

AMANDA MARREIRO BARBOSA

Suplementação com óleo de macadâmia associada à dieta de cafeteria com maior concentração de açúcares simples promove incremento no acúmulo de lipídeos hepáticos.

Tese de doutorado, apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina em cumprimento a requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas. Orientador: Prof. Dr. Everson Araújo Nunes
Coorientador: Prof. Dr. Alex Rafacho

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Barbosa, Amanda Marreiro

Suplementação com óleo de macadâmia associada à dieta de cafeteria com maior concentração de açúcares simples promove incremento no acúmulo de lipídeos hepáticos. / Amanda Marreiro Barbosa ; orientador, Everson Araújo Nunes, coorientador, Alex Rafacho, 2018.

131 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

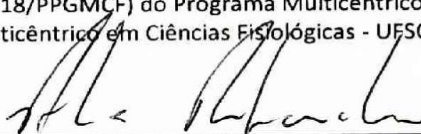
1. Ciências Fisiológicas. 2. Dieta de cafeteria. 3. Esteatose hepática. 4. Óleo de macadâmia. I. Nunes, Everson Araújo. II. Rafacho, Alex. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. IV. Título.

“Suplementação com óleo de macadâmia associada à dieta de cafeteria com maior concentração de açúcares simples promove incremento no acúmulo de lipídeos hepáticos”

Por

Amanda Marreiro Barbosa

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (002/2018/PPGMCF) do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas - UFSC.



Prof.(a) Dr.(a) Alex Rafacho

Coordenador(a) do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas

Banca examinadora:



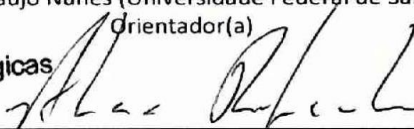
Dr.(a) Everson Araújo Nunes (Universidade Federal de Santa Catarina)

Alex Rafacho

Coordenador do PPG

Orientador(a)

Multicêntrico em Ciências Fisiológicas
CCRI/UFSC



Dr.(a) Mauricio da Silva Krause (Universidade Federal do Rio Grande do Sul – participação por videoconferência)



Dr.(a) Guilherme Fleury Fina Speretta (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.(a) Elisabeth Wazlawik (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 21 de junho de 2018.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar os meus passos nessa trajetória e por me dar forças para seguir a diante.

A minha mãe (Gorete) e meu pai (Nonato), por serem o meu exemplo de coragem, força, dedicação, respeito e companheirismo. Vocês são os verdadeiros responsáveis por esta conquista.

A minha irmã (Andreia), por ter me ensinado a conjugar o verbo esperançar, me incentivando e vibrando sempre comigo.

Aos meus familiares, que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse até aqui, tenho certeza que cada um sabe o quanto importante foi nesta jornada, muito obrigada pelo apoio.

Aos amigos, que a vida me presenteou e permitiu compartilhar dias mais leves e felizes durante estes quatro anos. Vocês foram meu alicerce em muitos momentos desta jornada, me incentivando e me mantendo firme na trajetória.

Aos professores e funcionários da Universidade Federal de Santa Catarina, em particular aos pertencentes ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Departamento de Ciências Fisiológicas e Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas, que contribuíram com a minha formação e crescimento profissional.

Aos professores Everson Araújo Nunes (orientador) e Alex Rafacho (coorientador) pela oportunidade concedida, pelo conhecimento compartilhado e por toda aprendizagem que levarei para toda vida.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Por fim, minha gratidão a cada um que de maneira particular sabe o quanto foi importante nesta etapa.

RESUMO

O modelo experimental de obesidade induzido por dietas ricas em gorduras e açúcares simples promove alterações glicêmicas, como hiperglicemia e intolerância à glicose, e tem sido utilizado como estudo da esteatose hepática e também do quadro de inflamação presente nesta doença. A suplementação com óleos ricos em ácidos graxos monoinsaturados parece contribuir para a atenuação dessas alterações. Neste estudo, foi avaliado o impacto da ingestão de óleo de macadâmia sobre o acúmulo de lipídios hepáticos em dois tipos de dieta de cafeteria com composição de macronutrientes diferentes. Para tal, camundongos C57BL/6 foram divididos em quatro grupos: controle (CTL), alimentados com dieta de cafeteria (DC), suplementados com óleo de macadâmia (OM: 1g/kg de m.c. por via oral) e alimentados com dieta de cafeteria e suplementados com óleo de macadâmia (DOM), por 120 dias. Foram adotados dois modelos experimentais com duração de 120 dias com diferentes composições de dieta de cafeteria (Modelo 1: 47% de carboidratos, sendo destes 21% de açúcar refinado simples; Modelo 2: 54% de carboidratos, sendo destes 41% de açúcar refinado simples). Observamos que em ambos os modelos, a dieta de cafeteria promoveu: aumento da adiposidade visceral, da glicemia de jejum, redução da tolerância à glicose, além do aumento no conteúdo de lipídeos e células de Kupffer em tecido hepático, assim como aumento na atividade plasmática da aspartato aminotransferase (AST). Quando a dieta de cafeteria foi associada à suplementação com óleo de macadâmia, em ambos os modelos, houve redução no conteúdo de células de Kupffer. No entanto, observamos que a combinação do óleo de macadâmia com a dieta de cafeteria promoveu efeitos distintos dependendo do percentual de açúcares simples ingerido. Na dieta com maior quantidade de açúcar refinado (modelo 2), essa interação promoveu incremento na glicemia de jejum, na atividade plasmática da AST e maior acúmulo de lipídeos hepáticos em relação ao grupo DC, mesmo reduzindo o conteúdo de células inflamatórias hepáticas. Com isso, concluímos que o consumo de dieta de cafeteria independente da sua composição promove alterações no metabolismo glicêmico e lipídico, característica de um modelo de obesidade. Já a suplementação com óleo de macadâmia (1g/kg/dia), quando associada com dieta de cafeteria contendo maior percentual de açúcares simples (Modelo 2), intensificou as alterações glicêmicas e lipídicas já proporcionadas pela dieta de cafeteria. Sendo assim, estes achados alertam para o consumo de alimentos com alta densidade calórica e com baixo valor nutricional e fornecem informações sobre um efeito

específico do óleo de macadâmia dependendo da sua interação com outros nutrientes.

Palavras-chave: dieta de cafeteria, obesidade, esteatose hepática, óleo de macadâmia

ABSTRACT

The diet-induced obesity model (using diets rich in fats and sucrose) has also been used as a model for hepatic steatosis and inflammation. However, the supplementation with oils rich in monounsaturated fatty acids seems to play an important role in the attenuation of these alterations. In this study, we tested two distinct cafeteria diets compositions to induce obesity and evaluated the effect of macadamia oil supplementation on several parameters including hepatic fat accumulation. C57BL/6 mice were divided into four groups: control group (CT), cafeteria diet (CAF), supplemented with macadamia oil at 1 g/kg of body weight (MO) and cafeteria diet supplemented with macadamia oil (CAF+MO), for 120 days. Two diet-induced obesity models, with differences in the cafeteria diet composition, were used: Model 1 - 47% of carbohydrates (21% refined carbohydrates); Model 2 - 54% of carbohydrates (41% refined carbohydrates). Mice treated with any cafeteria diet showed an increase in visceral adiposity, fasting glycemia, and a reduction in glucose tolerance. Moreover, cafeteria diet ingestion increased hepatic fat accumulation, plasma aminotransferase (AST) activity, and Kupffer cells. Interestingly, the association of cafeteria diet with macadamia oil reduced Kupffer cells in both models. However, the combination of cafeteria diet with macadamia oil had different effects on other parameters depending on the percentage of refined carbohydrates. Combining a diet enriched in refined sugar (model 2) with macadamia oil ingestion caused a further increment in fasting glycemia, AST activity and hepatic fat accumulation in comparison to CAF, even though there were less hepatic inflammatory cells. Cafeteria diet, regardless the composition, induced changes in glucose and lipid metabolism, characteristics observed in obesity models. The association of macadamia oil supplementation (1 g/kg/day) with cafeteria diet, with a higher percentage of refined carbohydrates (Model 2), enhanced the metabolic disturbances. Therefore, taken together, our results highlight the detrimental effect of the intake of foods enriched in sugar, with high energy density and low nutritional value.

Keywords: cafeteria diet; obesity; hepatic steatosis; macadamia oil

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fisiopatologia da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), cujas causas e consequências se assemelham às da síndrome metabólica.	36
Figura 2 - Desenho do estudo e procedimentos experimentais.	52
Figura 3 - Consumo de ração e consumo calórico de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 120 dias.	59
Figura 4 - Consumo de macronutrientes de camundongos alimentados com duas composições de dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 120 dias.	60
Figura 5 - Massa corporal de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 120 dias...	61
Figura 6 - Curva glicêmica de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia ao longo dos 120 dias.	62
Figura 7 - Glicemia de jejum de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 120 dias...	65
Figura 8 - Tolerância à glicose de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, após 90 e 120 dias de intervenção – Modelo 1.	68
Figura 9 - Tolerância à glicose de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, após 90 e 120 dias de intervenção – Modelo 2.	70
Figura 10 – Teste de tolerância à insulina de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, após 120 dias de intervenção.	71
Figura 11 - Concentrações plasmáticas de insulina de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 120 dias – Modelos 1 e 2.	73
Figura 12 - Concentrações plasmáticas de TAG e CT de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 120 dias.	75
Figura 13 - Conteúdo de TAG e CT hepáticos de camundongos alimentados com diferentes dietas de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 120 dias.	77
Figura 14 – Análise histológica do fígado com identificação dos lipídeos hepáticos, micro e macrogotículas de gordura em camundongos CTL e tratados com diferentes dieta de cafeteria, suplementado ou não com óleo de macadâmia durante 120 dias.	79

Figura 15 – Análise histológica das células de Kupffer em camundongos CTL e tratados com dieta de cafeteria suplementados ou não com óleo de macadâmia durante 120 dias - Modelos 1 e 2.....	84
Figura 16 – Imagens representativas da análise histológica do fígado com identificação do percentual de lipídeos hepáticos e células de Kupffer em camundongos CTL e tratados com dieta de cafeteria, suplementados ou não com óleo de macadâmia -Modelo1.	85
Figura 17 - Imagens representativas da análise histológica do fígado com identificação do percentual de lipídeos hepáticos e células de Kupffer em camundongos CTL e tratados com dieta de cafeteria, suplementados ou não com óleo de macadâmia –Modelo2.....	86
Figura 18 - Atividade enzimática da AST e ALT plasmática de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 120 dias – Modelos 1 e 2.....	88
Figura 19 - Massa corporal de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 90 dias...	123
Figura 20 - Glicemia de jejum de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 90 dias...	125
Figura 21 - Tolerância à glicose e sensibilidade à insulina de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 90 dias.	126
Figura 22 - Concentrações plasmáticas e conteúdo hepático de TAG e CT de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 90 dias.	128

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Percentual de contribuição dos macronutrientes e valor calórico total da dieta padrão e da dieta de cafeteria consumidas pelos camundongos.....	48
Quadro 2- Percentual de ácidos graxos presentes nas dietas a partir da cromatografia líquida de alta performance.....	49
Quadro 3- Percentual de ácidos graxos presentes no óleo de macadâmia a partir da cromatografia líquida de alta performance.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos de diferentes tipos de dietas sobre a obesidade, hiperglicemia e dislipidemia em roedores.	27
Tabela 2 - Efeitos da suplementação de ácidos graxos monoinsaturados, isolados ou provenientes de fontes alimentares em modelos de alterações metabólicas induzidas por dietas.	41
Tabela 3 - Efeitos da suplementação de óleo de macadâmia em modelos de alterações metabólicas induzidas por dietas.	42
Tabela 4 – Perfil de ácidos graxos em tecido hepático de camundongos CTL e tratados com dieta de cafeteria suplementados ou não com óleo de macadâmia durante 120 dias – Modelos 1 e 2.	82
Tabela 5– Concentração de citocinas (pg/mg de proteína total) em tecido hepático de camundongos CTL e tratados com dieta de cafeteria suplementados ou não com óleo de macadâmia durante 120 dias – Modelos 1 e 2.	89
Tabela 6- Índice de adiposidade (%) e fígado (mg/g de m.c.) de camundongos CTL e tratados com dieta de cafeteria suplementados ou não com óleo de macadâmia durante 120 dias – Modelos 1 e 2.	90
Tabela 7- Resumo dos efeitos do consumo da dieta de cafeteria e da suplementação com óleo de macadâmia nos Modelos experimentais 1 e 2.	92
Tabela 8- Índice de adiposidade (%) e massa do fígado (mg/g de m.c.) de camundongos CTL e tratados com dieta de cafeteria suplementados ou não com óleo de macadâmia durante 90 dias.	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC A1 - Proteína cassete ligada ao ATP 1
ACC - Acetil-CoA carboxilase
AGLs - Ácidos graxos livres
AGMIs - Ácidos graxos monoinsaturados
AGs - Ácidos graxos
Akt - Proteína cinase B
ALT - Alanina aminotransferase
AMPc - Monofosfato de adenosina cíclico
ApoA-100 - Apolipoproteína A-100
ApoA-I - Apolipoproteína A-I
ApoA-II - Apolipoproteína A-II
ApoA-IV - Apolipoproteína A-IV
ApoB-48 - Apolipoproteína B-48
ApoC-II - Apolipoproteína C-II
ApoC-III - Apolipoproteína C-III
AST - Aspartato aminotransferase
ATGL - Lipase de triacilglicerol
BMMC - Bromo metil metoxi coumirin
CAF - *Cafeteria diet*
CAM - Camundongo
CETP - Proteína de transferência do éster de colesterol
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CHO - Carboidrato
CoA - Coenzima A
CT - Colesterol total
CTL - Grupo controle
DAG - Diacilglicerol
DC - Grupo dieta de cafeteria
DM2 - Diabetes Mellitus Tipo 2
DNL - Lipogênese de novo (*De novo lipogenesis*)
DOM - Grupo dieta de cafeteria + óleo de macadâmia
EPM - Erro padrão da média
EVOO - Azeite de oliva extra virgem (*Extra-virgin olive oil*)
FAS - Sintase dos ácidos graxos (*Fatty acid synthase*)
FGF21 - Fator de crescimento fibroblástico 21
GGT - Gamaglutamiltransferase
Glicerol-3-P - Glicerol-3-fosfato
GWAS - *Genome-wide association study*

HDL - *High-density lipoprotein*
HFD - *High fat diet*
HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*
HSL - Lipase hormônio sensível (*Hormone-sensitive lipase*)
HSP-P - Lipase hormônio sensível fosforilada
IDE - Enzima degradadora de insulina (*Insulin-degrading enzyme*)
IDL - *Intermediary density lipoprotein*
IMC - Índice de massa corporal
ipGTT - Teste de tolerância à glicose intraperitoneal
ipITT - Teste de tolerância à insulina intraperitoneal
IRS-1 - Substrato do receptor de insulina 1
JNK - Cinase N-terminal c-Jun
K - Constante de decaimento de glicose
LANDI - Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação
LBP - Proteína de ligação lipopolissacárida
LCAT - Lecitina-colesterol aciltransferase
LDL - *Low density lipoprotein*
LIP - Lipídeos
LPL - Lipase lipoproteica
LPS - Lipopolissacarídeos
MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos-1
MGL - Lipase de monoacilglicerol
MTP - Proteína de transferência microssomal
NAFL - Esteatose hepática não alcoólica
NAFLD - Doença hepática gordurosa não alcoólica
NASH - Esteatohepatite não alcoólica
NEFA - Ácidos graxos não esterificados
NFκB - Fator nuclear κB
NHANES - *National Health and Nutrition Examination Survey*
OM - Grupo óleo de macadâmia
m.c. - massa corpórea
PAI-1 - Inibidor do ativador de plasminogênio-1
PCR - Proteína C reativa
PDH - Piruvato desidrogenase
PKA - Proteína cinase A
PPAR-α - Receptor ativado por proliferador de peroxissoma-α
RI - Resistência à ação da insulina
SCD-1 - Esteatoil-coenzima A-dessaturase
SM - Síndrome Metabólica
SREBP-1 - Proteína de ligação do elemento regulador de esteroides 1
TAG - Triacilglicerol

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
VLDL - *Very low density lipoprotein*
WHO - *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 OBESIDADE.....	23
1.1.1 Definição e dados epidemiológicos	23
1.1.2 Etiologia da Obesidade.....	23
1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS INDUZIDOS POR DIETAS	26
1.3 METABOLISMO DOS LIPÍDIOS.....	29
1.4 ADIPOSIDADE VISCERAL E DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA	34
1.5 ÁCIDOS GRAXOS MONOINSATURADOS COMO ESTRATÉGIA NUTRICIONAL.....	37
2 HIPÓTESE.....	45
3 OBJETIVOS.....	45
3.1 OBJETIVO GERAL	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 ANIMAIS.....	47
4.1.1 Cálculo amostral.....	47
4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	47
4.3 CONSUMO DE RAÇÃO E PARÂMETROS METABÓLICOS .50	
4.3.1 Consumo de ração e massa corporal.....	50
4.3.2 Parâmetros metabólicos	51
4.3.2.1 Avaliação da glicemia em jejum.....	51
4.3.2.2 Avaliação da tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT).....	51
4.3.2.3 Avaliação da sensibilidade à insulina “in vivo”.....	51
4.3.2.4 Eutanásia dos animais.....	52
4.3.2.5 Pesagem de órgãos e tecidos.....	52
4.3.2.6 Análise bioquímica plasmática.....	52
4.3.2.7 Conteúdo de triacilglicerol e colesterol total hepático.....	53

4.3.2.8Análise histológica do fígado e determinação do grau de esteatose.....	53
4.3.2.9Perfil de ácidos graxos em tecido hepático.....	54
4.3.2.10Dosagem de citocinas em tecido hepático.....	55
4.4 TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	55
5 RESULTADOS.....	57
5.1 ALTERAÇÕES NO CONSUMO DE RAÇÃO, DE MACRONUTRIENTES E NA MASSA CORPORAL APÓS 120 DIAS DO CONSUMO DE DIFERENTES DIETAS DE CAFETERIA E DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE MACADÂMIA.	58
5.2 O CONSUMO DE DIETA DE CAFETERIA PROMOVEU AUMENTO NA GLICEMIA DE JEJUM E REDUÇÃO DA TOLERÂNCIA À GLICOSE.	61
5.3 O CONSUMO DE DIFERENTES DIETAS DE CAFETERIA COM OU SEM A SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE MACADÂMIA DURANTE 120 DIAS PROMOVEU ALTERAÇÕES NO PERFIL LIPÍDICO PLASMÁTICO DE CAMUNDONGOS.	73
5.4 O CONSUMO DE DIETA DE CAFETERIA PROMOVEU ACÚMULO DE LIPÍDEOS HEPÁTICOS APÓS 120 DIAS DE INTERVENÇÃO.	76
5.5 O CONSUMO DE DIETA DE CAFETERIA E A SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE MACADÂMIA PROMOVERAM ALTERAÇÕES NOS MARCADORES DA FUNÇÃO HEPÁTICA, MAS NÃO ALTERARAM AS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS APÓS 120 DIAS DE INTERVENÇÃO EM AMBOS OS MODELOS EXPERIMENTAIS.....	83
5.6 CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DE DIETA DE CAFETERIA APRESENTARAM AUMENTO DA ADIPOSIDADE VISCERAL E DIMINUIÇÃO DA MASSA DO FÍGADO APÓS 120 DIAS DE INTERVENÇÃO, INFLUENCIADO OU NÃO PELA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE MACADÂMIA.	89
6 DISCUSSÃO.....	93
7 CONCLUSÃO.....	107
REFERÊNCIAS.....	109
APÊNDICE A - Estudo Piloto.....	123
ANEXO A.....	131

1 INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE

1.1.1 Definição e dados epidemiológicos

A obesidade é definida como uma doença crônica de natureza multifatorial, dentre os quais se destacam fatores ambientais, nutricionais e genéticos, e é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, acarretando prejuízos à saúde (BRASIL, 2007). Segundo a *World Health Organization* - WHO (1995), um indivíduo adulto é considerado obeso quando o seu índice de massa corporal (IMC), determinado pela divisão da massa do indivíduo pelo quadrado de sua altura, é igual ou superior a 30 kg/m^2 , independente do sexo.

No mundo, quase 38% dos adultos apresentam obesidade, como mostram os dados do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) de 2013-2014 e quase 8% dos adultos são extremamente obesos ($\text{IMC} \geq 40,0 \text{ kg/m}^2$). Tal percentual de obesidade é mais alto entre as mulheres (40,4%) em comparação aos homens (35,0%). Além disso, a prevalência da obesidade parece ocorrer mais entre os adultos de meia-idade (41% de 40 a 59 anos de idade) quando comparados a adultos jovens (34,3% para 20 a 39 anos de idade) e idosos (38,5% dos adultos com 60 anos ou mais) (FLEGAL et al., 2016).

No Brasil, a prevalência de obesidade em adultos é de aproximadamente 17,5% em ambos os sexos e quadruplicou entre os homens e duplicou entre as mulheres nos últimos 35 anos (VIGITEL, 2014).

A obesidade está associada ao aumento significativo na mortalidade e com o risco de doenças, incluindo Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2), hipertensão, dislipidemia, doença cardíaca, acidente vascular cerebral, apneia do sono, câncer, dentre outras (BIRO; WIEN, 2010; MOLLER; KAUFMAN, 2005).

1.1.2 Etiologia da Obesidade

Como doença de natureza multifatorial, a obesidade pode sofrer influência de fatores genéticos e de fatores ambientais, por exemplo. Os fatores genéticos influenciam a obesidade de duas maneiras: 1) com genes que são fatores primários no desenvolvimento da obesidade, como a deficiência de leptina, hormônio que auxilia no controle da saciedade; 2) genes de suscetibilidade, nos quais os fatores ambientais agem, levando à obesidade. Além da herdabilidade do peso, a taxa metabólica, a resposta

térmica aos alimentos e a atividade física espontânea são, em certa medida, hereditárias (LOOS, 2012; RANKINEN et al., 2006).

Nas últimas décadas, houve mudança nos padrões alimentares da população brasileira, caracterizada pela elevação do consumo de alimentos processados, industrializados, com alto valor energético, baixo teor de nutrientes, altos teores de sódio, de gorduras saturadas, gorduras *trans* e carboidratos refinados, assim como a redução do consumo de alimentos “*in natura*”, ricos em fibras (LEVY et al., 2012).

Essa mudança nos hábitos alimentares tem contribuído para o desequilíbrio energético observado na obesidade, o que pode levar ao ganho de peso e distúrbios metabólicos causando estresse e disfunção tecidual (GUILHERME et al., 2008).

As mudanças no fornecimento global de alimentos, incluindo a disponibilidade de alimentos baratos, saborosos e com alta densidade calórica, podem ser responsáveis, em parte, pelo aumento da prevalência da obesidade (SWINBURN et al., 2011).

Dados epidemiológicos sugerem que dieta rica em gordura saturada e açúcar refinado, está associada à obesidade. Em avaliação prospectiva de três coortes (120.877 homens e mulheres), o aumento do consumo de batatas fritas, bebidas açucaradas e carnes processadas foi diretamente associado ao ganho de peso (MOZAFFARIAN et al., 2011).

Aliado à qualidade da dieta, outros fatores contribuem para o desenvolvimento da obesidade. Estilo de vida sedentário, por exemplo, reduz o gasto de energia e promove o ganho de massa corporal. A partir de dados do NHANES, foi observado que a obesidade foi mais evidente e inversamente proporcional à atividade física moderadamente vigorosa, e diretamente proporcional ao tempo assistindo televisão, prática essa rotineira na atualidade (MAHER et al., 2013).

De todos os comportamentos sedentários, assistir televisão por tempo prolongado parece ser o mais preditivo risco de obesidade e de DM2. No *Nurses' Health Study*, após o ajuste para idade, tabagismo, nível de exercício e fatores alimentares, cada incremento de duas horas gasto assistindo televisão estava associado ao aumento de 23% (95% IC 17-30%) no risco de obesidade e aumento de 14% (95% IC 5-23%) no risco de DM2 (HU, 2003).

Além disso, Spiegel, Tasali, Penev (2004) realizaram um estudo com 12 homens adultos saudáveis, com massa corporal normal. Estes foram submetidos a duas noites de restrição de sono (quatro horas por noite) e duas noites de extensão de sono (10 horas por noite), espaçados

com seis semanas de intervalo com condições controladas de ingestão calórica e atividade física. Os autores mostraram que a restrição do sono, quando comparada com a extensão do sono, foi associada à diminuição da leptina sérica (hormônio anorexigênico), e ao aumento da grelina sérica (hormônio orexigênico), refletindo no aumento da fome e do apetite (em particular para alimentos com alta densidade calórica e ricos em carboidratos simples).

Outro fator, como a nutrição materna ou perfil endócrino durante a gestação é provavelmente um determinante importante da programação metabólica, podendo ter efeitos permanentes sobre a predisposição de um indivíduo para a obesidade e doença metabólica (WAHI; ANAND, 2013). Como exemplo, o peso corporal da mãe durante a gravidez pode influenciar o tamanho e a composição corporal posterior de seu bebê. O ganho excessivo de peso durante a gestação é fator de risco para a obesidade infantil. Além disso, as crianças nascidas de mães diabéticas têm maior risco de sobrepeso quando crianças e adultos, assim como as crianças cujas mães fumaram durante a gravidez (NG et al., 2014; PATRO et al., 2013).

Um estudo realizado com ratos, mostrou que um modelo de obesidade paterna induzida por dieta rica em gordura causa impacto direto sobre a prole feminina que desenvolveu intolerância à glicose a partir das 6 semanas de idade (NG et al., 2010).

Lecomte et al. (2016) mostrou que a prole macho de ratos obesos, alimentados com dieta rica em gordura, apresentou crescimento alterado impulsionado principalmente pela diminuição na secreção do hormônio do crescimento, observado com 8 semanas de idade. Os autores desse estudo descrevem que este ambiente resultou na diminuição da adipogênese e do crescimento muscular levando a músculos menores. A capacidade reduzida de armazenamento lipídico do tecido adiposo destes animais causou acúmulo de lipídeos ectópicos, como o observado no músculo sóleo da prole aos 6 meses de idade.

Além disso, nos últimos anos, o consumo destas dietas compostas por alimentos palatáveis, com alto valor energético e ricas em gorduras saturadas e carboidratos simples, tem sido associado a maior permeabilidade intestinal e endotoxemia metabólica que, por sua vez, participam da ocorrência de distúrbios metabólicos (KAAKOUSH et al., 2016).

A ligação entre o alto consumo destas dietas com distúrbios metabólicos, e disbiose intestinal, pode estar relacionada aos lipopolissacarídeos (LPS). Dados clínicos e experimentais confirmam que os LPS contribuem significativamente para o desenvolvimento de

doenças hepáticas inflamatórias relacionadas com a obesidade, tais como a doença hepática gordurosa não alcoólica e a esteatohepatite não alcoólica (NASH). O aumento nas concentrações plasmáticas de LPS pode acarretar no aumento da produção de endotoxina o que promove alterações na microbiota intestinal (CANI et al., 2007).

Assim, por ser uma doença que está se alastrando a cada ano e que é de natureza multifatorial, com influência predominante do estilo de vida, a obesidade é alvo de muitos estudos experimentais e epidemiológicos, que visam elucidar os principais eventos que estão envolvidos com o desenvolvimento e prevenção desta doença.

1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS INDUZIDOS POR DIETAS

Para tentar mimetizar a etiologia da obesidade e esclarecer melhor os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das comorbidades associadas a esta doença, muitos ensaios pré-clínicos utilizam modelos experimentais com roedores que recebem alimentos palatáveis, saborosos e com densidade calórica elevada (BUETTNER et al., 2006, CESARETTI; KOHLMANN, 2006, GHITZA et al., 2006).

Ratos e camundongos são os modelos animais mais comuns utilizados na investigação de doenças metabólicas. Dentre as várias abordagens utilizadas para induzir alterações metabólicas em roedores, incluem a manipulação dietética, a modificação genética e o uso de fármacos (WONG et al., 2016).

Inúmeras abordagens dietéticas em animais capazes de mimetizar Síndrome Metabólica, doença caracterizada por alterações (aumento da circunferência da cintura, hiperglicemia, dislipidemia) presentes em outras doenças, como obesidade e DM2, têm sido relatadas. A utilização de um único tipo de dieta ou combinação de dietas, tais como ricas em frutose, com alto teor de sacarose, ricas em gordura (do inglês “*High fat diet*” - HFD), ricas em frutose/ricas em gordura ou com alto teor de sacarose têm sido utilizadas como indutoras de alterações metabólicas (WONG et al., 2016).

Estes estudos utilizando diferentes composições de dietas tornaram-se importantes para a investigação de alterações metabólicas presentes, em sua maioria, nas doenças crônicas não transmissíveis, pois estas dietas afetam o metabolismo de todo o corpo, por meio de efeitos sobre hormônios, metabolismo da glicose e vias de metabolismo lipídico. As estirpes de roedores mais usadas em modelos de Síndrome Metabólica induzidos pela dieta incluem ratos Sprague-Dawley, ratos Wistar e camundongos C57BL/6 J (SENAPHAN et al., 2015; SUMAN et al., 2016).

Essas dietas ricas em frutose, sacarose, gorduras ou a combinação destes elementos, promovem diversas alterações no metabolismo dos carboidratos e dos lipídios, resultando em hiperglicemia, redução da tolerância à glicose, resistência à ação da insulina, aumento da adiposidade, dislipidemia e hipertensão arterial em roedores (CESARETTI; KOHLMANN, 2006; KOHLI et al., 2010; CUNHA et al., 2007; CALLIGARIS et al., 2013). Na tabela 1 pode-se observar o compilado de estudos que utilizaram estes diferentes tipos de dietas isoladas ou combinadas e seus efeitos sobre o desenvolvimento da obesidade, da hiperglicemia e dislipidemia em ratos Wistar e camundongos C57BL/6.

Tabela 1 - Efeitos de diferentes tipos de dietas sobre a obesidade, hiperglicemia e dislipidemia em roedores.

