos Tuba1a e Gapdh. Utilizou-se o teste *t* para os dados normais, e teste de Kruskal Wallis para dados não normais. Para os protocolos de LPS e CLP foi utilizado o endógeno Gapdh. Utilizou-se o teste One-Way ANOVA, seguido de pós teste de Bonferroni. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado, sendo "*".

Para complementar o entendimento diante dos diferentes quadros inflamatórios e o GPR120, o *Ffar4* também foi avaliado em protocolo de *overtraining*. O grupo OTD apresentou maior expressão do *Ffar4* comparado aos grupos SED e TRD (Figura 20A).

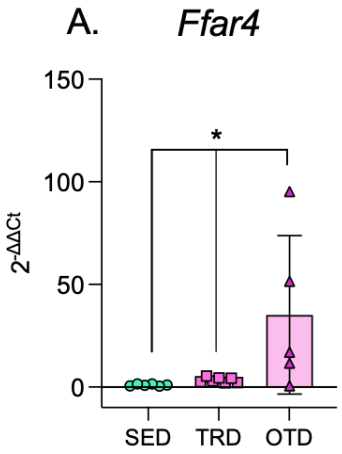


Figura 20. Avaliação da expressão gênica do *Ffar4* em modelo *overtraining*. A. Níveis de RNA mensageiro de *Ffar4*. O grupo SED continha 6 animais e os grupos TRD e OTD continham 5 animais.. Utilizou-se o teste One-Way ANOVA, seguido de pós teste de Bonferroni. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado, sendo "*".

6.3 Etapa 3

Uma vez observado os impactos dos protocolos inflamatórios em animais experimentais, sobre o gene *Ffar4*, iniciou-se a ETAPA 3 do trabalho, que consistiu na caracterização dos processos inflamatórios mediados por LPS e Palmitato em linhagens de cultura celular RAW 264.7 e 3T3-L1, e a relação com a expressão do gene *Ffar4*.

Inicialmente realizou-se o ensaio de dose resposta no tempo 6 h com palmitato. Observou-se que as doses de 25 μM e 50 μM de palmitato elevou os níveis de expressão de *Tnfa* (Figura 21A), assim como a expressão de *Il1b* (Figura 21B). Além disso, o *Ffar4* aumentou em relação ao CT na dose de 500 μM de palmitato (Figura 21C).

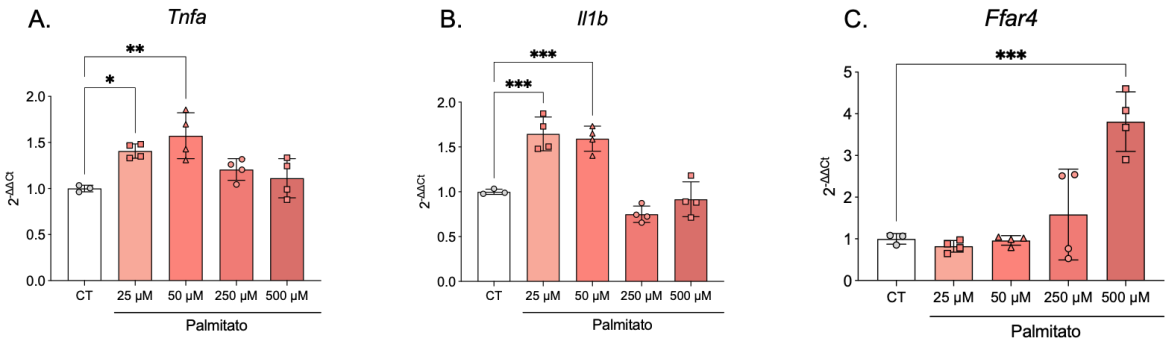


Figura 21. Ensaio de dose resposta do palmitato em 6 h em células RAW. A. Nível de RNA mensageiro *Tnfa*. B. Nível de RNA mensageiro de *Il1b*. C. Nível de RNA mensageiro de *Ffar4*. Cada grupo foi representado por n de 3-4. A expressão dos genes foi relativizada pela *Actb*. Valores expressos em média ± desvio padrão. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado "*".

Em seguida, fizemos o mesmo ensaio experimental, com as mesmas doses, porém com a coleta e avaliação do RNA mensageiro após 24 h, com a finalidade de exacerbar as respostas. Todas as doses utilizadas (25 µM até 500 µM) de palmitato foram suficientes para aumentar os marcadores inflamatórios *Tnfa* e *Il1b* (Figura 22A-B). Enquanto o *Ffar4* aumentou sua expressão nas doses 50 µM , 250 µM e 500 µM (Figura 22C).

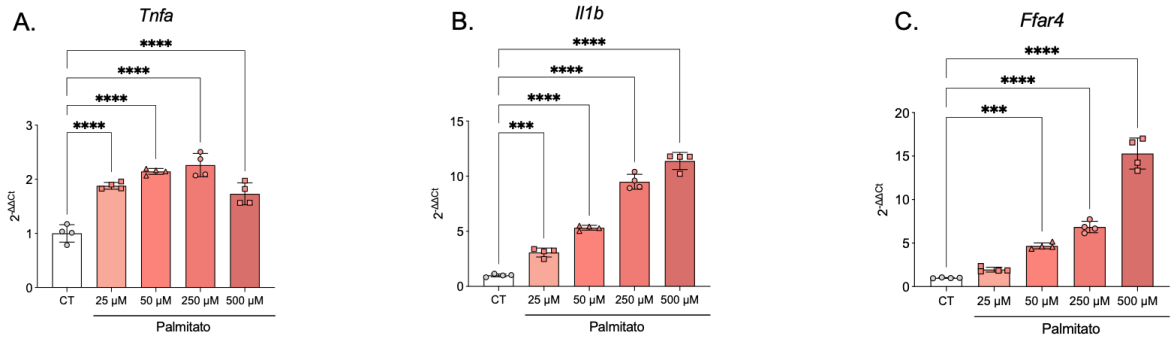


Figura 22. Ensaio de dose resposta do palmitato em 24 h em células RAW. A. Nível de RNA mensageiro *Tnfa*. B. Nível de RNA mensageiro de *Il1b*. C. Nível de RNA mensageiro de *Ffar4*. Cada grupo foi representado por n de 3-4. A expressão dos genes foi relativizada pela *Actb*. Valores expressos em média ± desvio padrão. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado "*".

Em paralelo, também foi realizado ensaio de tempo-resposta, com LPS 10 µg/mL em 6 h e 24 h, nas células RAW 246.7. Observou-se que em 6 h e 24 h os genes *Tnfa* e *Il1b* aumentaram sua expressão comparado ao grupo CT (Figura 23A-B). Por outro lado, houve redução na expressão de *Ffar4* em 6 h e 24 h, comparado ao grupo CT (Figura 23C). Ademais, a expressão do *Ffar4* voltou a aumentar no grupo 24 h em relação ao grupo 6 h (Figura 23C).

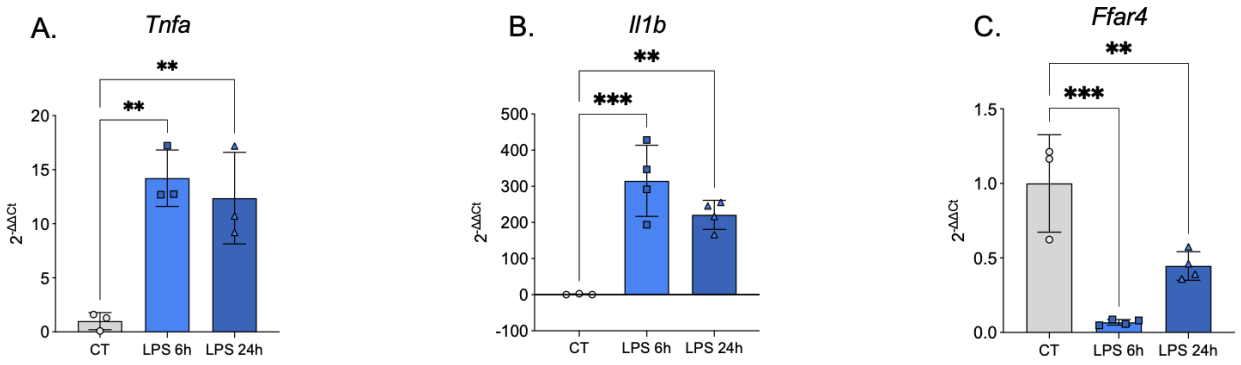


Figura 23. Ensaio de LPS 10 µg/mL em 6 h e 24 h em células RAW. A. Nível de RNA mensageiro *Tnfa*. B. Nível de RNA mensageiro de *Il1b*. C. Nível de RNA mensageiro de *Ffar4*. A expressão dos genes foi relativizada pela *Actb*. Cada grupo foi representado por n de 3-4. Valores foram expressos em média ± desvio padrão. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado "*".

Adotado o tempo 6 h, o ensaio de dose resposta com diferentes doses de LPS foi realizado. Nota-se que as doses de 50 ng/mL e 500 ng/mL de LPS apresentaram aumento de *Tnfa* comparado ao grupo CT (Figura 24A). Já a *Il1b*, apresentou aumento nas dosagens 5 ng/mL, 50 ng/mL e 500 ng/mL de LPS comparado ao CT (Figura 24B). Por fim, o gene *Ffar4* apresentou redução em todas as doses tratadas com LPS em relação ao CT (Figura 24C).

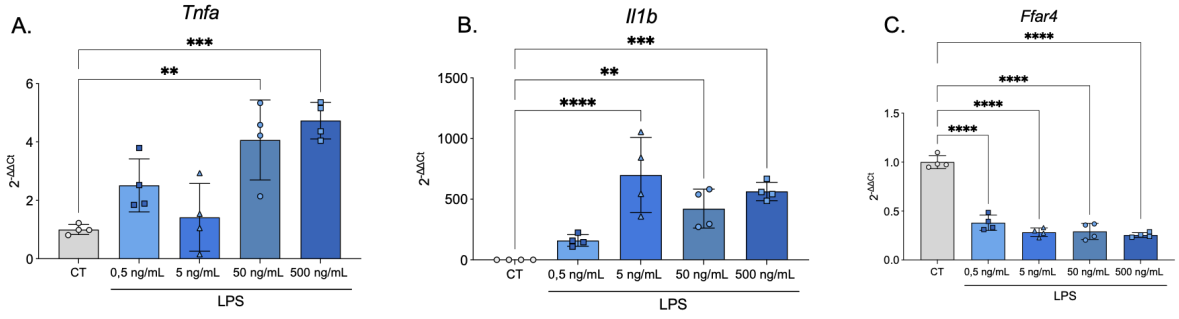


Figura 24. Ensaio de dose resposta do LPS em 6 h em células RAW. A. Nível de RNA mensageiro *Tnfa*. B. Nível de RNA mensageiro de *Il1b*. C. Nível de RNA mensageiro de *Ffar4*. A expressão dos genes foi relativizada pela *Actb*. Cada grupo foi representado por n de 3-4.Valores expressos em média ± desvio padrão. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado "*".

A partir dos achados na linhagem RAW 264.7, iniciou-se os ensaios na linhagem 3T3-L1. Inicialmente as células foram diferenciadas da 3T3-L1, para que os fibroblastos se tornassem adipócitos. As fotomicrografias demonstram êxito na condução do processo de diferenciação (Figura 25 A-C).

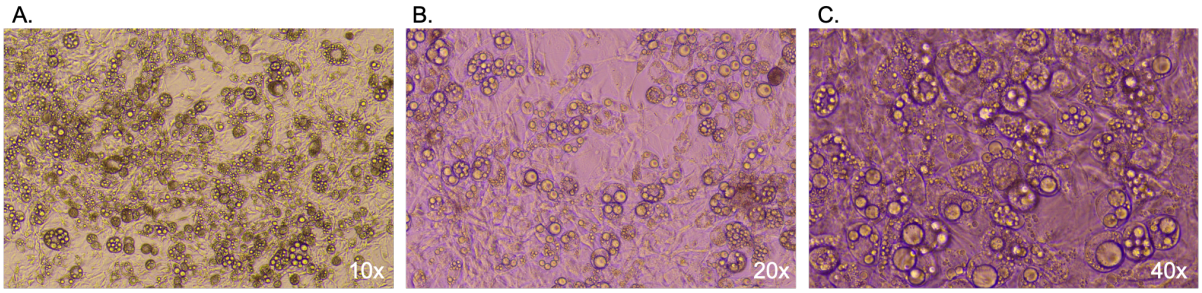


Figura 25. Fotos representativas das células 3T3 diferenciadas em aumentos de 10x (A), 20x (B) e 40x (C).

Assim como no protocolo adotado na linhagem RAW, iniciou-se o ensaio de tempo-resposta de palmitato nas células 3T3-L1, porém no tempo de 24 h. O *Ffar4* não apresentou diferença entre os grupos (Figura 26A). Os marcadores inflamatórios *Tnfa* e *Il1b* não foram detectados neste ensaio.

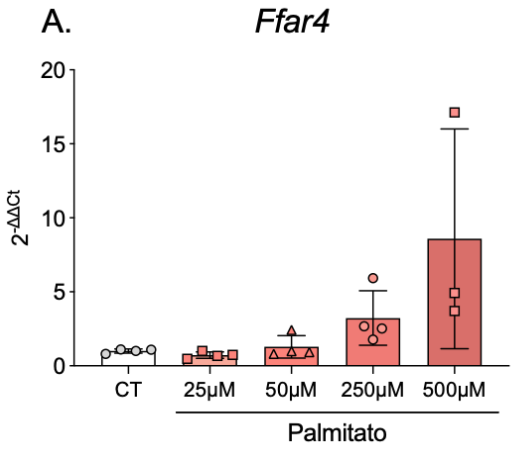


Figura 26. Ensaio de dose resposta do palmitato em 24h em células 3T3. A. Nível de RNA mensageiro de *Ffar4*. A expressão dos genes foi relativizada pela *Actb*. Cada grupo foi representado por n de 3-4. Valores expressos em média ± desvio padrão. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado "*".

Em paralelo, realizou-se o ensaio com LPS 10 µg/mL em 6 h e 24 h na linhagem 3T3-L1. Observou-se que o gene *Il1b* não alterou em 6 h e 24 h em relação ao CT (Figura 27A). Enquanto a expressão de *Ffar4* diminuiu em 6 h e 24 h comparado ao grupo CT (Figura 27B). Neste ensaio, o *Tnfa* não foi detectado.

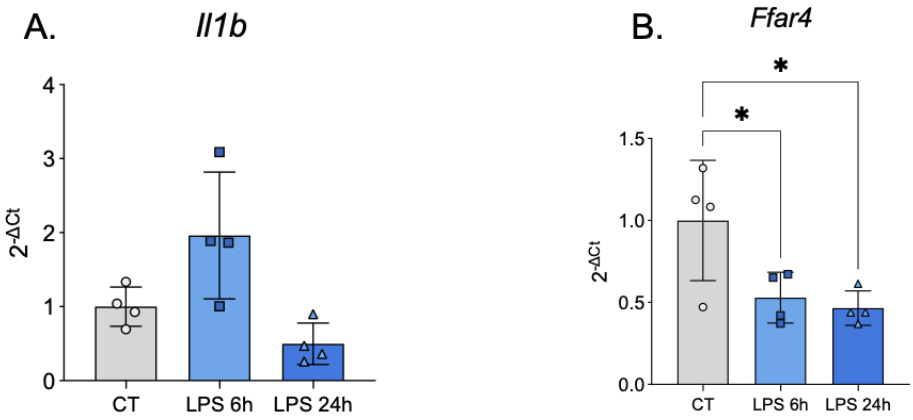


Fig 27. Ensaio de LPS 10 µg/mL em 6 h e 24 h em células 3T3-L1. A. Nível de RNA mensageiro *Il1b*. B. Nível de RNA mensageiro de *Ffar4*. A expressão dos genes foi relativizada pela *Actb*. Cada grupo foi representado por n de 3-4. Valores expressos em média ± desvio padrão . Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado "*".

Em seguida, foi feito o ensaio de dose resposta de LPS na linhagem 3T3-L1 após 24 h. Assim como o tratamento com palmitato, o *Ffar4* não apresentou diferença nas diferentes doses (Figura 28A). Os marcadores inflamatórios *Tnfa* e *Il1b* não foram detectados neste ensaio.

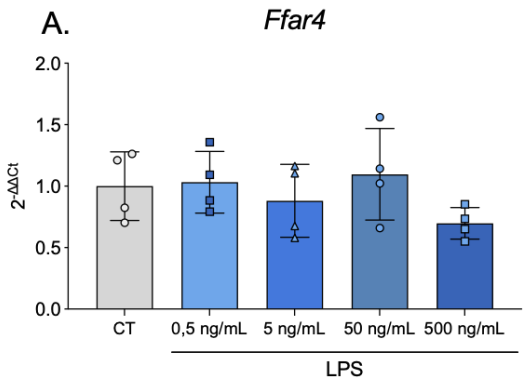


Figura 28. Ensaio de dose resposta do LPS em 24 h em células 3T3. A. Nível de RNA mensageiro de *Ffar4*. A expressão dos genes foi relativizada pela *Actb*. Cada grupo foi representado por n de 3-4. Valores expressos em média ± desvio padrão. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado "*".