Estudos	Tipo de dieta	Tempo de tratamento	Animal	Presença ou Ausência		
				Obesidade	Hiperglicemia	Dislipidemia
Thirunavukkarasu et al., 2004	↑ frutose	3 semanas	Ratos Wistar machos	-	✓	-
Shahraki et al., 2011	↑ frutose	8 semanas	Ratos Wistar machos	X	✓	✓
Mahmoud and Elshazly, 2014	Frutose na água de beber (10%)	12 semanas	Ratos Wistar machos	✓	✓	✓
Mamikutty et al., 2014	Frutose na água de beber	8 semanas	Ratos Wistar machos	✓	✓	✓
Aguilera et al., 2004	Sacaros e na água de beber (30%)	21 semanas	Ratos Wistar machos	✓	-	✓
Rossmeisl et al., 2003	↑ gordura	8 semanas	C57BL/6J machos	✓	✓	✓
Estadella et al., 2004	↑ gordura	8 semanas	Ratos Wistar machos	✓		✓
Gallou-Kabani et al., 2007	↑ gordura (60%)	20 semanas	C57BL/6J machos e fêmeas	✓	✓	✓
Fraulob et al., 2010	↑ gordura	16 semanas	C57BL/6J machos	✓	✓	✓

Graham et al., 2010	↑ gordura	40 semanas	C57BL/6J machos	-	-	✓
Halade et al., 2010	↑ gordura	24 semanas	C57BL/6J fêmeas	✓	-	-
Xu et al., 2013	↑ gordura	12 semanas	C57BL/6J machos	✓	-	-
Fujita and Maki, 2015	↑ gordura	4 semanas	C57BL/6J machos	✓	-	✓
Gancheva et al., 2015	↑ gordura	8 semanas	Ratos Wistar machos	✓	✓	✓
Li et al., 2015	↑ gordura	16 semanas	C57BL/6J machos	✓	✓	✓
Poudyal et al., 2010	↑ gordura + ↑ CHO	16 semanas	Ratos Wistar machos	✓	✓	✓
Panchal et al., 2011	↑ gordura + ↑ CHO	16 semanas	Ratos Wistar machos	✓	✓	✓
Hao et al., 2015	↑ gordura + ↑ CHO	14 semanas	Ratos Wistar machos	✓	✓	✓
Dissard et al., 2013	↑ gordura + ↑ frutose	32 semanas	C57BL/6J machos	✓	✓	✓
Gancheva et al., 2015	↑ gordura + ↑ frutose	8 semanas	Ratos Wistar machos	✓	✓	✓
Yang et al., 2012	↑ gordura + ↑ sacarose	4 semanas	C57BL/6J machos	✓	✓	✓
Higa et al., 2014	CAF (↑gordura)	12 semanas	C57BL/6J machos	✓	✓	✓

O símbolo “✓” e “X” indicam a presença e ausência, respectivamente, de efeito significativo sobre estes parâmetros, “-”: indica que este componente não foi avaliado no estudo. CHO: carboidrato, CAF: dieta de cafeteria. Adaptado de WONG et al., 2016.

A maior parte dos modelos em roedores para induzir obesidade utiliza dietas ricas em gordura. Tradicionalmente, essas dietas consistem em simples troca de calorias derivadas de carboidratos com calorias derivadas de gordura quando comparadas com dietas de baixo teor de gordura ou ração controle. No entanto, tem-se utilizado outro modelo

experimental de dieta em roedores que reflete com mais precisão a variedade de alimentos altamente palatáveis e com alta densidade calórica que são prevalentes na sociedade ocidental e associados à atual pandemia da obesidade: a dieta de cafeteria, do inglês "*cafeteria diet*" (CAF) (KENNEDY et al., 2010; SAMPEY et al., 2011).

Estudo realizado por Sampey et al. (2011) demonstrou que a CAF é um modelo mais robusto para obesidade humana em comparação com HFD. Apresentaram dados mostrando que a CAF promove obesidade grave, NASH e intolerância à glicose, em comparação com uma tradicional HFD à base de banha. Além disso, mostrou que a CAF induz inflamação no fígado e nos tecidos adiposos branco e marrom, inflamação esta que é bem reconhecida em desempenhar um papel na obesidade.

A utilização deste modelo experimental de indução da obesidade com CAF pode ser útil para identificar novas vias para intervenção preventiva ou terapêutica no tratamento da obesidade humana. Dentre as alterações metabólicas que ocorrem na obesidade, o metabolismo lipídico é alvo bastante afetado, uma vez que o acúmulo excessivo de lipídeos no tecido adiposo propicia quadro de dislipidemia e acúmulo ectópico de lipídeos, como veremos nos tópicos seguintes.

1.3 METABOLISMO DOS LIPÍDIOS

O metabolismo lipídico envolve várias vias que são pelo menos em parte, interdependentes e "cross-reguladas". Os ácidos graxos (AGs) são as formas de energia mais comumente armazenadas e circulantes, e os triacilgliceróis (TAG) são as formas de ácidos graxos não tóxicas mais comuns. Os AGs/TAG podem ser provenientes de quatro fontes: lipogênese de novo, depósitos de TAG citoplasmático, AGs derivados de triacilgliceróis de lipoproteínas remanescentes diretamente absorvidos pelo fígado e ácidos graxos não esterificados plasmáticos (NEFA) liberados pelo tecido adiposo (NGUYEN et al., 2008).

Na dieta, os AGs são adquiridos, principalmente como TAG, e são armazenados para reserva energética, transformados em hormônios, mensageiros celulares e constituintes da membrana celular (ALBERTS et al., 1997).

Após serem absorvidas pelas células intestinais, as diversas moléculas lipídicas, particularmente os AGs, são utilizadas na produção de quilomícrons (XAVIER et al., 2013). Estes são conjugados com a apolipoproteína B-48 (ApoB-48), bem como apolipoproteína A-IV (ApoA-IV) e apolipoproteína A-I (ApoA-I), em um processo que envolve a proteína de transferência microssomal (MTP) (VERGÈS, 2015). Os

quilomícrons são em seguida secretados pelas células intestinais para o interior do sistema linfático, onde alcançam a circulação sanguínea via comunicação do ducto torácico com a veia subclávia esquerda (XAVIER et al., 2013).

Os quilomícrons quando circulantes sofrem ação da lipase lipoproteica (LPL), enzima localizada na superfície endotelial de capilares de células, como os miócitos, cardiomiócitos e adipócitos, com a liberação de AGs e glicerol, e de colesterol não esterificado da superfície dessas partículas. Após esse processo de lipólise, AGs são capturados por células musculares e adipócitos, esses últimos importantes reservatórios de TAG. Os remanescentes de quilomícrons e AGs também são capturados pelo fígado, onde são utilizados na formação de lipoproteína de densidade muito baixa (do inglês, *very low density lipoprotein*-VLDL) (BEIGNEUX et al., 2008; DAVIES et al., 2010).

As lipoproteínas permitem a solubilização e o transporte dos lipídios, que são substâncias geralmente hidrofóbicas no meio aquoso plasmático. Existem quatro grandes classes de lipoproteínas separadas em dois grupos: (1) as ricas em TAG, maiores e menos densas, representadas pelos quilomícrons, de origem intestinal, e pelas lipoproteínas VLDL, de origem hepática; e (2) as ricas em colesterol, incluindo as de densidade baixa ou *low density lipoprotein* (LDL) e as de densidade alta ou *High-density lipoprotein* (HDL). Existe ainda uma classe de lipoproteínas de densidade intermediária ou *intermediary density lipoprotein* (IDL) (XAVIER et al., 2013).

As ações, principalmente, de duas enzimas influenciam diretamente o metabolismo dos lipídeos: a lipase hormônio sensível (HSL) e a LPL. A LPL, localizada nas células endoteliais, age sobre os quilomícrons e VLDL, hidrolisando triglicerídeos e fosfolipídios em glicerol e ácidos graxos. A LPL do tecido adiposo é mais ativa no período pós-prandial e a LPL do músculo nos períodos de jejum. Quando os AGs são necessários, a HSL mobiliza-os do tecido adiposo, por hidrólise dos triglicerídeos armazenados, para a corrente sanguínea (JÉQUIER, E.; TAPPY, 1999).

Além da HSL, a hidrólise do TAG depende da atividade de outras duas enzimas lipolíticas, a lipase de triacilglicerol (ATGL) e a lipase de monoacilglicerol (MGL) (SCHWEIGER et al., 2006). A ATGL é predominantemente responsável pela hidrólise do TAG, resultando na liberação de diacilglicerol (DAG), por conseguinte, a HSL hidrolisa o DAG, liberando monoacilglicerol (MAG). Ao final, a enzima MGL hidrolisa o produto resultante em AG e glicerol (FREDRIKSON et al., 1981; SCHWEIGER et al., 2006).

Ao entrarem na célula, estes AGs são transportados para o interior da mitocôndria através de acil-transferases. Estes podem ser reesterificados, convertidos em TAG e armazenados na própria célula, podem ser incorporados nas membranas, seguir na via da β -oxidação ou ainda entrar no núcleo e agir como ativadores ou inibidores da expressão gênica (JÉQUIER; TAPPY, 1999).

O fígado é um órgão que exerce um papel fundamental na distribuição dos substratos energéticos para outros tecidos periféricos. Este órgão é responsável pela determinação das concentrações plasmáticas de TAG, ácidos graxos livres (AGLs), colesterol e lipoproteínas (MCGARRY e FOSTER, 1980). As principais fontes de lipídios estocados no fígado são, além da lipogênese, os AGs liberados pelos tecidos periféricos no sangue via lipólise e lipídeos provenientes da dieta, as quais chegam no fígado derivadas do quilomícron após absorção intestinal (HAVEL e HAMILTON, 2004).

O transporte de lipídios de origem hepática ocorre por meio das VLDL, IDL e LDL. As VLDL são lipoproteínas ricas em TAG e contêm a ApoB-100 como sua apolipoproteína principal. As VLDLs são montadas e secretadas pelo fígado e liberadas na circulação periférica. Na circulação, os TAGs das VLDL, assim como no caso dos quilomícrons, são hidrolisados pela LPL, enzima estimulada pela ApoC-II e inibida pela ApoC-III. (XAVIER et al., 2013).

Por intermédio da ação da proteína de transferência do éster de colesterol ou *cholesterol ester transfer protein* (CETP), as VLDLs trocam TAGs por ésteres de colesterol com as HDLs e LDLs. O LDL circula conjugado a ApoB-100, é o principal transportador de colesterol no sangue e está diretamente associado com o risco de aterosclerose e risco de doenças cardiovasculares (KLERKX et al., 2006).

As partículas de HDL são formadas no fígado, no intestino e na circulação e seu principal conteúdo proteico é representado pelas Apos A-I e A-II. O HDL por sua vez, possui efeito ateroprotetor diretamente relacionado com a sua atuação no transporte reverso de colesterol para o fígado. O colesterol livre da HDL, recebido das membranas celulares, é esterificado por ação da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT). A ApoA-I, principal proteína da HDL, é cofator dessa enzima. A HDL transporta o colesterol até o fígado, onde este é captado. Neste transporte, é importante a ação da proteína cassete ligada ao ATP 1 (*ATP binding cassette A1 - ABC-A1*), que facilita a extração do colesterol da célula pelas HDLs. A HDL também tem outras ações que contribuem para a proteção do leito vascular contra a aterogênese, como a remoção de lipídeos oxidados da LDL, a inibição da fixação de moléculas de adesão

e monócitos ao endotélio e a estimulação da liberação de óxido nítrico (PILLOIS et al., 2012; XAVIER et al., 2013).

A regulação dos processos metabólicos envolvendo os lipídios, como a síntese de ácidos graxos (lipogênese), estocagem de TAG e sua mobilização (lipólise), ocorre por meio de nutrientes e sinais aferentes dos sistemas neurais e endócrino, e depende das necessidades energéticas do indivíduo (AHIMA et al., 2000).

O sistema nervoso autônomo simpático relaciona-se principalmente com as ações catabólicas, como a lipólise mediada pelos receptores β -adrenérgicos e dependente da atividade da enzima HSL (PÉNICAUD et al., 2000).

A ativação da lipólise por meio das catecolaminas (noradrenalina e adrenalina) é mediada por um aumento na concentração intracelular do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), desencadeando ativação da proteína quinase A (PKA), que por sua vez irá fosforilar no adipócito a enzima HSL, sendo esta a principal enzima envolvida na lipólise, bem como as perilipinas. As perilipinas são proteínas envolvidas com a superfície limitante de gotículas de lipídios presentes nos adipócitos, cuja função principal parece ser criar uma barreira limitando a ação da HSL. A fosforilação das perilipinas por meio da PKA libera esse impedimento, permitindo que a enzima lipase hormônio sensível fosforilada (HSP-P) realize sua ação na gotícula de gordura (LONDOS et al., 1996; HOLM et al., 2000).

Já o sistema nervoso parassimpático está envolvido na execução de efeitos anabólicos sobre os depósitos adiposos, como a captação de glicose e de AGs, estimulada pela insulina (PÉNICAUD et al., 2000).

A insulina é um hormônio anabólico, que está ligada diretamente ao processo de oxidação dos nutrientes e atua no metabolismo de lipídeos, reduzindo a oxidação de gorduras por inibição da HSL, e estimulando o depósito por ativação da LPL. Assim, indivíduos que apresentam resistência à ação da insulina (RI), a ação LPL é suprimida o que pode explicar as elevadas concentrações de TAG nesses indivíduos (HOWARD, 1999).

A lipogênese é um processo que ocorre preferencialmente no tecido adiposo, mas também ocorre no fígado, caracterizado pela síntese de AGs, que são utilizados como reservas de energia. Este processo é estimulado pela insulina e ocorre tanto pela re-esterificação dos AGLs com o glicerol ou pelo processo de lipogênese *de novo* (DNL), no qual a síntese de TAG ocorre a partir de substratos não lipídicos, como a glicose (STRAWFORD, 2004).

Para a biossíntese de TAG, o adipócito necessita do glicerol-3-fosfato (glicerol-3-P) proveniente da via glicolítica e de AGL complexado com coenzima A (CoA), constituindo o composto acilCoA que provêm da biossíntese a partir de acetilCoA ou da captação de AGL proveniente de lipoproteínas (quilomícrons e VLDL) circulatórias que no tecido adiposo branco sofrem a ação da LPL, que hidrolisa o TAG nelas contido, liberando os AGLs, que são transportados para o citoplasma dos adipócitos (KERSTEN, 2001).

Parte do fluxo de metabólitos da via glicolítica segue em direção à formação de piruvato que, transportado para o interior da mitocôndria, é transformado em acetilCoA pela ação da piruvato desidrogenase (PDH). A acetil-CoA é carboxilada à malonil-CoA pela acetil-CoA carboxilase (ACC), que é subsequentemente convertida a palmitato pela sintase dos ácidos graxos (FAS), uma enzima determinante da velocidade da lipogênese (HILLGARTNER; SALATI; GOODRIDGE, 1995).

A insulina também tem efeitos a longo prazo na expressão de genes lipogênicos, por meio da proteína de ligação do elemento regulador de esteroides 1 (SREBP-1), que está fundamentalmente envolvida tanto na lipogênese como na homeostase do colesterol. Além disso, a insulina faz com que o SREBP-1 induza a expressão e a atividade da glicocinase, aumentando assim a concentração de um metabólito de glicose que medeia os efeitos da glicose na expressão de genes lipogênicos (por exemplo: ACC, FAS) (ASSIMACOPOULOS-JEANNET et al., 1995; OSBORNE, 2000).

De acordo com Arner et al. (1990), o efeito inibitório da lipólise observado pela presença da insulina possivelmente seja devido à redução na concentração de AMPc em função da estimulação da fosfodiesterase intracelular que degrada AMPc em AMP, dessa forma inibindo a estimulação da HSL.

Além destes hormônios, o metabolismo lipídico é regulado pelo próprio tecido adiposo branco, reconhecido como importante órgão endócrino, parácrino e autócrino, apresentando alta atividade metabólica (JOHNSON; JUSTIN MILNER; MAKOWSKI, 2012).

Os adipócitos maduros, entre outras células desse tecido, são responsáveis por sintetizar e secretar grande número de proteínas bioativas que controlam funções metabólicas, denominadas adipocinas, como leptina, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas, adiponectina, angiotensinogênio, inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1), proteínas de fase aguda e moléculas de adesão. Estas adipocinas estão envolvidas na regulação da pressão arterial, do apetite, metabolismo lipídico e glicídico, da angiogênese, resposta inflamatória e

função reprodutiva (KARASTERGIOU; MOHAMED-ALI, 2010; KERSHAW EE, 2004; FRÜHBECK et al., 2001).

1.4 ADIPOSIDADE VISCERAL E DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA

Alterações no tecido adiposo, como ocorrem na obesidade, estão associadas às funções fisiológicas alteradas em quase todos os tecidos e sistemas de órgãos do corpo. Nesta situação, o tecido adiposo apresenta várias alterações tais como: hipóxia, aumento da infiltração de macrófagos em torno de adipócitos mortos, aumento da expressão de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL 1 β) e deficiência de adiponectina (ANTUNA-PUENTE et al., 2008; SHOELSON; HERRERO; NAAZ, 2007).

O tecido adiposo inflamado é resistente à insulina, levando ao aumento do fluxo de ácidos graxos não esterificados para o fígado. Como o fígado é o órgão central do metabolismo de lipídeos e da glicose, o excesso de deposição de energia está associado com efeitos adversos neste órgão, como o desenvolvimento da esteatose hepática. Esta por sua vez, é resultado do aumento do fluxo de AGLs derivados do tecido adiposo resistente à insulina, da alteração no processamento hepático dos lipídeos provenientes da dieta fornecidos pelas lipoproteínas, do aumento da lipogênese *de novo* hepática ou da perda da exportação de lipídeos para fora dos hepatócitos (KOTRONEN et al., 2008).

Esta "lipotoxicidade" crônica afeta o metabolismo oxidativo mitocondrial hepático. Estudos sugerem que a adaptação contínua ou "remodelação" energética mitocondrial, expressão gênica, morfologia e conteúdo, desempenham papel chave na patogênese da esteatose. Além disso, na presença da esteatose, a disfunção mitocondrial é concomitante à oxidação incompleta da gordura, levando ao acúmulo de intermediários lipídicos tóxicos, como ceramidas e DAGs, que podem desencadear a inflamação e prejudicar a sinalização insulínica (PATTERSON et al., 2016).

A esteatose hepática, quando ocorre sem história significativa de ingestão de álcool e exclusão de outras causas de doença hepática como drogas, toxinas e hepatite C, é conhecida como esteatose hepática não alcoólica (NAFL, do inglês *Nonalcoholic fatty liver*) (CHALASANI et al., 2012). Quando este quadro de esteatose hepática não alcoólica progride, temos a presença da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD, do inglês *Nonalcoholic fatty liver disease*), que representa amplo espectro desde a esteatose, esteatohepatite não alcoólica (NASH) até cirrose. A NASH é caracterizada pela presença de inflamação, fibrose

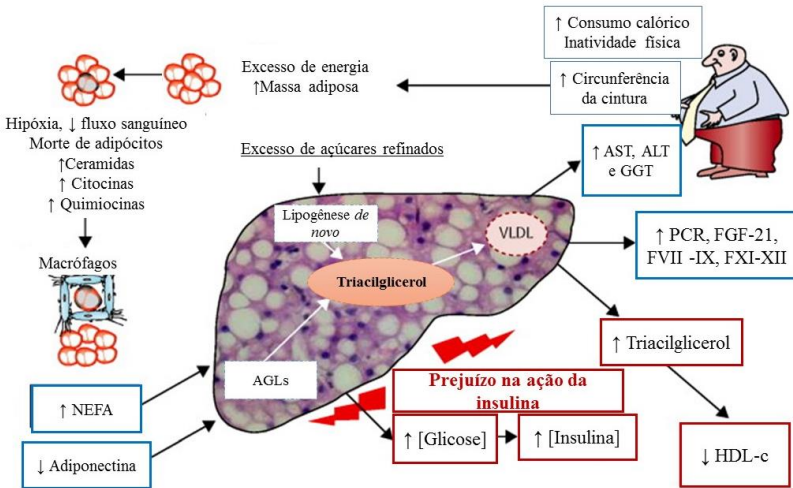
e tem potencial de progredir para cirrose (FIERBINTEANU-BRATICEVICI et al., 2011).

Os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da NAFLD evoluíram para hipótese de "múltiplos impactos" que compreende amplo espectro de fatores paralelos, tais como fatores nutricionais, mecanismos genéticos e epigenéticos, mudanças na microbiota intestinal, resistência à insulina, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e citocinas secretadas a partir do tecido adiposo (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016).

O aumento do consumo, especialmente de açúcares simples e gorduras saturadas, e inatividade física, predispõem à NAFLD. Os açúcares em excesso são convertidos em TAG intra-hepatocelulares no fígado através da lipogênese *de novo*, que é aumentada na NAFLD. Em pacientes com NAFLD, mesmo em comparação com indivíduos igualmente obesos, o tecido adiposo é hipóxico e contém adipócitos mortos rodeados por macrófagos e lipídios bioativos como ceramidas, citocinas, tais como o TNF- α e quimiocinas, como a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) o que pode contribuir para a resistência à insulina no tecido adiposo (TRAYHURN, 2013).

O tecido adiposo torna-se resistente à ação da insulina inibindo a liberação de ácidos graxos não esterificados e secretando quantidades diminuídas de adiponectina, citocina sensibilizadora da insulina. Estas duas alterações promovem a síntese de TAG intra-hepatocelulares e VLDL. A capacidade da insulina em suprimir a produção de glicose e VLDL no fígado esteatótico é prejudicada, resultando em hiperglicemia leve e hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e diminuição nas concentrações de colesterol HDL. Os hepatócitos danificados liberam quantidades aumentadas de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gamaglutamiltransferase (GGT) e aumentam a produção de proteína C reativa (PCR), fator de crescimento fibroblástico 21 (FGF21) e fatores de coagulação, FVII -IX, FXI-XII (GRATTAGLIANO, 2007; YKI-JÄRVINEN, 2014).

Figura 1 - Fisiopatologia da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), cujas causas e consequências se assemelham às da síndrome metabólica.



NEFA: ácidos graxos não esterificados, AGLs: ácidos graxos livres, HDL-c: lipoproteína de alta densidade, VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade, AST: aspartato aminotransferase, ALT: alanina aminotransferase, GGT: gama-glutamilttransferase, PCR: proteína C reativa, FGF21: fator de crescimento fibroblástico 21 e FVII -IX, FXI-XII: fatores de coagulação. Adaptado de YKI-JÄRVINEN (2014).

Assim como na obesidade, alterações na microbiota intestinal podem contribuir para a patogênese da NAFLD. Alterações na flora bacteriana intestinal podem alterar a permeabilidade da mucosa intestinal para indutores de inflamação, como a endotoxina (MACHADO e CORTEZ-PINTO, 2012).

Os componentes ativos da endotoxina, os LPS, são elementos da parede celular de bactérias gram negativas. O LPS endógeno é continuamente produzido no intestino com morte bacteriana. A sua translocação através dos capilares intestinais ocorre num mecanismo dependente do receptor 4 (TLR-4). A partir daí o transporte de LPS para os tecidos alvo é facilitado por lipoproteínas e sua absorção ocorre durante a absorção de lipídeos. O LPS liga-se à proteína de ligação lipopolissacárida (LBP) e esse complexo liga-se a CD14, expresso em células inflamatórias. Juntos, o LPS-LBP-CD14 ativa o TLR-4, presente em células inflamatórias como monócitos, células de Kupffer e células estreladas. Com isso, é desencadeada uma cascata intracelular, incluindo

cinases ativadas por estresse e ativadas por mitógenos, cinase N-terminal c-Jun (JNK), fator nuclear κ B (NF κ B). O NF κ B transloca-se para o núcleo onde aumenta a expressão de vários genes alvo envolvidos na via inflamatória, tais como TNF- α , interleucina 1 e 6. A sinalização do TLR-4 pode assim promover resistência à insulina, inflamação e fibrogênese (ABU-SHANAB; QUIGLEY, 2010; LAUGERETTE et al., 2011).

Bäckhed et al., (2004) demonstraram que um aumento de mais de duas vezes no teor de TAG no fígado, associado a maior absorção de monossacárideos a partir do lúmen, promove a síntese *de novo* de ácidos graxos, como confirmado pela atividade aumentada da acetil-CoA carboxilase e da ácido graxo sintase.

Este acúmulo de lipídeos hepáticos além de promover alterações no metabolismo glicêmico e lipídico, está diretamente relacionado com a promoção de um quadro inflamatório, que pode progredir e acarretar injúrias hepáticas mais graves. Esta inflamação, geralmente é mista, contendo linfócitos e neutrófilos em torno de hepatócitos alterados nas áreas portais (ZAFRANI, 2004).

Um estudo realizado por Liang et al., (2014) estabeleceu um escore de NAFLD simples, robusto e genérico. Este estudo demonstra seu uso em pesquisas pré-clínicas utilizando vários modelos de roedores que apresentam diferentes estágios da etiologia da NAFLD. Em roedores, a melhor medida de esteatose é a quantificação bioquímica de TAG hepático e neste estudo os autores mostraram ótima correlação deste parâmetro com esteatose microvesicular.

Com isso, estes modelos experimentais têm sido bastante utilizados para tentar elucidar os mecanismos envolvidos na NAFLD e que estratégias nutricionais ou farmacológicas atuam na terapia e/ou prevenção de alterações associadas a esta patologia, como o acúmulo de lipídios hepáticos e o aumento dos marcadores inflamatórios.

1.5 ÁCIDOS GRAXOS MONOINSATURADOS COMO ESTRATÉGIA NUTRICIONAL

Os ácidos graxos monoinsaturados (AGMIs) são classificados como cadeias de ácidos graxos contendo uma dupla ligação. Os AGMIs mais comuns são o ácido oleico (18:1 n-9) e o ácido palmitoleico (16:1 n-7), apresentando predominantemente isomeria *cis*. Dos óleos dietéticos ricos em AGMIs, os mais comumente consumidos são azeite de oliva e óleo de canola (GILLINGHAM; HARRIS-JANZ; JONES, 2011).

A dieta mediterrânea possui percentual elevado de ácidos graxos monoinsaturados na sua composição. É tradicionalmente caracterizada pelo consumo elevado de azeite, legumes, verduras, frutas, nozes e cereais

integrais, alimentos estes, com menor densidade calórica, pelo consumo moderado de aves e peixes e pelo menor consumo de alimentos com alta densidade calórica, como carnes vermelhas e processadas e doces (DAVIS et al., 2015; WILLETT et al., 1995).

Estudos têm demonstrado que a utilização de AGMIs isolados ou combinados, presentes principalmente, em óleos vegetais, têm contribuído para a prevenção e/ou tratamento de alterações metabólicas presentes na obesidade e outras doenças associadas (DM2, Síndrome Metabólica-SM), como por exemplo, hiperglicemia, hipertriacilgliceridemia, esteatose hepática e inflamação (BARRENA et al., 2014; BOZZETTO et al., 2016; MAEDLER et al., 2003; POU DYAL et al., 2013; VIOLI et al., 2015; YANG; MIYAHARA; HATANAKA, 2011).

O azeite de oliva extra virgem (EVOO, do inglês, *Extra virgin olive oil*) é um alimento característico da dieta mediterrânea, que é considerado saudável por suas ações antioxidantes, anti-inflamatórias e cardiovasculares (WILLETT et al., 1995). Nutricionalmente, o EVOO é ótima fonte de ácido oleico (C18:1, n-9), ácido graxo que é considerado como um dos fatores que explicam os efeitos da dieta mediterrânea sobre a saúde (CICERALE; LUCAS; KEAST, 2010).

Estudos recentes sugerem que o EVOO atenua a esteatose hepática induzida por HFD (DOS SANTOS et al., 2015). Camundongos C57BL/6J alimentados com HFD (49% de gordura do valor calórico total) durante 12 semanas, desenvolveram NAFLD. Parte destes animais receberam EVOO, representando 41,7% de energia do total de gordura. Esta substituição da gordura dietética por EVOO reduziu a esteatose hepática induzida por HFD. Além disso, o uso de EVOO melhorou o perfil lipídico plasmático e a expressão de citocinas do tecido adiposo destes camundongos com NAFLD (JURADO-RUIZ et al., 2016).

Além de estudos com fontes do AGMI oleico, pesquisas têm sido realizadas para investigar o potencial efeito do AGMI palmitoleico. A contribuição exógena para o organismo de ácido palmitoleico é pequena, tendo em vista a baixa concentração desse ácido graxo nos alimentos. Dentre as fontes de n-7 podemos citar o salmão (6%), o óleo de fígado de bacalhau (7,1%) e, principalmente, o óleo de macadâmia, com 17,3% de sua composição sendo ácido palmitoleico (HODSON; KARPE, 2013; POU DYAL et al., 2013).

O ácido palmitoleico presente no organismo de mamíferos é advinda da produção endógena principalmente no fígado e no tecido adiposo, por meio da ação da enzima esteatoil-coenzima A-dessaturase (SCD 1) que adiciona uma insaturação na molécula do ácido palmítico,

produzindo o ácido palmitoleico. A mesma enzima é responsável pela insaturação de outros ácidos graxos saturados como, por exemplo, o esteárico (18:0) que é convertido em oleico (18:1 – ômega 9) (GONG et al., 2011).

No estudo realizado por CAO et al. (2008), em ratos foi demonstrado que o AGMI palmitoleico age como uma lipocina, contribuindo para a redução do desenvolvimento da obesidade induzida por dieta, estimulando a ação da insulina no músculo, o que pode estar associado ao aumento na expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização insulínica, como substrato receptor da insulina-1 (IRS-1) e proteína cinase B (Akt) e suprimindo a esteatose hepática.

Camundongos C57BL/6 suplementados com 300mg/kg/dia de ácido palmitoleico por 10 dias apresentam incremento na expressão dos mRNAs da AGTL e da HSL em adipócitos. Estes animais também demonstraram aumento nas taxas de lipogênese (incorporação de ácidos graxos em TAG) e incorporação de glicose na forma de glicerol nos adipócitos do tecido adiposo epididimal. Apesar destas modificações, não foram apresentadas quaisquer alterações em variáveis da homeostase glicêmica e lipídica ou massa corporal, de órgãos e tecidos dos animais. Nesse mesmo estudo foi demonstrado que em camundongos com deleção gênica knockout para PPAR- α (receptor ativado por proliferador de peroxissoma- α) as modificações sobre a lipólise, mas não lipogênese e incorporação de glicose em glicerol, não ocorreram nos camundongos suplementados (BOLSONI-LOPES et al., 2013).

Um outro estudo utilizou camundongos C57BL/6 alimentados com HFD e suplementados com óleo de macadâmia (2g/kg m.c., três vezes por semana) durante 12 semanas. Os autores mostraram que a suplementação com óleo de macadâmia atenuou a inflamação induzida pela HFD. O conteúdo de IL-10, citocina anti-inflamatória, foi aumentado pela suplementação. No entanto, a mesma não promoveu redução da resistência à insulina, nem do conteúdo de TAG hepático (LIMA et al., 2014).

Barrena et al. (2013) utilizaram em seu estudo camundongos suíços alimentados com HFD ou HFD com substituição do óleo de soja por óleo de linhaça (HFD-LO) ou óleo de macadâmia (HFD-MO) por 14 dias. Os autores mostraram que a adiposidade visceral e a glicemia de jejum não foram atenuadas pela suplementação com óleo de macadâmia. Além disso, os autores mostraram que apenas a suplementação com óleo de linhaça promoveu efeito protetor sobre o acúmulo de lipídeos induzido por HFD. Os autores sugerem que este fato é mediado pelo elevado teor de AGPIs n-3.

Camundongos C57BL/6 foram alimentados com dietas normocalóricas que variaram no tipo de carboidrato (amido, sacarose, frutose) durante 8 dias. Os animais de cada grupo de carboidratos foram divididos em cinco grupo que receberam emulsões lipídicas com composições distintas (sem adição de lipídeos, óleo de soja - 20 g/dL, óleo de soja + azeite de oliva -20 g/dL, óleo de macadâmia - 20 g/dL, óleo de peixe - 10 g/dL) a partir do terceiro dia de tratamento (3-8 dia). Todas as emulsões lipídicas, independente da composição de AGPIs (ácido linoleico, ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico) ou AGMIs (ácido oleico, ácido palmitoleico), reduziram de forma semelhante a esteatose hepática induzida pelo consumo de sacarose ou frutose (SIDDIQUI et al., 2015).

Ratos Wistar ingerindo dieta hiperlipídica com 3% óleo de macadâmia adicionada a ração por 8 semanas apresentaram remodelação positiva do tecido cardiovascular, redução da pressão arterial média e melhora da estrutura hepática e de marcadores de função hepática (POUDYAL et al., 2013).

Na tabela 2 estão apresentados estudos que utilizaram a suplementação de AGMIs, isolados ou provenientes de fontes alimentares em modelos de alterações metabólicas induzidas por dietas.

Tabela 2 - Efeitos da suplementação de ácidos graxos monoinsaturados, isolados ou provenientes de fontes alimentares em modelos de alterações metabólicas induzidas por dietas.

Estudos	Modelo experimental	Tempo de tratamento	Animal	Efeito da suplementação		
				Dislipidemia	Esteatose hepática	Marcadores inflamatórios
(GUO et al., 2012)	HFD	12 semanas	C57BL/6J machos	-	↑	↓
	Palmitoleico (600mg/kg m.c.)	Últimas 4 semanas				
(DIAS et al., 2014)	HFD	12 semanas	C57BL/6J machos	-	-	↓
	Palmitoleico (300mg/kg m.c.)	Últimas 2 semanas				
(DOS SANTOS et al., 2015)	HFD	8 semanas	CAM suíço machos	NA	↓	NA
	EVOO (104 g/kg da dieta)					
(JURADO-RUIZ et al., 2016)	HFD EVOO (41% de energia a partir do EVOO)	24 semanas	C57BL/6J machos	↓	↓	↓
(RINCÓN-CERVERA et al., 2016)	HFD EVOO (100 mg/dia)	12 semanas	C57BL/6J machos	↓	↓	NA

O símbolo “↑” e “↓” indicam aumento e diminuição significativa da suplementação sobre os parâmetros avaliados, respectivamente. NA: indica que este componente não foi avaliado no estudo “-”: indica que este componente não foi alterado pela suplementação. HFD: dieta rica em gordura, EVOO: azeite de oliva extra virgem, CAM: camundongo, CHO: carboidrato, LIP: lipídeos, OM: óleo de macadâmia, m.c.: massa corpórea.

Esses estudos apontam efeitos benéficos dos ácidos graxos monoinsaturados provenientes de fontes alimentares específicas, como o EVOO, e efeito satisfatório do ácido palmitoleico quando administrado isoladamente sobre as alterações metabólicas (hipertriacilglicerolemia, esteatose hepática, inflamação) mais frequentes em doenças crônicas não-transmissíveis, como obesidade, DM2 e SM. No entanto, os efeitos do óleo de macadâmia composto por percentual elevado do AGMI oleico e palmitoleico ainda são pouco retratados na literatura, como podemos observar na tabela abaixo.

Tabela 3 - Efeitos da suplementação de óleo de macadâmia em modelos de alterações metabólicas induzidas por dietas.

Estudos	Modelo experimental	Tempo de tratamento	Animal	Efeito da suplementação		
				Dislipidemia	Esteatose hepática	Marcadores inflamatórios
(POUDYAL et al., 2013)	Rica em carboidratos e lipídeos	8 semanas (↑ CHO e LIP)	Ratos Wistar machos	↓	↓	↓
	Óleo de macadâmia (3% na dieta)	8 semanas após o início da HFD				
(LIMA et al., 2014)	HFD Óleo de macadâmia (2g/kg m.c. 3 x/sem)	12 semanas	C57BL/6 J machos	↓	NA	↓
(SIDDIQUI et al., 2015)	Diferente composição de CHO (amido, sacarose ou frutose)	8 dias	C57BL/6 J machos	NA	↓	NA
	Emulsão lipídica (OS, OS+EVOO, OM ou OP)	3 ao 8 dia (6 dias)				

O símbolo “↑” e “↓” indicam aumento e diminuição significativa da suplementação sobre os parâmetros avaliados, respectivamente. NA: indica que este componente não foi avaliado no estudo “-”: indica que este componente não foi alterado pela suplementação. HFD: dieta rica em gordura, CAM: camundongo, CHO: carboidrato, LIP: lipídeos, OS: óleo de soja, EVOO: azeite de oliva extra virgem, OM: óleo de macadâmia, OP: óleo de peixe, m.c.: massa corpórea, HFD-LO: dieta rica em gordura + óleo de linhaça, HFD-OM: dieta rica em gordura + óleo de macadâmia.

Assim, a utilização de modelos experimentais que mimetizam as alterações metabólicas presentes nas doenças crônicas não transmissíveis (Obesidade, DM2, SM) são de extrema importância para melhor esclarecê-las, e com isso, desenvolver estratégias terapêuticas que visem prevenir e/ou atenuá-las. No entanto, existe variabilidade em relação ao tempo e composição das dietas utilizadas nestes modelos experimentais apresentados na literatura, o que muitas vezes dificulta um entendimento

mais aprofundado destas alterações metabólicas. Assim como, observa-se com a utilização diversificada de tempos e dose de administração de AGMIs isolados ou provenientes de fontes alimentares.

Diante do exposto, estudos em animais que avaliem a diferença na composição de uma dieta cada vez mais semelhante ao consumido pela população e a utilização da suplementação com óleos, controlada (dose e tempo), permitem gerar dados que embasem uma possível recomendação deste suplemento para a população.

2 HIPÓTESE

H_{nula} : A ingestão de óleo de macadâmia não reduz o acúmulo de lipídeos hepáticos induzido pelo consumo de dieta de cafeteria.

$H_{alternativa}$: A ingestão de óleo de macadâmia reduz o acúmulo de lipídeos hepáticos induzido pelo consumo de dieta de cafeteria.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do óleo de macadâmia sobre o acúmulo de lipídeos hepáticos em camundongos expostos a diferentes dietas de cafeteria.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar parâmetros (massa corporal, consumo de ração e massa de órgãos e tecidos) do modelo experimental com diferentes composições de dieta de cafeteria.
- Avaliar o efeito da ingestão de óleo de macadâmia em camundongos alimentados com diferentes dietas de cafeteria durante 120 dias, sobre:
 - Glicemia de jejum, tolerância à glicose e insulinemia;
 - Perfil lipídico plasmático;
 - Grau de esteatose hepática;
 - Função hepática;
 - Concentrações de citocinas em tecido hepático;
 - Perfil de ácidos graxos hepáticos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 81 camundongos C57BL/6 machos, produzidos e mantidos no biotério setorial, coordenado pelo Professor Adair Roberto Soares dos Santos, pesquisador responsável pelo Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI), localizado no Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, sendo 5 animais em cada gaiola em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) em ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas), com livre acesso à comida (ração comercial, BIOBASE® 9301; Águas Frias, SC, Brasil) e água. Os protocolos e procedimentos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob número do protocolo 5855301015 (ANEXO A).

4.1.1 Cálculo amostral

Para o cálculo do tamanho da amostra considerou-se os critérios de erro $\alpha=0,05$, erro $\beta=80$, análise bicaudal e o desfecho primário da glicemia de jejum encontrado no trabalho de Higa et al. (2014) como determinante, utilizando a ferramenta online: http://www.statisticalsolutions.net/pss_calc.php. Nossos cálculos estimaram o tamanho da amostra como 10 animais por grupo.

4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL E GRUPOS EXPERIMENTAIS

O protocolo experimental foi estabelecido após a realização de um estudo piloto, baseado na metodologia utilizada por Higa et al. (2014). Os resultados referentes ao estudo piloto estão inseridos ao final deste documento no item Anexos (APÊNDICE A).

A dieta de cafeteria utilizada foi baseada na composição proposta por Higa et al. (2014). A mesma contém chocolate ao leite (10g), amendoim (10g), biscoito salgado tipo cracker (5g), açúcar (5g) e ração para roedores (15g). Para execução do protocolo experimental utilizou-se duas dietas de cafeteria com percentuais de macronutrientes e valor calórico distintos, como pode ser visualizado no quadro 1. Para o melhor entendimento utilizamos a denominação de Modelo 1 para o protocolo experimental com dieta de cafeteria com 21 % de açúcares simples. Já para a dieta de cafeteria com 41 % de açúcares simples denominamos de Modelo 2.

Quadro 1 - Percentual de contribuição dos macronutrientes e valor calórico total da dieta padrão e da dieta de cafeteria consumidas pelos camundongos.

	Dieta Padrão	Dieta de cafeteria (Modelo 1)	Dieta de cafeteria (Modelo2)
CARBOIDRATOS (%)	59	47	54
PROTEÍNAS (%)	29	14	12
LIPÍDEOS TOTAIS (%)	12	39	34
Kcal/g	3,00	4,41	4,35

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Para a determinação dos ácidos graxos presentes na dieta padrão e na dieta de cafeteria nós realizamos a cromatografia líquida de alta performance, descrita no item 4.3.2.9 da metodologia. O percentual de ácidos graxos presentes nestas dietas estão descritos no quadro 2.

Quadro 2- Percentual de ácidos graxos presentes nas dietas a partir da cromatografia líquida de alta performance.

ÁCIDO GRAXO	Dieta Padrão (%)	Dieta de cafeteria (%)
Mirístico 14:0	2,99	1,35
Palmítico 16:0	36,92	14,32
Esteárico 18:0	1,84	5,15
Palmitoleico 16:1(n-7)	1,12	0,14
Oleico 18:1(n-9)	17,73	40,39
Linoleico 18:2(n-6)	18,24	24,79
Araquidônico 20:4 (n-6)	19,39	13,70
Alfa-linolênico 18:3(n-3)	0,46	0,06
EPA 20:5(n-3)	0,89	0,06
DHA 22:6(n-3)	0,42	0,05

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Além disso, utilizou-se o óleo de macadâmia da marca Pazze, disponível no site <http://www.pazze.com.br/brasil/linha-de-produtos/oleos-vegetais>. Para a determinação dos ácidos graxos presentes no óleo de macadâmia também realizamos a metodologia citada no item 4.3.2.9 da metodologia. No quadro 3 podemos observar o percentual de ácidos graxos presentes no óleo de macadâmia.

Quadro 3- Percentual de ácidos graxos presentes no óleo de macadâmia a partir da cromatografia líquida de alta performance.

ÁCIDO GRAXO	%
Mirístico 14:0	1,00
Palmítico 16:0	7,67
Esteárico 18:0	3,81
Palmitoleico 16:1(n-7)	22,32
Oleico 18:1(n-9)	57,04
Linoleico 18:2(n-6)	7,49
Alfa-linolênico 18:3(n-3)	0,68

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O protocolo experimental dos modelos 1 e 2 foram realizados em duas remessas diferentes de animais, para testarmos a reprodutibilidade dos dados.

Após 21º dia do nascimento, os animais foram separados das mães (desmame) e passaram por nove dias de adaptação em gaiolas coletivas. Aos 30 dias de vida (T0), estes animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais, neste momento foi verificado a massa corporal dos mesmos. Cada grupo experimental foi composto por 10 animais. Durante 120 dias estes animais receberam dieta padrão ou dieta de cafeteria e ingeriram, ou não, óleo de macadâmia.

O grupo controle (CTL) recebeu dieta padrão e água, o grupo dieta de cafeteria (DC) recebeu dieta de cafeteria e água, o grupo óleo de macadâmia (OM) recebeu dieta padrão e óleo de macadâmia (1g/kg de m.c.), o grupo dieta de cafeteria e óleo de macadâmia (DOM) recebeu dieta de cafeteria e óleo de macadâmia (1g/kg de m.c.), durante 120 dias. A água e óleo de macadâmia foram administrados via oral com o auxílio de uma micropipeta. A dose dos óleos por dia foi baseada em trabalhos prévios de nosso grupo com outros tipos de óleo (BARBOSA et al., 2016).

4.3 CONSUMO DE RAÇÃO E PARÂMETROS METABÓLICOS

4.3.1 Consumo de ração e massa corporal

O consumo de ração e a massa corporal dos animais foram verificados semanalmente. O consumo de ração ingerida semanalmente

por gaiola foi determinado pela pesagem da ração remanescente descontada do total daquela depositada na semana anterior. O consumo médio de ração ingerido por animal foi obtido por meio da divisão da massa de cada animal, pela soma do peso de todos os animais por gaiola, multiplicado pela quantidade de ração que foi ingerida pelos animais da gaiola durante a semana. Os resultados foram expressos em gramas de ração ingerida por semana. Para o cálculo do valor calórico total e da quantidade de lipídeos ingeridas, os animais dos grupos OM e DOM tiveram o valor referente à suplementação com óleo de macadâmia agregado.

4.3.2 Parâmetros metabólicos

4.3.2.1 Avaliação da glicemia em jejum

A cada 30 dias, após restrição alimentar de seis horas a partir das 07:00 horas da manhã, a glicemia foi determinada por meio do sistema de fitas (monitor digital) “Accu-Check Performa” (ROCHE, Brasil) a partir da gota de sangue obtida pela secção da ponta da cauda do animal.

4.3.2.2 Avaliação da tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT)

Após seis horas de restrição alimentar, os animais tiveram a extremidade da cauda seccionada para a coleta de sangue utilizado para determinação da glicemia no tempo 0. Logo após, foi administrado solução de glicose 50% (2 g/kg de m.c.) via intraperitoneal e verificado a glicemia nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos (HIGA et al., 2014). A partir desses valores calculou-se a área sob a curva (ASC) (BERGMAN et al., 1985). Esta avaliação foi realizada aos 90 e 120 dias de execução do protocolo experimental.

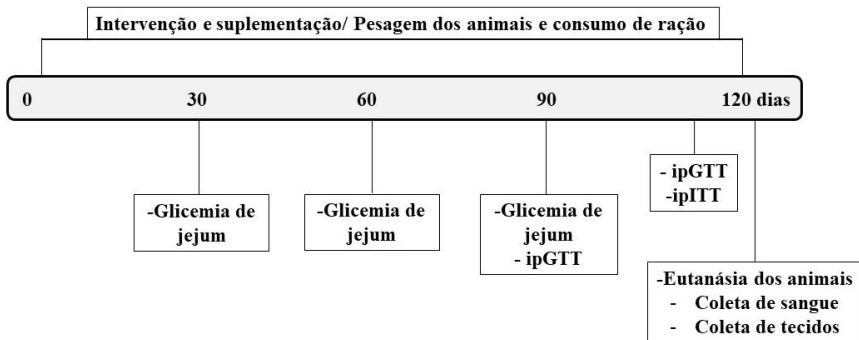
4.3.2.3 Avaliação da sensibilidade à insulina “in vivo”

Animais alimentados foram submetidos ao teste de tolerância à insulina. Inicialmente, foi verificada a glicemia no tempo 0, como descrito no tópico anterior. Logo após, foi injetado Insulina humana recombinante (Biohulin®) equivalente a (0,75UI/kg m.c.) via intraperitoneal e a glicemia foi verificada nos tempos 5, 10, 15, 20 minutos após a aplicação (HIGA et al., 2014). Esta avaliação foi realizada ao fim dos 120 dias de execução do protocolo experimental.

4.3.2.4 Eutanásia dos animais

Após 120 dias de execução do protocolo experimental, os animais passaram por restrição alimentar de seis horas, a partir das 07:00 horas da manhã e foram eutanasiados por decapitação direta com uso de tesoura cirúrgica para coleta de sangue e posterior retirada de tecidos. A figura abaixo representa o desenho do estudo (Modelo 1 e 2).

Figura 2 - Desenho do estudo e procedimentos experimentais.



ipGTT-teste de tolerância à glicose intraperitoneal, ipITT-teste de tolerância à insulina intraperitoneal

4.3.2.5 Pesagem de órgãos e tecidos

Imediatamente após a eutanásia dos animais, os órgãos e tecidos de interesse (fígado, tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal) foram cuidadosamente removidos e pesados em balança eletrônica analítica digital (TECNAL, SP, Brasil). Para o cálculo do Índice de Adiposidade (%), utilizou-se a seguinte fórmula: somatório das gorduras epididimal e retroperitoneal/massa corporal final x 100. Fragmentos destes tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido para posterior armazenagem em freezer -80°C.

4.3.2.6 Análise bioquímica plasmática

O sangue foi coletado em microtubos previamente lavados com solução salina, contendo anticoagulante NaF (Glistab – Labtest; Lagoa Santa, MG, Brasil). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 400 x g por 10 min em temperatura ambiente (KASVI - K14-1215, Curitiba, PR, Brasil) e o plasma foi alíquotado e armazenado a -80 °C. Estas amostras foram utilizadas para determinar as concentrações de TAG e colesterol

total (CT), por métodos colorimétricos, de acordo com as recomendações do fabricante de sistemas comerciais Biotécnica[®]. Além disso, foram determinadas as concentrações das enzimas alanina-aminotransferase e aspartato-aminotransferase, por meio de métodos colorimétricos, de acordo com as recomendações do fabricante de sistemas comerciais Biotécnica[®]. Foi verificado também, as concentrações plasmáticas de insulina por meio do sistema de microesferas utilizando o kit AlphaLISA[®], de acordo com as orientações do fabricante (AL204C) (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA).

4.3.2.7 Conteúdo de triacilglicerol e colesterol total hepático

Para determinação do conteúdo de TAG e CT hepático, 100 mg de fígado obtido logo após a eutanásia (mesma região para todos os animais) foi transferido para tubos de ensaio contendo NaCl (1M) e homogeneizado (UltraTurrax[®] - IKA[®] Staufen, Alemanha). Posteriormente, foi adicionado clorofórmio/metanol (2:1) e centrifugado a 5000 x g por 5 min, com a formação de 3 fases, sendo a fase inferior (metanólica) retirada para posterior secagem em banho-maria fervente. Em seguida, a amostra foi ressuspendida em Triton X100/Metanol (2:1) seguida por agitação em vórtex. Logo após, foi realizada a dosagem do TAG e CT por ensaio colorimétrico enzimático de acordo com instruções do fabricante (Biotécnica[®]) (TRINH et al., 1998; BARBOSA et al., 2016).

4.3.2.8 Análise histológica do fígado e determinação do grau de esteatose

Para a determinação do escore de esteatose, ao final do protocolo experimental, fragmentos de fígado foram imediatamente armazenados em cassetes histológicos e imersos em paraformaldeído 4% por 48 horas em geladeira (4-8°C) para procedimentos posteriores. Cortes histológicos de 5 µm foram obtidos com o auxílio de micrótomo rotativo e aderidos em lâminas de vidro. Em seguida, foram coradas com Hematoxilina-Eosina e posteriormente quantificou-se o grau de esteatose. Para isto, diferenciou-se gotículas lipídicas em macro e micro gotículas, além da contagem de células de Kupffer em um gride de 100 pontos, com o auxílio de um microscópio Olympus CX-41 (BRUNT et al., 1999; KLEINER et al., 2005). As fotos representativas foram obtidas a partir da captura realizada em uma câmera acoplada (Olympus SC30) ao microscópio, com o uso do software AnalySIS getIT (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH).

4.3.2.9 Perfil de ácidos graxos em tecido hepático

O perfil lipídico do tecido hepático (100 mg), foi determinado por cromatografia líquida de alta performance (High Performance Liquid Chromatography- HPLC). A extração dos lipídeos das amostras foi efetuada de acordo com o método descrito por FOLCH et al., 1957. Os tecidos foram homogeneizados em 1,33 mL de clorofórmio:metanol (2:1 v/v). Ao sobrenadante resultante da homogeneização adicionou-se 0,24 ml de metanol para precipitação de proteínas. As amostras depois de homogeneizadas, foram centrifugadas durante 10 minutos a 2500 rpm em centrífuga Eppendorf modelo 5810R. A fase superior (hidrometanólica) foi transferida para outro tubo de ensaio e adicionou-se 0,48 ml de cloroformio e 0,41mL de água, para formação de emulsão. Após a formação espontânea de sistema bifásico, a cada amostra foi adicionado 1 mL da solução de Folch (clorofórmio:metanol:água, 3:48:47 v/v) para eluição da fração hidrometanólica. Os extratos lipídicos foram submetidos à secagem em fluxo de nitrogênio gasoso. Após secagem, as amostras contendo os lipídios foram saponificadas, processo onde separou-se apenas os ácidos graxos dos lipídeos totais. À cada amostra submetida ao fluxo de nitrogênio, foram acrescentados 0,1 mL de metanol e saponificadas com 2 mL de solução alcalina em metanol (1 mol/L de hidróxido de sódio em metanol a 90 %) sendo então incubadas em banho-maria a 37° C, sob agitação por 2 horas (NISHIYAMA – NARUKE et al., 1998). Após incubação as amostras foram resfriadas em banho de gelo e a solução alcalina foi acidificada até atingir pH 3.0 pela adição de ácido clorídrico 1 mol/L. Os ácidos graxos contidos nesta solução foram extraídos pela adição 1 ml de hexano, em três repetições. A fração obtida das extrações foi evaporada em fluxo de nitrogênio gasoso. Após secagem, amostras foram acondicionadas à -20° C, até a derivatização com e posterior análise por HPLC. Para detecção em cromatógrafo líquido alta precisão (HPLC), os ácidos graxos foram ressuspensos em acetonitrila e derivatizados usando Bromometil-Metóxi-Coumarin (BMCM) (1 mg/mL), a 60° C por 15 minutos (ABUSHUFA et al., 1994). Após a incubação, estas foram diluídas em igual volume de acetonitrila e transferidas para vials de injeção, onde foram mantidas a 10° C até o momento da injeção no HPLC. Para a análise dos ácidos graxos derivatizados através do detector de fluorescência, foram realizadas injeções no volume de 20 µL de cada amostra. Os ácidos graxos foram injetados em cromatógrafo líquido Varian Pró-Star e separados em coluna de sílica C8, com partícula interna de 5 µm de poro de saída de 100 Å. A eluição aconteceu pela injeção de fase móvel, em gradiente isocrático de

acetona e água (77/23 - v/v). Uma vez eluídos, os ácidos graxos foram detectados através de detector de fluorescência, com excitação em 325 nm e emissão 398 nm.

4.3.2.10 Dosagem de citocinas em tecido hepático

Para quantificar as citocinas (IL-12, IL-6, IL-10, TNF) utilizou-se o kit CBA mouse Inflammation (BD Cytometric beads array, CA, USA) em uma mesma amostra de fígado.

Este kit CBA possui microesferas do mesmo tamanho, mas com intensidade de fluorescência distinta, de acordo com a citocina que foi mensurada. Além disso, cada partícula está conjugada com um anticorpo específico para cada citocina, que foi identificada pela fluorescência emitida. A quantificação foi realizada por meio de uma curva padrão, que possibilitou a construção de um gráfico comparativo de intensidades das amostras e da curva padrão. A equação gerada a partir deste gráfico foi utilizada para calcular as concentrações de citocinas nas amostras. Para a leitura do teste CBA, utilizou-se o citômetro de fluxo BD FACSCanto II e analisou-se os resultados no software FCAP Array v3.

4.4 TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

A análise estatística dos dados foi realizada no programa estatístico Graphpad Prism v.6.01 (Graphpad Inc.; La Jolla, USA). Para avaliação da distribuição dos dados foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As variáveis não paramétricas foram transformadas em logaritmo. As variáveis quantitativas foram descritas e apresentadas em média e erro padrão da média (EPM) quando a distribuição foi simétrica ou em mediana e intervalo interquartil quando foi assimétrica. Foi realizada a análise de variância de duas vias (*two way* - ANOVA) para avaliar o efeito de cada fator e a interação dos mesmos, seguido do *post hoc* de Bonferroni para comparação múltipla. Para todos os testes, foi adotado o nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

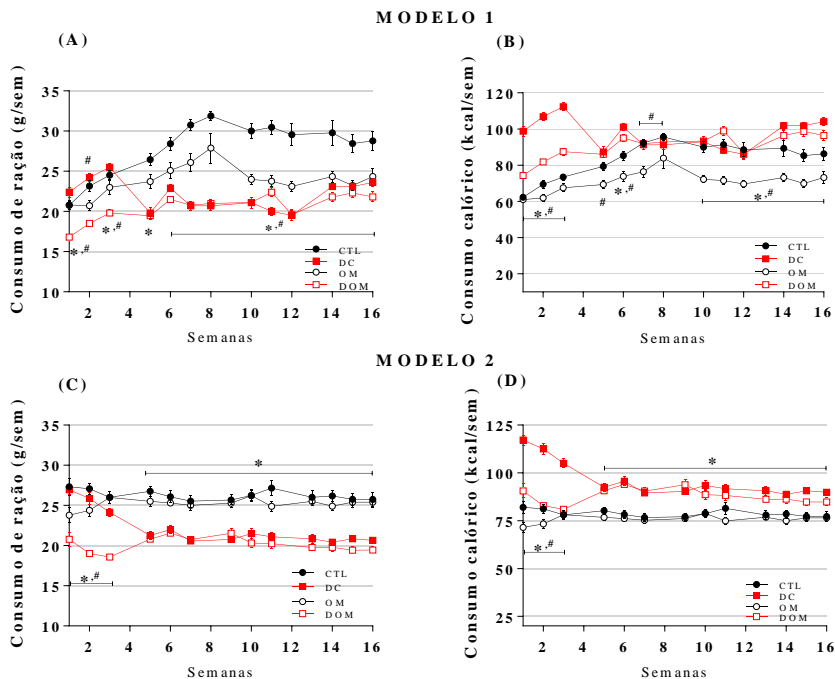
Visando estabelecer um modelo experimental adequado para a avaliação dos efeitos da suplementação com óleo de macadâmia sobre o acúmulo de lipídeos hepáticos e avaliar a reprodutibilidade dos efeitos da dieta de cafeteria utilizada no modelo experimental proposto por Higa et al., (2014), realizamos um estudo piloto utilizando dieta de cafeteria composta por 47% de carboidratos, sendo destes 21% de açúcar refinado simples (açúcar de mesa), 39% de lipídeos e 14% de proteínas, durante 90 dias. Os resultados referentes a este estudo estão descritos detalhadamente no Apêndice A. Após a análise dos dados deste estudo piloto, observamos que a dieta de cafeteria promoveu alterações transitórias na glicemia de jejum, discreta redução da tolerância à glicose, sem alteração na responsividade à insulina e nas concentrações plasmáticas de TAG. No entanto, o consumo de dieta de cafeteria promoveu aumento nas concentrações plasmáticas de CT, no acúmulo de lipídeos hepáticos, representado pelo aumento do conteúdo de TAG e CT hepáticos, além de promover o aumento da adiposidade visceral. Apesar desses efeitos promovidos pela dieta de cafeteria, consideramos necessário estabelecer um modelo que represente com mais consistência as alterações metabólicas, como intolerância à glicose e hiperglicemia mais acentuadas, alterações mais severas/representativas nas concentrações de lipídeos plasmáticos, por isso, propomos o aumento da intervenção para 120 dias. Além disso, nos experimentos piloto, nenhum dos parâmetros alterados pela dieta de cafeteria foi atenuado pela suplementação com óleo de macadâmia. Baseados nesta observação, a proposta do aumento para 120 dias de exposição à dieta acarreta em aumento paralelo do tempo de suplementação. Neste sentido, o fator tempo de suplementação foi modificado para avaliarmos se este seria um dos pontos que determinaria potencial efeito da suplementação com óleo de macadâmia. Ainda durante esta etapa inicial do trabalho, levando em consideração que dados presentes na literatura sugerem que intervenções nutricionais em modelos experimentais utilizando dieta de cafeteria podem ser ou não efetivas dependendo da composição da dietas de cafeteria utilizada como modelo, propomos acrescentar um segundo modelo de dieta, visando a comparação entre dois modelos. O segundo modelo (Modelo 2) foi planejado para conter 41% de açúcar refinado simples em sua composição, enquanto o modelo original contém 21% de açúcar refinado simples (Modelo 1).

5.1 ALTERAÇÕES NO CONSUMO DE RAÇÃO, DE MACRONUTRIENTES E NA MASSA CORPORAL APÓS 120 DIAS DO CONSUMO DE DIFERENTES DIETAS DE CAFETERIA E DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE MACADÂMIA.

Após 120 dias de intervenção com dieta de cafeteria e suplementação com óleo de macadâmia, observou-se uma redução significativa no consumo de ração nos grupos que foram alimentados com dieta de cafeteria quando comparados com seus respectivos controles, a partir da quinta semana de tratamento, independente da composição da dieta de cafeteria (Figura 3A e 3C). Ainda, na figura 3A podemos observar que os animais do grupo óleo de macadâmia também apresentaram um menor consumo quando comparado com o grupo controle. As três primeiras semanas após o início do protocolo experimental apresentaram variações no consumo de ração que flutuaram até a quinta semana (Figura 3A e 3C). Quando avaliamos o consumo total de ração durante os 120 dias, também observamos esta redução do consumo de ração pelos grupos alimentados com dieta de cafeteria, além de um efeito da suplementação com óleo de macadâmia em ambos os modelos. (MODELO 1: CTL: $362,97 \pm 9,52$; DC: $286,60 \pm 5,03^*$; OM: $306,98 \pm 7,37^\#$; DOM: $266,87 \pm 4,49^{*,\$}$; sendo (*): DC vs CTL ou DOM vs OM; (#): OM vs CTL ou DOM vs DC e (\$): CTL vs DOM; Fator interação: $F = 6,69$; $p = 0,01$; Fator dieta : $F = 27,84$; $p < 0,0001$; Fator suplementação: $F = 21,32$; $p < 0,0001$; MODELO 2: CTL: $341,83 \pm 9,18$; DC: $286,88 \pm 5,03^*$; OM: $327,61,00 \pm 6,42$; DOM: $261,98 \pm 4,87^{*,\$}$; Fator dieta : $F = 74,13$; $p < 0,0001$; Fator suplementação: $F = 7,80$; $p = 0,0080$).

Na figura 3B, nós podemos observar que apesar do consumo de ração ter variado, mas ter sido menor nos grupos que receberam dieta de cafeteria ao longo do período de intervenção, o consumo calórico apresentou apenas reduções transitórias nestes grupos ao longo dos 120 dias, no modelo 1. Já na figura 3D, a partir da quinta semana, os animais que consumiram dieta de cafeteria (modelo 2) apresentaram aumento significativo no consumo de ração em relação ao grupo CTL.

Figura 3 - Consumo de ração e consumo calórico de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 120 dias.