Para melhor mimetizar o que ocorre no tecido adiposo, foi proposto o ensaio nas células 3T3-L1 com meio condicionado tratado com LPS ou IL1β nas células RAW 264.7, descrito previamente. O primeiro ensaio com meio condicionado foi feito com dose resposta de LPS. Após 24 h na linhagem 3T3-L1, observou-se diminuição do *Tnfa* na dose 50 ng/mL comparado ao CT (Figura 29A) e aumento de *Il1b* na dose 500 ng/mL (Figura 29B). Enquanto em relação ao *Ffar4* observou-se diminuição nas doses 0,5 e 5 ng/mL (Figura 29C).

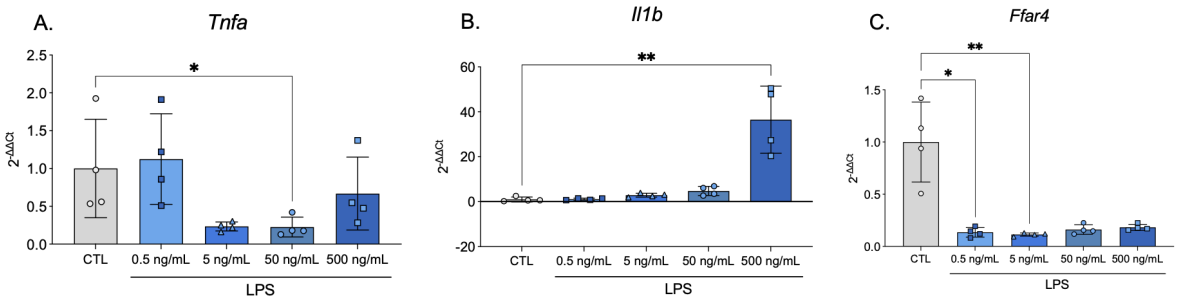


Figura 29. Ensaio de meio condicionado da RAW com LPS adicionado na 3T3. A. Nível de RNA mensageiro *Tnfa*. B. Nível de RNA mensageiro de *Il1b*. C. Nível de RNA mensageiro de *Ffar4*. A expressão dos genes foi relativizada pela *Actb*. Cada grupo foi representado por n de 3-4. Valores expressos em média ± desvio padrão. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado "*".

O próximo ensaio foi feito com o meio condicionado tratado com IL1β. Tanto o gene *Tnfa* quanto o *Il1b* não apresentaram diferença entre as doses em relação ao CT (Figura 30A-B). Contudo, o *Ffar4* diminuiu em todas as doses utilizadas (0,5 até 50 ng/mL) em comparação ao CT (Figura 30C).

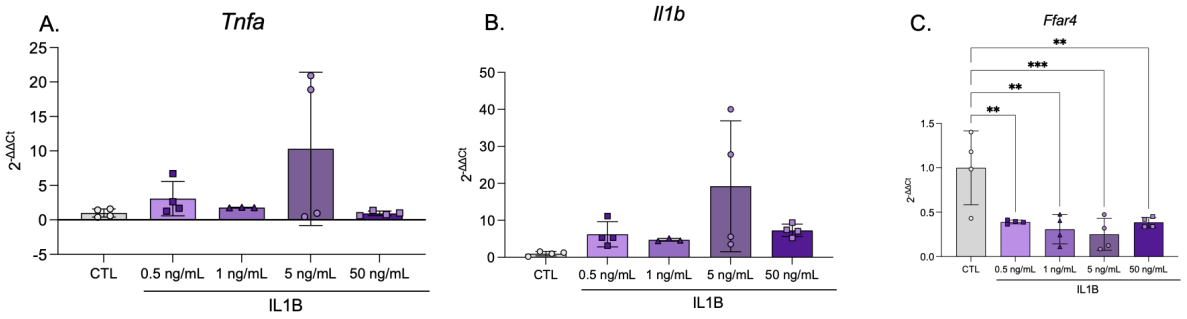


Figura 30. Ensaio de meio condicionado da RAW com IL1β adicionado na 3T3. A. Nível de RNA mensageiro *Tnfa*. B. Nível de RNA mensageiro de *Il1b*. C. Nível de RNA mensageiro de *Ffar4*. A expressão dos genes foi relativizada pela *Actb*. Cada grupo foi representado por n de 3-4. Valores expressos em média ± desvio padrão. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado "*".

Além dos ensaios com linhagem celular, macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) foram isolados de camundongos C57BL/6J. Após o cultivo de BMDM, foi feito o ensaio de dose-resposta com LPS (10 ng/mL a 500 ng/mL). O experimento foi validado com *Il6* (Figura 31 A). No entanto, não conseguimos detectar a expressão de *Ffar4*.

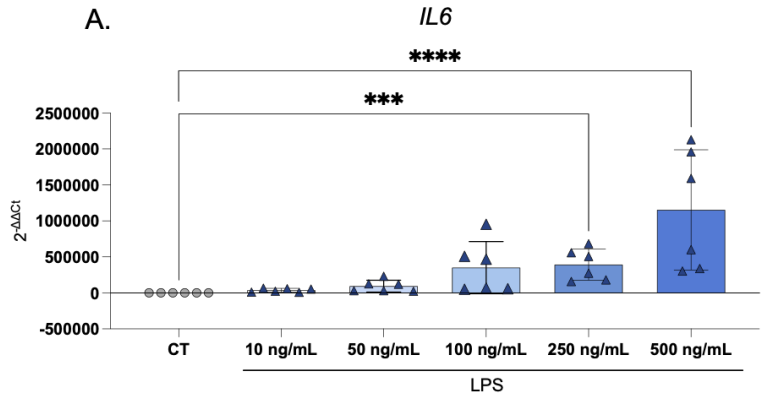


Figure 31. Ensaio de dose-resposta de LPS em BMDM. A. Verificação do experimento através da expressão gênica de IL6. A expressão dos genes foi relativizada pela *Rpl13a*. Cada grupo foi

representado por n de 5-6. Valores expressos em média ± desvio padrão. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado "*".

Então, para verificar se diferentes localizações do gene *Ffar4* poderiam ser expressos de forma diferente, em diferentes células, três primers foram testados. O primeiro primer apresenta-se entre o exon 2 e 3, o segundo primer apresenta-se entre o exon 1 e 2, e o terceiro primer apresenta-se entre o exon 1 e 3 (Figura 32).

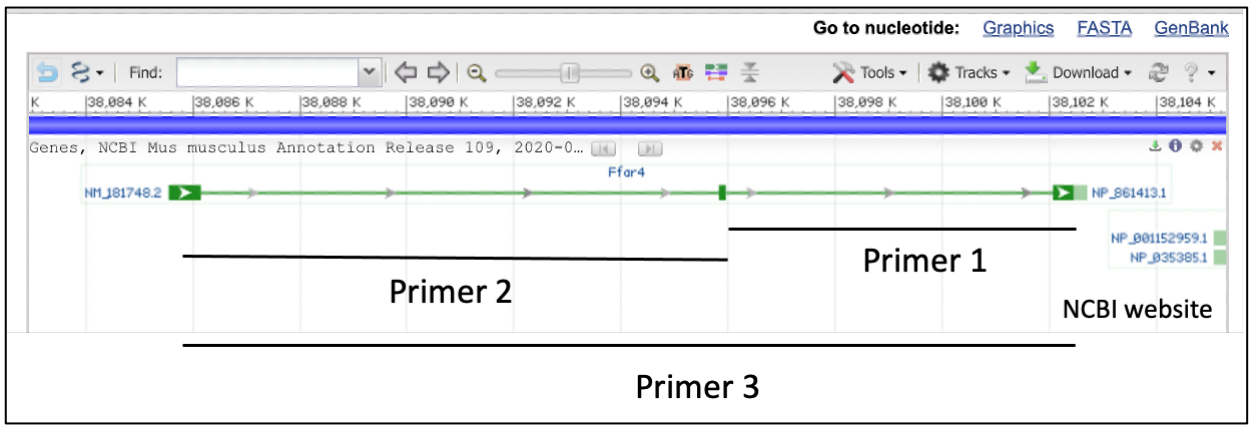


Figure 32. Desenho esquemático dos 3 diferentes primers de *Ffar4*. Figura adaptada do site do NCBI.

Os três primers foram testados no tecido adiposo branco (WAT) e no fígado 24 h após administrar LPS nos camundongos. O *Ffar4* diminuiu no grupo LPS no WAT (Figura 33A). Além disso, o *Ffar4* no fígado não se alterou (Figura 33B). Os diferentes primers tiveram o mesmo comportamento tanto no WAT quanto no fígado, porém comportamentos diferentes na *melt curve* (Figura 33C-H). Nota-se dois picos diferentes na *melt curve* do primer 3 (Figura 33G-H), o que sugerem que vários produtos de PCR estão sendo produzidos (diferentes produtos têm diferentes temperaturas de fusão com base na ligação de hidrogênio dos diferentes comprimentos e sequências de DNA). Isto pode sugerir diferentes isoformas do *Ffar4*.

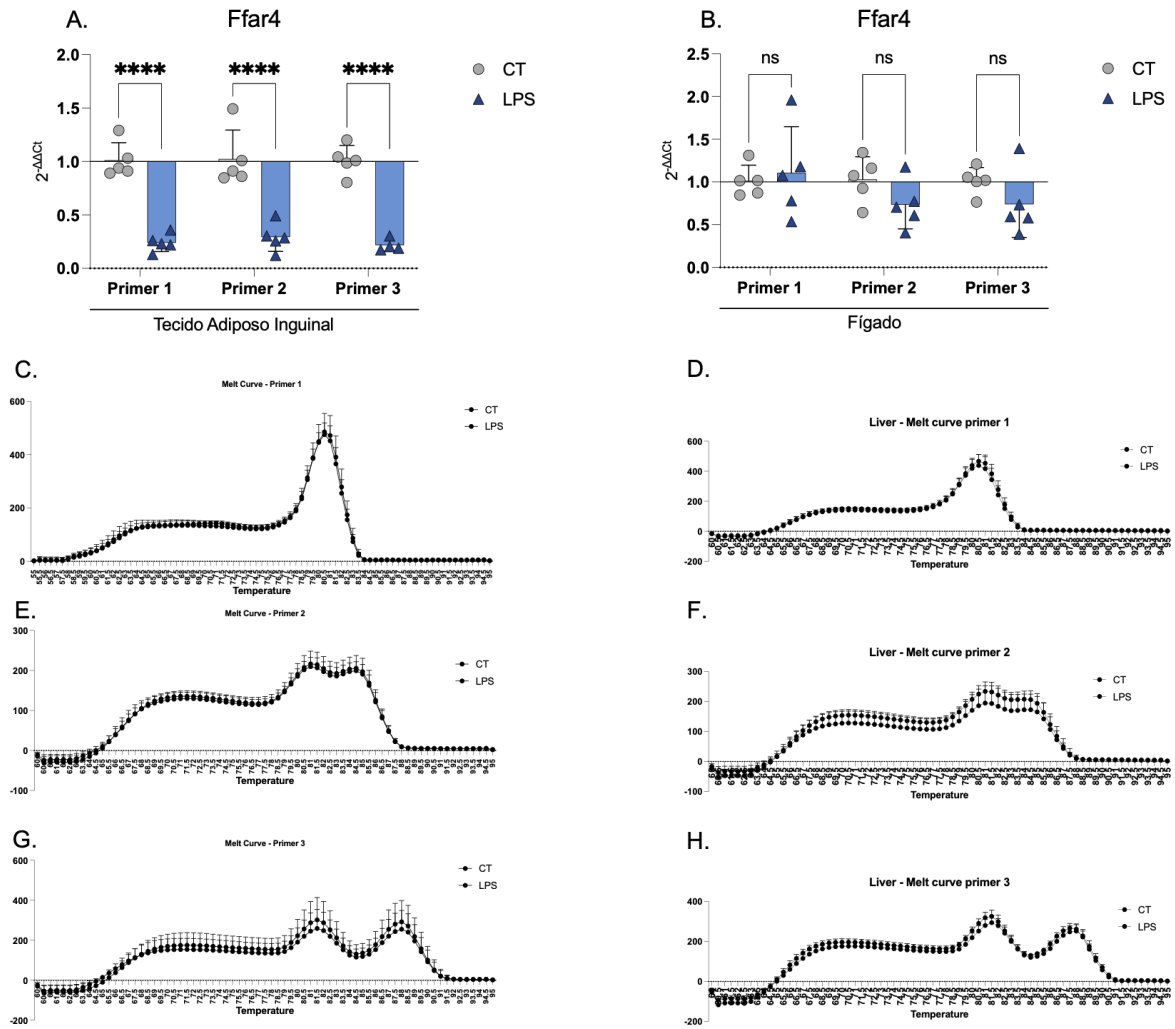
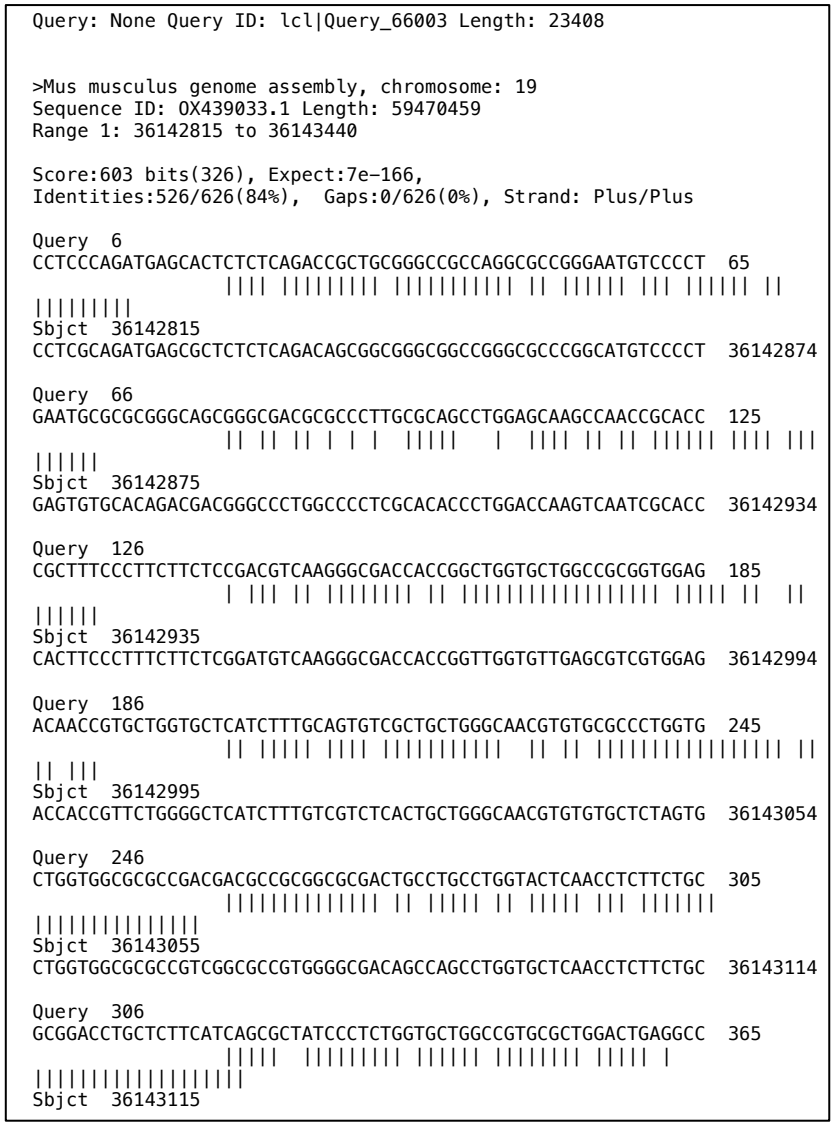


Figure 33. Padronização dos primers de *Ffar4* no WAT e no fígado 24 h após LPS. A. Expressão de *Ffar4* com os 3 primers no WAT. B. Expressão de *Ffar4* com os 3 primers no fígado. C. *Melt curve* do *Primer* 1 no WAT. D. *Melt curve* do *Primer* 1 no fígado. E. *Melt curve* do *Primer* 2 no WAT. F. *Melt curve* do *Primer* 2 no fígado. G. *Melt curve* do *Primer* 3 no WAT. H. *Melt curve* do *Primer* 3 no fígado. A expressão dos genes foi relativizada pela *Rpl13a*. Cada grupo foi representado por 5 animais. Utilizou-se o teste One-Way ANOVA, seguido de pós teste de Bonferroni. Valores foram expressos em média ± desvio padrão. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado ”*”.