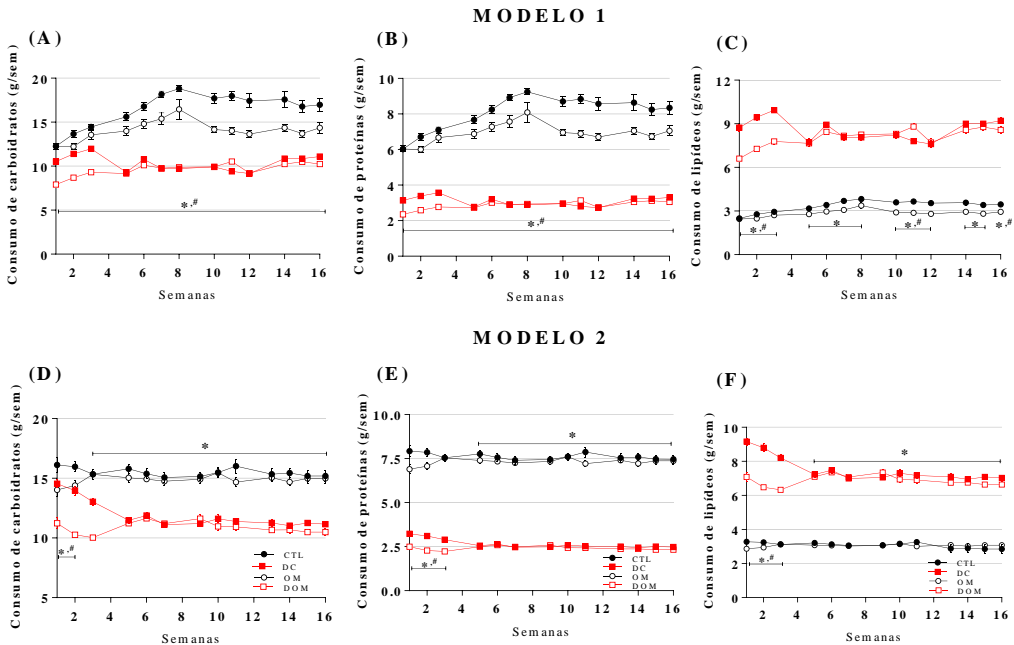


Os dados estão apresentados como média e EPM. Teste two-way ANOVA seguido de *post hoc* de Bonferroni, $p < 0,05$, MODELO 1: Grupos CTL, DC e DOM: $n = 10$; OM: $n = 9$; MODELO 2: Grupos CTL, DC: $n = 12$; OM: $n = 10$ e DOM: $n = 9$, (*) : indica efeito da dieta de cafeteria, DC vs CTL ou DOM vs OM e (#) : indica efeito do óleo de macadâmia, OM vs CTL ou DOM vs DC.

Em relação ao consumo de macronutrientes, observamos que o mesmo reflete o consumo de ração e a composição das dietas utilizadas. No modelo 1, o consumo de carboidratos e de proteínas foi significativamente menor tanto nos os grupos que receberam dieta de cafeteria quanto no grupo óleo de macadâmia, quando comparado com o grupo controle, ao longo dos 120 dias de tratamento (Figuras 4A e 4B). Já no modelo 2, o consumo de carboidratos e proteínas foi significativamente menor apenas nos grupos que receberam dieta de cafeteria (Figuras 4D e 4E). Em ambos os modelos (1 e 2), o consumo de

lipídeos foi maior nos grupos que consumiram dieta de cafeteria, a partir da terceira semana de intervenção (Figura 4C e 4F).

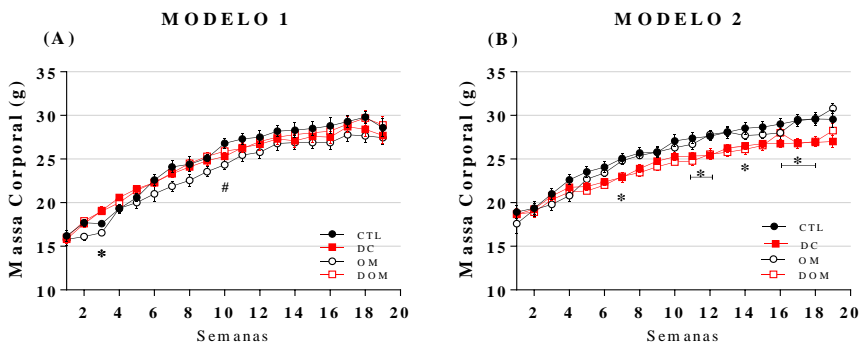
Figura 4 - Consumo de macronutrientes de camundongos alimentados com duas composições de dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 120 dias.



Os dados estão apresentados como média e EPM. Teste two-way ANOVA seguido de *post hoc* de Bonferroni, $p < 0,05$, MODELO 1: Grupos CTL, DC e DOM: $n=10$; OM: $n=9$; MODELO 2: Grupos CTL, DC: $n=12$; OM: $n=10$ e DOM: $n=9$, (*) indica efeito da dieta de cafeteria, DC vs CTL ou DOM vs OM e (#) indica efeito do óleo de macadâmia, OM vs CTL ou DOM vs DC.

A massa corporal foi semelhante entre os grupos na maior parte do período de intervenção em ambos os modelos experimentais (Figuras 5A e 5B). No entanto, a mesma apresentou variações discretas provocadas principalmente pelo consumo da dieta no modelo 2, que foram normalizadas ao final da intervenção (Figura 5B).

Figura 5 - Massa corporal de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 120 dias.



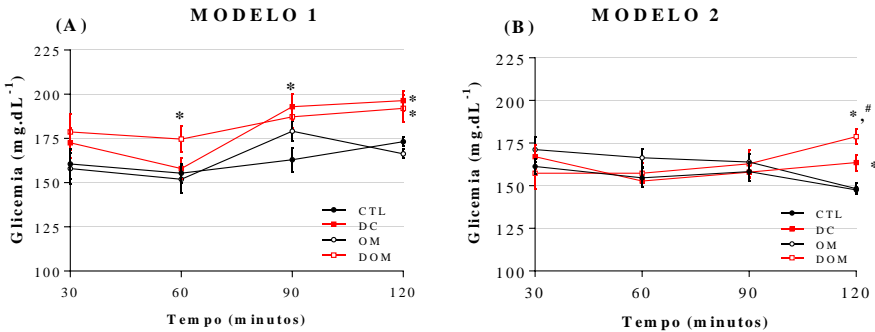
Os dados estão apresentados como média e EPM. Teste two-way ANOVA seguido de *post hoc* de Bonferroni, $p < 0,05$, MODELO 1: Grupos CTL, DC e DOM: $n=10$; OM: $n=9$; MODELO 2: Grupos CTL, DC: $n=12$; OM: $n=10$ e DOM: $n=9$, (*) indica efeito da dieta de cafeteria, DC vs CTL ou DOM vs OM e (#) indica efeito do óleo de macadâmia, OM vs CTL ou DOM vs DC.

Como nós podemos observar, os animais que receberam dieta de cafeteria em ambos os modelos, apresentaram um aumento no consumo calórico que variou ao longo da intervenção, mas o mesmo não refletiu na massa corporal dos animais, uma vez que ao longo do tempo a massa corporal foi semelhante entre os grupos, independentemente do tipo de dieta consumido.

5.2 O CONSUMO DE DIETA DE CAFETERIA PROMOVEU AUMENTO NA GLICEMIA DE JEJUM E REDUÇÃO DA TOLERÂNCIA À GLICOSE.

Em ambos os modelos experimentais podemos observar um aumento das concentrações de glicose sanguínea nos grupos alimentados com dieta de cafeteria ao final do protocolo experimental (120 dias), no entanto, ao longo da intervenção este perfil glicêmico foi diferente dependendo do modelo experimental (Figura 6A e 6B).

Figura 6 - Curva glicêmica de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia ao longo dos 120 dias.



Os dados estão apresentados como média e EPM. Teste two-way ANOVA seguido de *post hoc* de Bonferroni, $p < 0,05$ MODELO 1: Grupos CTL, DC: $n=10$; grupo OM: $n=8-10$, MODELO 2: Grupos CTL, DC: $n=11-13$; DOM: $n=8-9$; grupo OM: $n=10$; (*): indica efeito da dieta de cafeteria, DC vs CTL ou DOM vs OM e (#): indica efeito do óleo de macadâmia, OM vs CTL ou DOM vs DC.

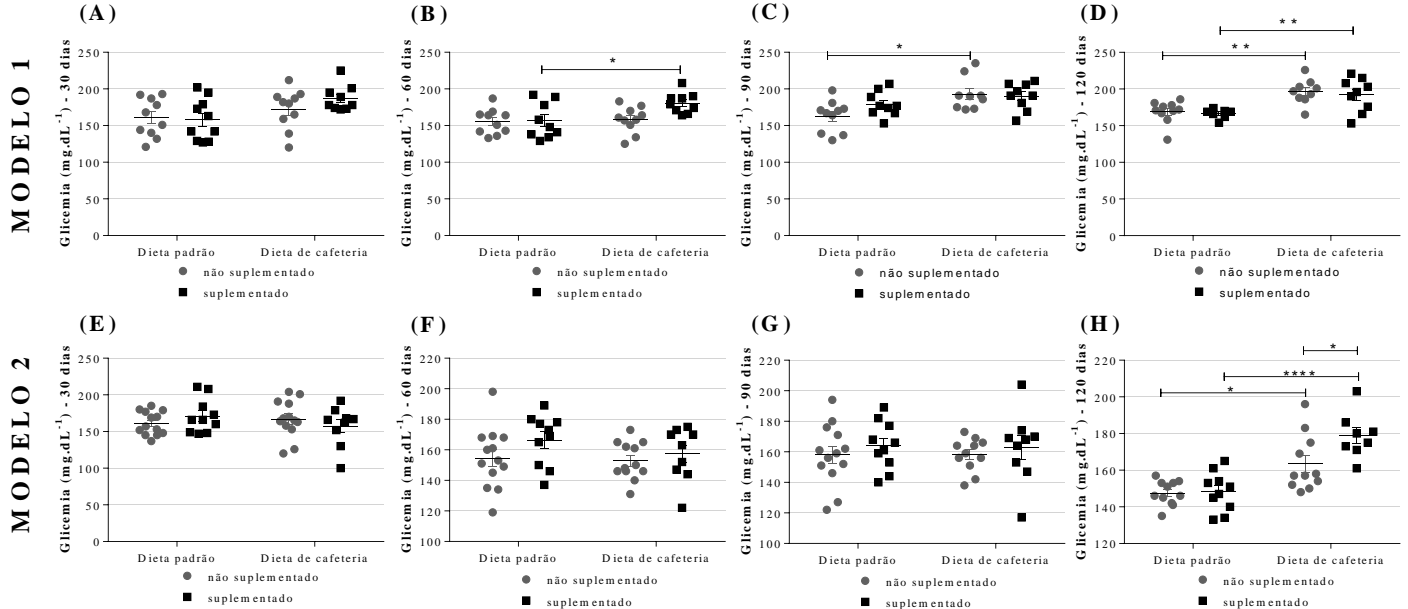
No modelo 1, aos 30 dias de intervenção os grupos DC e DOM apresentaram um aumento na glicemia de jejum, observado pelo teste ANOVA de duas vias, indicando um efeito da dieta de cafeteria sobre este parâmetro. No entanto, esse aumento não foi suficiente para observarmos esta diferença no teste de Bonferroni (CTL: $160,6 \pm 8,3$; DC: $172,6 \pm 8,6$; OM: $158,0 \pm 9,0$; DOM: $187,2 \pm 5,8$; $F = 6,383$; $p = 0,0162$; Figura 7A). Após 60 dias de intervenção os animais do grupo DOM apresentaram um aumento significativo da glicemia de jejum quando comparado com o grupo OM (CTL: $155,4 \pm 5,4$; DC: $158,0 \pm 5,7$; OM: $156,3 \pm 8,1$; DOM: $180,7 \pm 4,6^*$, $F = 4,954$; $p = 0,0328$; Figura 7B). Já aos 90 dias apesar dos grupos DC e DOM apresentarem valores aumentados de glicemia, apenas no grupo DC este aumento foi significativo quando comparado com o seu controle (CTL: $163,0 \pm 6,8$; DC: $193,0 \pm 7,4^*$; OM: $179,1 \pm 5,6$; DOM: $187,2 \pm 6,1$, $F = 9,78$; $p < 0,0037$; Figura 7C). Após estes aumentos transitórios, aos 120 dias foi observado um aumento significativo em ambos os grupos que receberam dieta de cafeteria, como podemos observar nas figuras 6A e 7D (CTL: $169,0 \pm 4,9$; DC: $196,4 \pm 5,6^*$; OM: $166,3 \pm 2,5$; DOM: $192,0 \pm 7,6^*$; $F = 21,16$; $p < 0,0001$).

Contrapondo o que tínhamos observado no modelo 1, o consumo de dieta de cafeteria e a suplementação com óleo de macadâmia no modelo 2 promoveram alteração na glicemia de jejum apenas aos 120 dias de intervenção. Após 30 dias (CTL: $161,31 \pm 4,44$; DC: $167,00 \pm 7,05$; OM:

171,20±7,38; DOM: 157,33±9,16), 60 dias (CTL: 154,62±5,51; DC: 152,75±3,55; OM: 166,40±5,32; DOM: 157,33±5,86) e 90 dias (CTL: 158,23±5,54; DC: 158,00±3,30; OM: 163,90±5,02; DOM: 162,89±7,80) de intervenção não houve alteração na glicemia de jejum, como podemos observar nas figuras 7E, 7F, 7G, respectivamente.

Apenas ao final da intervenção (120 dias, CTL: 147,54±2,01; DC: 163,54±4,63*; OM: 148,30±3,37; DOM: 178,75±4,37*[#], efeito do consumo de dieta de cafeteria: $F = 28,40$; $p < 0,0001$; efeito da suplementação com óleo de macadâmia: $F = 4,60$; $p = 0,0387$; Figura 6B), podemos observar um aumento significativo da glicemia nos animais dos grupos DC e DOM quando comparados com os seus respectivos controles. Além disso, aos 120 dias os animais do grupo DOM apresentaram um aumento significativo da glicemia quando comparados com os animais do grupo DC (Figura 7H), este dado nos mostra que o aumento de açúcar simples na dieta de cafeteria ofertada no modelo 2 quando associado à suplementação de óleo de macadâmia contribui para o aumento da glicemia, o que não foi observado no modelo 1.

Figura 7 - Glicemia de jejum de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 120 dias.



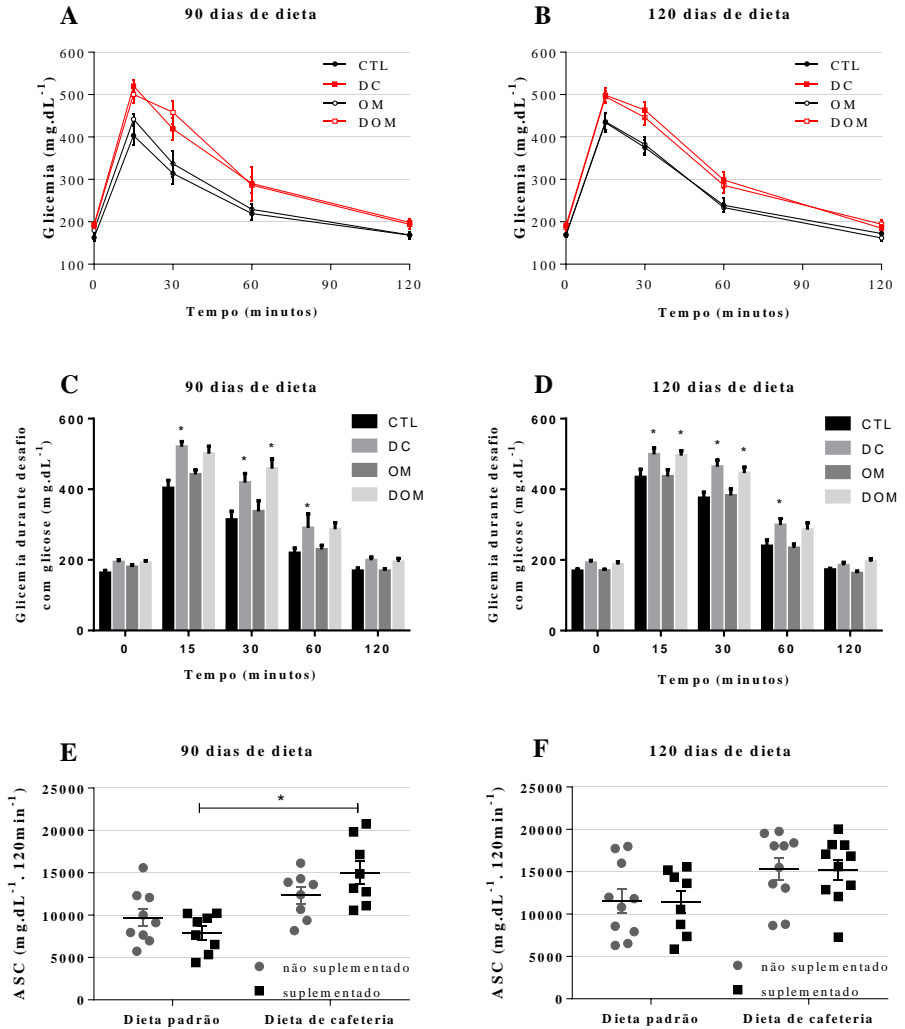
Os dados estão apresentados como média e EPM. Teste two-way ANOVA seguido de *post hoc* de Bonferroni, , MODELO 1: Grupos CTL, DC: n=10; DOM: n=9-10; grupo OM: n=8-10, MODELO 2: Grupos CTL, DC: n=11-13; DOM: n=8-9; grupo OM: n=10; (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$; (****): $p < 0,0001$.

Para avaliarmos se o consumo de dieta de cafeteria e/ou a suplementação com óleo de macadâmia promoveu alterações na tolerância à glicose, avaliamos este parâmetro aos 90 e 120 dias em ambos os modelos experimentais.

Podemos observar na figura 8 que no modelo 1, o consumo de dieta de cafeteria promoveu uma redução da tolerância à glicose aos 90 e 120 dias de intervenção e aos 90 dias esta redução foi intensificada pela associação com o óleo de macadâmia. Podemos observar este resultado na variação da glicemia durante o teste de tolerância à glicose (Figuras 8A, 8B, 8C e 8D) e na área abaixo da curva (**90 dias**: CTL: 9711 ± 1042 ; DC: 12320 ± 955 ; OM: 7899 ± 802 ; DOM: $15031 \pm 1364^*$; efeito do consumo de dieta de cafeteria: $F = 21,00$; $p < 0,0001$; efeito da interação dos fatores: $F = 4,53$; $p = 0,0419$; **120 dias**: CTL: 11570 ± 1395 ; DC: 15339 ± 1320 ; OM: 11414 ± 1336 ; DOM: 15156 ± 1195 ; efeito do consumo de dieta de cafeteria: $F = 8,052$; $p < 0,0076$) (Figuras 8E e 8F).

Figura 8 - Tolerância à glicose de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, após 90 e 120 dias de intervenção – Modelo 1.

MODELO 1



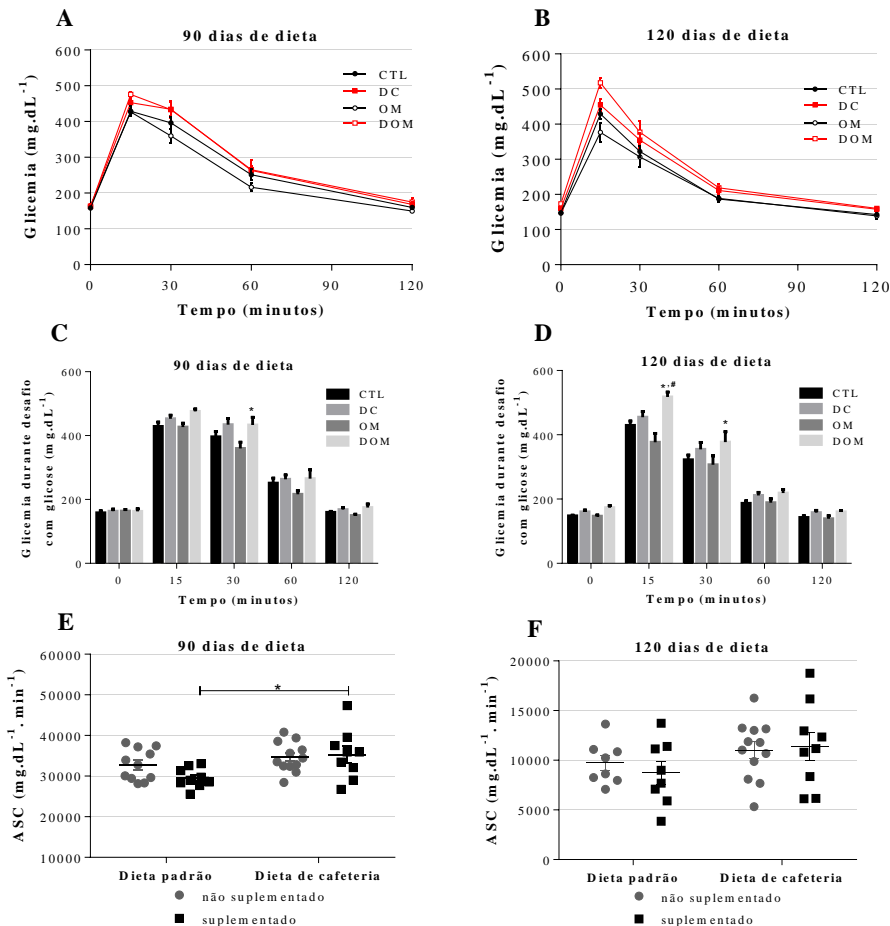
Os dados estão apresentados como média e EPM. Teste two-way ANOVA seguido de *post hoc* de Bonferroni, $p < 0.05$. **90 dias:** Grupos CTL e DC: n=9, OM e DOM: n=8; **120 dias:** Grupos CTL: n=9, DC e DOM: n=10 e OM: n=8. (*): indica efeito da dieta de cafeteria, DC vs CTL ou DOM vs OM.

Assim como no protocolo experimental anterior, no Modelo 2, aos 90 dias e 120 dias de intervenção houve uma redução na tolerância à glicose proporcionada tanto pelo consumo de dieta de cafeteria quanto por efeito da suplementação com óleo de macadâmia, como podemos observar na figura 9.

Aos 90 dias de intervenção, podemos observar na figura 9C um aumento significativo na glicemia dos animais do grupo DOM quando comparado com o grupo OM após 30 minutos do início do teste de tolerância à glicose (CTL: $396 \pm 16,2$; DC: $434 \pm 19,5$; OM: $359 \pm 19,5$; DOM: $433 \pm 24,0^*$; $p < 0,01$). Este incremento contribuiu para o aumento significativo da área abaixo da curva entre estes grupos, como podemos observar nas figuras 9A e E (**90 dias**: CTL: 32785 ± 1164 ; DC: 34657 ± 1054 ; OM: 29456 ± 726 ; DOM: $35296 \pm 2028^*$; efeito do consumo de dieta de cafeteria: $F = 396,8$; $p < 0,0001$). Além disso, a análise variância de duas vias nos mostra que houve efeito tanto do consumo de dieta de cafeteria quanto da suplementação com óleo de macadâmia (**90 dias**: CTL: 32785 ± 1164 ; DC: 34657 ± 1054 ; OM: 29456 ± 726 ; DOM: $35296 \pm 2028^*$; efeito do consumo de dieta de cafeteria: $F = 396,8$; $p < 0,0001$; efeito da suplementação com óleo de macadâmia: $F = 8,67$; $p < 0,0001$ – Figura 9C). Já aos 120 dias de intervenção, a tolerância à glicose foi reduzida tanto por efeito da dieta de cafeteria (**120 dias**: CTL: 9719 ± 759 ; DC: 11001 ± 852 ; OM: 8724 ± 1143 ; DOM: 11426 ± 11427 ; $F = 275,4$; $p < 0,0001$) quanto pela suplementação com óleo de macadâmia ($F = 13,26$; $p < 0,0001$) (Figuras 9B, 9D e 9F). Aos 15 minutos após o início do teste de tolerância à glicose, observou-se um aumento nas concentrações de glicose sanguínea no grupo DOM quando comparado com os grupos OM e DC e aos 30 minutos a diferença entre o grupo DOM e OM, permaneceu (Figura 9D).

Figura 9 - Tolerância à glicose de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, após 90 e 120 dias de intervenção – Modelo 2.

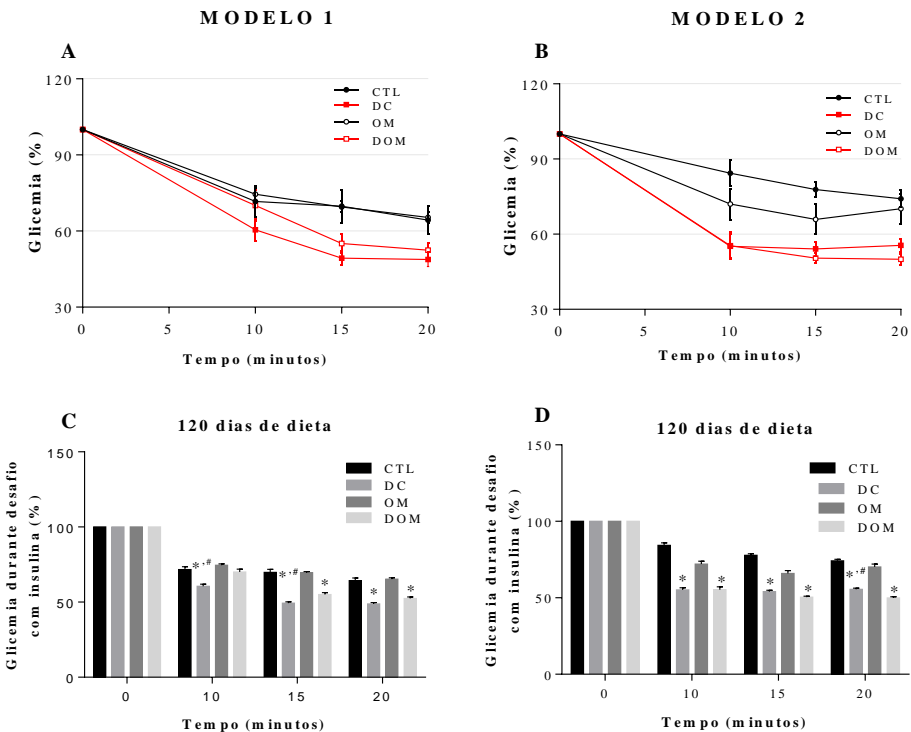
MODELO 2



Os dados estão apresentados como média e EPM. Teste two-way ANOVA seguido de *post hoc* de Bonferroni, $p < 0,05$. **90 dias:** Grupos CTL, DC: n=12, OM: n=10 e DOM: n=9; **120 dias:** Grupos CTL e OM: n=8, DC: n=12 e DOM=9. (*) indica efeito da dieta de cafeteria, DC vs CTL ou DOM vs OM; (#): indica efeito do óleo de macadâmia, OM vs CTL ou DOM vs DC.

Ainda sobre alterações no metabolismo glicêmico, nós realizamos o teste de tolerância à insulina e observamos que os animais que consumiram dieta de cafeteria (grupos DC e DOM) apresentaram um aumento significativo no decaimento da glicemia ao longo do teste, em ambos os modelos utilizados, como podemos observar na figura 10.

Figura 10 – Teste de tolerância à insulina de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, após 120 dias de intervenção.



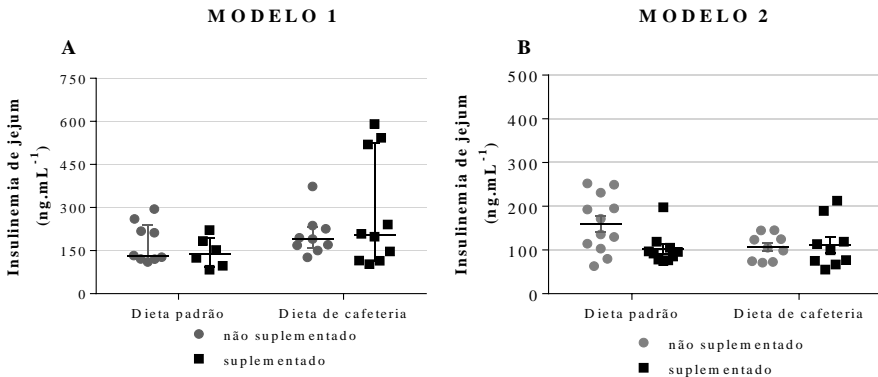
Os dados estão apresentados como média e EPM. Teste two-way ANOVA seguido de *post hoc* de Bonferroni, $p < 0,05$. MODELO 1: Grupos CTL, DC, OM e DOM: $n=10$. MODELO 2: Grupos CTL e OM: $n=10$, DC: $n=12$ e DOM: $n=9$. (*): indica efeito da dieta de cafeteria, DC vs CTL ou DOM vs OM; (#): indica efeito do óleo de macadâmia, OM vs CTL ou DOM vs DC.

Nas figuras 10A e C, podemos observar que no Modelo 1, durante a realização do teste de tolerância à insulina, 10 minutos após o início do teste os animais do grupo DC apresentaram uma redução significativa da glicemia em relação aos animais dos grupos CTL e DOM (CTL: $71 \pm 6,0$; DC: $60 \pm 4,3^{* \#}$; OM: $74 \pm 2,3$; DOM: $70 \pm 6,0$, $p < 0,05$). Após 15 minutos, podemos observar que esta redução do grupo DC em relação aos grupos CTL e DOM, continua. Neste minuto, o grupo DOM apresenta uma redução da glicemia em relação ao grupo OM (CTL: $69 \pm 6,5$; DC: $49 \pm 2,8^{* \#}$; OM: $69 \pm 2,1$; DOM: $55 \pm 3,8^*$, $p < 0,05$). Ao final do teste (minuto 20), os animais que consumiram dieta de cafeteria (grupos DC e DOM) apresentaram uma redução significativa em relação aos seus respectivos controles (grupos CTL e OM, respectivamente) (CTL: $64 \pm 5,3$; DC: $48 \pm 2,7^*$; OM: $65 \pm 2,1$; DOM: $52 \pm 3,0^*$, $p < 0,05$).

Já no Modelo 2, podemos observar que nos minutos 10 e 15, os animais que receberam dieta de cafeteria apresentaram uma redução significativa da glicemia em relação aos seus respectivos controles (**Minuto 10**: CTL: $84 \pm 5,0$; DC: $55 \pm 4,7^*$; OM: $72 \pm 6,1$; DOM: $55 \pm 5,3^*$, $p < 0,05$; **Minuto 15**: CTL: $77 \pm 3,1$; DC: $54 \pm 2,9^*$; OM: $65 \pm 6,0$; DOM: $50 \pm 1,9^*$, $p < 0,05$ - Figura 10D). No minuto 20, final do teste, além de permanecer esta redução nos grupos DC e DOM, o grupo DC também apresentou uma redução em relação ao grupo DOM (CTL: $74 \pm 3,3$; DC: $55 \pm 2,7^{* \#}$; OM: $70 \pm 5,9$; DOM: $49 \pm 2,2^*$, $p < 0,05$ - Figura 10D).

Ao final do período de intervenção avaliamos as concentrações plasmáticas de insulina de jejum nos Modelos 1 e 2 e observamos que não houve diferença significativa entre os grupos (MODELO 1: CTL: $177 \pm 23,3$; DC: $204 \pm 24,1$; OM: $144 \pm 21,5$; DOM: $278 \pm 61,5$ MODELO 2: CTL: $160 \pm 18,8$; DC: $106 \pm 9,9$; OM: $102 \pm 11,5$; DOM: $112 \pm 18,3$), como podemos observar nas figuras 11A e 11B, respectivamente.

Figura 11 - Concentrações plasmáticas de insulina de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 120 dias – Modelos 1 e 2.



Os dados estão apresentados como média e EPM. Teste two-way ANOVA seguido de *post hoc* de Bonferroni. Modelo 1: Grupos CTL, DC: n=9, OM: n=6 e DOM: n=10; Modelo 2: Grupos CTL: n= 12, DC e DOM: n=9, OM: n=10.

Assim, constatamos que independente do Modelo experimental utilizado, os animais que consumiram dieta de cafeteria (DC e DOM) apresentaram uma redução da tolerância à glicose após 120 dias de intervenção, sem alteração significativa na insulinemia de jejum e com indícios de um maior prejuízo quando a dieta de cafeteria foi associada com a suplementação de óleo de macadâmia, nestes parâmetros.

5.3 O CONSUMO DE DIFERENTES DIETAS DE CAFETERIA COM OU SEM A SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE MACADÂMIA DURANTE 120 DIAS PROMOVEU ALTERAÇÕES NO PERFIL LIPÍDICO PLASMÁTICO DE CAMUNDONGOS.

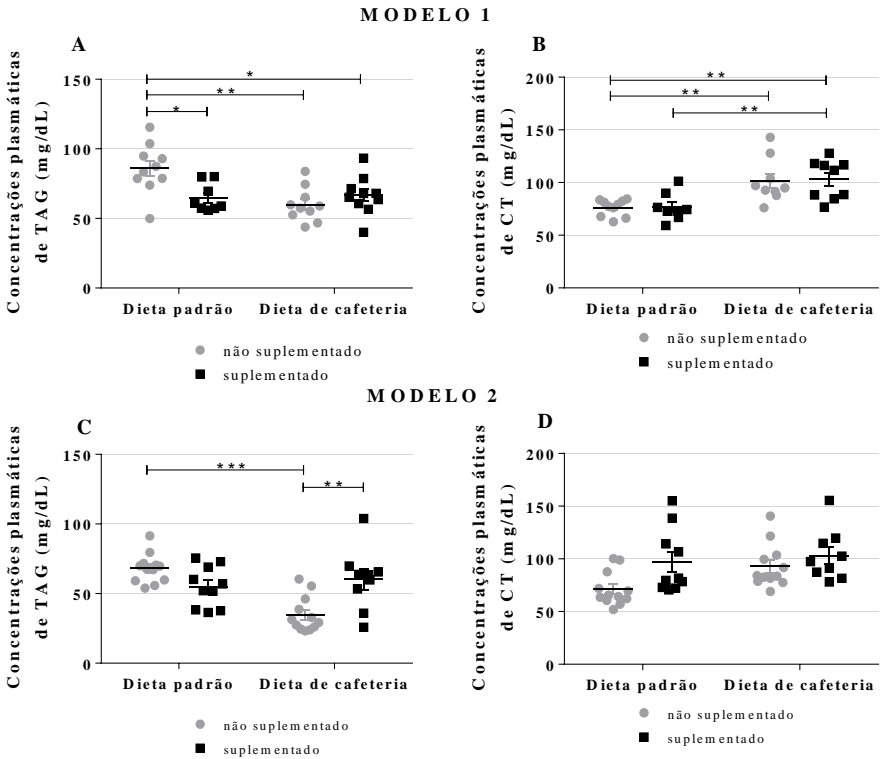
Ao final da intervenção, avaliou-se o perfil lipídico plasmático destes camundongos alimentados ou não com dieta de cafeteria, suplementados ou não com óleo de macadâmia.

Na figura 12A, podemos observar que no Modelo 1 as concentrações plasmáticas de TAG foram significativamente menores nos grupos DC, OM e DOM quando comparados com o grupo CTL (CTL: 85,92±5,65; DC: 59,82±3,84*; OM: 64,98±3,59#; DOM: 66,55±4,39\$, p<0,05, sendo (*):DC vs CTL ou DOM vs OM; (#): OM vs CTL ou DOM vs DC e (\$) : CTL vs DOM). Este resultado nos infere um efeito tanto da

dieta de cafeteria quanto do óleo de macadâmia, como podemos observar após a análise de variância de duas vias (efeito do consumo de dieta de cafeteria: $F = 7,24$; $p = 0,01$; efeito da interação dos fatores: $F = 9,21$; $p = 0,005$). Em contrapartida, as concentrações plasmáticas de CT foram significativamente maiores nos grupos DC e DOM quando comparadas aos seus respectivos controles (CTL: $76,14 \pm 2,47$; DC: $101,62 \pm 6,96^*$; OM: $76,68 \pm 4,65$; DOM: $103,18 \pm 6,15^s$, $p < 0,05$) (Figura 12B).

Assim como nós observamos no modelo 1, após 120 dias de intervenção as concentrações plasmáticas de TAG (CTL: $68,06 \pm 3,02$; DC: $34,96 \pm 3,65^*$; OM: $55,10 \pm 4,61$; DOM: $60,17 \pm 7,33$, efeito do consumo de dieta de cafeteria: $F = 9,27$; $p = 0,004$; efeito da interação dos fatores: $F = 17,20$; $p = 0,004$) foram menores no grupo DC quando comparado com o grupo CTL, além de um aumento nestas concentrações de TAG quando a dieta de cafeteria foi associada à suplementação com óleo de macadâmia (Figura 12C). As concentrações plasmáticas de CT foram alteradas tanto pelo consumo da dieta de cafeteria, quanto pela suplementação com óleo de macadâmia (CTL: $71,14 \pm 4,60$; DC: $92,86 \pm 5,95$; OM: $96,98 \pm 9,59$; DOM: $103,14 \pm 8,04$, efeito do consumo de dieta de cafeteria: $F = 3,94$; $p = 0,054$; efeito da suplementação com óleo de macadâmia: $F = 6,61$; $p = 0,01$), mas esta diferença não foi suficiente para ser identificada no teste de Bonferroni (Figura 12D).

Figura 12 - Concentrações plasmáticas de TAG e CT de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 120 dias.



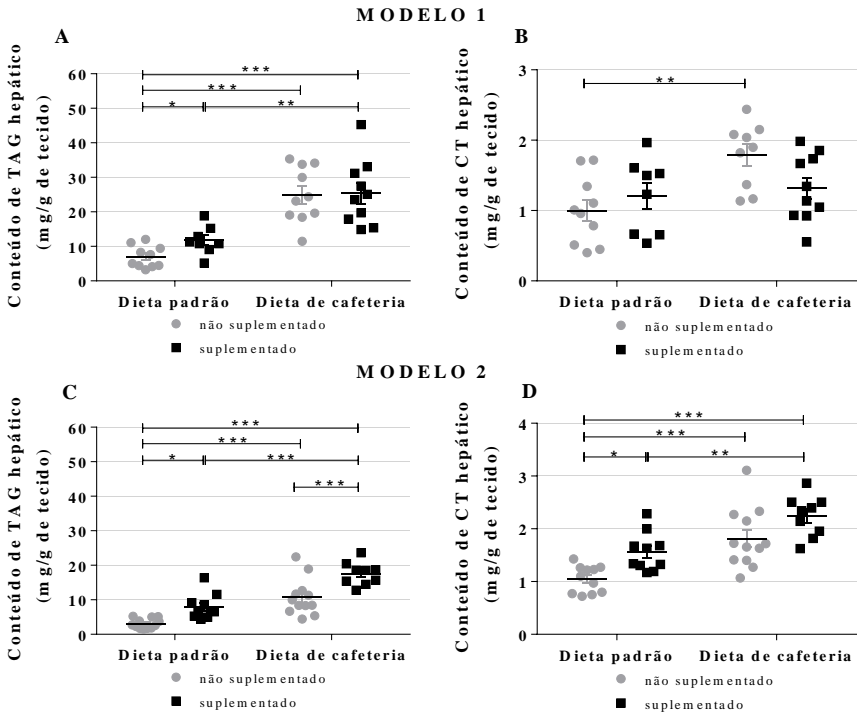
Os dados estão apresentados como média e EPM. Teste two-way ANOVA seguido de *post hoc* de Bonferroni. Figura A: Grupos CTL, DC, DOM: n=10 e OM: n=8. Figura B: Grupos CTL: n=10, DC e DOM: n=9 e OM: n=8. Figura C e D: Grupos CTL e DC: n=12, OM: n=10 e DOM: n=9. (*): p<0,05; (**): p<0,01; (***) p<0,001.

5.4 O CONSUMO DE DIETA DE CAFETERIA PROMOVEU ACÚMULO DE LIPÍDEOS HEPÁTICOS APÓS 120 DIAS DE INTERVENÇÃO.

Na figura 13A podemos observar que após 120 dias de intervenção, no Modelo 1, o conteúdo total de TAG hepático foi significativamente maior em ambos os grupos que receberam dieta de cafeteria e no grupo OM, representando um efeito per se, da suplementação com óleo de macadâmia (CTL: $6,97 \pm 1,00$; DC: $24,93 \pm 2,55^*$; OM: $11,75 \pm 1,44^\#$; DOM: $25,36 \pm 2,98^{*,\$}$, $p < 0,05$; efeito do consumo de dieta de cafeteria: $F = 66,32$; $p < 0,0001$; efeito da suplementação com óleo de macadâmia: $F = 4,97$; $p = 0,03$ e efeito da interação desses fatores: $F = 4,56$; $p = 0,04$). Já o conteúdo de CT hepático foi significativamente maior apenas no grupo DC (CTL: $1,00 \pm 0,15$; DC: $1,79 \pm 0,15^*$; OM: $1,21 \pm 0,19$; DOM: $1,32 \pm 0,15$, $p < 0,05$) (Figura 13B).

Assim como observado no modelo 1, no modelo 2 houve aumento significativo do conteúdo de TAG hepático nos grupos que consumiram dieta de cafeteria e no grupo OM em relação ao grupo CTL (CTL: $3,11 \pm 0,41$; DC: $10,72 \pm 1,54^*$; OM: $8,03 \pm 1,15^\#$; DOM: $17,57 \pm 1,11^{*,\$,\#}$, $p < 0,05$; efeito do consumo de dieta de cafeteria: $F = 67,49$; $p < 0,0001$; efeito da suplementação com óleo de macadâmia: $F = 37,54$; $p < 0,0001$ – Figura 13C). Além disso, podemos observar um incremento no conteúdo de TAG hepático no grupo DOM quando comparado com o grupo DC. Contrapondo os achados do modelo 1, o conteúdo de CT hepático apresentou-se aumentado nos grupos que receberam dieta de cafeteria e no grupo OM quando comparados com o grupo CTL (CTL: $1,05 \pm 0,08$; DC: $1,81 \pm 0,16^*$; OM: $1,56 \pm 0,12^\#$; DOM: $2,24 \pm 0,13^{*,\#}$, $p < 0,05$; efeito do consumo de dieta de cafeteria: $F = 31,16$; $p < 0,0001$; efeito da suplementação com óleo de macadâmia: $F = 13,20$; $p = 0,0008$ – Figura 13D).

Figura 13 - Conteúdo de TAG e CT hepáticos de camundongos alimentados com diferentes dietas de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 120 dias.



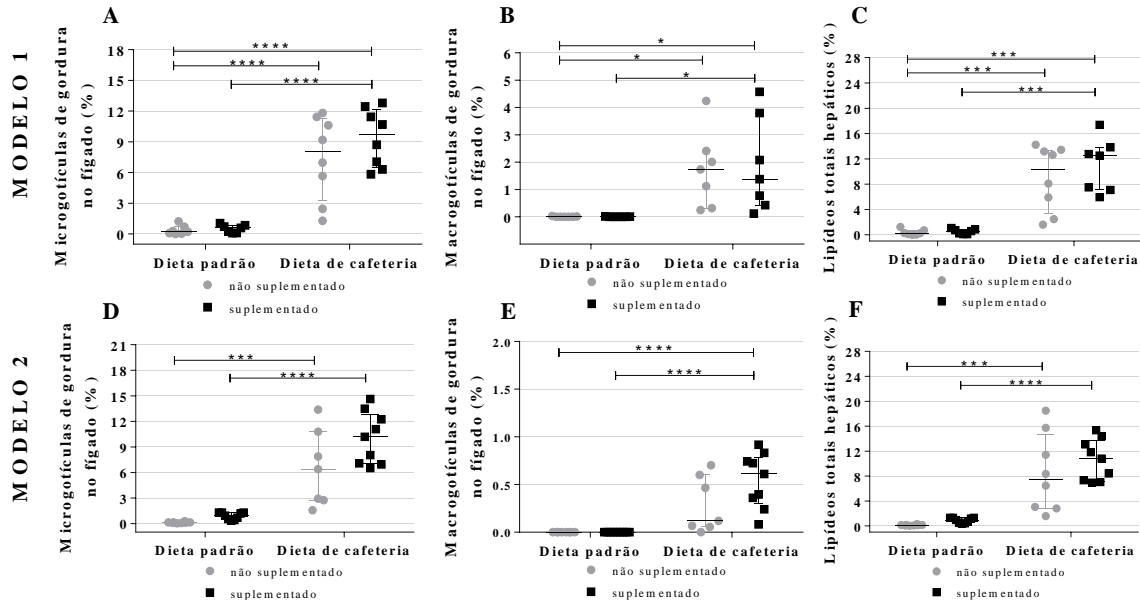
Os dados estão apresentados como média e EPM. Teste two-way ANOVA seguido de *post hoc* de Bonferroni. Figura A: Grupos CTL, DC, DOM: n=10 e OM: n=8. Figura B: Grupos CTL e DOM: n=10, DC: n=9 e OM: n= 8. Figura C e D: Grupos CTL e DC: n=12, OM: n= 10 e DOM: n=9. (*): p<0,05; (**): p<0,01; (***) p<0,001.

Para confirmarmos a presença de esteatose hepática, realizamos a análise histológica do fígado e diferenciamos a presença de gordura em microgotículas (aglomerados de gotículas de gordura ao redor do hepatócito) e macrogotículas (caracterizada pela presença de uma gotícula de gordura grande ao ponto de deslocar o núcleo do hepatócito para a periferia).

Assim como apresentado anteriormente, ao final dos 120 dias de intervenção os grupos que receberam dieta de cafeteria apresentaram um

aumento de lipídeos hepáticos em ambos os modelos utilizados, como podemos observar na figura 14.

Figura 14 – Análise histológica do fígado com identificação dos lipídeos hepáticos, micro e macrogotículas de gordura em camundongos CTL e tratados com diferentes dieta de cafeteria, suplementado ou não com óleo de macadâmia durante 120 dias.



Os dados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil. Teste two-way ANOVA seguido de *post hoc* de Bonferroni, MODELO 1: Grupos CTL, OM: n=7; DC e DOM: n=8; MODELO 2: Grupos CTL, DC: n=8; OM e DOM: n=9; (*): p<0,05; (**): p<0,01; (***) p<0,001; (****): p<0,0001.

Após a análise histológica observa-se um aumento no percentual de lipídeos hepáticos em ambos os grupos que receberam dieta de cafeteria (MODELO 1: CTL: 0,2[1,2;0,0]; DC: 10,4[14,2;1,6]*; OM: 0,6[1,0;0,1]; DOM: 12,5[17,4;5,9]*^s; F = 55,61; p < 0,0001; MODELO 2: CTL: 0,1[0,3;0,0]; DC: 7,4[18,5;1,6]*; OM: 0,9[1,3;0,4]; DOM: 10,8[15,4;6,9]*; F = 56,96; p < 0,0001). Este aumento no percentual de lipídeos foi acompanhado pelo aumento no percentual de microgotículas de gordura nos animais dos grupos DC e DOM, como podemos observar na figura 14A e D (MODELO 1: CTL: 0,2[1,2;0,0]; DC: 8,1[11,8;1,3]*; OM: 0,6[1,06;0,08]; DOM: 9,7[12,8;5,8]*; F = 72,14; p < 0,0001; MODELO 2: CTL: 0,1[0,3;0,0]; DC: 6,4[13,4;1,6]*; OM: 0,9[1,31;0,35]; DOM: 10,2[14,6;6,5]*; efeito do consumo de dieta de cafeteria: F = 73,70; p < 0,0001). O percentual de macrogotículas de gordura foi significativamente maior nos grupos DC e DOM, como apresentado na figura 14B (CTL: 0,00[0,03;0,00]; DC: 1,73[4,24;0,24]*; OM: 0,00[0,01;0,00]; DOM: 1,37[4,57;0,12]*; efeito do consumo de dieta de cafeteria: F = 18,64; p = 0,0002), apenas no modelo 1. Já no modelo 2, somente o grupo DOM apresentou um aumento significativo no conteúdo de macrogotículas de gordura (CTL: 0,00[0,00;0,00]; DC: 0,12[0,70;0,00]; OM: 0,00[0,00;0,00]; DOM: 0,61[0,92;0,08]*; efeito do consumo de dieta de cafeteria: F = 18,64; p = 0,0002), como podemos observar na figura 14E.

Devido à natureza da intervenção nutricional utilizada e a característica de aumento expressivo dos lipídeos hepáticos no modelo, foi avaliado o perfil de ácidos graxos presentes em amostras de fígado nos dois modelos. Os grupos que receberam dieta de cafeteria apresentaram características semelhantes em ambos os modelos. Existiu aumento no percentual de AGMI oleico, redução no percentual do ácido graxo mirístico e dos AGPIs linoleico e araquidônico quando comprado aos grupos dieta padrão. Observamos também aumento no percentual dos AGs oleico, araquidônico e alfa-linoleico no grupo OM quando comparado com o CTL, em ambos os modelos. A suplementação com óleo de macadâmia não promoveu incremento adicional dos AGMIs oleico e palmitoleico (mais abundantes no óleo de macadâmia) quando administrado em conjunto com a dieta de cafeteria. O perfil de ácidos graxos hepáticos nas amostras de fígado podem ser observadas com mais detalhes na tabela a seguir (Tabela 4).

Tabela 4 – Perfil de ácidos graxos em tecido hepático de camundongos CTL e tratados com dieta de cafeteria suplementados ou não com óleo de macadâmia durante 120 dias – Modelos 1 e 2.

	CTL	DC	OM	DOM
MODELO 1				
Mirístico 14:0	10,88±0,45	5,20±0,49*	8,81±0,57	5,25±0,72*.\$
Palmitico 16:0	22,24±0,33	19,33±0,54*	16,29±0,79#	20,00±0,42*.\$
Esteárico 18:0	7,32±0,23	6,38±0,23	10,75±0,43#	5,84±0,31*.\$
Palmitoleico 16:1	1,28±0,08	2,02±0,12	1,58±0,08	2,25±0,40 [§]
Oleico 18:1	15,17±0,40	44,82±1,38*	27,20±1,84#	45,06±1,71*.\$
Linoleico 18:2	24,39±0,82	10,22±0,31*	12,61±0,74	10,37±0,46*.\$
Araquidônico 20:4	17,83±0,61	11,91±0,92*	21,41±0,40#	10,93±0,88*.\$
Alfa-linolênico 18:3	0,48±0,08	0,01±0,01*	0,68±0,06	0,08±0,02*.\$
EPA 20:5	0,22±0,02	2,22±2,16	0,41±0,08	0,06±0,01
DHA 22:6	0,20±0,03	0,05±0,02	0,25±0,08	0,15±0,06
MODELO 2				
Mirístico 14:0	12,02±0,92	5,90±0,50*	8,45±1,02#	5,91±0,36 [§]
Palmitico 16:0	20,79±1,26	17,90±0,48	23,08±0,82	19,55±0,86
Esteárico 18:0	6,78±0,54	6,62±0,32	7,44±1,32	6,11±0,10
Palmitoleico 16:1	1,41±0,03	1,96±0,20*	1,75±0,17	1,27±0,04#
Oleico 18:1	16,24±1,23	44,37±1,03*	20,22±1,86	45,19±0,74*.\$
Linoleico 18:2	21,32±0,90	10,55±0,48*	25,48±0,86#	10,13±0,47*.\$
Araquidônico 20:4	20,83±1,00	12,44±0,89*	11,81±1,94#	11,67±0,33 [§]
Alfa-linolênico 18:3	0,22±0,03	0,07±0,03	0,49±0,08#	0,12±0,04*
EPA 20:5	0,25±0,03	0,10±0,24*	0,14±0,02	0,00±0,00*.\$
DHA 22:6	0,11±0,02	0,09±0,02	0,24±0,08	0,05±0,01*

(*): indica efeito da dieta de cafeteria, DC vs CTL ou DOM vs OM; (#): indica efeito do óleo de macadâmia, OM vs CTL ou DOM vs DC e (§): CTL vs DOM. Modelo 1: Grupos CTL e DC: n=6 e OM e DOM: n= 5. Modelo 2: Grupos CTL e DC: n=6, OM: n=4 e DOM: n= 5.

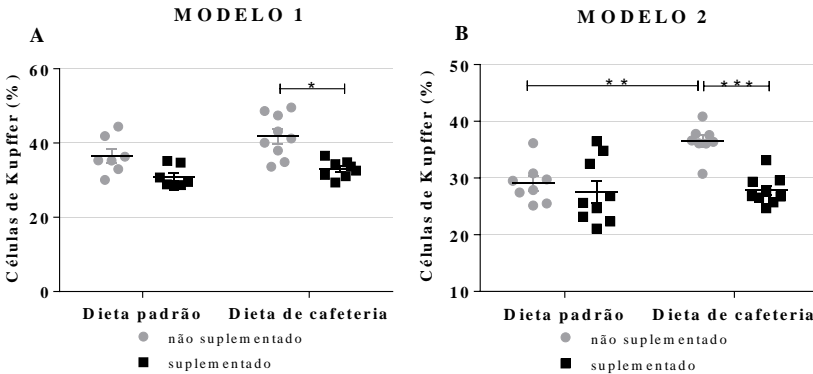
Como existe bastante literatura ligando a esteatose hepática ao aumento do tônus pró-inflamatório local e da diminuição da integridade dos hepatócitos destes animais, quantificamos a presença de células de Kupffer por análise histológica e analisamos a atividade plasmática das enzimas aspartato aminotransferase–AST e da alanina aminotransferase–ALT (indicadores indiretos de morte de hepatócitos).

5.5 O CONSUMO DE DIETA DE CAFETERIA E A SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE MACADÂMIA PROMOVERAM ALTERAÇÕES NOS MARCADORES DA FUNÇÃO HEPÁTICA, MAS NÃO ALTERARAM AS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS APÓS 120 DIAS DE INTERVENÇÃO EM AMBOS OS MODELOS EXPERIMENTAIS.

No modelo 1, podemos observar um aumento do número de células inflamatórias hepáticas no grupo DC e, em contraponto, os animais do grupo DOM apresentaram uma redução no número e células de Kupffer contadas quando comparado ao obtido nos animais do grupo DC (CTL: $36,6 \pm 1,9$; DC: $41,8 \pm 2,0$; OM: $30,9 \pm 1,1$; DOM: $33,0 \pm 0,8^{\#}$; efeito da dieta de cafeteria: $F= 5,42$; $p = 0,03$; efeito da suplementação com óleo de macadâmia: $F=21,6$; $p<0,001$ – Figura 15).

No modelo 2, observamos algo semelhante, pois houve um aumento das células de Kupffer provocada pelo consumo de dieta de cafeteria (CTL: $29,0 \pm 1,2$; DC: $36,5 \pm 1,0^*$; OM: $27,5 \pm 1,9$; DOM: $27,8 \pm 0,8^{\#}$; efeito da dieta de cafeteria: $F=8,51$; $p<0,01$; efeito da suplementação com óleo de macadâmia: $F=14,76$; $p<0,001$). No entanto, houve atenuação no conteúdo destas células nos animais que tiveram o consumo da dieta de cafeteria associado ao óleo de macadâmia (efeito da interação da dieta de cafeteria e da suplementação com óleo de macadâmia: $F=7,29$; $p=0,01$) (Figura 15).

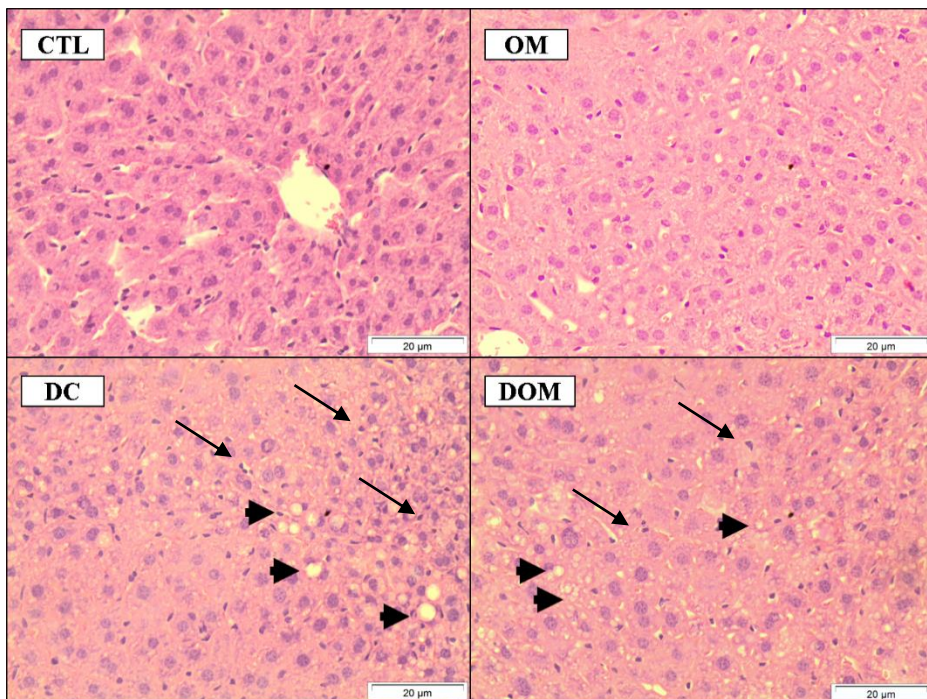
Figura 15 – Análise histológica das células de Kupffer em camundongos CTL e tratados com dieta de cafeteria suplementados ou não com óleo de macadâmia durante 120 dias - Modelos 1 e 2.



Os dados estão apresentados como média e EPM. Teste two-way ANOVA seguido de *post hoc* de Bonferroni. Figura A - Modelo 1: Grupos CTL e OM: n=7 e DC: n= 9 e DOM: n=8. Figura B – Modelo 2: Grupos CTL e DC: n=8, OM e DOM: n= 9. (*): p<0,05; (**): p<0,01; (***): p<0,001.

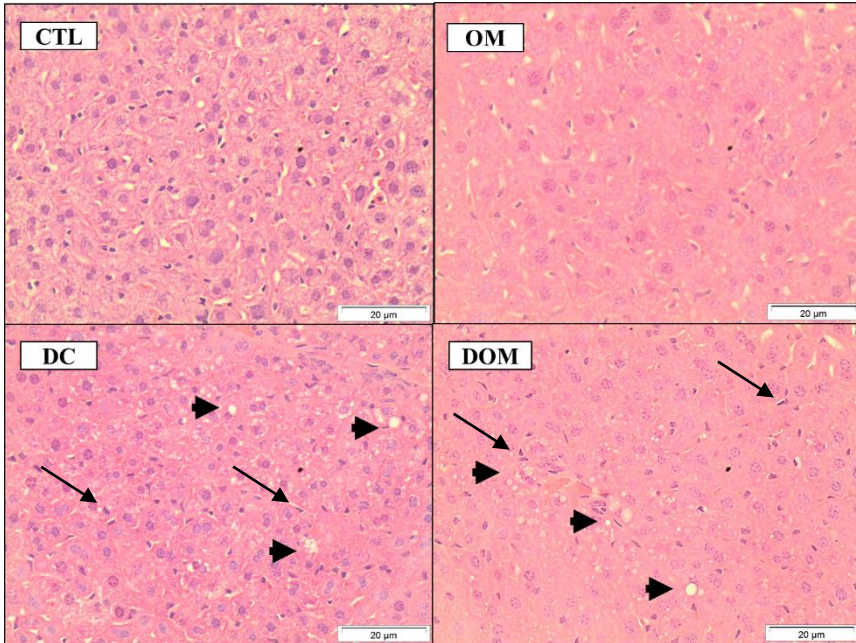
As imagens representativas do acúmulo de lipídeos hepáticos e do conteúdo de células de Kupffer no modelo 1 e modelo 2 estão apresentadas nas figuras 16 e 17, respectivamente.

Figura 16 – Imagens representativas da análise histológica do fígado com identificação do percentual de lipídeos hepáticos e células de Kupffer em camundongos CTL e tratados com dieta de cafeteria, suplementados ou não com óleo de macadâmia -Modelo1.



Imagens representativas dos grupos experimentais. As setas com traçado grosso indicam gotículas de gordura e as setas com traçado fino indicam células de Kupffer nos grupos DC e DOM. Grupos CTL e OM: n=7; DC e DOM: n=8.

Figura 17 - Imagens representativas da análise histológica do fígado com identificação do percentual de lipídeos hepáticos e células de Kupffer em camundongos CTL e tratados com dieta de cafeteria, suplementados ou não com óleo de macadâmia –Modelo2.



Imagens representativas dos grupos experimentais. As setas com traçado grosso indicam gotículas de gordura e as setas com traçado fino indicam células de Kupffer nos grupos DC e DOM. Grupos CTL e DC: n=8; OM e DOM: n=9.

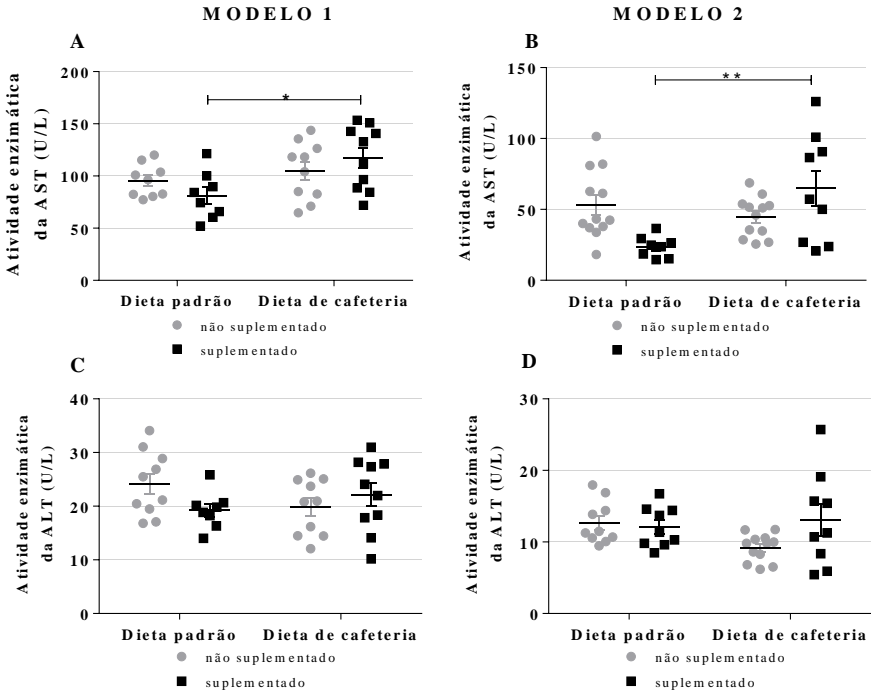
Diante disso, podemos observar nas imagens um acúmulo de lipídeos hepáticos em ambos os grupos que receberam dieta de cafeteria nos dois modelos experimentais (Figura 15 e 16). Entretanto, após as análises bioquímicas e histológicas do acúmulo de lipídeos hepáticos podemos observar que a composição da dieta de cafeteria influencia neste parâmetro, uma vez que no modelo 2 (maior percentual de açúcares simples) a suplementação com óleo de macadâmia aliada à dieta de cafeteria incrementa o acúmulo de lipídeos hepáticos, o que não foi observado no modelo 1. Além disso, em ambos os modelos podemos observar que a suplementação com óleo de macadâmia atenuou o

incremento do conteúdo de células de Kupffer em camundongos alimentados com dieta de cafeteria.