Prévios estudos na literatura descreveram duas isoformas de *Ffar4* humano, uma isoforma curta e outra longa[61]. A partir desse dado, foram verificadas as semelhanças entre o *Ffar4* humanos e o de mus musculus. A sequência do gene *Ffar4* Humano tem 84% de homologia com *Ffar4* de mus musculus (Figura 34).



```
Query: None Query ID: lcl|Query_66003 Length: 23408


>Mus musculus genome assembly, chromosome: 19
Sequence ID: OX439033.1 Length: 59470459
Range 1: 36142815 to 36143440

Score:603 bits(326), Expect:7e-166,
Identities:526/626(84%),  Gaps:0/626(0%), Strand: Plus/Plus

Query  6
CCTCCCAGATGAGCACTCTCTCAGACCGCTGCGGGCCGCCAGGCGCCGGGAATGTCCCCT  65
               |||| ||||||||| |||||||||| || ||||||| ||| ||||||| ||
|||||||||
Sbjct  36142815
CCTCGCAGATGAGCGCTCTCTCAGACAGCGGCGGGCGGCCGGGCGCCCGGCATGTCCCCT  36142874

Query  66
GAATGCGCGCGGGCAGCGGGCGACGCGCCCTTGCGCAGCCTGGAGCAAGCCAACCGCACC  125
               || || || | | |  |||||   |  |||| || || |||||| |||| |||
||||||
Sbjct  36142875
GAGTGTGCACAGACGACGGGCCCTGGCCCCTCGCACACCCTGGACCAAGTCAATCGCACC  36142934

Query  126
CGCTTTCCCTTCTTCTCCGACGTCAAGGGCGACCACCGGCTGGTGCTGGCCGCGGTGGAG  185
               | ||| || |||||||| || |||||||||||||||||| ||||| ||  ||
||||||
Sbjct  36142935
CACTTCCCTTTCTTCTCGGATGTCAAGGGCGACCACCGGTTGGTGTTGAGCGTCGTGGAG  36142994

Query  186
ACAACCGTGCTGGTGCTCATCTTTGCAGTGTCGCTGCTGGGCAACGTGTGCGCCCTGGTG  245
               || ||||| |||| ||||||||||  || || ||||||||||||||||| ||
|| |||
Sbjct  36142995
ACCACCGTTCTGGGGCTCATCTTTGTCGTCTCACTGCTGGGCAACGTGTGTGCTCTAGTG  36143054

Query  246
CTGGTGGCGCGCCGACGACGCCGCGGCGCGACTGCCTGCCTGGTACTCAACCTCTTCTGC  305
               ||||||||||||| || ||||| || ||||| ||| |||||||
|||||||||||||||
Sbjct  36143055
CTGGTGGCGCGCCGTCGGCGCCGTGGGGCGACAGCCAGCCTGGTGCTCAACCTCTTCTGC  36143114

Query  306
GCGGACCTGCTCTTCATCAGCGCTATCCCTCTGGTGCTGGCCGTGCGCTGGACTGAGGCC  365
               |||||  ||||||||| |||||| |||||||| ||||| |
||||||||||||||||||
Sbjct  36143115
```

Figure 34. Blast do gene humano do *Ffar4* em relação ao *Ffar4* de *Mus musculus*. Figura criada pelo site NCBI.

Por fim, utilizou-se camundongos que receberam LPS 6 mg/Kg via intraperitoneal, onde coletou-se o tecido adiposo branco após 24 h. Foram isolados os adipócitos da fração vascular do estroma (SVF), que contém vários tipos de células, como células endoteliais e macrófagos. O *Ffar4* foi reduzido em adipócitos isolados (Figura 35A), mas não foi diferente na SVF (Figura 35B).

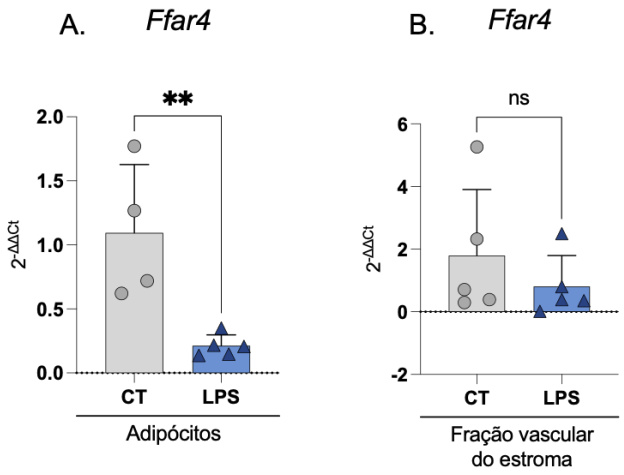


Figure 35. Ensaio de adipócitos primários e fração vascular do estroma 24 h após LPS. A. Nível de RNA mensageiro de *Ffar4* em adipócitos primários. B. A. Nível de RNA mensageiro de *Ffar4* na fração vascular do estroma. A expressão dos genes foi relativizada pela *Rpl13a*. Cada grupo foi representado por 5 animais. Valores foram expressos em média ± desvio padrão. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado "*".

Por fim, outro fator de interesse era verificar o fator de transcrição do *Ffar4*. Dados prévios sugeriram o PPARγ como fator de transcrição para o *Ffar4*. Portanto, analizamos o gene em animais com deleção de apenas uma cópia de PPARγ em adipócitos, porém a expressão de *Ffar4* não foi diferente entre os grupos (Figura 36A).

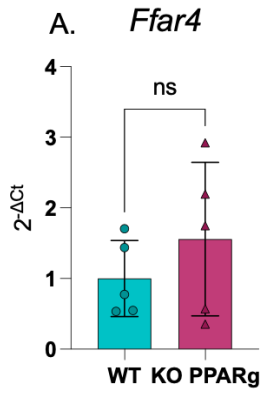


Figura 36. Expressão do *Ffar4* no tecido adiposo de animais com deleção de PPARγ. A. Nível de RNA mensageiro de Ffar4. A expressão dos genes foi relativizada pela *Actb*. Cada grupo foi representado por 5 animais. Valores foram expressos em média ± desvio padrão. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado "*".

6.4 Etapa 4

A ligadura e perfuração do ceco (CLP) é um modelo de sepse polimicrobiana, sendo considerado padrão ouro no modelo de sepse[56,62]. Este modelo pode ser utilizado em diferentes níveis de inflamação, dependendo da distância em que a ligadura é feita, assim como o número de perfurações. Portanto, antes de iniciar a gavagem com ácidos graxos ω3, adotou-se a inflamação branda e a cirurgia foi padronizada de acordo com o protocolo previamente descrito com a finalidade de atingir dose letal de 50 (LD50) (Material e métodos 5.3 B – Figura 37).

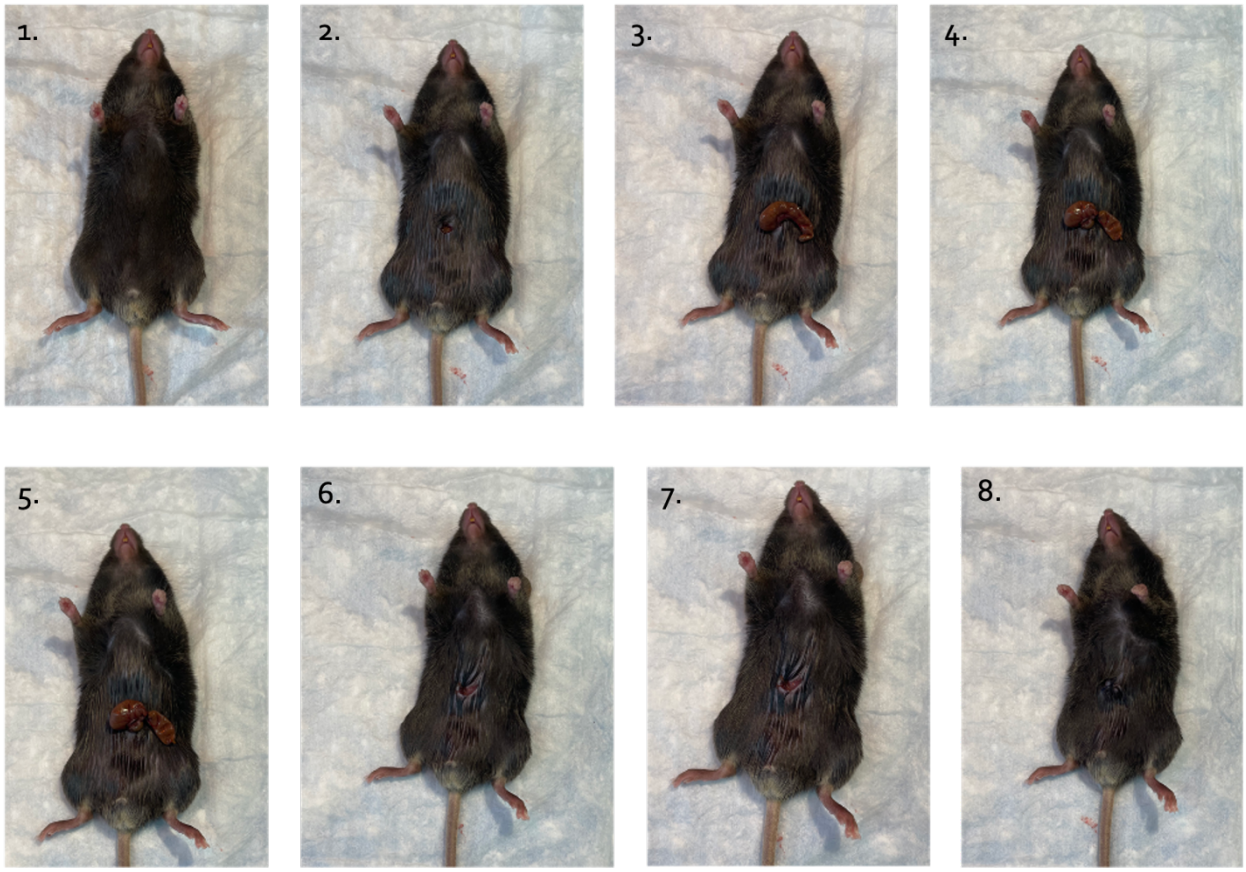


Figure 37. Cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP). 1. Animal foi anestesiado. 2. Após assepsia, pequena incisão linear foi feita dando acesso à cavidade abdominal. 3. Ceco foi exposto. 4. Ligadura do ceco foi feito 1 cm de distância do final do ceco, com fio de seda. 5. Perfusão única foi feita na ponta do ceco com agulha 20-gauge. 6. Ceco foi reintroduzido na cavidade abdominal. 7. Cavidade abdominal foi suturada com fio *chromic gut*. 8. Pele suturada com fio de polipropileno. Fotos feitas pela autora.

Após o CLP, os camundongos foram acompanhados por 120 h para acompanhar a taxa de sobrevivência, temperatura, massa corporal e ingestão alimentar. Ao final do quinto dia, 50% do grupo CLP não sobreviveu, caracterizando dose letal 50 (LD50) (Figura 38A). Além disso, a temperatura diminuiu no CLP após 8 e 10 h (Figura 38B). A massa corporal diminuiu no CLP às 72 h (Figura 38C). Isso é consequência da diminuição do consumo alimentar do grupo CLP em 94% em relação ao Sham, que continua menor às 72 h (Figura 38D).

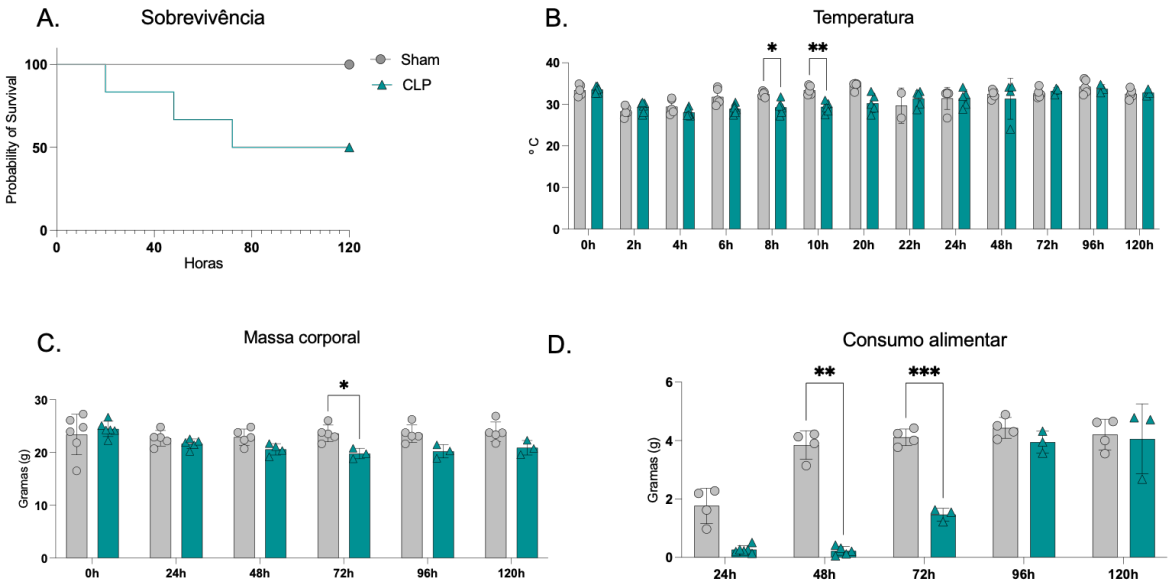


Figura 38. Caracterização fenotípica do modelo experimental de CLP 2. A. Probabilidade de sobrevivência. B. Temperatura. C. Massa corporal. D. Avaliação do consume alimentar. Cada grupo iniciou o experimento com n=6. Valores expressos como média ± desvio padrão. Para análise de sobrevivência, utilizou-se Kaplan-Meier. Para as outras análises, utilizou-se Two-Way ANOVA, seguido do pós teste de Bonferroni. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado, sendo "*".

Como a sepse é uma condição que exige alto gasto energético, de forma indireta foi acessado gliconeogênese e lipólise. A glicemia diminuiu no CLP às 10 h (Figura 39A). O plasma foi coletado 24 h pós-CLP, a insulina não foi alterada entre os grupos e o NEFA diminuiu no CLP (Figura 39B-C).

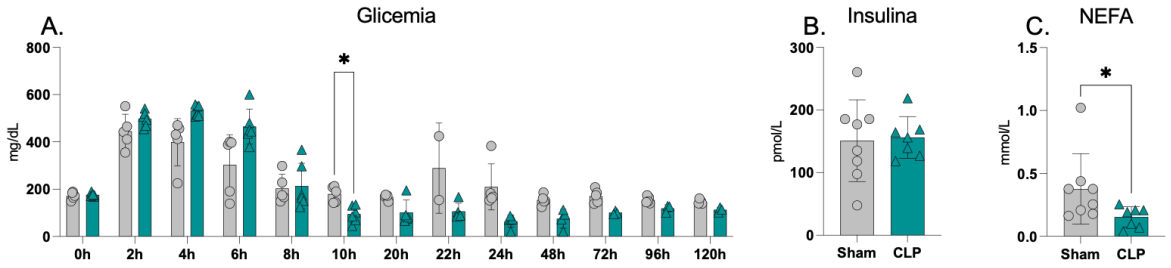


Figura 39. Caracterização do modelo CLP 2 em relação aos parâmetros bioquímicos. A. Glicemia. B. Insulina. C. NEFA. Cada grupo iniciou o experimento com n=6. Valores expressos como média ± desvio padrão. Utilizou-se Two-Way ANOVA, seguido do pós teste de Bonferroni. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado, sendo "*".

Após padronização da CLP, os camundongos receberam óleo mineral (MO) como controle, óleo de linhaça (FS) e óleo de peixe (FO), ambos fontes de ácidos graxos ω3, através de gavagem. Primeiramente, foi feita a gavagem diariamente com 100 µL de cada óleo por 5 dias, para análise da composição corporal antes e após gavagem. A gavagem diária de cinco dias com os respectivos óleos não alterou a composição corporal entre os grupos (Figura 40A-B).

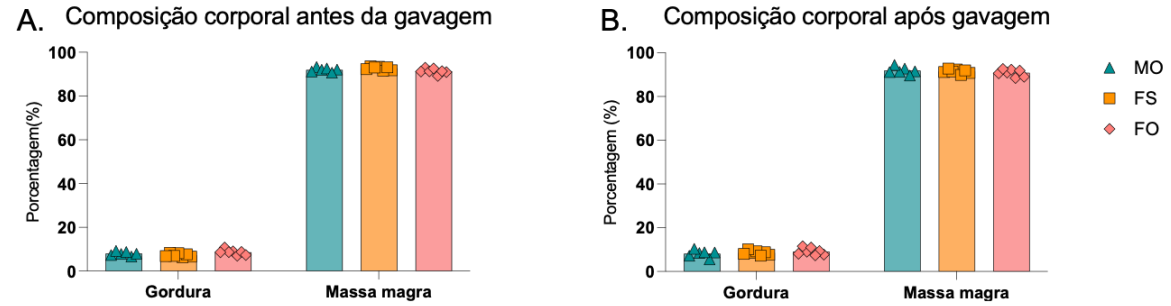


Figura 40. Composição corporal após gavagem com fontes de ω3. A. Composição corporal antes da gavagem. B. Composição corporal após 5 dias consecutives de gavagem. Os grupos apresentaram n=6-7. Valores expressos como média ± desvio padrão. Utilizou-se Two-Way ANOVA, seguido do pós teste de Bonferroni. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado, sendo "*".