Ainda em relação aos efeitos do consumo de dieta de cafeteria e da suplementação com óleo de macadâmia sobre o fígado, avaliamos a atividade plasmática da AST (U/L) e da ALT (U/L).

Mesmo com o aumento de lipídeos hepáticos, tanto no grupo DC quanto no grupo DOM e um aumento de células de Kupffer no grupo DC, a atividade plasmática da enzima AST foi significativamente maior apenas no grupo DOM, em ambos os modelos experimentais (MODELO 1 - CTL: $95,48 \pm 5,26$; DC: $104,98 \pm 8,76$; OM: $81,05 \pm 8,03$; DOM: $117,41 \pm 9,60^*$; efeito da dieta de cafeteria: $F = 7,651$; $p = 0,0092$; MODELO 2 - CTL: $53,41 \pm 7,05$; DC: $44,65 \pm 4,08$; OM: $23,62 \pm 2,64$; DOM: $64,76 \pm 12,66^*$; efeito da dieta de cafeteria: $F = 4,66$, $p = 0,04$, efeito da interação da dieta de cafeteria e da suplementação com óleo de macadâmia: $F = 11,06$; $p < 0,01$). No entanto, no modelo 2 podemos observar que também houve interação dos fatores, o que levou ao incremento maior quando associada a ingestão de CAF e a suplementação com óleo de macadâmia (Figura 17). Além disso, em ambos os modelos experimentais a enzima hepática ALT permaneceu semelhante entre os grupos após 120 dias de intervenção (MODELO 1 - CTL: $24,14 \pm 1,90$; DC: $19,88 \pm 1,64$; OM: $19,24 \pm 1,22$; DOM: $22,10 \pm 2,16$; MODELO 2 - CTL: $12,66 \pm 0,94$; DC: $9,20 \pm 0,55$; OM: $12,11 \pm 0,94$; DOM: $13,07 \pm 2,20$).

Figura 18 - Atividade enzimática da AST e ALT plasmática de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 120 dias – Modelos 1 e 2.



Os dados estão apresentados como média e EPM. Teste two-way ANOVA seguido de *post hoc* de Bonferroni. Figura A: Grupos CTL: n=9; OM: n=8 e DC e DOM: n= 10 e DOM: n=8. Figura B: Grupos CTL e DC: n=12, OM: n=8 e DOM: n= 9. Figura C: Grupos CTL, DC e DOM: n=10 e OM: n= 8. Figura D: Grupos CTL: n=10, DC: n=12, OM e DOM: n= 9. (*): p<0,05; (**): p<0,01.

Em relação às citocinas (IL12, IL10, IL6 e TNF), nossos dados mostram que não houve efeito da dieta de cafeteria, nem da suplementação com óleo de macadâmia em ambos os modelos utilizados. Podemos observar nos dados apresentados na tabela a seguir:

Tabela 5– Concentração de citocinas (pg/mg de proteína total) em tecido hepático de camundongos CTL e tratados com dieta de cafeteria suplementados ou não com óleo de macadâmia durante 120 dias – Modelos 1 e 2.

	CTL	DC	OM	DOM
MODELO 1				
IL12	0,091±0,012	0,091±0,018	0,244±0,113	0,212±0,025
TNF	0,057±0,016	0,065±0,010	0,153±0,062	0,117±0,028
IL6	0,017±0,000	0,015±0,003	0,051±0,000	0,021±0,009
IL10	0,038±0,000	0,043±0,010	0,110±0,065	0,104±0,053
MODELO 2				
IL12	0,032±0,015	0,139±0,024	0,131±0,018	0,238±0,076
TNF	0,024±0,008	0,104±0,016	0,091±0,044	0,124±0,038
IL6	0,006±0,002	0,014±0,004	0,013±0,021	0,021±0,009
IL10	ND	0,033±0,003	0,044±0,019	0,109±0,042

Os dados estão apresentados como média e EPM. Teste two-way ANOVA seguido de *post hoc* de Bonferroni. MODELO 1: “n” variando de 1 – 5; MODELO 2: n” variando de 2 – 5; (ND: não detectado)

5.6 CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DE DIETA DE CAFETERIA APRESENTARAM AUMENTO DA ADIPOSIDADE VISCERAL E DIMINUIÇÃO DA MASSA DO FÍGADO APÓS 120 DIAS DE INTERVENÇÃO, INFLUENCIADO OU NÃO PELA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE MACADÂMIA.

Ao final dos 120 dias de intervenção, os animais que receberam dieta de cafeteria apresentaram um aumento significativo no índice de adiposidade visceral em ambos os modelos experimentais. Além disso, após 120 dias de intervenção os animais dos grupos DC e DOM, em ambos os modelos, apresentaram uma redução significativa na massa do fígado quando comparado com seus respectivos controles. No modelo 1, nenhum destes tecidos foram alterados pela suplementação com óleo de macadâmia durante 120 dias. No entanto, no Modelo 2 observamos o efeito da interação do consumo da dieta de cafeteria e da suplementação com óleo de macadâmia, uma vez que os animais que consumiram DC e OM apresentaram um incremento ainda maior no índice de adiposidade visceral do que foi observado grupo DC. Ainda neste modelo observamos que a suplementação do óleo de macadâmia aliada ao consumo da dieta de cafeteria promoveu uma redução ainda mais acentuada da massa do fígado no grupo DOM (Tabela 6).

Tabela 6- Índice de adiposidade (%) e fígado (mg/g de m.c.) de camundongos CTL e tratados com dieta de cafeteria suplementados ou não com óleo de macadâmia durante 120 dias – Modelos 1 e 2.

	CTL	DC	OM	DOM	F	P
MODELO 1						
Índice de adiposidade	1,69±0,1	3,21±0,3*	1,71±0,1	3,62±0,4*	34,2 ¹	<0,0001
Fígado	49,74±1,4	40,29±1,8*	46,78±1,1	38,88±1,6*	31,8 ¹	<0,0001
MODELO 2						
Índice de adiposidade	2,01±0,2	2,43±0,1	1,64±0,1	3,31±0,3*#	32,1 ¹ 11,3 ³	<0,0001 ¹ =0,002 ³
Fígado	45,30±0,9	40,61±0,8*	42,45±1,0	37,93±1,4*	20,9 ¹ 7,5 ²	<0,0001 ¹ =0,009 ²

Os dados estão apresentados como média e EPM. Teste two-way ANOVA seguido de *post hoc* de Bonferroni. ¹ efeito da dieta de cafeteria, ²efeito da suplementação com óleo de macadâmia, ³efeito da interação dos fatores. MODELO 1: Grupos CTL, DC e DOM: n=10 e grupo OM: n=8; MODELO 2: Grupos CTL, DC: n=12; OM: n=10 e DOM: n=9, (*): indica efeito da dieta de cafeteria, DC vs CTL ou DOM vs OM, (#): indica efeito do óleo de macadâmia, OM vs CTL ou DOM vs DC.

A partir dos dados obtidos no protocolo experimental – Modelo 1, verificamos que o consumo de dieta de cafeteria (47% de carboidratos, sendo destes 21% de açúcar refinado simples) alterou a glicemia de jejum, a tolerância à glicose e a adiposidade tecidual sem efeito da suplementação com óleo de macadâmia.

O perfil lipídico plasmático foi alterado tanto pelo consumo da dieta de cafeteria quanto pela suplementação com óleo de macadâmia. Além disso, os animais alimentados com dieta de cafeteria apresentaram um aumento no acúmulo de lipídeos hepáticos, representado tanto pelo aumento no conteúdo total de TAG e CT, como pela presença significativa de micro e macrogotículas de gordura. Além disso, a atividade plasmática da enzima AST foi significativamente maior por efeito do consumo de dieta de cafeteria. Em contraponto, os animais do grupo DOM apresentaram uma diminuição significativa no percentual de células de Kupffer, parâmetro este aumentado significativamente no grupo DC.

Já os dados do modelo experimental 2 (dieta de cafeteria - 54% de carboidratos, sendo destes 41% de açúcar refinado simples) nos mostrou que a dieta de cafeteria também promoveu alterações na glicemia de jejum, na tolerância à glicose e no acúmulo de gordura visceral. Além de promover um aumento no acúmulo de lipídeos hepáticos, da atividade enzimática da AST e uma redução no conteúdo de células de Kupffer. No

entanto, observamos que a combinação da dieta de cafeteria com o óleo de macadâmia (grupo DOM) promoveu alterações, como por exemplo, da glicemia e da adiposidade tecidual, não observadas no grupo DC. Ainda em relação ao efeito da suplementação com óleo de macadâmia, quando associada à dieta de cafeteria também promoveu maior incremento no acúmulo de lipídeos hepáticos em relação ao grupo DC.

A tabela 7 apresenta o resumo dos dados obtidos com os dois modelos experimentais durante 120 dias de intervenção. A mesma foi construída a partir da interpretação dos dados apresentados anteriormente, na qual nós podemos observar os efeitos promovidos separadamente pela dieta de cafeteria, pelo óleo de macadâmia e pela combinação dos dois. Foi considerado efeito da DC quando observou diferença significativa entre os grupos que receberam a dieta de cafeteria e seus respectivos controles (DC vs CTL e DOM vs OM). Para avaliar o efeito do OM observou-se as diferenças entre os grupos OM vs CTL e DOM vs DC e para verificar o efeito combinado da dieta de cafeteria e do óleo de macadâmia observou-se a diferença concomitante entre o grupo DOM e os grupos OM e DC.

Tabela 7- Resumo dos efeitos do consumo da dieta de cafeteria e da suplementação com óleo de macadâmia nos Modelos experimentais 1 e 2.

Parâmetros	Modelo 1			Modelo 2		
	120 dias (21% de açúcar refinado simples)			120 dias (41% de açúcar refinado simples)		
	Efeito da DC	Efeito do OM	Efeito combinado (DC+OM)	Efeito da DC	Efeito do OM	Efeito combinado (DC+OM)
Consumo de ração	↓	-	-	↓	-	-
Massa corporal	-	-	-	-	-	-
Adiposidade	↑	-	-	↑	-	↑
Glicemia de jejum	↑	-	-	↑	↑	-
Tolerância à glicose	↓	-	-	↓	↓	-
TAG plasmático	↓	-	-	↓	-	↑
CT plasmático	↑	-	-	↑	-	-
Esteatose hepática	↑	-	-	↑	↑	-
Conteúdo de células de Kupffer	↑	↓	-	↑	-	↓
Citocinas	-	-	-	-	-	-
Atividade plasmática da AST	↑	-	-	↑	-	↑

Efeito da DC (DC vs CTL e DOM vs OM); efeito do OM (OM vs CTL e DOM vs DC); efeito combinado da dieta de cafeteria e do óleo de macadâmia (DOM vs OM e DC). (↑): aumentou, (↓): diminuiu, (-): não alterou.

Diante disso, nosso estudo se detém em discutir e entender melhor o impacto da diferença na composição da dieta de cafeteria e o efeito da suplementação com óleo de macadâmia sobre os parâmetros glicêmicos e lipídicos avaliados.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos que independente do consumo total de ração e da massa corporal, os animais alimentados com dieta de cafeteria apresentaram alterações glicêmicas e lipídicas, em ambos os modelos experimentais. Demonstramos ainda, que a mudança na composição da dieta de cafeteria, caracterizada pelo acréscimo de açúcar refinado simples (Modelo 1 - 21% de açúcar refinado simples e Modelo 2 - 41% de açúcar refinado simples) promoveu efeitos distintos nos parâmetros metabólicos avaliados quando a mesma foi associada ou não à suplementação com óleo de macadâmia.

Em ambos os modelos a intervenção com dieta de cafeteria não promoveu alteração na massa corporal. Este fato pode estar relacionado à diferença no percentual de proteínas e micronutrientes das dietas ofertadas, uma vez que as dietas de cafeteria (Modelo 1 e 2) apresentavam um percentual menor de proteínas e possivelmente de vitaminas e minerais em comparação à dieta padrão. Um estudo recente realizado com ratos Wistar, desenvolveu uma dieta baseada na dieta ocidental humana – WD (42,5% de kcal sendo derivada de lipídeos, sendo rica em carboidratos simples, sal e reduzida em fibras) e a compararam com a dieta cafeteria - CAF(contendo: queijo, bolo, salame, biscoito recheado, biscoito folheado, bolachas e biscoitos) e dieta rica em gordura - HFD (60% de lipídeos). Nesse estudo, os autores mostraram que a dieta WD e HFD possuem a mesma composição de proteínas e micronutrientes que a dieta controle, não podendo assim associar as alterações dessas dietas obesogênicas ao conteúdo de micronutrientes e de proteínas. No entanto, a dieta CAF têm em sua composição alimentos industrializados e altamente processados, contendo baixo conteúdo de vitaminas e minerais, além de um menor percentual de proteínas em comparação à dieta padrão, WD e HFD. Este estudo mostrou que os animais alimentados com CAF não apresentaram um aumento da massa corporal quando comparado com os outros grupos, assim como nós também observamos em nosso estudo. Isto pode ser reflexo da redução de micronutrientes e de proteínas presentes na CAF (BORTOLIN et al., 2018). Um outro parâmetro que pode estar associado a não alteração da massa corporal entre os animais alimentados com dieta de cafeteria e aqueles alimentados com dieta padrão, é o ambiente termoneutro, relatado em estudos que mostram que existe uma forte relação negativa entre a temperatura ambiental e a massa corporal, sugerindo ainda, que a variação da temperatura ideal é entre 28 – 30°C. (ENERBÄCK et al., 1997; LIU et al., 2003; SPEAKMAN; KEIJER, 2012). Como os animais utilizados neste estudo foram mantidos

em temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, temperatura padrão e sugerida pelas atuais legislações brasileiras (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002), a energia despendida pelos animais para manter a temperatura corporal pode ter influenciado (reduzido) o ganho de massa corporal e talvez diminuído a amplitude de outras modificações metabólicas (SPEAKMAN; KEIJER, 2012).

Apesar de não promover aumento adicional na massa corporal, nosso estudo mostrou um aumento na adiposidade causada pela dieta de cafeteria, em ambos os modelos experimentais. No modelo 2, em particular a interação entre o consumo de dieta de cafeteria e a suplementação com óleo de macadâmia promoveu um incremento adicional na adiposidade. Além disso, alterações lipídicas (aumento nas concentrações de CT) e glicêmicas (aumento da glicemia de jejum) foram provocadas pela dieta de cafeteria em ambos os modelos. Este efeito da dieta de cafeteria sobre alterações nos parâmetros do metabolismo lipídico e glicêmico pode ser observado em estudos anteriores (SAMPEY et al., 2011; HIGA et al., 2014; PARAFATI et al., 2015). Assim como o aumento na adiposidade corporal, no Modelo 2, estes parâmetros foram alterados também pela suplementação com óleo de macadâmia, uma vez que o aumento da glicemia de jejum também foi incrementada por efeito do óleo. No entanto, as informações na literatura referentes a suplementação com óleo de macadâmia em modelos experimentais de alterações metabólicas, ainda são escassas. Alguns são os fatores que podem estar associados à estes efeitos, como, aumento na disponibilidade de nutrientes (combinação do incremento de açúcares simples + óleo de macadâmia), acarretando, por exemplo, na ativação de vias lipogênicas (DE MELO et al., 2018) e também um aumento da atividade simpática (FIORINO et al., 2016; RAFACHO et al., 2013). Assim, ratifica-se a necessidade de investigarmos e entendermos melhor os efeitos da suplementação com óleo de macadâmia frente às dietas de cafeteria com composições distintas.

Corroborando com outros estudos, nossos dados mostram que o consumo de dieta de cafeteria promoveu acúmulo de lipídeos hepáticos (SAMPEY et al., 2011; SUGATANI et al., 2008; YANG et al., 2012; DISSARD et al., 2013; HIGA et al., 2014). Na obesidade, os principais mecanismos que conduzem ao acúmulo de TAG hepático são o aumento da liberação de AGLs pelos depósitos adiposos periféricos ao fígado e a síntese *de novo* de AGs e TAG no próprio fígado. A capacidade de eliminação de lipídeos hepáticos por meio da beta oxidação mitocondrial e da exportação de lipoproteínas parece relativamente intacta (ANSTEE; GOLDIN, 2006; JOU; CHOI; DIEHL, 2008). É importante salientar que

os triglicerídeos parecem não ser hepatotóxicos. Pelo contrário, são biomarcadores de exposição hepática aumentada aos AGLs (JOU; CHOI; DIEHL, 2008). Estudos *in vivo* e *in vitro* indicaram que o acúmulo de TAG hepático pode não ser nocivo, pois pode representar um mecanismo de proteção contra a lesão hepática induzida por AGLs armazenando-os na forma de TAG (LISTENBERGER et al., 2003; YAMAGUCHI et al., 2007). Contudo, o acúmulo de intermediários lipídicos lipotóxicos, incluindo DAG, ceramidas e acilcarnitinas de cadeia longa têm sido associados tanto com a resistência insulínica hepática quanto com o acúmulo de TAG (KOVES et al., 2008; RECTOR et al., 2010). Estes são considerados produtos do metabolismo mitocondrial oxidativo comprometido/incompleto e podem prejudicar a sinalização da insulina e mediar a inflamação dos hepatócitos (ERION; SHULMAN, 2010; FUCHO et al., 2016; SUMMERS, 2006).

Em nosso estudo, o consumo aumentado de açúcares simples, representado pela adição de sacarose (glicose + frutose) à dieta de cafeteria no Modelo 2, não influenciou o acúmulo de lipídeos hepáticos. Fato que é evidente após 120 dias em ambos os Modelos, representado pelo aumento de TAG e CT hepático e pela presença de micro e macrogotículas de gordura. Este aumento da esteatose hepática promovida pelo consumo de dietas com excessivo percentual de carboidratos simples foi relatado e discutido em uma revisão, na qual os autores concluem que estes açúcares simples tem papel importante na indução de esteatose hepática, por estimularem a lipogênese de novo e bloquearem a β -oxidação dos ácidos graxos. Além disso, concluíram que os efeitos pró-oxidativos e pró-inflamatórios do ácido úrico aumentam a permeabilidade do intestino e endotoxemia que exacerbam o processo lipogênico no fígado, que, associado à disfunção mitocondrial, resultam em doença hepática não alcoólica (JENSEN et al., 2018). No entanto, como apresentamos, o incremento de açúcares simples (sacarose) no Modelo 2 não promoveu um aumento adicional no acúmulo de lipídeos hepáticos. Possivelmente, o acúmulo maior de lipídeos hepáticos relatado na literatura pode estar associado ao maior percentual de frutose (geralmente utilizada em estudos com este perfil) e não ao aumento da ingestão sacarose. No estudo de Kasim-Karakas et al. (1996), foi demonstrado que apenas a dieta rica em frutose aumentou o conteúdo de triglicerídeos no fígado de hamsters sírios-dourados em comparação com dietas ricas em sacarose ou glicose. Além disso, a revisão realizada por Wong et al. (2016) demonstrou que a frutose, sendo o melhor substrato para a síntese de ácidos graxos no fígado, parece ser mais eficiente do que uma quantidade equivalente de sacarose na indução da esteatose hepática

porque a frutose existe como uma molécula livre, enquanto a sacarose contém apenas 50% de frutose e 50% de glicose. Em nosso estudo o aumento da sacarose (o dobro no Modelo 2) não promoveu aumento adicional de lipídeos no fígado, o que nos sugere, talvez, que seu efeito sobre o aumento de lipídeos hepáticos já foi atingido pela quantidade presente do modelo 1. Aparentemente, a quantidade de lipídeos da dieta parece ser o fator determinante para aumento dos lipídeos hepáticos nestes 2 modelos. A partir disso, podemos sugerir para estudos futuros uma mudança na composição da dieta de cafeteria com o acréscimo apenas de mais frutose na perspectiva de um aumento adicional no acúmulo de lipídeos hepáticos quando comparada a dieta com acréscimo de sacarose, como a utilizada em nosso estudo, ou até mesmo aumento no percentual de lipídeos.

Estudos experimentais com dieta de cafeteria, os roedores podem apresentar hiperfagia (GASPARIN et al., 2018; HEYNE et al., 2009; MORRIS et al., 2008), mas também é comum observar não alteração no consumo de ração e até mesmo reduzi-lo (GAC et al., 2015; HEINONEN et al., 2014). Algo como observado em nosso estudo. O consumo de ração foi menor nos dois modelos, no Modelo 1 o consumo de ração apresentou algumas flutuações ao longo da intervenção, predominando um consumo reduzido nos grupos que receberam dieta de cafeteria, mesmo assim, acarretou em um consumo calórico semelhante ou superior comparado aos animais que consumiram dieta padrão. Já no Modelo 2, este aumento no consumo calórico foi ainda mais evidente em virtude de uma menor variação no consumo de ração, que também estava reduzido nos animais dos grupos DC e DOM. O aumento no consumo calórico, deve-se à alta densidade calórica presente na dieta de cafeteria, em ambos os modelos, uma vez que o consumo de gorduras foi significativamente maior nos grupos alimentados com dieta de cafeteria. Assim como apresentado em nosso resultados, um estudo com C57BL/6 alimentados com HFD (45% de lipídeos) por 8 semanas, mostra que também não houve aumento no consumo da ração, fato este que pode estar relacionado ao alto valor energético provenientes dos lipídeos da dieta (MONTGOMERY et al., 2013). O mesmo foi observado em um estudo com camundongos C57BL/6 alimentados com dieta rica em gordura (45% kcal) (HFD) e dieta ocidental calórica (WD) rica em gordura, sacarose e colesterol por 8 semanas. Os autores mostraram que o consumo de ração foi semelhante entre os grupos e que a expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos foi relevante para isto, pois o AgRP e NPY (orexígenos) foram suprimidos e a POMC e CRH (anorexígenos) tenderam a ser suprarreguladas, provavelmente protegendo os animais do aumento da ingestão calórica

(HEINONEN et al., 2014). Já um estudo realizado com camundongos Balb/c alimentados com dieta de cafeteria por 8 semanas, mostrou uma redução no consumo de ração, porém apresentou um aumento no consumo de açúcares simples e lipídeos, devido a composição da dieta, assim como apresentado em nossos dados referentes ao consumo de macronutrientes (GAC et al., 2015).

Estudos que utilizam o modelo de dieta de cafeteria para indução da obesidade mostram diversas alterações no metabolismo glicêmico e lipídico. Em nosso estudo, demonstramos que estas alterações, em partes, dependem da composição desta dieta e sua combinação com a suplementação com óleo de macadâmia. Nos modelos 1 e 2 observamos que a dieta de cafeteria promoveu uma redução da tolerância à glicose e um aumento na glicemia de jejum após 120 dias de intervenção. Em contrapartida, um estudo com protocolo experimental semelhante ao nosso, realizado com camundongos Balb/c alimentados com dieta de cafeteria por 15 semanas mostrou uma redução na tolerância à glicose, sem alteração na glicemia de jejum. Como podemos observar, as alterações glicêmicas podem variar dependendo de diversos fatores, como, espécie, tempo de intervenção, composição da dieta, dentre outros.

Higa et al. (2014) realizou um estudo com camundongos C57BL/6 alimentados com dieta de cafeteria por 12 semanas. Estes apresentaram um aumento da glicemia de jejum a partir da terceira semana de intervenção. Além disso, estes animais apresentaram intolerância à glicose a partir da sexta semana de intervenção. No entanto, o mesmo não foi exatamente o observado em nosso estudo, apesar de adotarmos no Modelo 1 o mesmo modelo experimental. Em nosso estudo, existiu aumento da glicemia de jejum no Modelo 1 a partir dos 60 dias de intervenção, mas no Modelo 2 este aumento só foi observado apenas aos 120 dias de intervenção. Já a redução da tolerância à glicose foi observada apenas aos 90 e 120 dias do protocolo experimental, em ambos os modelos. Estas alterações no perfil glicêmico, como o aumento na glicemia de jejum e uma redução da tolerância à glicose foram avaliados na revisão realizada por Wong et al. (2016). Nesta revisão, foi destacado que a diferença na composição da dieta, quer seja em relação ao percentual de carboidratos simples (frutose, sacarose), de lipídeos, ou a combinação dos mesmos podem promover ou não estas alterações glicêmicas. Estas modificações parecem estar presentes, em sua maioria, em estudos com aumento no percentual de carboidratos simples, apesar dos outros estudos promoverem pelo menos alguma outra alteração metabólica, como obesidade, hipertensão ou alteração no perfil lipídico plasmático.

Ainda sobre as alterações no perfil glicêmico, nosso estudo mostra que quando associada com a suplementação com óleo de macadâmia, a dieta de cafeteria com maior percentual de açúcares simples (Modelo 2) promove um incremento adicional às concentrações de glicose sanguínea de jejum. Este fato poderia estar associado a menor responsividade à ação da insulina em tecidos periféricos quando têm-se excesso de nutrientes circulantes (carboidratos simples + lipídeos) (CASTELL-AUVÍ et al., 2012; HIGA et al., 2014). No entanto, nosso estudo mostra que as concentrações plasmáticas de insulina de jejum foram semelhantes entre os grupos em ambos os modelos, assim como a sua resposta frente a um desafio (teste de tolerância à insulina). Desta forma, algum outro fator ou mecanismo, não apresentado aqui, deve estar envolvido neste aumento da glicemia de jejum. Na tentativa de entender melhor este achado, realizamos um teste de tolerância ao glucagon (50 ug/kg m.c.) no Modelo 2. No entanto, verificamos que este desafio frente ao glucagon também mostrou uma resposta semelhante entre os grupos (dados não apresentados).

Alguns estudos nos mostram que também é característico do modelo de obesidade induzido por dieta a presença de resistência à insulina (CASTELL-AUVÍ et al., 2012; SAMPEY et al., 2011). Em nosso estudo, o teste de tolerância à insulina nos mostrou que em ambos os modelos a dieta de cafeteria promoveu um maior decaimento da glicemia. Este teste nos permite avaliar principalmente a capacidade de resposta à insulina do músculo esquelético, representada pela captação e utilização de glicose durante o teste. Entretanto, estudos têm mostrado que altas doses de insulina ($\sim 14 - 20 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) utilizadas neste teste, podem mascarar a sensibilidade à insulina, sendo assim, eficaz para avaliar a capacidade de resposta à insulina (responsividade à insulina) (KOWALSKI; BRUCE, 2014). Com isso, em nosso estudo devido a dose de insulina utilizada ($0,75 \text{ UI/kg m.c.}$) este teste nos permite avaliar a responsividade à insulina. Além disso, um outro parâmetro que também influencia na interpretação destes dados, é a composição corporal dos animais. Normalizar a dose de insulina pela massa magra corporal, quando possível, é um dos meios mais precisos para determinar a dose de insulina a ser administrada, uma vez que em modelos experimentais de obesidade ocorre um aumento significativo da massa gorda o que acarreta em uma maior dose de insulina para estes animais em comparação aos não obesos (AYALA et al., 2010). Este fato indica que em nosso estudo a dose de insulina administrada deveria ser menor ou normalizada pela massa magra dos animais para podermos avaliar com mais precisão a resposta destes tecidos à ação da insulina. Esta colocação se baseia no fato

de que nossos dados mostram que os animais alimentados com dieta de cafeteria apresentaram um aumento significativo da massa adiposa e uma redução significativa da massa visceral (redução da massa do fígado, intestino e estômago, dados não apresentados). No entanto, é importante destacar que o acesso a métodos para avaliação da massa magra de roedores in vivo é relativamente restrito devido ao alto custo destes equipamentos. Em particular ao nosso grupo, não possuímos acesso a equipamentos capazes desta avaliação localmente ou com colaboradores. Desta forma, se a sensibilidade à insulina está ou não alterada nos modelos utilizados ainda é uma questão a ser respondida por estudos adicionais.

Apesar de não termos o dado de sensibilidade, outro estudo em curso em nosso laboratório que utiliza o mesmo modelo experimental avaliou as concentrações plasmáticas de insulina (dados não apresentados) realizadas durante o ITT. Neste experimento foi demonstrado que existe um acúmulo maior de insulina no sangue dos animais DC (modelo 1), mesmo após 30 min da injeção contendo insulina. Isto sugere que mesmo sem alteração nas concentrações de insulina plasmática de jejum após 120 dias de intervenção, a degradação da insulina nos animais dos grupos que receberam dieta de cafeteria está deficiente frente ao desafio. Este dado sugere que o decaimento mais acentuado da glicemia nos ITTs do presente estudo podem ser reflexo de menor *clearance* da insulina injetada. Isto leva, potencialmente, a presença de maiores concentrações médias do hormônio durante o teste e maior redução da glicemia. A depuração de insulina tem um papel importante no controle glicêmico. Nos hepatócitos, a degradação da insulina é mediada pela enzima de degradação da insulina (IDE) que desempenha um papel contraditório na homeostase glicêmica. Um estudo realizado com camundongos C57BL/6 alimentados com dieta rica em gordura (58% de lipídeos) durante seis meses, sugere que a atividade de IDE foi aumentada pela dieta rica em gordura no fígado desses camundongos (WEI et al., 2014). Já no estudo de Brandimarti et al. (2013), realizado com camundongas Swiss alimentadas por 8 semanas com dieta de cafeteria (43,1% de carboidratos; 12,1% de proteínas, e 46,9% de lipídeos) mostrou uma redução na depuração da insulina e nas concentrações de IDE no fígado e no musculo esquelético. Estes estudos sugerem um efeito oposto na atividade da IDE, um aumento frente à dieta rica em gordura e uma redução frente à dieta rica em açúcares simples, fato este, que pode estar acontecendo em nosso estudo. Esta possível redução na ação da IDE (por redução de conteúdo, atividade ou ambos), fato pode ser reflexo da menor massa visceral (fígado, intestino,

estômago) destes animais. Como o fígado é um dos principais órgãos responsáveis pela degradação da insulina, devemos levar em consideração que o mesmo está significativamente menor nos grupos que receberam dieta de cafeteria, em ambos os modelos. No entanto, os estudos realizados nesta perspectiva de entender as modificações que acontecem com o conteúdo e atividade da IDE em modelos experimentais de doenças metabólicas induzidos por dietas ainda não são conclusivos.

Sabe-se que quando a ingestão de carboidratos excede o consumo diário preconizado, as concentrações de glicose no sangue permanecem altas e a liberação de insulina pelo pâncreas é aumentada para estimular a absorção de glicose pelas células. Nesse caso, a glicose é utilizada no processo de glicólise, é convertida em glicogênio no fígado e nos músculos no processo de glicogênese, e a insulina age no tecido adiposo estimulando a síntese de lipídeos e inibindo a liberação dos ácidos graxos já disponíveis (CHEN, 2012). O consumo excessivo e prolongado de carboidratos causa aumento nas concentrações de glicose sanguínea, como podemos observar em nosso estudo, porém o aumento proporcional nas concentrações plasmáticas de insulina em jejum não foi observado. Além da ação da insulina, outros fatores importantes podem contribuir para o aumento da glicemia de jejum, como uma maior atividade simpática (FIORINO et al., 2016; RAFACHO et al., 2013) e um aumento na ação de outros hormônios, como o cortisol e glucagon, envolvidos na regulação do metabolismo (NIRMALAN; NIRMALAN, 2017). Desta forma, estes outros mecanismos são possíveis alternativas de investigação para justificar a não alteração da insulinemia e o aumento da glicemia de jejum nos animais alimentados com dieta de cafeteria em nosso estudo.

Os animais que receberam dieta de cafeteria apresentaram um aumento de adiposidade. Ainda, em ambos os modelos a dieta de cafeteria promoveu alteração nos lipídeos plasmáticos. As concentrações plasmáticas de TAG foram menores nos animais alimentados com dieta de cafeteria, em ambos os modelos, no entanto, no Modelo 2 esta redução foi revertida pela interação desta dieta com a suplementação com óleo de macadâmia. Como apresentado na literatura, as concentrações plasmáticas de TAG são determinadas pelos lipídeos provenientes da dieta, pelos processos de lipogênese e lipogênese “*de novo*” e pela depuração de TAG hepático (JOU; CHOI; DIEHL, 2008; KERSTEN, 2001). O estudo realizado por Higa et al. (2014), comparando dietas que induzem obesidade (HFD e CAF) mostrou que as concentrações de triglicerídeos foram aumentadas independente da dieta que os animais que consumiram, resultado este não observado em nosso estudo. É importante destacar que este estudo foi a fonte inicial de informações

sobre o modelo de dieta de cafeteria que utilizamos. Ainda contrapondo nossos achados, o estudo de Heinonen et al. (2014) mostrou que o consumo de dieta ocidental (WD) rica em gordura, sacarose e colesterol por 8 semanas, não alterou as concentrações de triglicérides, mas promoveu um aumento nas concentrações plasmáticas de colesterol total, assim como observado em nosso estudo. Nossos resultados mostram uma redução nas concentrações plasmáticas de TAG e um aumento no conteúdo de TAG hepático nos grupos alimentados com dieta de cafeteria. Este dado pode estar relacionado com o efeito protetor do fígado ao armazenar TAG para impedir o seu aumento na circulação (YKI-JÄRVINEN, 2014). Esta redução nas concentrações plasmáticas de TAG provocada pela dieta de cafeteria em nosso estudo também esteve presente em outros estudos, que relacionam esta redução à diminuição da produção ou exportação de TAG hepático (ONO-MOORE et al., 2016; PETIT et al., 2007; WILLIAMS et al., 2014).

Além disso, nossos dados mostram que no fígado houve um aumento do percentual de AGMI oleico nos grupos que receberam dieta de cafeteria e também naqueles que receberam óleo de macadâmia, isto é reflexo do maior percentual deste ácido graxo na composição da dieta de cafeteria e do óleo de macadâmia. O AGMI oleico pode estar contribuindo para esta redução das concentrações plasmáticas de TAG, uma vez que o mesmo pode contribuir para o acúmulo de TAG no tecido adiposo, para os processos de lipogênese e adipogênese (YANTING et al., 2018).

As concentrações plasmáticas de CT apresentaram-se aumentadas em ambos os modelos. No entanto, apenas no Modelo 1 de dieta de cafeteria este aumento foi significativo. Estes resultados, também foram observado em outros estudos (HIGA et al., 2014; JURADO-RUIZ et al., 2016; LEPORE et al., 2015). Contudo, a suplementação com óleo de macadâmia não influenciou este parâmetro. Apesar disto, contrapondo nossos dados, um estudo realizado com adultos com dislipidemia foram suplementados com 220,5 mg de ácido cis-palmitoleico (52% da composição do óleo) durante 30 dias e apresentaram uma redução significativa nas concentrações de colesterol plasmático (BERNSTEIN et al., 2014). Este não efeito da suplementação com óleo de macadâmia em nosso estudo quando comparado com o estudo citado acima pode ser devido a menor ingestão de AGMI palmitoleico, que mesmo estando presente em torno de 22% no óleo de macadâmia (Quadro 3) não acarretou em um aumento esperado no tecido hepático.

Como apresentado anteriormente, nosso estudo mostrou um acúmulo de lipídeos hepáticos induzidos por dieta de cafeteria, tanto pelo

aumento no conteúdo de TAG hepático, quanto pela análise histológica, com a presença de micro e macrogotículas de gordura. No entanto, a massa do fígado foi reduzida nos animais alimentados com dieta de cafeteria, mesmo apresentando um aumento no conteúdo de lipídeos hepáticos. Este resultado, contrapõe os achados na literatura, pois estudos que utilizam modelos experimentais que induzem acúmulo de lipídeos hepáticos, apresentam um aumento na massa do fígado (LEPORE et al., 2015; SUGATANI et al., 2008). Este acúmulo de lipídeos em tecidos não adiposos está intimamente relacionado com o desenvolvimento de intolerância à glicose e redução da responsividade à insulina. Isto, em partes, deve-se à ativação de células inflamatórias no fígado. Estas células podem ser polarizadas para um fenótipo pró-inflamatório, contribuindo para a resistência à insulina (BAFFY, 2009; LANTHIER et al., 2010). Em nosso estudo, demonstramos que o consumo de dieta de cafeteria promoveu, além do acúmulo de lipídeos hepáticos, um aumento no percentual das células de Kupffer e um aumento nas concentrações plasmáticas de um marcador de injúria hepática, a transaminase - AST, em ambos os modelos experimentais, corroborando com outros estudos (KIM et al., 2014; LIANG et al., 2014; MACHADO et al., 2015; SAMPEY et al., 2011).

Em contrapartida, um estudo realizado com ratos alimentados com HFD, mostrou que o acúmulo de TAG no fígado não causa lesões nos hepatócitos. Este estudo mostra que os AGLs ou os seus metabólitos é que são responsáveis pela lesão hepática por meio do aumento do estresse oxidativo. Sugerem ainda, que estudos futuros devem priorizar descobertas sobre formas de reduzir eficazmente a lipotoxicidade de AGLs em vez de inibir a deposição de TAG hepático (LIU et al., 2016). Um outro estudo realizado com camundongos C57BL/6 alimentados com dieta rica em gordura *trans* e frutose por 8 ou 24 semanas avaliou se a atividade mitocondrial do ciclo do ácido tricarbóxico prejudicada é uma característica central da esteatose hepática. Os autores mostraram que a resistência à insulina hepática durante a NASH apresenta concomitantemente, altas taxas de síntese e armazenamento de TAG e altas taxas da atividade mitocondrial do ciclo do ácido tricarbóxico. Os autores ainda sugerem que este evento pode ser reflexo da combinação entre uma resposta compensatória precoce à sobrecarga de AGLs e uma “inflexibilidade” do metabolismo mitocondrial à ação da insulina. Sendo assim, os autores concluem que a indução constitutiva do ciclo do ácido tricarbóxico mitocondrial juntamente com a eliminação/armazenamento ineficaz de AGLs no fígado pode ser uma fonte crônica de espécies

reativas de oxigênio, o que poderia acelerar a inflamação e a fibrose durante a NASH (PATTERSON et al., 2016).

Apesar dos resultados desses estudos, o diagnóstico de esteatose hepática ainda é por meio do acúmulo de TAG. Além disso, nosso estudo mostrou que no Modelo 2, quando associada à suplementação com óleo de macadâmia, houve um incremento no acúmulo de lipídeos hepáticos e na atividade enzimática da AST, contrapondo o conteúdo de células de Kupffer que se mostrou reduzido com a interação dos fatores, fato este que também foi observado no Modelo 1, uma vez que observamos um efeito da dieta de cafeteria em aumentar as células de Kupffer e um efeito do óleo de macadâmia em reduzi-las.

Mesmo com um incremento no conteúdo de lipídeos hepáticos, em ambos os modelos experimentais, a suplementação com óleo de macadâmia se mostrou eficaz em reduzir a presença de células de Kupffer. Este dado pode indicar um possível efeito protetor do óleo de macadâmia, e poderia estar relacionado com o perfil de ácidos graxos no fígado. No entanto, nosso estudo não mostrou efeitos adicionais da suplementação com óleo de macadâmia sobre o perfil de ácidos graxos nos animais alimentados com dieta de cafeteria. Além disso, quando avaliamos os outros resultados obtidos neste estudo, a suplementação com óleo de macadâmia não se mostra eficaz, pois aumenta a atividade da AST, prejudica ainda mais o perfil glicêmico e não altera as concentrações das citocinas anti e próinflamatórias. Com isso, a redução no conteúdo de células de Kupffer pode estar associada a redução da proteção deste fígado, já que as mesmas são células de defesa, podendo proporcionar uma maior vulnerabilidade aos hepatócitos, frente à fatores de injúria, como as espécies reativas de oxigênio.

Apesar de termos poucos dados na literatura referente a estes achados com o óleo de macadâmia, estudos com os principais AGMIs presentes neste óleo têm sido reportados. Diferente do que encontramos em nosso estudo, o estudo de Souza et al. (2016) mostrou que a suplementação com ácido palmitoleico (300 mg/dia m.c., durante 12 semanas) em camundongos C57BL/6 alimentados com HFD reduziu a lipogênese por ativação de AMPK e do fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF-21), dependente de PPAR α , sendo estes efeitos essenciais para reduzir a deposição ectópica de lipídeos no fígado. Já o estudo realizado com C57BL/6 alimentados com HFD, mostrou que a suplementação com AGMI palmitoleico (600 mg/dia m.c., durante 12 semanas) promoveu aumento na esteatose hepática, mas reduziu marcadores de resposta inflamatória, como o número de células de Kupffer, fosforilação do NF κ B e citocinas próinflamatórias (TNF- α e IL-

6) (GUO et al., 2012). Resultados estes, observados parcialmente em nosso estudo. Além disso, no estudo de Lima et al. (2014), camundongos C57BL/6 alimentados com HFD e suplementados com óleo de macadâmia (2g/kg m.c., três vezes por semana) durante 12 semanas apresentaram uma atenuação da inflamação induzida pela HFD, representada pelo aumento no conteúdo de IL-10, por efeito da suplementação com óleo de macadâmia. Entretanto, em nosso estudo não observamos este efeito da suplementação com óleo de macadâmia sobre o conteúdo de citocinas hepáticas.

É importante ressaltar que os estudos citados anteriormente utilizaram a mesma linhagem de animal, modelo experimental semelhante, com o mesmo tempo de suplementação de AGMI palmitoleico ou óleo de macadâmia. No entanto, a dose de AGMIs utilizada por Guo et al. (2012) foi o dobro da dose utilizada no estudo de Souza et al. (2016). A dose de AGMI palmitoleico utilizada em nosso (223 mg/dia m.c.) ou de óleo de macadâmia (1g/kg/dia m.c.) é inferior a utilizada nos estudos anteriores, porém o tempo de suplementação do nosso estudo é maior (16 semanas). Isto nos permite supor que a dose do AGMI palmitoleico ou de óleo de macadâmia utilizada nos estudos pode ser o ponto chave para os resultados controversos presentes na literatura. Além do uso do AGMIs isolados e de óleo de macadâmia, como mostrado nos estudos anteriores, um estudo realizado com camundongos suíços alimentados com HFD e suplementados por 8 semanas com EVOO (azeite de oliva extra virgem) mostrou que a suplementação promoveu uma redução no conteúdo de lipídeos hepáticos e uma melhora na condição hepática, com a redução de injúria tecidual, caracterizada pela menor presença de fibrose, diferente do que encontramos com o óleo de macadâmia (DOS SANTOS et al., 2015).

Ainda sobre o acúmulo de lipídeos hepáticos, o estudo de Siddiqui et al. (2015) mostrou efeitos protetores da suplementação com óleo de macadâmia sobre a esteatose hepática. Os autores utilizaram camundongos C57BL/6 alimentados por 8 dias com dietas normocalóricas compostas de CHO distintos (amido, sacarose, frutose). Estes animais foram divididos e receberam emulsões lipídicas com composições distintas (óleo de soja - 20 g/dL, óleo de soja + azeite de oliva -20 g/dL, óleo de macadâmia - 20 g/dL, óleo de peixe - 10 g/dL) a partir do terceiro dia de tratamento (3-8 dia). Os autores mostraram que independente da composição de AGPIs (ácido linoleico, ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico) ou AGMIs (ácido oleico, ácido palmitoleico), todas as emulsões lipídicas reduziram de forma semelhante a esteatose hepática induzida pelo consumo de sacarose ou

frutose. Em nossos estudo não observamos este efeito do óleo de macadâmia, no entanto vale ressaltar que a dose que utilizamos foi aproximadamente 3,6 vezes menor do que a do estudo citado acima, o que pode contribuir para esta diferença entre nossos dados.

Além disso, um estudo realizado com ratos wistar, uma linhagem diferente da utilizada em nosso estudo, mostrou que animais ingerindo dieta hiperlipídica com 3% óleo de macadâmia adicionada a ração (8 semanas) apresentaram uma melhora da estrutura hepática e de marcadores de função hepática (POUDYAL et al., 2013). Este estudo diverge com os nossos dados, uma vez que, em nosso estudo a suplementação com óleo de macadâmia promoveu um aumento na atividade da transaminase – AST devido à um potencial incremento na morte de hepatócitos.

Com isso, podemos observar que os dados presentes na literatura sobre o efeito da suplementação com óleo de macadâmia sobre a esteatose e injúria no tecido hepático, até o momento são controversos. Estudos futuros utilizando diferentes doses de óleo de macadâmia e a sua associação com dietas de padrões alimentares distintos (diferentes percentuais de açúcares simples e lipídeos) podem contribuir para novas descobertas sobre o efeito deste óleo.

Em suma, nosso estudo mostrou que independente da composição, a dieta de cafeteria (Modelo 1 – 21% de açúcares simples, Modelo 2 – 41% de açúcares simples) promove alterações metabólicas. O consumo de dieta de cafeteria promoveu aumento na adiposidade visceral, na glicemia de jejum, nas concentrações plasmáticas de CT, esteatose hepática, aumento no percentual de células inflamatórias hepáticas e da injúria hepática (aumento da atividade da AST). Já a suplementação com óleo de macadâmia (1g/kg/dia), quando associada apenas com uma dieta de cafeteria contendo maior percentual de açúcares simples (Modelo 2), incrementou algumas alterações glicêmicas e lipídicas já proporcionadas pela dieta, como: a glicemia de jejum, a esteatose hepática, injúria do tecido hepático e em contraponto reduz o conteúdo de células de Kupffer em ambos os modelos. Estes achados alertam para a necessidade na realização de mais estudos envolvendo a suplementação com óleo de macadâmia em diferentes contextos, evitando assim, eventuais efeitos indesejados e até mesmo desconhecidos.

7 CONCLUSÃO

O consumo de dieta de cafeteria, com maior ou menor quantidade de açúcar, promove alterações na homeostase glicêmica e lipídica.

Contraopondo a nossa hipótese inicial, a suplementação com óleo de macadâmia (1g/kg/dia) não atenuou o acúmulo de lipídeos hepáticos acarretado pelo consumo de dieta de cafeteria. No entanto, em ambos os modelos a suplementação promoveu uma redução no conteúdo de células de Kupffer.

Interessantemente, quando associada com uma dieta de cafeteria contendo maior percentual de açúcares simples (Modelo 2), a ingestão de óleo de macadâmia intensificou as alterações glicêmicas e lipídicas já proporcionadas pela dieta de cafeteria.

Sendo assim, estes achados alertam para o consumo de alimentos com alta densidade calórica (principalmente na forma de açúcar) e com baixo valor nutricional e fornecem informações sobre efeito específico do óleo de macadâmia dependendo da sua interação com outros nutrientes. Com isso, este estudo resgata a importância de se conhecer efeitos fisiológicos de estratégias nutricionais em diferentes cenários metabólicos visando compreensão das possibilidades de desfechos.

REFERÊNCIAS

- ABU-SHANAB, A.; QUIGLEY, E. M. M. The role of the gut microbiota in nonalcoholic fatty liver disease. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 7, n. 12, p. 691–701, 2010.
- ABUSHUFA, R.; REED, P.; WEINKOVE, C. Fatty acids in erythrocytes measured by isocratic HPLC. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1707–1712, 1994.
- AGUILERA AA, DIAZ GH, BARCELATA ML, GUERRERO OA, R. R. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor-alpha in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. **J Nutr Biochem**, v. 15, p. 350–7, 2004.
- AHIMA, R. S. et al. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 11, n. 8, p. 327–32, 2000.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**, 3ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. DE. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: [s.n.].
- ANSTEE, Q. M.; GOLDIN, R. D. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. **International journal of experimental pathology**, v. 87, n. 1, p. 1–16, 2006.
- ANTUNA-PUENTE, B. et al. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. **Diabetes & metabolism**, v. 34, n. 1, p. 2–11, fev. 2008.
- ARNER P, et al. Adrenergic regulation of lipolysis in situ at rest and during exercise. **J. Clin. Invest.**, v. 85, n. 3, p. 893898, 1990.
- ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F. et al. In vivo effects of hyperinsulinemia on lipogenic enzymes and glucose transporter expression in rat liver and adipose tissues. **Metabolism**, v. 44, n. 2, p. 228–233, 1995.
- AYALA, J. E. et al. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. **Disease Models & Mechanisms**, v. 3, n. 9–10, p. 525–534, 2010.
- BÄCKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 44, p. 15718–23, 2 nov. 2004.
- BAFFY, G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: The emerging view. **Journal of Hepatology**, v. 51, n. 1, p. 212–223, 2009.
- BARBOSA, A. M. et al. Fish oil supplementation attenuates changes in plasma lipids caused by dexamethasone treatment in rats. **Applied physiology, nutrition, and metabolism**, v. 41, n. 4, p. 382–90, abr. 2016.

- BARRENA, H. C. et al. Effect of linseed oil and macadamia oil on metabolic changes induced by high-fat diet in mice. **Cell biochemistry and function**, v. 32, n. 4, p. 333–40, jun. 2014.
- BEIGNEUX, A. P. et al. NIH Public Access. **Cell Metabolism**, v. 5, n. 4, p. 279–291, 2008.
- BERNSTEIN A.M, ROIZEN M.F, M. L. Purified palmitoleic acid for the reduction of high-sensitivity C-reactive protein and serum lipids: A double-blinded, randomized, placebo controlled study. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 8, n. 6, p. 612–617, 2014.
- BIRO, F. M.; WIEN, M. Childhood obesity and adult morbidities. **Am J Clin Nutr**, v. 91, n. 1, p. 1499–1505, 2010.
- BOLSONI-LOPES, A. et al. Palmitoleic acid (n-7) increases white adipocyte lipolysis and lipase content in a PPAR α -dependent manner. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 305, n. 9, p. E1093-102, 2013.
- BORTOLIN, R. C. et al. A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. **International Journal of Obesity**, v. 42, n. 3, p. 525–534, 3 mar. 2018.
- BOZZETTO, L. et al. Reduction in liver fat by dietary MUFA in type 2 diabetes is helped by enhanced hepatic fat oxidation. **Diabetologia**, 2016.
- BRANDIMARTI, P. et al. Cafeteria diet inhibits insulin clearance by reduced insulin-degrading enzyme expression and mRNA splicing. **Journal of Endocrinology**, v. 219, n. 2, p. 173–182, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Glossário Temático Alimentação e Nutrição. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília - DF: Ministério da Saúde, 2007.
- BRUNT, E. M. et al. Nonalcoholic steatohepatitis: A proposal for grading and staging the histological lesions. **American Journal of Gastroenterology**, v. 94, n. 9, p. 2467–2474, 1999.
- BUETTNER R, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. **J Mol Endocrinol**, v.36, p. 485-501, 2006.
- BUZZETTI, E.; PINZANI, M.; TSOCHATZIS, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 65, n. 8, p. 1038–1048, 2016.
- CALLIGARIS SD, et al. Mice long-term high-fat diet feeding recapitulates human cardiovascular alterations: an animal model to study the early phases of diabetic cardiomyopathy. **PLoS One** 2013; v.8, p. 609-631, 2013.
- CANI, P. D. et al. Original Article. **Diabetes**, v. 56, n. July, p. 1761–1772,

2007.

CAO, H. et al. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. **Cell**, v. 134, n. 6, p. 933–44, 19 set. 2008.

CASTELL-AUVÍ, A. et al. The effects of a cafeteria diet on insulin production and clearance in rats. **The British journal of nutrition**, v. 108, n. 7, p. 1155–62, 2012.

CESARETTI MLR, KOHLMANN O JR. Experimental models of insulin resistance and obesity: learned lessons. **Braz Arch Endocrinol Metabol**, v. 50, p. 190-197, 2006.

CHALASANI, N. et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 55, n. 6, p. 2005–23, jun. 2012.

CICERALE, S.; LUCAS, L.; KEAST, R. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 2, p. 458–479, 2010.

CUNHA TS, et al. Relationship between renal and cardiovascular changes in a murine model of glucose intolerance. **Regul Pept**, v. 139, p. 1-4, 2007.

DAVIES, B. S. J. et al. GPIHBP1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries. **Cell Metabolism**, v. 12, n. 1, p. 42–52, 2010.

DAVIS, C. et al. Definition of the mediterranean diet: A literature review. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9139–9153, 2015.

DE MELO, A. F. et al. Increase in liver cytosolic lipases activities and VLDL-TAG secretion rate do not prevent the non-alcoholic fatty liver disease in cafeteria diet-fed rats. **Biochimie**, v. 150, p. 16–22, 2018.

DIAS, F. M. et al. Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) juice intake protects against alterations to proteins involved in inflammatory and lipolysis pathways in the adipose tissue of obese mice fed a cafeteria diet. **Lipids in health and disease**, v. 13, n. 1, p. 24, 2014.

DISSARD, R. et al. Long term metabolic syndrome induced by a high fat high fructose diet leads to minimal renal injury in C57BL/6 mice. **PLoS One**. v. 8, p. e76703, 2013.

DOS SANTOS, G. A. et al. Identification of compounds from high-fat and extra virgin olive oil-supplemented diets in whole mouse liver extracts and isolated mitochondria using mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 50, n. 7, p. 951–958, 2015.

ENERBÄCK, S. et al. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are

cold-sensitive but not obese. **Nature**, v. 387, n. 6628, p. 90–4, 1 maio 1997.

ERION, D. M.; SHULMAN, G. I. Diacylglycerol-mediated insulin resistance. **Nature medicine**, v. 16, n. 4, p. 400–2, 2010.

FIERBINTEANU-BRATICEVICI, C. et al. Predictive factors for nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases**, v. 20, p. 153–159, 2011.

FIORINO, P. et al. Exposure to high-fat diet since post-weaning induces cardiometabolic damage in adult rats. **Life Sciences**, v. 160, p. 12–17, 2016.

FLEGAL, K. M. et al. Trends in obesity among adults in the united states, 2005 to 2014. **Jama**, v. 315, n. 21, p. 2284–2291, 2016.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation 128 and purification of total lipid from animal tissue. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497–509, 1957.

FRAULOB JC, OGG-DIAMANTINO R, FERNANDES-SANTOS C, AGUILA MB, MANDARIMDE-LACERDA CA. A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in C57BL/6 mice fed a high fat diet. **J Clin Biochem Nutr**. v. 46, p. 212–23, 2010.

FREDRIKSON G, STRALFORS P, NILSSON NO, BELFRAGE P. Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue. Purification and some properties. **J Biol Chem**, v. 356, p. 6311–6320, 1981.

FRUHBECK G, GOMEZ-AMBROSI J, MURUZABAL FJ, BURRELL MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 280, p. E827-47, 2001.

FUCHO, R. et al. Ceramides and mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. **The FASEB Journal**, n. 26, 2016.

FUJITA Y, MAKI K. High-fat diet-induced obesity triggers alveolar bone loss and spontaneous periodontal disease in growing mice. **BMC Obes**. v. 3, p. 1, 2015.

GAC, L. et al. Behavioral characterization of a model of differential susceptibility to obesity induced by standard and personalized cafeteria diet feeding. **Physiology and Behavior**, v. 152, p. 315–322, 2015.

GALLOU-KABANI, C. et al. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. **Obesity (Silver Spring)**. v. 15, p. 1996–2005, 2007.

- GANCHEVA S, ZHELYAZKOVA-SAVOVA M, GALUNSKA B, CHERVENKOV T. Experimental models of metabolic syndrome in rats. **Scr Sci Med**. v. 47, p. 14–21, 2015.
- GASPARIN, F. R. S. et al. Sex differences in the development of hepatic steatosis in cafeteria diet-induced obesity in young mice. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1864, n. 7, p. 2495–2509, jul. 2018.
- GILLINGHAM, L. G.; HARRIS-JANZ, S.; JONES, P. J. H. Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. **Lipids**, v. 46, n. 3, p. 209–228, 2011.
- GHITZA UE, et al. The anxiogenic drug yohimbine reinstates palatable food seeking in a rat relapse model: a role of CRF(1) receptors. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, p. 2188–2196, 2006.
- GONG, J. et al. Adipose tissue palmitoleic acid and obesity in humans: Does it behave as a lipokine? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, n. 1, p. 186–191, 2011.
- GRAHAM, L.S. et al. Bone density and hyperlipidemia: the T-lymphocyte connection. **J Bone Miner Res**. v. 25, p. 2460–9, 2010.
- GRATTAGLIANO, I. Clinical Review Recommendations for family physicians. **Canadian Family Physician**, v. 53, p. 857–863, 2007.
- GUILHERME, A. et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 5, p. 367–377, 2008.
- GUO, X. et al. Palmitoleate induces hepatic steatosis but suppresses liver inflammatory response in mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1–9, 2012.
- HALADE GV, RAHMAN MM, WILLIAMS PJ, FERNANDES G. High fat diet-induced animal model of age-associated obesity and osteoporosis. **J Nutr Biochem**. v. 21, p. 1162–9, 2010.
- HAO L, LU X, SUN M, LI K, SHEN L, WU T. Protective effects of L-arabinose in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. **Food Nutr Res**. v. 59, p. 28886, 2015.
- HAVEL RJ, HAMILTON RL. Hepatic catabolism of remnant lipoproteins: where the action is. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 24, n.2, p. 213-5, 2004.
- HEINONEN, I. et al. The effects of equal caloric high fat and western diet on metabolic syndrome, oxidative stress and vascular endothelial function in mice. **Acta physiologica (Oxford, England)**, v. 211, n. 3, p. 515–27, jul. 2014.
- HEYNE, A. et al. An animal model of compulsive food-taking behaviour. **Addiction Biology**, v. 14, n. 4, p. 373–383, 2009.
- HIGA, T. S. et al. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the

induction of metabolic dysfunction in mice. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 47–54, 2014.

HILLGARTNER FB, SALATI LM, GOODRIGE AG. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. **Physiol Rev**, v. 75, n. 1, p. 47 – 76, 1995.

HODSON, L.; KARPE, F. Is there something special about palmitoleate? **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 16, p. 225–31, 2013.

HOLM, C. et al. Molecular mechanisms regulating hormonesensitive lipase and lipolysis. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 20, p. 365393, 2000.

HOWARD, B. V. Insulin resistance and lipid metabolism. **Am. J. Cardiol.**, v. 84, n. 1A, p. 28–32, 1999.

HU, F. B. Television Watching and Other Sedentary Behaviors in Relation to Risk of Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus in Women. **Jama**, v. 289, n. 14, p. 1785, 2003.

JENSEN, T. et al. Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 68, n. 5, p. 1063–1075, maio 2018.

JÉQUIER, E.; TAPPY, L. Regulation of body weight in humans. **Phys. Rev.**, v. 79, n. 2, p. 451–480, 1999.

JOHNSON, A. R.; JUSTIN MILNER, J.; MAKOWSKI, L. The inflammation highway: Metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. **Immunological Reviews**, v. 249, n. 1, p. 218–238, 2012.

JOU, J.; CHOI, S. S.; DIEHL, A. M. Mechanisms of Disease Progression in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Semin Liver Dis.**, v. 28, n. 4, p. 52, 2008.

JURADO-RUIZ, E. et al. An extra virgin olive oil-rich diet intervention ameliorates the non-alcoholic steatohepatitis induced by a high-fat “Western type” diet in mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 201600549, p. 1–12, 2016.

KAAKOUSH, N. O. et al. Alternating or continuous exposure to cafeteria diet leads to similar shifts in gut microbiota compared to chow diet. **Molecular Nutrition and Food Research**, p. 1–9, 2016.

KARASTERGIOU, K.; MOHAMED-ALI, V. The autocrine and paracrine roles of adipokines. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 318, n. 1–2, p. 69–78, 2010.

KARINE SPIEGEL, ESRA TASALI, PLAMEN PENEV, E. V. C. Brief Communication: Sleep Curtailment in Healthy Young Men Is Associated with Decreased Leptin Levels, Elevated Ghrelin Levels, and Increased Hunger and Appetite. **Ann Intern Med**, v. 141, p. 846–850, 2004.

- KASIM-KARAKAS, S. E. et al. Effects of dietary carbohydrates on glucose and lipid metabolism in golden Syrian hamsters. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 128, n. 2, p. 208–13, ago. 1996.
- KENNEDY, A. J. et al. Mouse models of the metabolic syndrome. **Disease Models & Mechanisms**, v. 3, p. 156–166, 2010.
- KERSHAW EE, F. J. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* **Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89(6), n. December, p. 2548–2556, 2004.
- KERSTEN, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. **EMBO Reports**, v. 2, n. 4, p. 282–286, 2001.
- KIM, S. W. et al. Oleuropein prevents the progression of steatohepatitis to hepatic fibrosis induced by a high-fat diet in mice. **Experimental & molecular medicine**, v. 46, n. 4, p. e92, 2014.
- KLEINER, D. E. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313–1321, 2005.
- KLERKX, A. H. E. M. et al. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibition beyond raising high-density lipoprotein cholesterol levels pathways by which modulation of CETP activity may alter atherogenesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 4, p. 706–715, 2006.
- KOHLI R, et al. High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 52, p. 934-944, 2010.
- KOTRONEN, A. et al. Increased Liver Fat, Impaired Insulin Clearance, and Hepatic and Adipose Tissue Insulin Resistance in Type 2 Diabetes. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 122–130, 2008.
- KOVES, T. R. et al. Mitochondrial Overload and Incomplete Fatty Acid Oxidation Contribute to Skeletal Muscle Insulin Resistance. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 1, p. 45–56, 2008.
- KOWALSKI, G. M.; BRUCE, C. R. The regulation of glucose metabolism: implications and considerations for the assessment of glucose homeostasis in rodents. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 307, n. 10, p. E859–E871, 2014.
- LANTHIER, N. et al. Kupffer cell activation is a causal factor for hepatic insulin resistance. **Society**, 2010.
- LAUGERETTE, F. et al. Complex links between dietary lipids, endogenous endotoxins and metabolic inflammation. **Biochimie**, v. 93, n. 1, p. 39–45, 2011.
- LECOMTE, V. et al. Effects of paternal obesity on growth and adiposity

- of male rat offspring. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, p. ajpendo.00262.2016, 2016.
- LEPORE, S. M. et al. Oral Administration of Oleuropein and Its Semisynthetic Peracetylated Derivative Prevents Hepatic Steatosis, Hyperinsulinemia, and Weight Gain in Mice Fed with High Fat Cafeteria Diet. **International Journal of Endocrinology**, v. 2015, 2015.
- LEVY, R. B. et al. adição ” no Brasil : distribuição , fontes alimentares e tendência temporal Availability of added sugars in Brazil : trends. **Rev Bras Epidemiol**, v. 15, n. 1, p. 3–12, 2012.
- LI, Y. et al. Metabolic syndrome exacerbates inflammation and bone loss in periodontitis. **J Dent Res**. v. 94, p. 362–70, 2015.
- LIANG, W. et al. Establishment of a general NAFLD scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–17, 2014.
- LIMA, E. A. et al. Macadamia oil supplementation attenuates inflammation and adipocyte hypertrophy in obese mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.
- LISTENBERGER, L. L. et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 6, p. 3077–82, 2003.
- LIU, J. et al. Free fatty acids, not triglycerides, are associated with non-alcoholic liver injury progression in high fat diet induced obese rats. **Lipids in health and disease**, v. 15, n. 1, p. 27, 2016.
- LIU, X. et al. Paradoxical resistance to diet-induced obesity in UCP1-deficient mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 111, n. 3, p. 399–407, fev. 2003.
- LONDOS, C. et al. Perilipin: a possible roles in structure and metabolism intracellular neutral lipids in adipocytes and steroidogenic cells. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 20, n. suppl 3, p. S97101, 1996.
- LOOS, R. J. F. Genetic determinants of common obesity and their value in prediction. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 2, p. 211–226, 2012.
- MACHADO, M. V. et al. Mouse models of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis reproduce the heterogeneity of the human disease. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–16, 2015.
- MAEDLER, K. et al. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic β -cell turnover and function. **Diabetes**, v. 52, n. 3, p. 726–733, 2003.
- MAHER C, MIRE E, HARRINGTON D M, STAIANO A E, K. P. T. NIH Public Access. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 12, p. 1–17, 2013.