Em seguida, os grupos MO, FS e FO passaram pelo CLP. No quinto dia, C+FO apresentou probabilidade de sobrevivência de 11,11%, enquanto C+FS foi de 44,44% e C+MO 77,77%, portanto a probabilidade de sobrevivência do C+FO foi menor do que C+MO (Figura 40A). Quatro horas pós-CLP, C+FS apresentou maior glicemia em comparação a C+MO, enquanto C+FO foi maior após 6 h (Figura 41D). A massa

corporal e a temperatura foram aferidas após a cirurgia, mas não alteraram entre os grupos (Figura 41B-C).

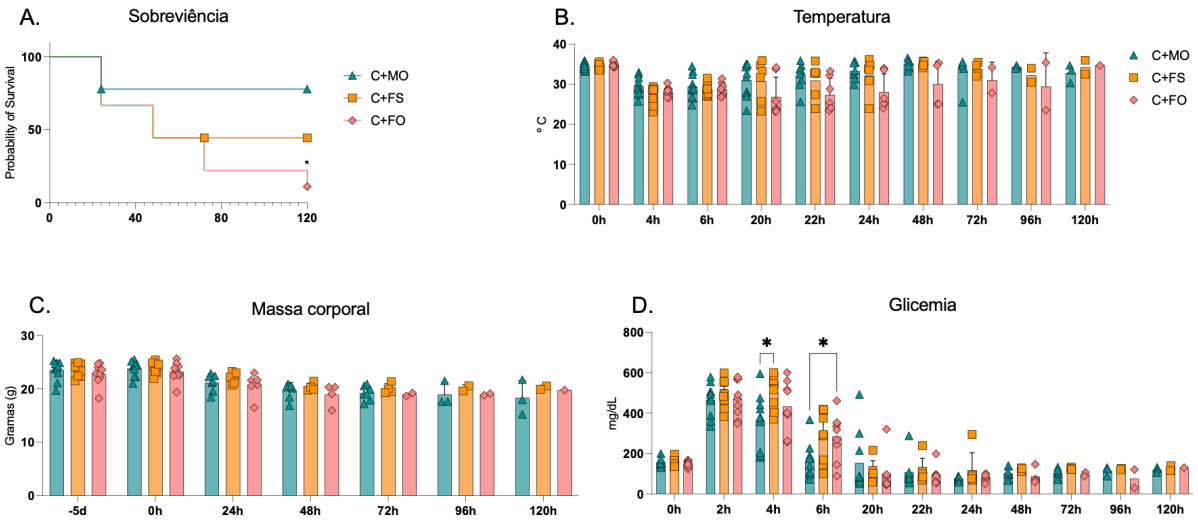


Figure 41. Caracterização fenotípica do modelo experimental de CLP após gavagem com ω3. A. Probabilidade de sobrevivência. B. Temperatura. C. Massa corporal. D. Glicemia. Os grupos foram representados por n=9-10. Valores expressos como média ± desvio padrão. Para análise de sobrevivência, utilizou-se Kaplan-Meier. Para as outras análises, utilizou-se Two-Way ANOVA, seguido do pós teste de Bonferroni. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado, sendo "*".

Como as fontes de ω3 não conseguiram melhorar a sobrevida, em vez disso, o FO piorou-a, o próximo passo foi analisar as citocinas no plasma 24 h após o CLP. No entanto, IL1β, IL6, IL10, IL17, MCP1 e TNFα não se alteraram entre os grupos (Figura 42A-F).

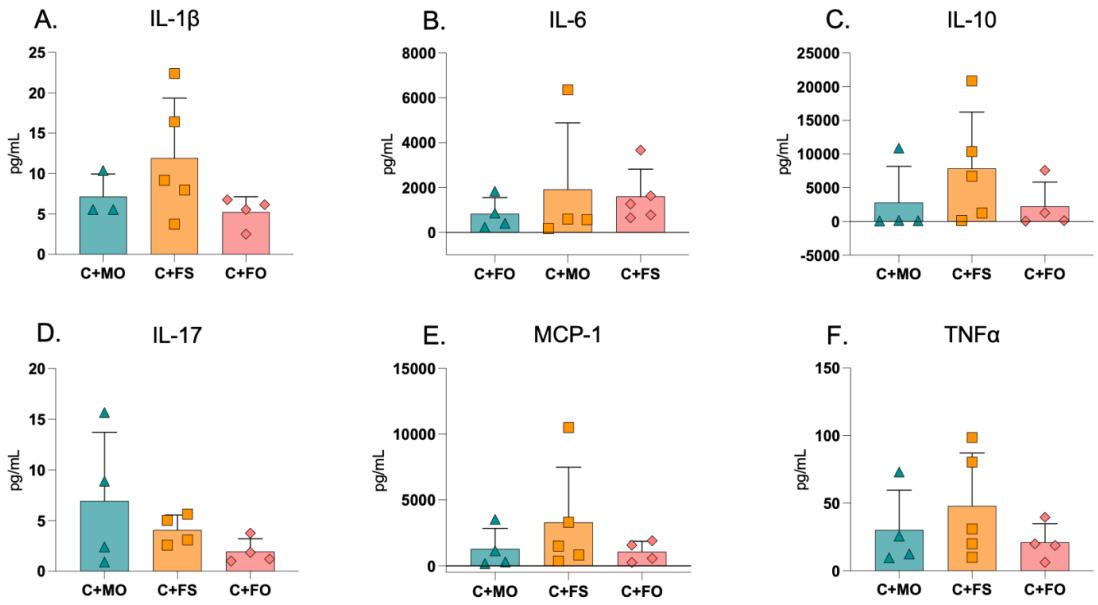


Figura 42. Painel de citocinas do experimento de CLP com gavagem prévia de ω3. O plasma foi coletado 24 h após CLP. A. IL1β. B. IL6. C. IL10. D. IL17. E. MCP1. F. TNFα. Os grupos apresentaram n=3-5. Valores expressos como média ± desvio padrão. Utilizou-se Two-Way ANOVA, seguido do pós teste de Bonferroni. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado, sendo "*".

Não foi possível esclarecer a razão do grupo FO piorar a sobrevida após CLP. Então, o experimento foi redefinido com a finalidade de evidenciar mais o grupo FO e, também, verificar se o óleo mineral é de fato o melhor placebo para estudos com óleos. Todos os grupos foram submetidos a CLP, mas um deles recebeu gavagem com seringa vazia (CLP), enquanto MO e FO receberam 100 µL de óleo mineral e óleo de peixe, respectivamente. Assim como no experimento anterior, foi verificada a composição corporal antes e após 5 dias de gavagem diária e não foi observado diferenças entre os grupos (Figura 43A-B).

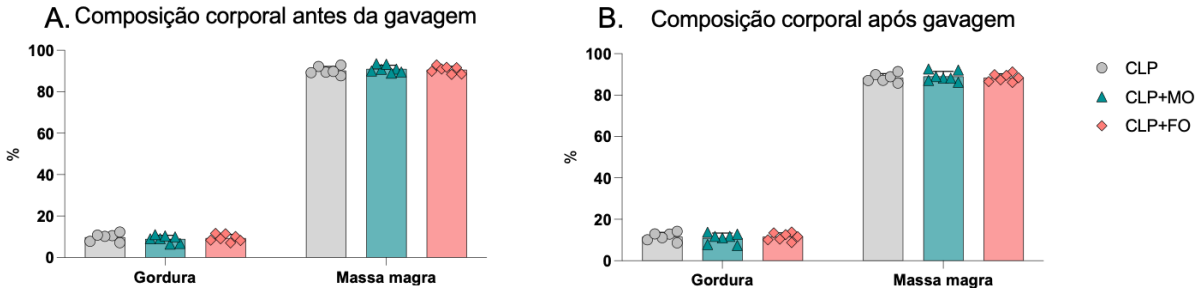


Figura 43. Composição corporal após gavagem com óleo de peixe. A. Composição corporal antes da gavagem. B. Composição corporal após 5 dias consecutives de gavagem. Os grupos foram representados por n=6-7. Valores expressos como média ± desvio padrão. Utilizou-se Two-Way ANOVA, seguido do pós teste de Bonferroni. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado, sendo "*".

Em seguida, os camundongos foram submetidos a CLP após o período de gavagem. Após 120 h pós-CLP, CLP+MO teve 12,28% de chance de sobreviver, enquanto CLP teve 33,33%, e CLP+FO 28,57%, porém não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 44A). A temperatura e a massa corporal também foram acompanhadas, mas não houve diferença entre os grupos (Figura 44B-C).

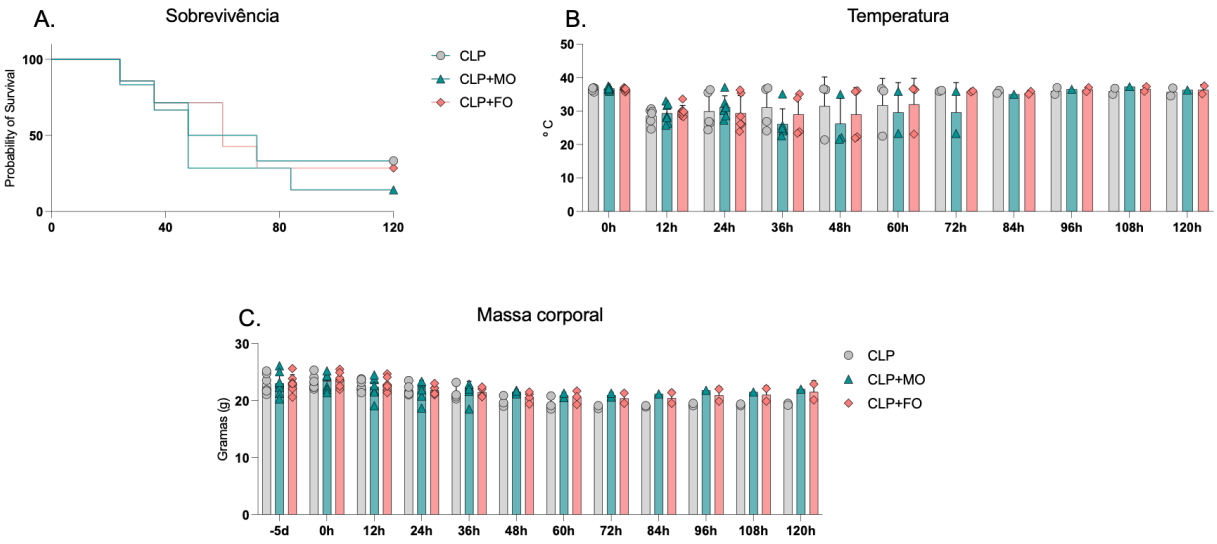


Figura 44. Caracterização fenotípica do CLP após gavagem com MO e FO. A. Probabilidade de sobrevivência. B. Temperatura. C. Massa corporal. Os grupos foram representados por n=6-7. Valores expressos como média ± desvio padrão. Para análise de sobrevivência, utilizou-se Kaplan-Meier. Para as outras análises, utilizou-se Two-Way ANOVA, seguido do pós teste de Bonferroni. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado, sendo "*".

A glicemia também foi acompanhada pós-CLP, mas não houve diferença entre os grupos (Figura 45A). Após 24 h da cirurgia CLP, NEFA, insulina e somatostatina não foram diferentes entre os grupos (Figura 45B-D).

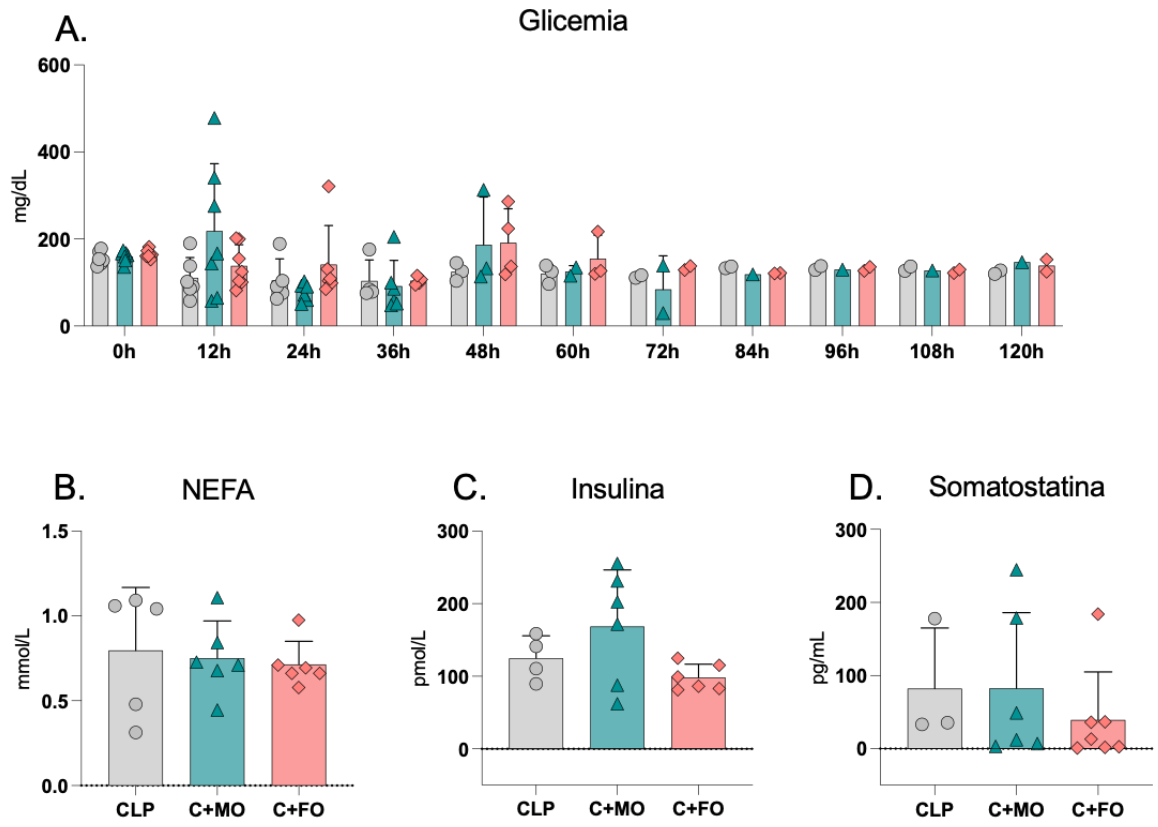


Figura 45. Caracterização do modelo CLP após gavagem com MO e FO relação aos parâmetros bioquímicos. A. Glicemia. B. NEFA. C. Insulina. D. Somatostatin. Os grupos foram representados por n=5-7.Valores expressos como média ± desvio padrão. Utilizou-se Two-Way ANOVA, seguido do pós teste de Bonferroni. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado, sendo "*".

Embora CLP+MO não tenha sido diferente de CLP ou CLP+FO, CLP+MO apresentou uma taxa de sobrevivência 50% pior comparado ao CLP. Portanto, as citocinas inflamatórias foram avaliadas após 24 h com a finalidade de esclarecer a diferença entre os comportamentos dos grupos, mas não foi observada diferença entre os grupos (Figura 46A-F).

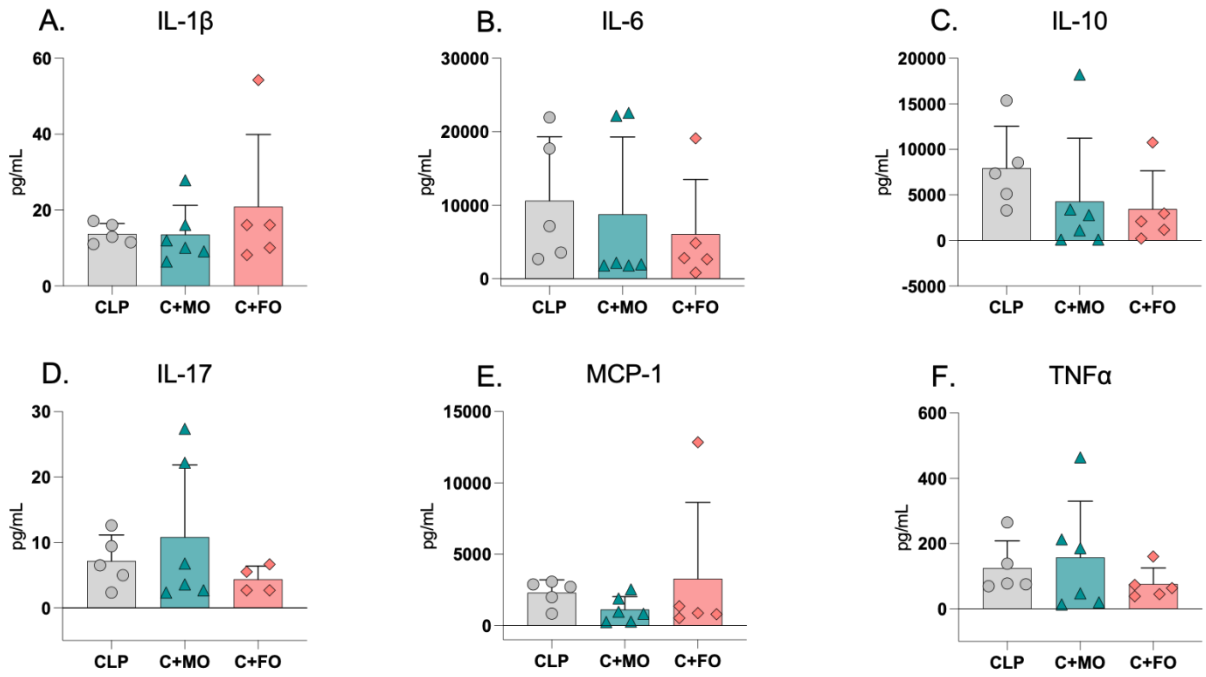


Figura 46. Painel de citocinas do experimento de CLP com gavagem prévia de MO e FO. O plasma foi coletado 24 h após CLP. A. IL1β. B. IL6. C. IL10. D. IL17. E. MCP1. F. TNFα. Os grupos foram representados por n=4-5. Valores expressos como média ± desvio padrão. Utilizou-se Two-Way ANOVA, seguido do pós teste de Bonferroni. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado, sendo "*".

Paralelamente aos experimentos com CLP, foram realizados experimentos com LPS. A dose de LPS adotada foi de 6 mg/Kg, pois estudos prévios do laboratório mostraram que esta dose representa LD50. Portanto, a primeira abordagem foi gavagem diária por cinco dias consecutivos com MO, FS e FO, depois administração intraperitoneal de LPS. Os dados mostraram que LPS+MO (66,66%) teve duas vezes maior probabilidade de sobrevivência em comparação com LPS+FO (33,33%), enquanto LPS+FS foi de 50%, mas a probabilidade de sobrevivência não foi diferente entre os grupos (Figura 47A). A glicemia foi menor no LPS+FO após 12 h em comparação ao LPS+MO (Figura 47B). O peso corporal não se alterou entre os grupos até 96 h, quando LPS+FS aumentou o peso corporal em comparação com LPS+MO (Figura 47C). Tanto o LPS +FS quanto o +FO aumentaram a temperatura após 3 h, mas o LPS+FO apresentou temperatura mais baixa em 12 h e 72 h em comparação ao LPS+MO (Figura 47D).

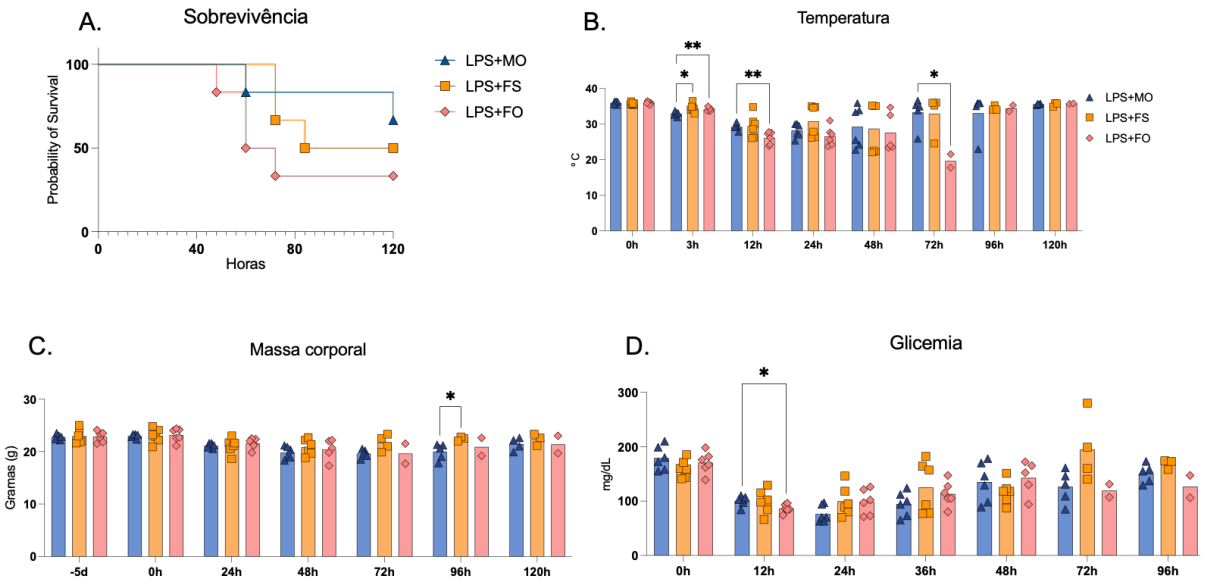


Figura 47. Caracterização fenotípica do LPS após gavagem com fontes de ω3. A. Probabilidade de sobrevivência. B. Temperatura. C. Massa corporal. D. Glicemia. Os grupos foram representados por n=6. Valores expressos como média ± desvio padrão. Para análise de sobrevivência, utilizou-se Kaplan-Meier. Para as outras análises, utilizou-se Two-Way ANOVA, seguido do pós teste de Bonferroni. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado, sendo "*".

Anteriormente, foi verificado no modelo CLP se o MO é o melhor placebo, mas os dados sugerem que pode ser que o óleo mineral não seja o melhor placebo. Em seguida, os animais receberam gavagem com seringa vazia (LPS) para mimetizar o estresse e o outro grupo recebeu FO (LPS+FO). Após 5 dias de gavagem diária, os camundongos receberam LPS. A probabilidade de sobrevivência no LPS+FO ficou em torno de 90% e no LPS em torno de 66,66%, porém não estatisticamente diferente (Figura 48A). Consistente com as taxas de sobrevivência, não observamos diferenças entre os grupos em termos de glicemia, massa corporal e temperatura (Figura 48B-D).

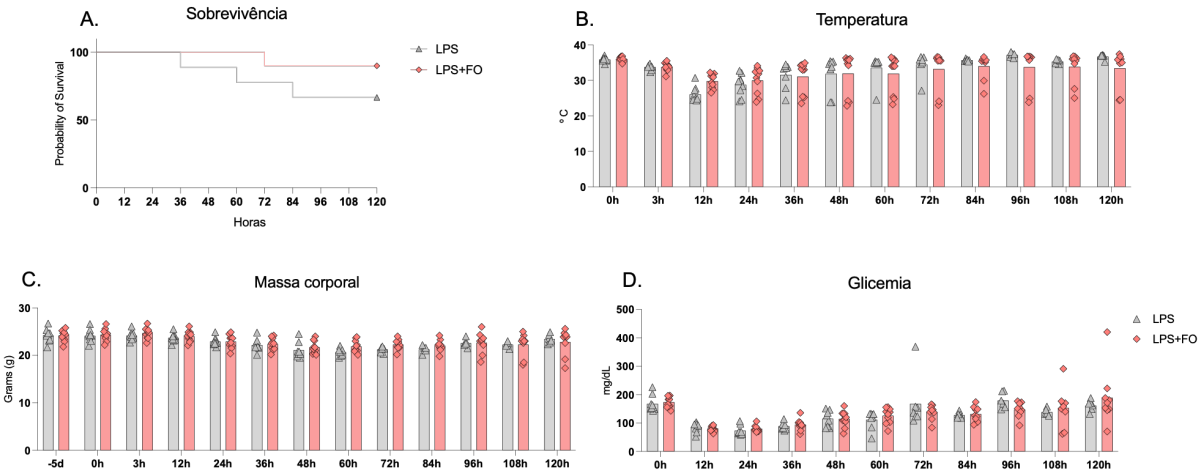


Figure 48. Caracterização fenotípica do LPS após gavagem com FO. A. Probabilidade de sobrevivência. B. Temperatura. C. Massa corporal. D. Glicemia. Os grupos foram representados por n=9-10. Valores expressos como média ± desvio padrão. Para análise de sobrevivência, utilizou-se Kaplan-Meier. Para as outras análises, utilizou-se Two-Way ANOVA, seguido do pós teste de Bonferroni. Para diferença significativa, p <0,05 foi adotado, sendo "*".

7 Discussão

O receptor GPR120 tem sido amplamente investigado devido a suas ações pleiotrópicas intracelulares, principalmente as voltadas ao controle da resistência a insulina e inflamação[39]. Inicialmente foi descrito como reconhecedor principal de ácidos graxos ω3, contudo, diversos agonistas sintéticos estão disponíveis para testes científicos, devido a seu impacto no controle de doenças metabólicas, como obesidade e diabetes tipo 2 [6,63]**.** O receptor GPR40 apresenta 10% de homologia ao GPR120, sendo o GW9508, duplo agonista, atuando em ambos os receptores. Agonistas específicos para GPR40, como a TAK875, conhecida também como Fasiglifam®, já se encontram em ensaio clínico de fase III, para controle da hiperglicemia em pacientes com diabetes tipo 2[64,65]. Devido à semelhança desses receptores e também à atividade *downstream* de ambos[66], é possível que em breve agonistas específicos para GPR120 também sejam empregados em estudos clínicos. Uma vez ativado, o GRP120 é capaz de desarticular o processo inflamatório e consequentemente promover a melhora da homeostase metabólica sistêmica. Essas ações podem ir além do controle inflamatório, em células de tecidos metabólicos, mas também em células específicas do sistema imune, demonstrados em diversos trabalhos[6,9], sendo esta a hipótese investigativa do presente trabalho.

Embora outros estudos tenham relacionado a presença do GPR120 em células do sistema imune, não foi encontrado outro estudo que compare a expressão do *Ffar4* diante da exposição da dieta hiperlipídica em diversos períodos, em quadros de sepse, em diferentes graus de intensidade, em animais e células. Apesar da ausência de estudos investigando a expressão de *Ffar4* em quadros de sepse, o ω3 é um nutriente amplamente estudado em doenças inflamatórias agudas, como a sepse, ou crônicas, como a aterosclerose e obesidade, o que justifica a importância de se entender melhor o comportamento da expressão do *Ffar4*, com ou sem estímulo de ω3 nessas situações[49,67].

Em conjunto com dados prévios encontrados na literatura, a análise em modelo de *Single Cell*, no que tange o mapeamento do *Ffar4,* fortaleceu a hipótese do trabalho. Os dados obtidos neste trabalho a partir de uma grande base de dados apontou a presença do *Ffar4* predominantemente em células de ação central na imunidade inata, como os monócitos e as células dendríticas. Este dado confirmou a presença do *Ffar4* em células do sistema imune. Apesar do trabalho ter utilizado camundongos como modelo investigativo, o objetivo do estudo, de forma abrangente, foi encontrar estratégias que possam auxiliar tratamento em humanos. Portanto, a base de dados utilizada na análise *in silico* foi crucial para direcionar as posteriores investigações *in vitro* e *in vivo* do presente estudo.

O segundo objetivo do estudo foi verificar se o *Ffar4* é modulado em diferentes quadros inflamatórios. Para isso, inicialmente foram utilizados camundongos C57BL/6J em diferentes quadros inflamatórios, como exposição à dieta hiperlipídica, modelos de sepse e *overtraining*. Ademais, sabe-se que o tecido adiposo é um dos tecidos com maior expressão do *Ffar4*, tanto em roedores quanto em humanos[6,68]. Não obstante, esse tecido é bem caracterizado em contextos de obesidade e sepse. Na obesidade, a hipertrofia do tecido adiposo promove diversas alterações metabólicas, entre elas, o recrutamento de macrófagos e sua polarização, do perfil anti-inflamatório para pró-inflamatório[69–72]. Na condição de sepse, o tecido adiposo sofre lipólise intensa, devido ao aumento do catabolismo característico da reprogramação metabólica da sepse[73–75]. Portanto, o tecido adiposo foi o tecido alvo do presente estudo.

Outros estudos apontam que o tecido adiposo responde à ingestão de dieta hiperlipídica, mesmo em curto prazo[76,77]. Por enquanto, parece não haver descrições sobre a expressão gênica de *Ffar4* no contexto agudo de exposição à dietas hiperlipídicas no tecido adiposo epididimal. Contudo, estudo anterior a esse, nosso grupo mostrou que em 3 dias de exposição à HF o tecido adiposo mesentérico não apresentou diferença no conteúdo proteico de GPR120 entre o grupo controle e o

grupo que recebeu dieta hiperlipídica[78]. Neste trabalho, a dieta hiperlipídica, em curto ou longo prazo não foi capaz de alterar de forma significativa o padrão de expressão do *Ffar4*. Contrário ao nosso estudo, em 2012, Ichimura et al. trouxeram a evidência inicial de que a obesidade poderia aumentar o conteúdo de GPR120 no tecido adiposo de roedores e humanos[79], uma vez que o GPR120 poderia ser um sensor lipídico. Isso também foi verificado em outros trabalhos experimentais, que apesar de não demonstrarem diferenças significativas, parece haver um comportamento de aumento do conteúdo proteico de GPR120 em organismos expostos à dieta hiperlipídica, por 60 dias ou mais[9,35,37,38]. Além disso, Oh e colaboradores (2010), verificaram que a expressão de *Ffar4* estava aumentada na fração vascular estromal (SVF) do tecido adiposo de animais alimentados com HF, mas não foi observada uma diferença nos adipócitos[6]. Portando, a diferença dos resultados encontrados em nosso estudo, quando comparado aos demais, pode estar relacionada à avaliação da expressão de *Ffar4* no tecido adiposo total, e não nas diferentes frações do tecido.

No quadro de inflamação severa, os protocolos de CLP em 24 h e 48 h, e no protocolo de LPS em 24 h, houve redução da glicemia de jejum em relação aos seus respectivos controles. É sabido que tanto a hiperglicemia como a hipoglicemia proporcionam maior correlação com a mortalidade em pacientes com sepse [80,81]. Os dados da glicemia de jejum acompanham as observações feitas durante o pós-operatório da CLP, em que foi notado o alto grau de debilidade dos animais, independente do tempo (24 h ou 48 h), assim como no pós administração de LPS. Em 24 h pós LPS, os animais apresentaram pouca ou nenhuma movimentação, olhar baixo, características clínicas associadas ao quadro de sepse, enquanto que em 48 h os animais estavam mais ativos, em processo de convalescença.

As citocinas TNFα e IL1β são as mais estudadas em relação à sepse [43]. Dessa forma, os dados apresentados relativos à expressão dos genes *Tnfa* e *Il1b* são coerentes aos dados fisiológicos, uma vez que *Tnfa* apresentou aumento no grupo CLP 48 h e LPS 24 h, em relação ao grupo Sham 48 h e CT 24 h, respectivamente. A *Il1b*

apresentou-se elevada nos grupos CLP 24 h e 48 h, LPS 24 h e 48 h, comparados ao Sham 24 h e 48 h e CT 24 h e 48 h, respectivamente. Por outro lado, o *Ffar4* parece responder aos estímulos inflamatórios, uma vez que os protocolos de sepse que obtiveram aumento da expressão de genes inflamatórios apresentaram redução do *Ffar4*. Muredda et al. (2018) também observaram, em adipócitos humanos, que a exposição à IL1B reduziu a expressão de *Ffar4*[82].

Trabalhos prévios em modelos experimentais demonstram que a ativação ou inibição do GPR120 impactam diretamente a expressão de proteínas pró-inflamatórias[6,83], no entanto, pouco se sabe sobre os efeitos de diferentes graus de inflamação na modulação do GPR120. Para complementar os modelos inflamatórios proposto, o *Ffar4* foi analisado após protocolo de *overtraining* e, diferente dos outros modelos utilizados, apresentou aumento em sua expressão em relação ao grupo sedentário e ao grupo treinado. De acordo com os achados dessa etapa do estudo, observou-se que o estímulo inflamatório, independente do estímulo lipídico, foi capaz de modular a expressão de *Ffar4*. A fim de melhor elucidar se a expressão de *Ffar4* é modulada especificamente em macrófagos ou por adipócitos, ou ainda, macrófagos recrutados no tecido adiposo, iniciou-se experimentos em linhagens celulares linhagens RAW 264.7 e 3T3-L1, assim como cultura primária. Além disso, as linhagens celulares foram utilizadas para avaliar se a modulação do *Ffar4* é dependente de LPS ou de IL1B.Células RAW 264.7 em ensaio de dose-resposta com palmitato e com LPS, possibilitaram maior detalhamento dos fenômenos observados nos experimentos com roedores. Na dose-resposta com palmitato, no tempo de coleta de 6 h, o *Ffar4* aumentou sua expressão em 500 μM, enquanto *Tnfa* e *Il1b* aumentaram nas suas menores doses de 25 e 50 μM. Já em 24 h, nas doses de 50 a 500 μM de palmitato aumentaram a expressão de *Ffar4, Tnfa e Il1b*. Dessa forma, através da utilização da linhagem RAW observou-se aumento do *Ffar4* diante do estímulo de palmitato, o que não foi observado no modelo animal de dieta hiperlipíca no tecido adiposo epididimal, tanto a curto prazo quanto a longo prazo.

Células RAW 264.7, submetidas ao ensaio de tempo-resposta apresentaram na dose de LPS (10 μg/mL), aumento da expressão de *Tnfa* e *Il1b*, e redução de *Ffar4* tanto em 6 h quanto 24 h. Portanto, na dose-resposta de LPS conduzida em 6 h, foi observado aumento significativo do *Tnfa* e da *Il1b* comparado ao CT. Já em relação ao gene do *Ffar4*, houve diminuição em todas as doses de LPS. Assim, o menor estímulo de LPS (0,5 ng/mL) foi capaz de modular a expressão de *Ffar4*. Zhao e colaboradores, mostraram em linhagem de macrófagos alveolares dados similares, que apontaram para redução da expressão de *Ffar4* após estímulo com LPS[84].

Considerando os efeitos do LPS e do palmitato na linhagem RAW, o experimento de tempo-resposta também foi realizado na linhagem 3T3-L1. O experimento de dose-resposta de palmitato e de LPS não alterou a expressão de *Ffar4* entre as doses, no tempo de 24 h. Além disso, não foi possível detectar os genes *Tnfa* e *Il1b*. Contudo, na dose de 10 μg/mL de LPS, em 6 h e 24 h, o *Ffar4* diminuiu em relação ao CT. Nesse experimento, a *Il1b* foi detectada, mas não teve diferença entre os tempos em relação ao CT. Nossos achados corroboram estudo prévio em 3T3, no qual foi visto em 24 h após tratamento com LPS na dose de 100 ng/mL a expressão do *Ffar4* não possui diferença em relação ao grupo controle[85]. Apesar disso, o estudo de Muredda e colaboradores (2018) mostrou em cultura primária de adipócitos humanos tratados com TNFα e *Il1b* a redução da expressão de *Ffar4*, sugerindo relação direta entre expressão destas citocinas e a expressão do *Ffar4*[82].

Diante dos resultados apresentados nos protocolos realizados com animais e linhagens celulares, em conjunto com os dados descritos na literatura, acreditamos que a expressão do gene *Ffar4* esteja relacionada diretamente com a expressão de genes envolvidos no contexto inflamatório, em especial a *Il1b*, já que seu aumento diminuiu abruptamente a expressão de *Ffar4*. Estudo recente mostrou que os macrófagos são inibidos em protocolos de sepse induzidos por perfuração do ceco[86], o que em conjunto com os dados da análise de *single cell in silico*, fortalece a hipótese

de que o *Ffar4* presente nos macrófagos possa ser chave importante na regulação do sistema imune.

Portanto, utilizamos o ensaio de meio condicionado de LPS e IL1β para melhor investigar a relação da *Il1b* com *Ffar4*. No ensaio de meio condicionado com LPS, o *Ffar4* diminuiu nas doses de 0,5 e 5 ng/mL, porém *Il1b* aumentou na dose de 500 ng/mL. Já no experimento com meio condicionado de *Il1b*, o *Ffar4* teve sua expressão reduzida em todas as doses utilizadas, mas sem diferença em relação à *Il1b* e *Tnfa*. A ação da *Il1b* na regulação do *Ffar4* não ficou clara nos contextos analisados e, portanto, mais estratégias são necessárias para esclarecer essa questão.

Posteriormente aos resultados conquistados em linhagem de cultura de células, novamente adotou-se modelo animal, mas agora em cultura primária, para verificar se a ação do *Ffar4* diante de quadros inflamatórios é controlada por macrófagos ou pelo tecido adiposo. O primeiro experimento proposto foi extrair os macrófagos derivados da medula óssea (BMDM), já que a medula óssea é progenitora de células hematopoiéticas, as quais podem se diferenciar em diversas células entre elas as plaquetas, células dendríticas, macrófagos e células plasmáticas. Após o plaqueamento das BMDM, foi feito o tratamento dose-resposta com LPS. Apesar do sucesso do experimento, confirmado com a expressão de *Il6*, *Ffar4* não foi expresso. Para confirmar se a expressão do *Ffar4* não foi detectada devido a especificidades do *primer* utilizado, foram desenhados dois outros *primers* de *Ffar4* com diferentes ligações entre exons. Ainda assim, não houve detecção do *Ffar4* na BMDM.

Dessa forma, foi realizado o protocolo de cultura primária de adipócitos com separação da SVF. A SVF é composta por diversos tipos celulares, entre eles as células mesenquimais, células endoteliais e macrófagos. Após a separação dos adipócitos e do SVF, foi observado que *Ffar4* diminuiu no grupo LPS nos adipócitos, mas não no SVF.

Estudos prévios demonstraram o GPR120 em macrófagos[38,87]. Oh e colaboradores mostraram a ausência de *Ffar4* em BMDM[6], porém não com tratamento posterior ao LPS. Por outro lado, neste mesmo trabalho, mostraram aumento do *Ffar4* em SVF no grupo HF, mas sem diferença na expressão em adipócitos. Devido a contradição entre os resultados com os diferentes experimentos, nossos dados sugerem que nos experimentos com tratamento de LPS, os adipócitos estão envolvidos na modulação do *Ffar4*. De forma geral, na etapa 3, foi verificado que o *Ffar4* é modulado de forma diferente dependendo dos estímulos que recebeu.

De forma complementar, verificamos que apesar de Oh e colaboradores terem sugerido que o receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPARγ) é o principal fator de transcrição do GPR120[88], em um ensaio isolado, verificamos a não plausabilidade desta hipótese. Animais PPARγ$^{+/-}$ continuam apresentando *Ffar4* em níveis similares aos selvagens.

Na etapa final deste trabalho, foram analisados os efeitos da suplementação prévia de ω3 no quadro de sepse. A sepse é uma síndrome que afeta milhões de indivíduos por ano, sendo responsável por 20% das mortes mundiais, com possibilidade de subestimação desse número devido a dificuldade de diagnóstico, falta de recursos na prevenção e tratamento e falta de formação especializada, em países de média e baixa renda[10,89]. Por outro lado, os ácidos graxos ω3 possuem suas propriedades anti-inflamatórias previamente descritas e tem sido utilizados em diversos estudos principalmente em doenças inflamatórias[8,24,49,90]. Até o presente momento, as diretrizes internacionais mencionam evidências fracas para a recomendação do uso do ω3 em pacientes críticos[49–51]. Os objetivos dessa etapa foram avaliar o impacto de ω3 em modelos animais de sepse e avaliar o óleo mineral como placebo em modelos de sepse.

Nos experimentos aqui conduzidos, quando utilizado o óleo mineral como placebo frente à suplementação com fontes de ω3 previamente ao tratamento de sepse,

por CLP ou LPS, o óleo de peixe piorou a chance de sobrevivência dos animais. Estes dados demonstram que os potenciais efeitos benéficos do óleo de peixe na sepse merecem investigação futura cuidadosa, uma vez que o processo inflamatório é essencial em determinadas condições. A investigação foi expandida para outras citocinas, como IL1β, IL6, IL10, IL17, MCP1 e TNFα, no modelo CLP para melhor entendê-lo. Contudo, não foram observadas diferenças entre os grupos. Apesar disso, outros marcadores importantes como prostaglandinas do tipo 2 e a enzima iNOS não foram avaliados.

O óleo mineral é considerado atualmente "padrão ouro" de placebo para estudos com ácido graxos. Assim, o próximo passo desse estudo foi verificar se o óleo mineral seria realmente um bom placebo. No modelo de CLP, apesar de não ser estatisticamente diferente, o CLP+MO apresentou probabilidade de sobrevivência de 12,28%, enquanto o CLP apresentou 33,33%. Não foram observadas diferenças no peso corporal, temperatura, glicemia ou citocinas circulantes entre os grupos. Apesar de haver relatos na literatura trazendo debate e descrição do uso do óleo mineral como seguro para ser utilizado como controle[91], outros estudos descrevem o óleo mineral como não sendo bom placebo. Por exemplo, no estudo REDUCE-IT, o grupo que recebeu óleo mineral por dois anos apresentou aumento no colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e na proteína C reativa de alta sensibilidade (hsCRP), enquanto o grupo tratado com derivado sintético do ω3, icosapent etil, reduziu 25% eventos cardiovasculares[92].

De forma interessante, neste trabalho, ao desconsiderar o MO como controle, CLP e CLP+FO não parecem diferentes na probabilidade de sobrevivência. Além disso, LPS e LPS+FO também não apresentaram diferença na probabilidade de sobrevivência, mas o LPS+FO mantém-se em torno de 90% e o LPS, 66,66%. Estudo prévio mostrou que o ω3 pode prejudicar mecanismos inflamatórios essenciais para recuperação e cura[26]. Nossos dados sugerem que o óleo de peixe não apresenta benefícios na sobrevivência de camundongos, nos modelos de CLP ou LPS. A sepse é

uma condição que pode ser desencadeada por diferentes microrganismos, e cada um deles pode desenvolver diferentes consequências no metabolismo e consequentemente na mortalidade. Os resultados deste trabalho sugerem que a suplementação de ω3 cinco dias antes de desenvolver sepse não altera a sobrevivência nos modelos de CLP e LPS.

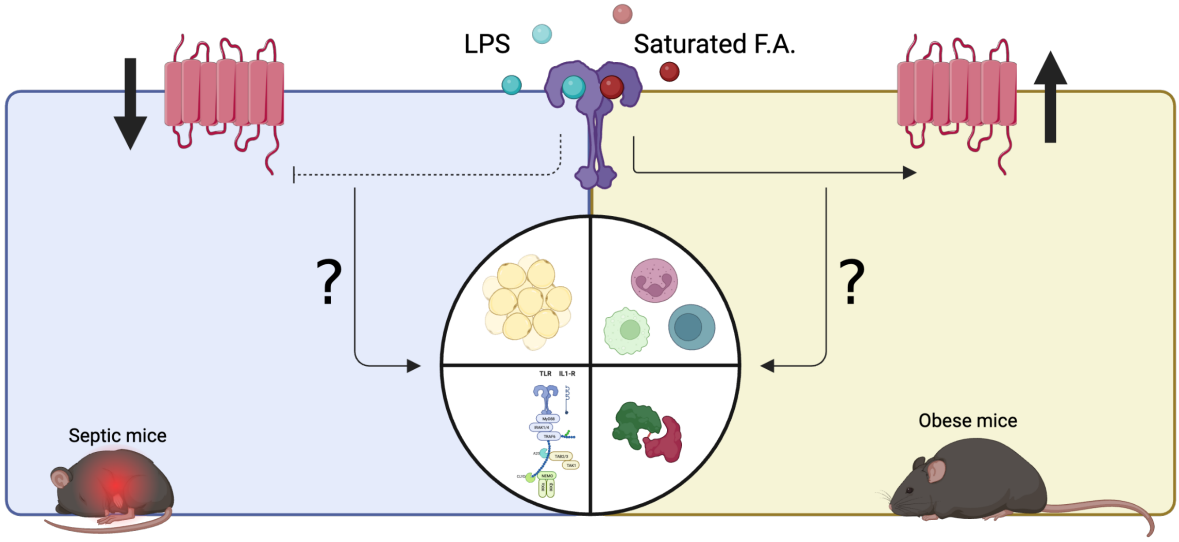


Figura 49. Modulação do *Ffar4* em diferentes gatilhos inflamatórios. A expressão gênica de *Ffar4* é reduzida em inflamação causada por LPS enquanto é aumentada em inflamação causada por HF e palmitato. Os tecidos, as células imunes e o mecanismo ainda não estão totalmente esclarecidos.

8 Conclusão

Através dos dados apresentados, conclui-se que o GPR120 não é apenas um receptor lipídico, mas também possui função na resposta inflamatória. Em quadros inflamatórios como a sepse, sua expressão diminui, enquanto em quadros de exposição à dieta hiperlipídica, o conteúdo de mRNA não se altera ou aumenta, dependendo do tecido e/ou tipo celular . Os dados em cultura primária sugerem que o *Ffar4* tem maior função nos adipócitos do que nos macrófagos, porém mais estudos são necessários para esclarecer qual célula imune é responsável direta ou indiretamente para a ativação do *Ffar4*.

Além disso, os dados sugerem que o ω3 não foi capaz de melhorar a sobrevivência dos camundongos com sepse. Contudo, mais estudos são necessários para estabelecer

doses, frequência e qual o melhor momento para utilizar óleo de peixe em pacientes com sepse.

9 Referências

1. Lawrence, T., Willoughby, D. A. & Gilroy, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 787–795 (2002).
2. Drewnowski, A. & Popkin, B. M. The Nutrition Transition: New Trends in the Global Diet. *Nutr. Rev.* **55**, 31–43 (1997).
3. Lordan, R. Dietary supplements and nutraceuticals market growth during the coronavirus pandemic – Implications for consumers and regulatory oversight. *PharmaNutrition* **18**, 2020–2022 (2021).
4. Arlauskas, R., Austys, D. & Stukas, R. COVID-19 Pandemic and Consumption of Dietary Supplements among Adult Residents of Lithuania. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **19**, (2022).
5. Hirasawa, A. *et al.* Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat. Med.* **11**, 90–94 (2005).
6. Oh, D. Y. *et al.* GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell* **142**, 687–698 (2010).
7. Simopoulos, A. P. An increase in the Omega-6/Omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients* **8**, (2016).
8. Oh, D. Y. & Walenta, E. The role of omega-3 fatty acid receptor GPR120 in insulin resistance. *Int. J. Obes. Suppl.* (2014). doi:10.1038/ijosup.2014.5
9. Moura-Assis, A. *et al.* Flaxseed oil rich in omega-3 protects aorta against inflammation and endoplasmic reticulum stress partially mediated by GPR120 receptor in obese, diabetic and dyslipidemic mice models. *J. Nutr. Biochem.* **53**, 9–19 (2018).
10. World Health Organisation. *Global report on the epidemiology and burden of sepsis: current evidence, identifying gaps and future directions*. *World Health Organization* (2020).
11. Sepsis. Available at: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis.

(Accessed: 27th November 2023)

12. Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* **420**, 885–891 (2002).
13. Chousterman, B. G., Swirski, F. K. & Weber, G. F. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin. Immunopathol.* **39**, 517–528 (2017).
14. Chovatiya, R. & Medzhitov, R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Mol. Cell* **54**, 281–288 (2014).
15. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428–435 (2008).
16. Okin, D. & Medzhitov, R. Evolution of inflammatory diseases. *Curr. Biol.* **22**, R733–R740 (2012).
17. Damude, H. G. *et al.* Identification of bifunctional Δ12/ω3 fatty acid desaturases for improving the ratio of ω3 to ω6 fatty acids in microbes and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 9446–9451 (2006).
18. Simopoulos, A. P. & Dinicolantonio, J. J. The importance of a balanced ω -6 to ω -3 ratio in the prevention and management of obesity. *Open Hear.* **3**, 1–6 (2016).
19. Bang, H., Dyerberg, J. & Hjerne, N. The Composition of Food Consumed by Greenland Eskimos. *Acta Med Scan* **200**, 69–73 (1976).
20. Daly, J. *et al.* Enteral nutrition with supplemental arginine, RNA, and omega-3 fatty acids in patients after operation: immunologic, metabolic, and clinical outcome. *Surgery* **112**, 56–67 (1992).
21. Georgilis, K. & Klempner, M. No In vitro effects of omega-3 fatty acids on neutrophil intracellular calcium homeostasis and receptor expression for FMLP and LTB4. *Inflammation* **12**, 475–490 (1988).
22. Sperling, R. I. *et al.* Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils. *J. Clin. Invest.* **91**, 651–660 (1993).
23. Wachtler, P., König, W., Senkal, M., Kemen, M. & Köller, M. No Influence of a total parenteral nutrition enriched with omega-3 fatty acids on leukotriene synthesis of peripheral leukocytes and systemic cytokine levels in patients with

major surgery. *J Trauma* **42**, 191–198 (1997).

24. Razzini, F. & Baronzio, G. Omega-3 Fatty Acids as Coadjuvant Treatment in AIDS. *Med Hypotheses* **41**, 300–305 (1993).
25. Lo, C. J., Chiu, K. C., Fu, M., Lo, R. & Helton, S. Fish oil decreases macrophage tumor necrosis factor gene transcription by altering the NF kappa B activity. *J. Surg. Res.* **82**, 216–221 (1999).
26. Burger, B. *et al.* Eicosapentaenoic acid-rich oil supplementation activates PPAR-γ and delays skin wound healing in type 1 diabetic mice. *Front. Immunol.* **14**, 1–14 (2023).
27. Christen, W. G. *et al.* Efficacy of Marine ω-3 Fatty Acid Supplementation vs Placebo in Reducing Incidence of Dry Eye Disease in Healthy US Adults: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Ophthalmol.* **140**, 707–714 (2022).
28. Okereke, O. I. *et al.* Effect of Long-term Supplementation with Marine Omega-3 Fatty Acids vs Placebo on Risk of Depression or Clinically Relevant Depressive Symptoms and on Change in Mood Scores: A Randomized Clinical Trial. *Jama* **326**, 2385–2394 (2021).
29. Berquin, I. M. *et al.* Modulation of prostate cancer genetic risk by omega-3 and omega-6 fatty acids. *J. Clin. Invest.* **117**, 1866–1875 (2007).
30. As, A. *et al.* cardiovascular disease (Review). (2020). doi:10.1002/14651858.CD003177.pub5.www.cochranelibrary.com
31. Fredriksson, R., Höglund, P. J., Gloriam, D. E. I., Lagerström, M. C. & Schiöth, H. B. Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS Lett.* **554**, 381–388 (2003).
32. Pruitt, K. D., Tatusova, T., Brown, G. R. & Maglott, D. R. NCBI Reference Sequences (RefSeq): Current status, new features and genome annotation policy. *Nucleic Acids Res.* **40**, 130–135 (2012).
33. Brunton, L. L., Hilal-Dandan, R. & Knollman, B. C. *Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman*. (2019).
34. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A. A human homologue of

the Drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394–397 (1997).

35. Oliveira, V. *et al.* Diets containing α-linolenic (ω3) or oleic (ω9) fatty acids rescues obese mice from insulin resistance. *Endocrinology* **156**, 4033–4046 (2015).
36. Cintra, D. E. *et al.* Unsaturated Fatty Acids Revert Diet-Induced Hypothalamic Inflammation in Obesity. *PLoS One* **7**, e30571 (2012).
37. Dátilo, M. N. *et al.* Omega-3 from Flaxseed Oil Protects Obese Mice Against Diabetic Retinopathy Through GPR120 Receptor. *Sci. Rep.* **8**, 1–13 (2018).
38. Raptis, D. A. *et al.* GPR120 on Kupffer cells mediates hepatoprotective effects of ω3-fatty acids. *J. Hepatol.* **60**, 625–632 (2014).
39. Wang, X. *et al.* Discovery of Novel and Selective G-Protein Coupled Receptor 120 (GPR120) Agonists for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Molecules* **27**, (2022).
40. Milligan, G., Alvarez-Curto, E., Hudson, B. D., Prihandoko, R. & Tobin, A. B. FFA4/GPR120: Pharmacology and Therapeutic Opportunities. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 809–821 (2017).
41. Carullo, G. *et al.* GPR120/FFAR4 Pharmacology: Focus on Agonists in Type 2 Diabetes Mellitus Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **64**, 4312–4332 (2021).
42. Singer, M. *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **315**, 801–810 (2016).
43. Nedeva, C., Menassa, J. & Puthalakath, H. Sepsis: Inflammation is a necessary evil. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, 1–12 (2019).
44. Hotchkiss, R. S. *et al.* Sepsis and septic shock. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2**, 16046 (2016).
45. Rodgers, G. P. & Gibbons, G. H. Obesity and hypertension in the time of COVID-19. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **324**, 1163–1165 (2020).
46. Stefan, N., Birkenfeld, A. L. & Schulze, M. B. Global pandemics interconnected — obesity, impaired metabolic health and COVID-19. *Nat. Rev. Endocrinol.* **17**, 135–149 (2021).
47. Tsampasian, V. *et al.* Risk Factors Associated With Post-COVID-19 Condition A

Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Intern. Med.* **183**, 566–580 (2023).

48. Wang, A. *et al.* Opposing Effects of Fasting Metabolism on Tissue Tolerance in Bacterial and Viral Inflammation. *Cell* **166**, 1512-1525.e12 (2016).
49. Singer, P. *et al.* ESPEN guideline on clinical nutrition in the intensive care unit. *Clin. Nutr.* **38**, 48–79 (2019).
50. Singer, P. *et al.* ESPEN practical and partially revised guideline: Clinical nutrition in the intensive care unit. *Clin. Nutr.* **42**, 1671–1689 (2023).
51. Compher, C. *et al.* Guidelines for the provision of nutrition support therapy in the adult critically ill patient: The American Society for Parenteral and Enteral Nutrition. *J. Parenter. Enter. Nutr.* **46**, 12–41 (2022).
52. Kagan, I. *et al.* Preemptive enteral nutrition enriched with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid and antioxidants in severe multiple trauma: a prospective, randomized, double-blind study. *Intensive Care Med.* **41**, 460–469 (2015).
53. Khilnani, P. Severe sepsis and septic shock. *ICU Protoc. A Stepwise Approach* 703–707 (2012). doi:10.1007/978-81-322-0535-7_88
54. Moraes, J. C. *et al.* High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One* **4**, (2009).
55. Reeves, P., Nielsen, F. & Fahey Jr, G. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **123**, 1939–1951 (1993).
56. Rittirsch, D., Huber-Lang, M. S., Flierl, M. A. & Ward, P. A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat. Protoc.* **4**, 31–36 (2009).
57. Morais, G. P. *et al.* Chronic uphill and downhill exercise protocols do not lead to sarcomerogenesis in mouse skeletal muscle. *J. Biomech.* **98**, 109469 (2020).
58. Hausman, D. B., Park, H. J. & Hausman, G. J. Isolation and Culture of Preadipocytes from Rodent White Adipose Tissue. in *Adipose Tissue Protocols* (ed. Yang, K.) 201–219 (Humana Press, 2008). doi:10.1007/ 978-1-59745-245-8

59. FOLCH, J., LEES, M. & SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509 (1957).

60. Shirai, N., Suzuki, H. & Wada, S. Direct methylation from mouse plasma and from liver and brain homogenates. *Anal. Biochem.* **343**, 48–53 (2005).

61. Burns, R. N. & Moniri, N. H. Agonism with the omega-3 fatty acids α-linolenic acid and docosahexaenoic acid mediates phosphorylation of both the short and long isoforms of the human GPR120 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 1030–1035 (2010).

62. Buras, J. A., Holzmann, B. & Sitkovsky, M. Model organisms: Animal models of sepsis: Setting the stage. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 854–865 (2005).

63. Oh, D. Y. *et al.* A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice. *Nat. Med.* (2014). doi:10.1038/nm.3614

64. Kaku, K., Enya, K., Nakaya, R., Ohira, T. & Matsuno, R. Long-term safety and efficacy of fasiglifam (TAK-875), a G-protein-coupled receptor 40 agonist, as monotherapy and combination therapy in Japanese patients with type 2 diabetes: a 52-week open-label phase III study. *Diabetes, Obes. Metab.* **18**, 925–929 (2016).

65. Marcinak, J. F., Munsaka, M. S., Watkins, P. B., Ohira, T. & Smith, N. Liver Safety of Fasiglifam (TAK-875) in Patients with Type 2 Diabetes: Review of the Global Clinical Trial Experience. *Drug Saf.* **41**, 625–640 (2018).

66. Oliveira, V. *et al.* Diets containing α-linolenic (<inf>ω</inf>3) or oleic (<inf>ω</inf>9) fatty acids rescues obese mice from insulin resistance. *Endocrinology* **156**, (2015).

67. De Waele, E., Malbrain, M. L. N. G. & Spapen, H. Nutrition in sepsis: A bench-to-bedside review. *Nutrients* **12**, 1–16 (2020).

68. Fagerberg, L. *et al.* Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 397–406 (2014).

69. Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. & Spiegelman, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-α: Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (80-.).* **259**, 87–91 (1993).

70. Lottenberg, A. M., Afonso, M. da S., Lavrador, M. S. F., Machado, R. M. & Nakandakare, E. R. The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. *J. Nutr. Biochem.* **23**, 1027–1040 (2012).

71. Reilly, S. M. & Saltiel, A. R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat. Rev. Endocrinol.* **13**, 633–643 (2017).

72. Davanzo, G. G., Castro, G. & Moraes-Vieira, P. M. M. Immunometabolic regulation of adipose tissue resident immune cells. *Curr. Opin. Pharmacol.* **58**, 44–51 (2021).

73. Chioléro, R., Revelly, J. P. & Tappy, L. Energy metabolism in sepsis and injury. *Nutrition* **13**, 45 (1997).

74. Ilias, I. *et al.* Adipose tissue lipolysis and circulating lipids in acute and subacute critical illness: Effects of shock and treatment. *J. Crit. Care* **29**, 1130.e5-1130.e9 (2014).

75. Goossens, C. *et al.* Adipose tissue protects against sepsis-induced muscle weakness in mice: From lipolysis to ketones. *Crit. Care* **23**, 1–17 (2019).

76. Ji, Y. *et al.* Short term high fat diet challenge promotes alternative macrophage polarization in adipose tissue via natural killer T cells and interleukin-4. *J. Biol. Chem.* **287**, 24378–24386 (2012).

77. Lyu, K. *et al.* Short-term overnutrition induces white adipose tissue insulin resistance through sn-1,2-diacylglycerol – PKCε – insulin receptorT1160 phosphorylation. *JCI Insight* **6**, 1–12 (2021).

78. Nakandakari, S. C. B. R. *et al.* Short-term flaxseed oil, rich in omega 3, protects mice against metabolic damage caused by high-fat diet, but not inflammation. *J. Nutr. Biochem.* **114**, 109270 (2023).

79. Ichimura, A. *et al.* Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature* **483**, 350–354 (2012).

80. Ingels, C., Gunst, J. & Van den Berghe, G. Endocrine and Metabolic Alterations in Sepsis and Implications for Treatment. *Critical Care Clinics* (2018). doi:10.1016/j.ccc.2017.08.006

81. Falciglia, M., Freyberg, R. W., Almenoff, P. L., D'Alessio, D. A. & Render, M. L. Hyperglycemia-related mortality in critically ill patients varies with admission diagnosis. *Crit. Care Med.* (2009). doi:10.1097/CCM.0b013e3181b083f7

82. Muredda, L., Kępczyńska, M. A., Zaibi, M. S., Alomar, S. Y. & Trayhurn, P. IL-1β and TNFα inhibit GPR120 (FFAR4) and stimulate GPR84 (EX33) and GPR41 (FFAR3) fatty acid receptor expression in human adipocytes: implications for the anti-inflammatory action of n-3 fatty acids. *Arch. Physiol. Biochem.* **124**, 97–108 (2018).

83. Zhi, D., Zhang, M., Lin, J., Liu, P. & Duan, M. GPR120 Ameliorates Apoptosis and Inhibits the Production of Inflammatory Cytokines in Renal Tubular Epithelial Cells. *Inflammation* **44**, 493–505 (2021).

84. Zhao, Y. Y. *et al.* Lipopolysaccharide inhibits GPR120 expression in macrophages via Toll-like receptor 4 and p38 MAPK activation. *Cell Biol. Int.* **44**, 89–97 (2020).

85. Hasan, A. U. *et al.* GPR120 in adipocytes has differential roles in the production of pro-inflammatory adipocytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **486**, 76–82 (2017).

86. Nascimento, D. C. *et al.* Sepsis expands a CD39+ plasmablast population that promotes immunosuppression via adenosine-mediated inhibition of macrophage antimicrobial activity. *Immunity* **54**, 2024-2041.e8 (2021).

87. Li, X., Yu, Y. & Funk, C. D. Cyclooxygenase-2 induction in macrophages is modulated by docosahexaenoic acid via interactions with free fatty acid receptor 4 (FFA4). *FASEB J.* **27**, 4987–4997 (2013).

88. Paschoal, V. A. *et al.* Positive Reinforcing Mechanisms between GPR120 and PPARγ Modulate Insulin Sensitivity. *Cell Metab.* **31**, 1173-1188.e5 (2020).

89. Sepsis. Available at: https://www.who.int/health-topics/sepsis#tab=tab_1.

(Accessed: 16th October 2021)

90. Kazemian, P., Kazemi-Bajestani, S. M. R., Alherbish, A., Steed, J. & Oudit, G. Y. The use of ω-3 poly-unsaturated fatty acids in heart failure: A preferential role in patients with diabetes. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **26**, 311–320 (2012).

91. Olshansky, B. *et al.* Mineral oil: Safety and use as placebo in REDUCE-IT and other clinical studies. *Eur. Hear. Journal, Suppl.* **22**, J34–J48 (2020).

92. Bhatt, D. L. *et al.* Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia. *N. Engl. J. Med.* **380**, 11–22 (2019).

10 ANEXO 1. Lista de publicações durante o período do doutorado

10.1 Artigos de primeira autoria gerados com os dados desse trabalho

1. **Nakandakari SCBR**, Gaspar RC, Kuga GK, Ramos CO, Vieira RF, Rios TDS, Muñoz VR, Sant'ana MR, Simabuco FM, da Silva ASR, Moura LP, Ropelle ER, Pauli JR, Cintra DE. Short-term flaxseed oil, rich in omega 3, protects mice against metabolic damage caused by high-fat diet, but not inflammation. J Nutr Biochem. 2023 Apr;114:109270. doi: 10.1016/j.jnutbio.2023.109270. Epub 2023 Jan 25. PMID: 36706930.

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Journal of Nutritional Biochemistry 114 (2023) 109270
Journal of Nutritional Biochemistry

RESEARCH PAPER

Short-term flaxseed oil, rich in omega 3, protects mice against metabolic damage caused by high-fat diet, but not inflammation

Susana Castelo Branco Ramos Nakandakari[a,b], Rafael Calais Gaspar[b,c], Gabriel Keine Kuga[c], Camila de Oliveira Ramos[a], Renan Fudoli Vieira[b,c], Thaiane da Silva Rios[a,b], Vitor Rosetto Muñoz[b,c], Marcella Ramos Sant'ana[a], Fernando Moreira Simabuco[d], Adelino Sanchez Ramos da Silva[e], Leandro Pereira Moura[c,f], Eduardo Rochete Ropelle[b,c,f], José Rodrigo Pauli[b,c,f], Dennys Esper Cintra[a,b,f,*]

[a] Laboratory of Nutritional Genomics, University of Campinas (UNICAMP), Limeira, São Paulo, Brazil
[b] Nutrigenomics and Lipids Research Center (CELN), University of Campinas (UNICAMP), Limeira, São Paulo, Brazil
[c] Laboratory of Molecular Biology of Exercise, University of Campinas (UNICAMP), Limeira, São Paulo, Brazil
[d] Multidisciplinary Laboratory of Food and Health (LABMAS), School of Applied Sciences (FCA), University of Campinas (UNICAMP), Limeira, São Paulo, Brazil
[e] School of Physical Education and Sport of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil
[f] Laboratory of Cell Signaling, Obesity and Comorbidities Research Center (OCRC), University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

Received 13 May 2022; received in revised form 2 January 2023; accepted 10 January 2023

Abstract

It is known that long-term high-fat diet (HF) feeding drastically affects the adipose tissue, contributing to metabolic disorders. Recently, short-term HF consumption was shown to affect different neuronal signaling pathways. Thus, we aimed to evaluate the inflammatory effects of a short-term HF and whether a diet containing omega-3 fatty acid fats from flaxseed oil (FS) has protective effects. Mice were divided into three groups for 3 d, according to their diets: Control group (CT), HF, or FS for 3 d. Lipid profiles were assessed through mass spectrometry and inflammatory markers by RT–qPCR and Western blotting. After short-term HF, mice increased food intake, body weight, adiposity, and fasting glucose. Increased mRNA content of *Ccl2* and *Tnf* was demonstrated in the HF compared to CT in mesenteric adipose tissue. In the liver, TNFα protein was higher in the HF group than in CT, followed by a decreased polyunsaturated fatty acids tissue incorporation in HF. On the other hand, the consumption of FS reduced food intake and fasting glucose, as well as increased omega-3 fatty acid incorporation in MAT and the liver. However, short-term FS was insufficient to control the early inflammation triggered by HF in MAT and the liver. These data demonstrated that a 3-d HF diet is enough to damage glucose homeostasis and trigger inflammation. In contrast, short-term FS protects against increased food intake and fasting glucose but not inflammation in mice.
© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Omega-3; Inflammation; Saturated fatty acids; Adipose tissue; Liver.

1. Background

Nutrients can change physiological and molecular parameters in both human and experimental models since their first consumption (acute) or after a cumulative intake (chronic) [1,2]. The consumption of diets rich in saturated fatty acids (SFAs) is an essential trigger for developing obesity and its comorbidities, such as diabetes type 2, cardiovascular diseases, and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [3]. Nevertheless, the development of the food industry increased fat consumption because it is a crucial ingredient in maintaining stability and shelf life, with flavor as an adjuvant effect [4–6].

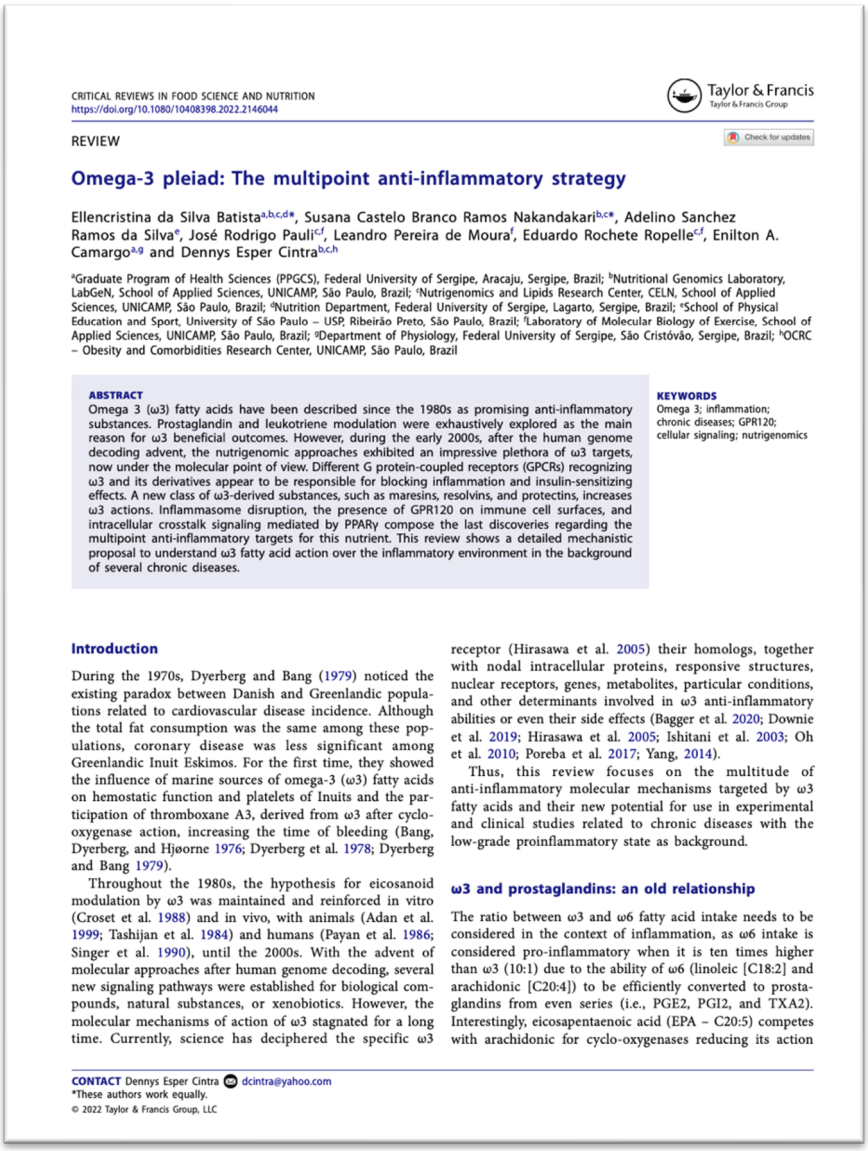
Among fats in industrialized foods, several research groups have targeted SFAs due to their inflammatory potential. SFAs are essential for micronutrient transportation, cell membrane composition, and homeostasis; however, the overconsumption of SFAs activates Toll-like receptor 4 (TLR4), an immune system receptor, which transduces a pro-inflammatory response through NFkB [7,8]. When long-term exposure to SFAs, several tissues are impaired, such as the hypothalamus, adipose tissue, liver, and skeletal muscle [9–11]. However, other tissues have shown metabolic damage after short-term high-fat diet (HF) feeding, such as the hypothalamus and hippocampus [1,12].

Adipose tissue is well-known as essential for storage and metabolic actions. However, this tissue can also produce and recruit several chemokines, cytokines, and immune cells and secrete

* Corresponding author at: Laboratory of Nutritional Genomics, University of Campinas (UNICAMP), R. Pedro Zaccaria, 1300, Jd. Sta. Luzia, CEP 13484-350, Limeira, São Paulo, Brazil.
E-mail address: dcintra@yahoo.com (D.E. Cintra).

https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2023.109270
0955-2863/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

2. da Silva Batista E*, **Nakandakari SCBR***, Ramos da Silva AS, Pauli JR, Pereira de Moura L, Ropelle ER, Camargo EA, Cintra DE. Omega-3 pleiad: The multipoint anti-inflammatory strategy. Crit Rev Food Sci Nutr. 2022 Nov 16:1-16. doi: 10.1080/10408398.2022.2146044. Epub ahead of print. PMID: 36382659.



CRITICAL REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND NUTRITION
https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2146044

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

REVIEW

Check for updates

Omega-3 pleiad: The multipoint anti-inflammatory strategy

Ellencristina da Silva Batista[a,b,c,d*], Susana Castelo Branco Ramos Nakandakari[b,c*], Adelino Sanchez Ramos da Silva[e], José Rodrigo Pauli[c,f], Leandro Pereira de Moura[f], Eduardo Rochete Ropelle[c,f], Enilton A. Camargo[a,g] and Dennys Esper Cintra[b,c,h]

[a]Graduate Program of Health Sciences (PPGCS), Federal University of Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil; [b]Nutritional Genomics Laboratory, LabGeN, School of Applied Sciences, UNICAMP, São Paulo, Brazil; [c]Nutrigenomics and Lipids Research Center, CELN, School of Applied Sciences, UNICAMP, São Paulo, Brazil; [d]Nutrition Department, Federal University of Sergipe, Lagarto, Sergipe, Brazil; [e]School of Physical Education and Sport, University of São Paulo – USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; [f]Laboratory of Molecular Biology of Exercise, School of Applied Sciences, UNICAMP, São Paulo, Brazil; [g]Department of Physiology, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil; [h]OCRC – Obesity and Comorbidities Research Center, UNICAMP, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Omega 3 (ω3) fatty acids have been described since the 1980s as promising anti-inflammatory substances. Prostaglandin and leukotriene modulation were exhaustively explored as the main reason for ω3 beneficial outcomes. However, during the early 2000s, after the human genome decoding advent, the nutrigenomic approaches exhibited an impressive plethora of ω3 targets, now under the molecular point of view. Different G protein-coupled receptors (GPCRs) recognizing ω3 and its derivatives appear to be responsible for blocking inflammation and insulin-sensitizing effects. A new class of ω3-derived substances, such as maresins, resolvins, and protectins, increases ω3 actions. Inflammasome disruption, the presence of GPR120 on immune cell surfaces, and intracellular crosstalk signaling mediated by PPARγ compose the last discoveries regarding the multipoint anti-inflammatory targets for this nutrient. This review shows a detailed mechanistic proposal to understand ω3 fatty acid action over the inflammatory environment in the background of several chronic diseases.

KEYWORDS
Omega 3; inflammation; chronic diseases; GPR120; cellular signaling; nutrigenomics

Introduction

During the 1970s, Dyerberg and Bang (1979) noticed the existing paradox between Danish and Greenlandic populations related to cardiovascular disease incidence. Although the total fat consumption was the same among these populations, coronary disease was less significant among Greenlandic Inuit Eskimos. For the first time, they showed the influence of marine sources of omega-3 (ω3) fatty acids on hemostatic function and platelets of Inuits and the participation of thromboxane A3, derived from ω3 after cyclo-oxygenase action, increasing the time of bleeding (Bang, Dyerberg, and Hjøorne 1976; Dyerberg et al. 1978; Dyerberg and Bang 1979).

Throughout the 1980s, the hypothesis for eicosanoid modulation by ω3 was maintained and reinforced in vitro (Croset et al. 1988) and in vivo, with animals (Adan et al. 1999; Tashijan et al. 1984) and humans (Payan et al. 1986; Singer et al. 1990), until the 2000s. With the advent of molecular approaches after human genome decoding, several new signaling pathways were established for biological compounds, natural substances, or xenobiotics. However, the molecular mechanisms of action of ω3 stagnated for a long time. Currently, science has deciphered the specific ω3 receptor (Hirasawa et al. 2005) their homologs, together with nodal intracellular proteins, responsive structures, nuclear receptors, genes, metabolites, particular conditions, and other determinants involved in ω3 anti-inflammatory abilities or even their side effects (Bagger et al. 2020; Downie et al. 2019; Hirasawa et al. 2005; Ishitani et al. 2003; Oh et al. 2010; Poreba et al. 2017; Yang, 2014).

Thus, this review focuses on the multitude of anti-inflammatory molecular mechanisms targeted by ω3 fatty acids and their new potential for use in experimental and clinical studies related to chronic diseases with the low-grade proinflammatory state as background.

ω3 and prostaglandins: an old relationship

The ratio between ω3 and ω6 fatty acid intake needs to be considered in the context of inflammation, as ω6 intake is considered pro-inflammatory when it is ten times higher than ω3 (10:1) due to the ability of ω6 (linoleic [C18:2] and arachidonic [C20:4]) to be efficiently converted to prostaglandins from even series (i.e., PGE2, PGI2, and TXA2). Interestingly, eicosapentaenoic acid (EPA – C20:5) competes with arachidonic for cyclo-oxygenases reducing its action

CONTACT Dennys Esper Cintra dcintra@yahoo.com
*These authors work equally.
© 2022 Taylor & Francis Group, LLC

10.2 Artigos como colaboradora

1. Rodrigues PB, Dátilo MN, Sant'Ana MR, Nogueira GADS, Marin RM, **Nakandakari SCBR**, de Moura LP, da Silva ASR, Ropelle ER, Pauli JR, Cintra DE. The early impact of diets enriched with saturated and unsaturated fatty acids on intestinal inflammation and tight junctions. J Nutr Biochem. 2023

Sep;119:109410. doi: 10.1016/j.jnutbio.2023.109410. Epub 2023 Jun 24. PMID: 37364793.

2. Muñoz VR, Botezelli JD, Gaspar RC, da Rocha AL, Vieira RFL, Crisol BM, Braga RR, Severino MB, **Nakandakari SCBR**, Antunes GC, Brunetto SQ, Ramos CD, Velloso LA, Simabuco FM, de Moura LP, da Silva ASR, Ropelle ER, Cintra DE, Pauli JR. Effects of short-term endurance and strength exercise in the molecular regulation of skeletal muscle in hyperinsulinemic and hyperglycemic Slc2a4$^{+/-}$ mice. Cell Mol Life Sci. 2023 Apr 13;80(5):122. doi: 10.1007/s00018-023-04771-2. PMID: 37052684.

3. Pauli JR, Muñoz VR, Vieira RFL, **Nakandakari SCBR**, Macêdo APA, de Lima RD, Antunes GC, Simabuco FM, da Silva ASR, de Moura LP, Ropelle ER, Cintra DE, Mekary RA, Zaghloul I. Exercise training restores weight gain and attenuates hepatic inflammation in a rat model of non-celiac gluten sensitivity. J Cell Biochem. 2023 Feb 15. doi: 10.1002/jcb.30387. Epub ahead of print. PMID: 36791261.

4. Brícola RS, Cordeiro AV, Crisol BM, Braga RR, de Melo DG, Rocha MB, Gaspar RC, **Nakandakari SCBR**, Silva VRR, Anaruma CP, Katashima CK, Canciglieri RDS, Munõz VR, Pavan ICB, Pinto AP, Simabuco FM, Silva ASRD, Moura LP, Pauli JR, Cintra DE, Ropelle ER. Aging reduces ABHD5 protein content in the adipose tissue of mice: The reversal effect of exercise. Cell Biochem Funct. 2023 Jan;41(1):128-137. doi: 10.1002/cbf.3770. Epub 2022 Dec 14. PMID: 36515301.

5. Dias BV, Gomes SV, Castro MLDC, Carvalho LCF, Breguez GS, de Souza DMS, Ramos CO, Sant'Ana MR, **Nakandakari SCBR**, Araujo CM, Grabe-Guimarães A, Talvani A, Carneiro CM, Cintra DEC, Costa DC. EPA/DHA and linseed oil

have different effects on liver and adipose tissue in rats fed with a high-fat diet. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2022 Apr;159:106622. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2022.106622. Epub 2022 Jan 25. PMID: 35091082.

6. Batista ES, da Silva Rios T, Muñoz VR, Jesus JS, Vasconcelos MM, da Cunha DT, Marques-Rocha JL, **Nakandakari SCBR**, Lara R, da Silva ASR, Pauli JR, Ropelle ER, Mekary RA, de Moura LP, Camargo EA, Cintra DE. Omega-3 mechanism of action in inflammation and endoplasmic reticulum stress in mononuclear cells from overweight non-alcoholic fatty liver disease participants: study protocol for the "Brazilian Omega Study" (BROS)-a randomized controlled trial. Trials. 2021 Dec 18;22(1):927. doi: 10.1186/s13063-021-05702-x. PMID: 34922604; PMCID: PMC8684080.

7. De Carvalho FG, Muñoz VR, Brandao CFC, Simabuco FM, Pavan ICB, **Nakandakari SCBR**, Pauli JR, De Moura LP, Ropelle ER, Marchini JS, da Silva ASR, de Freitas EC. Taurine upregulates insulin signaling and mitochondrial metabolism in vitro but not in adipocytes of obese women. Nutrition. 2022 Jan;93:111430. doi: 10.1016/j.nut.2021.111430. Epub 2021 Jul 24. PMID: 34479044.

8. Braga RR, Crisol BM, Brícola RS, Sant'ana MR, **Nakandakari SCBR**, Costa SO, Prada PO, da Silva ASR, Moura LP, Pauli JR, Cintra DE, Ropelle ER. Exercise alters the mitochondrial proteostasis and induces the mitonuclear imbalance and UPR^{mt} in the hypothalamus of mice. Sci Rep. 2021 Feb 15;11(1):3813. doi: 10.1038/s41598-021-82352-8. PMID: 33589652; PMCID: PMC7884690.

9. Vieira RFL, Muñoz VR, Junqueira RL, de Oliveira F, Gaspar RC, **Nakandakari SCBR**, Costa SO, Torsoni MA, da Silva ASR, Cintra DE, de Moura LP, Ropelle ER, Zaghloul I, Mekary RA, Pauli JR. Time-restricted feeding combined with

aerobic exercise training can prevent weight gain and improve metabolic disorders in mice fed a high-fat diet. J Physiol. 2022 Feb;600(4):797-813. doi: 10.1113/JP280820. Epub 2021 Jan 26. PMID: 33450053.

10. Gaspar RC, **Nakandakari SCBR**, Muñoz VR, Vieira RFL, da Silva ASR, Cintra DE, de Moura LP, Ropelle ER, Pauli JR. Acute physical exercise increases PI3K-p110α protein content in the hypothalamus of obese mice. J Anat. 2021 Mar;238(3):743-750. doi: 10.1111/joa.13342. Epub 2020 Oct 22. PMID: 33094520; PMCID: PMC7855078.

11. Gaspar RC, Muñoz VR, **Nakandakari SCBR**, Vieira RFL, da Conceição LR, de Oliveira F, Crisol BM, da Silva ASR, Cintra DE, de Moura LP, Ropelle ER, Zaghloul I, Mekary RA, Pauli JR. Aging is associated with increased TRB3, ER stress, and hepatic glucose production in the liver of rats. Exp Gerontol. 2020 Oct 1;139:111021. doi: 10.1016/j.exger.2020.111021. Epub 2020 Jul 10. PMID: 32659331.

11 ANEXO 2. Certificado CEUA

UNICAMP

CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **A influência do GPR120 no sistema imune**, registrada com o nº **5421-1/2019**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Dennys Esper Cintra e Susana Castelo Branco Ramos Nakandakari**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido** aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais** da **Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP,** em reunião de **14/11/2019**.

Finalidade:	**( ) Ensino (X) Pesquisa Científica**
Vigência do projeto:	01/01/2020 a 01/02/2024
Vigência da autorização para manipulação animal:	14/11/2019 a 01/02/2024
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	12 Machos

UNICAMP

CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**A Influência do GPR120 no sistema imune**", (protocolo CEUA/UNICAMP nº **5421-1/2019**), de responsabilidade do **Prof. Dr. Dennys Esper Correa Cintra** e da aluna **Susana Castelo Branco Ramos Nakandakari**, teve a alteração de metodologia experimental abaixo autorizada pela CEUA-UNICAMP:

Acréscimo do número de tecidos investigados, que se mostraram de interesse após análises de resultados preliminares de bioinformática em banco público de dados.

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado aprovado originalmente pela reunião CEUA/UNICAMP ocorrida em 14/11/2019.

Campinas, 22 de setembro de 2020.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente da CEUA/UNICAMP

Rosangela dos Santos
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/