- MAHMOUD, A. A. A.; ELSHAZLY, S. M. Ursodeoxycholic acid ameliorates fructose-induced metabolic syndrome in rats. **PLoS one**, v. 9, n. 9, p. e106993, 2014.
- MALIK, V. S. et al. Sugar-sweetened beverages and weight gain in children and adults: a systematic review and meta-analysis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 98, n. 4, p. 1084–102, 2013.
- MAMIKUTTY, N. et al. The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. **BioMed Res Int**. v. 2014, p. 263897, 2014.
- MARINA V. MACHADO, H. C. P. **Gut microbiota and immunity Gut microbiota**, [s.d.].
- MCGARRY, J. D.; FOSTER, D. W. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. **Annual review of biochemistry**, v. 49, p. 395–420, 1980.
- MOLLER, D. E. D. E.; KAUFMAN, K. D. K. D. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. **Annual Review of Medicine**, v. 56, n. 3, p. 45–62, 2005.
- MONTGOMERY, M. K. et al. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. **Diabetologia**, v. 56, n. 5, p. 1129–1139, 2013.
- MORRIS, M. J. et al. Brain neuropeptide Y and CCK and peripheral adipokine receptors: temporal response in obesity induced by palatable diet. **International journal of obesity (2005)**, v. 32, n. 2, p. 249–58, 2008.
- MOZAFFARIAN D, HAO T, RIMM EB, WILLETT WC, H. F. Changes in Diet and Lifestyle and Long-Term Weight Gain in Women and Men. **N Engl J Med**, v. 364, n. 25, p. 2392–2404, 2011.
- NG, S.-F. et al. Chronic high-fat diet in fathers programs β -cell dysfunction in female rat offspring. **Nature**, v. 467, n. 7318, p. 963–966, 2010.
- NG, S. F. et al. Paternal high-fat diet consumption induces common changes in the transcriptomes of retroperitoneal adipose and pancreatic islet tissues in female rat offspring. **FASEB Journal**, v. 28, n. 4, p. 1830–1841, 2014.
- NGUYEN, P. et al. Liver lipid metabolism. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 92, p. 272–283, 2008.
- NIRMALAN, N.; NIRMALAN, M. Hormonal control of metabolism: regulation of plasma glucose. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 18, n. 10, p. 502–507, 2017.
- NISHIYAMA – NARUKE, A.; SOUZA, J. A.; CARNELLÓS, M.; CURTI, R. HPLC Determination of underivatized fatty acids saponified at

- 37° C analysis of fatty acids in oils and tissues. **Analytical Letters**, v. 31, n. 14, p. 2565–2576, 1998.
- ONO-MOORE, K. D. et al. Application of an In Vivo Hepatic Triacylglycerol Production Method in the Setting of a High-Fat Diet in Mice. **Nutrients**, v. 9, n. 1, 28 dez. 2016.
- OSBORNE, T. F. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPS): Key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 42, p. 32379–32382, 2000.
- PANCHAL, S. K. et al. High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. 57, p. 51–64, 2011.
- PATRO B, LIBER A, ZALEWSKI B, POSTON L, SZAJEWSKA H, K. B. Maternal and paternal body mass index and offspring obesity: a systematic review. **Ann Nutr Metab**, v. 63, p. 32–41, 2013.
- PATTERSON, R. E. et al. Lipotoxicity in steatohepatitis occurs despite an increase in tricarboxylic acid cycle activity. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, n. 21, p. ajpendo.00492.2015, 2016.
- PÉNICAUD, L. et al. The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance. **Nutrition**, v. 16, n. 10, p. 903–908, 2000.
- PETIT, V. et al. Chronic high-fat diet affects intestinal fat absorption and postprandial triglyceride levels in the mouse. **Journal of lipid research**, v. 48, n. 2, p. 278–87, fev. 2007.
- PILLOIS, X. et al. Constitutive inhibition of plasma CETP by apolipoprotein C1 is blunted in dyslipidemic patients with coronary artery disease. **The Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 6, p. 1200–1209, 2012.
- POUDYAL H, PANCHAL S, BROWN L. Comparison of purple carrot juice and beta-carotene in a high-carbohydrate, high-fat diet-fed rat model of the metabolic syndrome. **Br J Nutr.** v. 104, p. 1322–32, 2010.
- POUDYAL, H. et al. Responses to oleic, linoleic and α -linolenic acids in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 7, p. 1381–1392, 2013.
- QI, Q. et al. Sugar-sweetened beverages and genetic risk of obesity. **The New England journal of medicine**, v. 367, n. 15, p. 1387–1396, 2013.
- RAFACHO, A. et al. Glucose homeostasis in rats exposed to acute intermittent hypoxia. **Acta Physiologica**, v. 209, n. 1, p. 77–89, 2013.
- RANKINEN, T. et al. The human obesity gene map: the 2005 update. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 14, n. 4, p. 529–644, 2006.
- RECTOR, R. S. et al. Mitochondrial dysfunction precedes insulin resistance and hepatic steatosis and contributes to the natural history of non-alcoholic fatty liver disease in an obese rodent model. **Journal of**

- Hepatology**, v. 52, n. 5, p. 727–736, 2010.
- RINCÓN-CERVERA, M. A. et al. Supplementation with antioxidant-rich extra virgin olive oil prevents hepatic oxidative stress and reduction of desaturation capacity in mice fed a high-fat diet: Effects on fatty acid composition in liver and extrahepatic tissues. **Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–17, 2016.
- ROSSMEISL M, RIM JS, KOZA RA, KOZAK LP. Variation in type 2 diabetes-related traits in mouse strains susceptible to diet-induced obesity. **Diabetes**. v. 52, p. 1958–66, 2003.
- SAMPEY, B. P. et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 19, n. 6, p. 1109–17, 2011.
- SCHWEIGER, M. et al. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 52, p. 40236–40241, 2006.
- SENAFAN, K. et al. Ferulic acid alleviates changes in a rat model of metabolic syndrome induced by high-carbohydrate, high-fat diet. **Nutrients**, v. 7, n. 8, p. 6446–6464, 2015.
- SHAHRAKI MR, HARATI M, SHAHRAKI AR. Prevention of high fructose-induced metabolic syndrome in male wistar rats by aqueous extract of Tamarindus indica seed. **Acta Med Iran**. v. 49, p.277–83, 2011.
- SHOELSON, S. E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2169–2180, 2007.
- SIDDIQUI, R. A. et al. Comparative study of the modulation of fructose/sucrose-induced hepatic steatosis by mixed lipid formulations varying in unsaturated fatty acid content. **Nutrition & metabolism**, v. 12, p. 41, 2015.
- SOUZA, C. O. et al. Palmitoleic Acid Improves Metabolic Functions in Fatty Liver by PPAR α -Dependent AMPK Activation. **Journal of Cellular Physiology**, n. October 2016, 2016.
- SPEAKMAN, J. R.; KEIJER, J. Not so hot: Optimal housing temperatures for mice to mimic the thermal environment of humans. **Molecular metabolism**, v. 2, n. 1, p. 5–9, 8 nov. 2012.
- STRAWFORD, A. Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with $^2\text{H}_2\text{O}$. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 286, n. 4, p. E577–E588, 2004.
- SUGATANI, J. et al. Comparison of enzymatically synthesized inulin, resistant maltodextrin and clofibrate effects on biomarkers of metabolic

- disease in rats fed a high-fat and high-sucrose (cafeteria) diet. **European Journal of Nutrition**, v. 47, n. 4, p. 192–200, 2008.
- SUMAN, R. K. et al. Development of an Experimental Model of Diabetes Co-Existing with Metabolic Syndrome in Rats. **Advances in pharmacological sciences**, v. 2016, p. 9463476, 2016.
- SUMMERS, S. A. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. **Progress in Lipid Research**, v. 45, n. 1, p. 42–72, 2006.
- SWINBURN, B. A. et al. Obesity 1: The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments - ProQuest Health & Medical Complete - ProQuest. v. 378, p. 804–814, 2011.
- THIRUNAVUKKARASU V, ANITHA NANDHINI AT, ANURADHA CV. Lipoic acid attenuates hypertension and improves insulin sensitivity, kallikrein activity and nitrite levels in high fructose-fed rats. **J Comp Physiol B**. v. 174, p.587–92, 2004.
- TOOP, C. R.; GENTILI, S. Fructose beverage consumption induces a metabolic syndrome phenotype in the rat: A systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, v. 8, n. 9, 2016.
- TRAYHURN, P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. **Physiological reviews**, v. 93, n. 1, p. 1–21, 2013.
- TRINH KY, et al. Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats. **J Biol Chem.**, v.273, n.47, p. 31615-20, 1998.
- VERGÈS, B. Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? **Diabetologia**, v. 58, n. 5, p. 886–899, 2015.
- VIGITEL, Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- VIOLI, F. et al. Extra virgin olive oil use is associated with improved post-prandial blood glucose and LDL cholesterol in healthy subjects. **Nutrition & diabetes**, v. 5, n. 7, p. e172, 2015.
- XAVIER, H. T. et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq. Bras. Cardiol.** [online], v.101, suppl.1, p. 1-20, 2013.
- XIAO L, et al. Large adipocytes function as antigen-presenting cells to activate CD4(+) T cells via upregulating MHCII in obesity. **Int J Obes**, v. 40, p. 112-120, 2016.
- XU F, DU Y, HANG S, CHEN A, GUO F, XU T. Adipocytes regulate the bone marrow microenvironment in a mouse model of obesity. **Mol Med Rep**. v. 8, p. 823–8, 2013.
- WAHI, G.; ANAND, S. S. Race/Ethnicity, Obesity, and Related Cardio-Metabolic Risk Factors: A Life-Course Perspective. **Current**

Cardiovascular Risk Reports, v. 7, n. 5, p. 326–335, 2013.

WEI, X. et al. Regulation of insulin degrading enzyme activity by obesity-associated factors and pioglitazone in liver of diet-induced obese mice.

PLoS ONE, v. 9, n. 4, p. 1–7, 2014.

WILLETT WC, SACKS F, TRICHOPOULOU A, DRESCHER G, FERRO-LUZZI A, HELSING E, T. D. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. **Am J Clin Nutr**, v. 61, p. 1402S–1406S, 1995.

WILLIAMS, L. M. et al. The development of diet-induced obesity and glucose intolerance in C57BL/6 mice on a high-fat diet consists of distinct phases. **PLoS one**, v. 9, n. 8, p. e106159, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert committee on physical status: the use and interpretation of anthropometry. Physical status: the use and interpretation of anthropometry: report of a WHO expert committee. **WHO technical report series**, 854. Geneva: WHO, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight**. Geneva: WHO. 2015.

WONG, S. K. et al. Animal models of metabolic syndrome: a review. **Nutrition & metabolism**, v. 13, p. 65, 2016.

YAMAGUCHI, K. et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 45, n. 6, p. 1366–1374, 2007.

YANG, Z.-H.; MIYAHARA, H.; HATANAKA, A. Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-Ay Mice with genetic type 2 diabetes. **Lipids in health and disease**, v. 10, n. 1, p. 120, 2011.

YANG ZH, MIYAHARA H, TAKEO J, KATAYAMA M. Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. **Diabetol Metab Syndr**. v. 4, p. 32, 2012.

YANTING, C. et al. Dose- and type-dependent effects of long-chain fatty acids on adipogenesis and lipogenesis of bovine adipocytes. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 2, p. 1601–1615, fev. 2018.

YKI-JÄRVINEN, H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. **The lancet. Diabetes & endocrinology**, v. 2, n. 11, p. 901–10, nov. 2014.

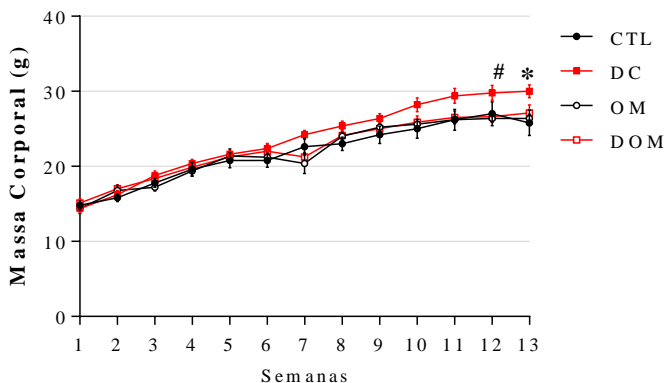
ZAFRANI, E. S. Non-alcoholic fatty liver disease: An emerging pathological spectrum. **Virchows Archiv**, v. 444, n. 1, p. 3–12, 2004.

APÊNDICE A - Estudo Piloto

Os dados apresentados a seguir, são referentes ao estudo piloto realizado para avaliar as alterações no perfil glicêmico e lipídico provocadas pelo consumo de dieta de cafeteria e o efeito da suplementação com óleo de macadâmia (1g/kg/dia) realizado durante 90 dias em camundongos C57/BL6. Nesta fase do estudo utilizamos a dieta de cafeteria com 47% de carboidratos, sendo destes 21% de açúcares simples, a mesma utilizada no modelo 1.

Ao longo dos 90 dias de acompanhamento e execução do protocolo experimental, observamos que a massa corporal foi semelhante entre os grupos. No entanto, na penúltima semana de intervenção observou-se um aumento significativo transitório nos animais do grupo DC quando comparado com o grupo DOM. Já na última semana de intervenção esta diferença não permanece e tem-se apenas um aumento no grupo DC quando comparado com o grupo CTL ($F = 11,28$; $p < 0,0001$). (Figura 19).

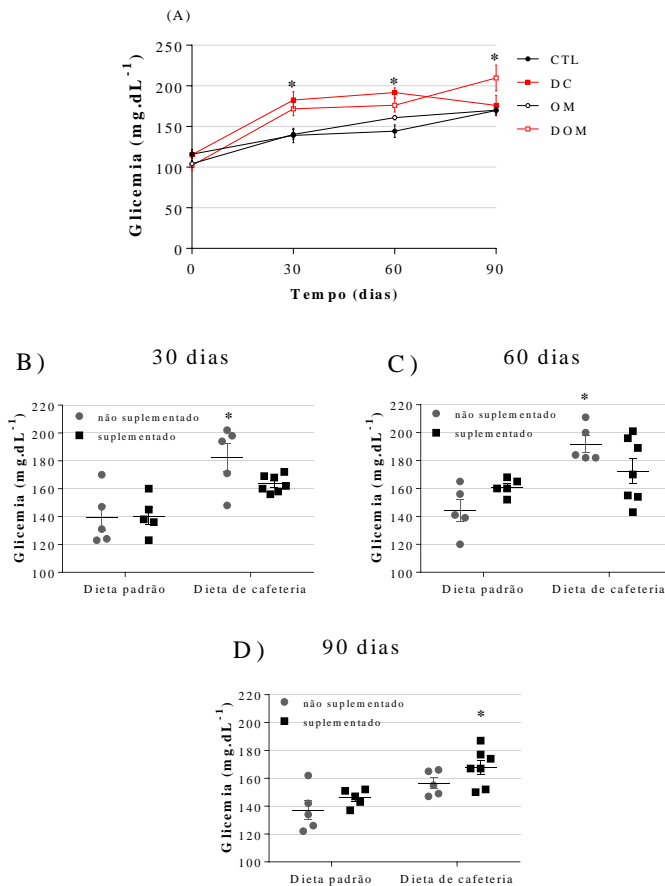
Figura 19 - Massa corporal de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 90 dias.



Os dados estão apresentados como média e EPM. Teste two-way ANOVA seguido de *post hoc* de Bonferroni. Grupos CTL, DC e OM: $n=5$; grupo DOM: $n=8$; (*): indica efeito da dieta de cafeteria, DC vs CTL ou DOM vs OM; (#): indica efeito do óleo de macadâmia, OM vs CTL ou DOM vs DC.

Após 30 e 60 dias de intervenção os animais do grupo DC apresentaram um aumento significativo na glicemia de jejum quando comparado com o grupo CTL (30 dias: CTL= 139,0±8,9; DC= 182,6±10,2*; OM= 140,4±6,0; DOM= 163,6±2,3; F = 23,47; p = 0,0001; 60 dias: CTL= 144,2±7,7; DC= 191,8±5,9*; OM= 161,0±2,7; DOM= 172,6±8,7; F = 16,34; p = 0,0008). No entanto, ao final dos 90 dias estes animais apresentam uma redução da glicemia, apesar de ainda ser maior quando comparado ao grupo CTL, a diferença não foi significativa (90 dias: CTL= 137,2±7,1; DC= 156,4±3,9; OM= 146,0±2,8; DOM= 167,7±5,0*; F = 16,05; p < 0,0008). Já o grupo DOM ao longo da intervenção apresentou aumentos não significativos e ao final dos 90 dias apresentou um aumento significativo em relação ao seu controle, o grupo OM (Figura 20 A e B).

Figura 20 - Glicemia de jejum de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 90 dias.



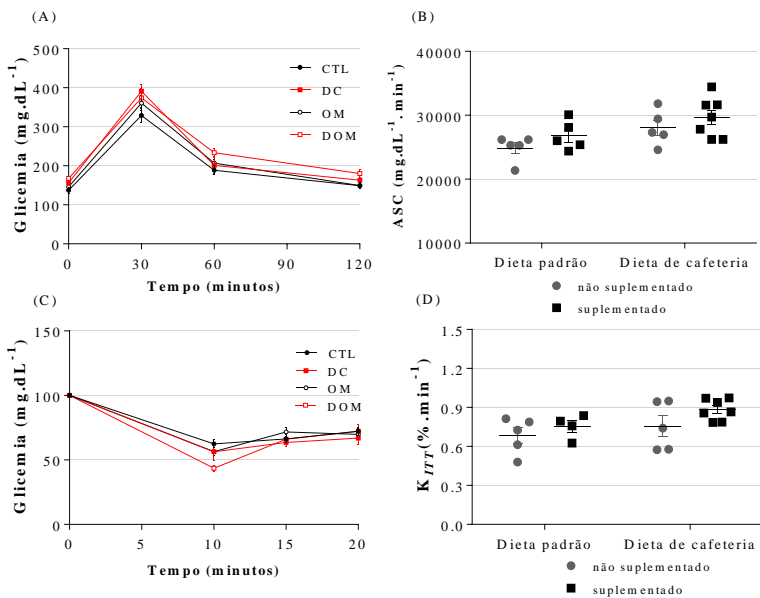
Os dados estão apresentados como média e EPM. Teste two-way ANOVA seguido de *post hoc* de Bonferroni, Grupos CTL, DC e OM: n=5; grupo DOM: n=7, (*): indica efeito da dieta de cafeteria, DC vs CTL ou DOM vs OM; (#): indica efeito do óleo de macadâmia, OM vs CTL ou DOM vs DC.

Após 90 dias de intervenção observamos que a dieta de cafeteria promoveu uma redução da tolerância à glicose. Este resultado pode ser observado na figura 21A que apresenta os valores de glicemia durante a realização do teste de tolerância à glicose e na figura 21B pelo cálculo da

área sob a curva (CTL: 24864 ± 898 ; DC: 28017 ± 1219 ; OM: 26796 ± 1022 ; DOM: 29651 ± 1170 , $F=7,035$; $p=0,0162$).

Como apresentado na figura 21, não houve alteração na sensibilidade à insulina após 90 dias de intervenção com dieta de cafeteria e suplementação com óleo de macadâmia. Na Figura 21C podemos observar a curva glicêmica durante a realização do teste de tolerância à insulina e na figura 21D, a constante de decaimento (CTL: $0,684 \pm 0,06$; DC: $0,756 \pm 0,08$; OM: $0,750 \pm 0,04$; DOM: $0,88 \pm 0,03$).

Figura 21 - Tolerância à glicose e sensibilidade à insulina de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 90 dias.



Os dados estão apresentados como média e EPM. Teste two-way ANOVA seguido de *post hoc* de Bonferroni, $p < 0,05$, Figuras A e B: Teste de tolerância à glicose: Grupos CTL, DC e OM: $n=5$ e DOM: $n=7$; Figuras C e D: Teste de tolerância à insulina: Grupos CTL, DC: $n=5$; OM: $n=4$ e DOM: $n=7$. Teste de tolerância à insulina realizado com $1\bar{U}/\text{kg m.c}$.

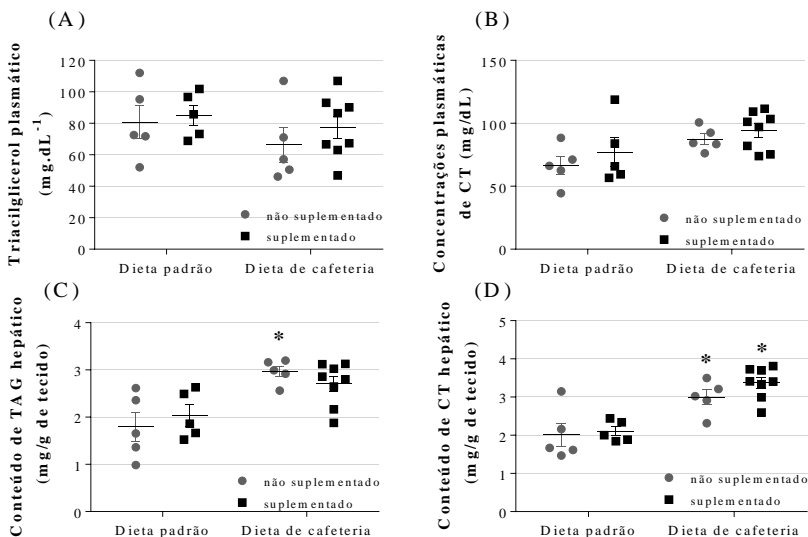
Com isso, podemos observar que o consumo de dieta de cafeteria promove alteração no metabolismo glicêmico, caracterizado pelo aumento da glicemia de jejum, redução da tolerância à glicose e não alterou sensibilidade à insulina. Além disso, observamos que a

suplementação com óleo de macadâmia não promove nenhum efeito nestes parâmetros.

Após a análise das concentrações plasmáticas de TAG observamos que não houve alteração provocada pela dieta de cafeteria ou pela suplementação com óleo de macadâmia, como podemos observar na figura 22A (CTL: $80,73 \pm 10,41$; DC: $66,37 \pm 10,99$; OM: $85,28 \pm 6,40$; DOM: $77,56 \pm 6,96$). Já em relação às concentrações plasmáticas de CT ao final da intervenção (90 dias), as mesmas apresentaram-se aumentadas pela intervenção com dieta de cafeteria, sem efeito da suplementação com óleo de macadâmia (CTL: $66,58 \pm 7,09$; DC: $87,44 \pm 4,20$; OM: $79,92 \pm 11,50$; DOM: $94,22 \pm 5,32$, $F=6,829$; $p=0,017$).

O conteúdo de TAG hepático apresentou-se significativamente aumentado nos animais que receberam apenas dieta de cafeteria (CTL: $1,80 \pm 0,30$; DC: $2,97 \pm 0,11^*$; OM: $2,04 \pm 0,22$; DOM: $2,70 \pm 0,16$; $F = 19,41$; $p = 0,0003$) (Figura 22C). Além disso, o conteúdo de CT hepático foi significativamente maior em ambos os grupos que receberam dieta de cafeteria, sem efeito da suplementação com óleo de macadâmia (CTL: $2,01 \pm 0,31$; DC: $2,99 \pm 0,20$; OM: $2,10 \pm 0,12$; DOM: $3,37 \pm 0,14$; $F = 32,10$; $p < 0,0001$) (Figura 22D).

Figura 22 - Concentrações plasmáticas e conteúdo hepático de TAG e CT de camundongos alimentados com dieta de cafeteria, tratados ou não com óleo de macadâmia, durante 90 dias.



Os dados estão apresentados como média e EPM. Os dados referentes ao conteúdo de TAG hepático foi transformado em logaritmo. Teste two-way ANOVA seguido de *post hoc* de Bonferroni, Grupos CTL, DC e OM: n=5 e grupo DOM: n=7, (*): indica efeito da dieta de cafeteria, DC vs CTL ou DOM vs OM.

Estes dados nos mostram que o consumo de dieta de cafeteria promoveu aumento nas concentrações de CT plasmático e acúmulo de lipídeos hepáticos, sem efeito da suplementação com óleo de macadâmia.

A tabela 8 apresenta os dados referentes às massas de depósitos de tecido adiposo e do fígado avaliados no presente estudo. Após o período de intervenção de 90 dias os animais dos grupos que receberam dieta de cafeteria apresentaram um aumento significativo no índice de adiposidade.

Além disso, após 90 dias de intervenção observou-se uma redução significativa da massa do fígado em ambos os grupos que receberam dieta de cafeteria. Nenhum destes tecidos foram alterados pela suplementação com óleo de macadâmia.

Tabela 8- Índice de adiposidade (%) e massa do fígado (mg/g de m.c.) de camundongos CTL e tratados com dieta de cafeteria suplementados ou não com óleo de macadâmia durante 90 dias.

	CTL	DC	OM	DOM	F	P
Índice de adiposidade	1,42±0,1	2,90±0,3*	1,76±0,2	3,00±0,2*	28,4	< 0,0001
Fígado	48,79±1,0	39,70±1,4*	44,75±1,1	38,66±1,8*	23,6	= 0,0001

Os dados estão apresentados como média e EPM. Teste two-way ANOVA seguido de *post hoc* de Bonferroni. Grupos CTL, DC e OM: n=5 e grupo DOM: n=7, (*): indica efeito da dieta de cafeteria, DC vs CTL ou DOM vs OM.

Após a análise destes dados observamos que esta intervenção durante 90 dias com dieta de cafeteria promoveu alterações transitórias na glicemia de jejum, discreta redução da tolerância à glicose, sem alteração na responsividade à insulina e nas concentrações plasmáticas de TAG. No entanto, o consumo de dieta de cafeteria promoveu aumento nas concentrações plasmáticas de CT, no acúmulo de lipídeos hepáticos, representado pelo aumento do conteúdo de TAG e CT hepáticos, além de promover o aumento da adiposidade visceral. Estes parâmetros não foram atenuados pela suplementação com óleo de macadâmia.

A partir da análise desses resultados, nos questionamos se de fato a suplementação com óleo de macadâmia não promove efeitos sobre os parâmetros avaliados ou se a amplitude de algumas alterações metabólicas causadas pela dieta de cafeteria foram tão discretas que impediram de se verificar um possível efeito do óleo. Sendo assim, tomamos a decisão de ampliar o tempo de exposição à dieta, em congruência com outros estudos da literatura (SAMPEY et., 2011; ZEENI et al., 2015) que também utilizaram períodos de intervenção mais prolongados. Esta exposição prolongada à dieta, também acarretaria em aumento do tempo de suplementação (+30 dias) nos grupos suplementados. Em adição, baseado na corrente preocupação com a ingestão excessiva de açúcar pela população (MALIK et al., 2013; QI et al., 2013) e em modelos animais de obesidade induzida por dieta rica em açúcar (AGUILERA et al., 2004; MAHMOUD; ELSHAZLY, 2014; TOOP; GENTILI, 2016) decidimos executar em paralelo um modelo de obesidade induzida por dieta de cafeteria enriquecida em açúcar investigando também os potenciais efeitos da suplementação com óleo de macadâmia.

ANEXO A



Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Métodos para estudo de intervenções nutricionais em modelos animais de inflexibilidade metabólica", protocolada sob o CEUA nº 5855301015, sob a responsabilidade de **Everson Araújo Nunes e equipe; Amanda Marreiro Barbosa; Henver Simionato Brunetta; Thayz Rodrigues Chagas** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 02/09/2016.

We certify that the proposal "Methods for the study of nutritional interventions in animal models of metabolic inflexibility", utilizing 80 Heterogenics rats (males and females), 320 Isogenics mice (males and females), protocol number CEUA 5855301015, under the responsibility of **Everson Araújo Nunes and team; Amanda Marreiro Barbosa; Henver Simionato Brunetta; Thayz Rodrigues Chagas** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 09/02/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **10/2015 a 10/2019**

Área: **Ciências Fisiológicas**

Origem:	Biotério Central	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	2 a 4 meses	N:	80
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	200 a 450 g		
Linhagem:	Wistar						
Origem:	CCB - LANDI	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	22 a 140 dias	N:	320
Espécie:	Camundongos isogênicos			Peso:	7 a 35 g		
Linhagem:	CS7BL/6						

Resumo: Nossas metodologias visam testar hipóteses relacionadas à dinâmica do metabolismo sob diferentes intervenções nutricionais e/ou estados fisiopatológicos. Os procedimentos com os animais in vivo se baseiam em desafiar metabolicamente o sistema como um todo, tendo como parâmetros de observação as respostas que esse organismo tem frente a esses estímulos. Sobrecargas orais ou intraperitoneais de glicose, piruvato, insulina e/ou lipídeos serão realizadas com o objetivo de testar nossas hipóteses. Para observar a resposta de um tecido específico, substâncias poderão ser administradas para obter uma resposta isolada de um órgão ou a remoção do mesmo para trabalhos posteriores com as células. É importante destacar que diversos dos procedimentos que serão descritos nesta submissão foram previamente aprovados pela CEUA-UFSC no protocolo PP00782 - Título: METODOLOGIAS UTILIZADAS NO LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÃO DE DOENÇAS CRÔNICAS □ LIDOc / ABORDAGENS ENDÓCRINAS E METABÓLICAS Na submissão atual seguirão atualizações ou inserções de procedimentos experimentais e adição de novos modelos animais de distúrbios metabólicos.

Local do experimento: Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas - Departamento de Ciências Fisiológicas - CCB/UFSC

Florianópolis, 02 de setembro de 2016

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Aderbal Silva Aguiar Júnior
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina