



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO - PPGN

THAYZ RODRIGUES CHAGAS

**EFEITO DA INGESTÃO DE ÓLEOS FONTES DE ÁCIDO
PALMITOLEICO SOBRE O TECIDO ADIPOSEO DE CAMUNDONGOS
ALIMENTADOS COM DIETA DE CAFETERIA**

FLORIANÓPOLIS

2019

Thayz Rodrigues Chagas

**EFEITO DA INGESTÃO DE ÓLEOS FONTES DE ÁCIDO PALMITOLEICO SOBRE
O TECIDO ADIPOSEO DE CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA DE
CAFETERIA**

Tese de doutorado, submetida ao programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Nutrição. Área de concentração: Bioquímica da Nutrição.
Orientador: Prof. Dr. Everson Araújo Nunes.

FLORIANÓPOLIS

2019

Ficha de identificação da obra

Chagas, Thayz Rodrigues

Efeito da ingestão de óleos fontes de ácido palmitoleico sobre o tecido adiposo de camundongos alimentados com dieta de cafeteria / Thayz Rodrigues Chagas ; orientador, Everson Araújo Nunes, 2019.

134 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Nutrição, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Nutrição. 2. Obesidade. 3. Ácido palmitoleico. 4. Óleo de macadâmia. 5. Dieta de cafeteria. I. Nunes, Everson Araújo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. III. Título.

Thayz Rodrigues Chagas

Título: Efeito da ingestão de óleos fontes de ácido palmitoleico sobre o tecido adiposo de camundongos alimentados com dieta de cafeteria

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Fabíola Iagher, Dra.
Universidade Federal do Paraná

Profa. Katya Naliwaiko, Dra.
Universidade Federal do Paraná

Prof. Wagner Luis Reis, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Nutrição.

Profa. Dra. Patrícia Faria Di Pietro
Coordenadora do Programa

Prof. Dr. Everson Araújo Nunes
Orientador

Florianópolis, 28 de junho de 2019.

AGRADECIMENTOS

Escreveu o poeta John Donne que "nenhum homem é uma ilha, um ser inteiro em si mesmo, todo homem é uma partícula do continente, uma parte da terra". Não seria possível fazer esta tese sem que muitas pessoas tivessem, de alguma forma, me auxiliado e se sacrificado por mim, razão pela qual a tese é tributada a todos eles, ainda que os esqueça de nominar. Agradeço primeiramente a Deus por me abençoar e tornar possível o desejo do meu coração. Em especial, agradeço aos meus pais, Homero Rodrigues Chagas e Terezinha Marlene Chagas Parizotto. Agradeço aos meus irmãos Thyago Rodrigues Chagas e Thonny Anderson Rodrigues Chagas, minhas cunhadas Marta Fath e Andreia Arnohld, minha linda sobrinha Luísa Chagas e TODA minha família (de sangue e de coração, família Zanetti, Soares e Miquelito), pelo carinho e apoio, sem vocês eu nada seria. Agradeço especialmente ao meu primo Gabriel Parizotto, minha "prima" Manuela Miquelito e Michel Mocellin (Amo muito vocês! Obrigada por estarem comigo sempre!). Agradeço aos meus irmãos da Congregação Cristã no Brasil, pelas orações e pelos domingos abençoados. Agradeço também aos grandes amigos da pós-graduação, Amanda Marreiro, Natália Engroff, Daniela Hauschild, Bruna Teles, Martha Machado, Amanda Della Giustina, Camila Amaral, Rafaela Grippa e Raquel Angel com quem dividi o caminhar e tive a oportunidade de aprender e se tornaram amigos eternos. Agradeço ao "LIDoC *team*", a qual tive o grande orgulho de fazer parte. Agradeço aos meus "velhos", "novos" e grandes amigos, Kassiano Rotta, Cheila Rotta, Caroline Kuhn, Michael Rocha, Dayanne Borges, Thiago Oliveira, Rogério Bulhões, Vitor Angarten, Gustavo Dias e Aninha, Raisa Leal, Nadia Favretto, Thaís Abatti, Marina Córdova, Bruna Comotti, Julia Ottoni e Maria Angélica pelos "*happy hours*" e pelos ensinamentos que me passam a cada conversa. Agradeço aos professores, Drs. Alex Rafacho, Anicleto Poli, Erasmo Trindade e Dra. Kathya Naliwaiko exemplos de profissionais, dedicação e inteligência que tento seguir diariamente. Agradeço aos professores Drs. Adair Roberto dos Santos Soares e Luis Claudio Fernandes pela abertura, generosidade e disponibilidade estrutural para execução deste projeto. Agradeço a todos os professores e a coordenação do PPGN-UFSC, pelos ensinamentos passados ao longo destes 4 anos e pelo esforço em tornar o PPGN cada vez melhor. São lições que levarei para a vida. Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de uma bolsa de estudos, com a qual foi possível dedicação exclusiva ao doutorado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por acreditar na relevância da proposta e assim financiá-la. Agradeço aos membros da banca de avaliação, Dra. Katya Naliwaiko, Dra. Fabíola Iagher e Dr. Wagner Luis Reis que aceitaram prontamente a participar como membro da banca examinadora para defesa da tese. Agradeço aos animais que fizeram parte deste trabalho. Agradeço ao meu orientador, prof. Dr. Everson Araújo Nunes, pelos ensinamentos e pelo exemplo de seriedade, como professor e pesquisador, aprendi com o senhor a fazer e viver ciência, que o método científico é a mais preciosa ferramenta já desenvolvida pelo intelecto humano, que com esforço, inteligência e habilidade podemos executar nossos projetos. Muito obrigada a todos que contribuíram para a concretização deste trabalho, afinal, o talento vence jogos, mas só o trabalho em equipe ganha campeonatos. A todos deixo de coração, minha eterna gratidão.

RESUMO

CHAGAS, T. R. **Efeito da ingestão de óleos fontes de ácido palmitoleico sobre o tecido adiposo de camundongos alimentados com dieta de cafeteria.** 2019. Tese (doutorado em Nutrição) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

O ácido palmitoleico (AP) é descrito na literatura como uma lipocina capaz de estimular processos metabólicos e desta maneira promover lipólise em adipócitos, atenuar distúrbios imunometabólicos e aumentar a sensibilidade à insulina no músculo esquelético e reduzir o acúmulo de gordura no fígado de camundongos. Assim, nós verificamos se a ingestão de um alimento que contém este ácido graxo (óleo de macadâmia) ou se a ingestão de um óleo enriquecido com 50% deste ácido graxo pode ser uma estratégia terapêutica para mitigar os efeitos de dietas de cafeterias, as quais são mais representativas para tendências alimentares modernas. Para este trabalho, camundongos C57BL/6 foram divididos em quatro grupos: alimentados com uma dieta padrão, alimentados com dieta de cafeteria, alimentados com dieta padrão e suplementados com óleo de macadâmia ou óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico (1g/kg de m.c. por via oral) e um último grupo alimentados com dieta de cafeteria e suplementados com óleo de macadâmia ou óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico, durante 16 semanas. Em um primeiro momento, foram adotados dois modelos experimentais de dietas com diferentes composições (Dieta 1: 47% de kcal dos carboidratos, 39% de kcal de gorduras e 14% de kcal de proteínas e Dieta 2: 54% de kcal de carboidratos, 34% de kcal de gorduras e 12% de kcal de proteínas). Observamos que na dieta 1, a dieta de cafeteria promoveu um aumento da adiposidade visceral, aumento da área dos adipócitos e aumento do colesterol total, sem efeito do óleo de macadâmia. Na dieta 2, a dieta promoveu um aumento do colesterol total e um aumento somente do tecido adiposo retroperitoneal, contudo o óleo de macadâmia promoveu um incremento adicional deste tecido e do tecido epididimal e um aumento do triacilglicerol. Por outro lado, em um segundo momento, a ingestão do óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico, preveniu o aumento do tecido retroperitoneal e epididimal e atenuou alterações metabólicas relacionadas a homeostase glicêmica de camundongos alimentados com uma dieta obesogênica. Portanto, a suplementação com óleo de macadâmia (1g/kg/dia), quando associada com dieta de cafeteria contendo maior percentual de açúcares simples (Dieta 2), promoveu um aumento da gordura visceral. Contudo, a ingestão do óleo enriquecido com ácido palmitoleico concomitante a dieta 1 preveniu o aumento da adiposidade.

Palavras-chave: Ácido palmitoleico, óleo de macadâmia, tecido adiposo, dieta de cafeteria.

ABSTRACT

CHAGAS, T. R. **Effect of ingestion of palmitoleic acid source oils on adipose tissue of cafeteria-fed mice. 2019.** Thesis (Nutrition doctoral) – Nutrition Postgraduate Program, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

Palmitoleic acid (PA) is described in the literature as a lipocin capable of stimulating metabolic processes and thereby promoting lipolysis in adipocytes, attenuating immunometabolic disorders and increasing insulin sensitivity in skeletal muscle and reducing the accumulation of fat in the liver of mice. Thus, we analyzed whether the intake of an edible oil containing this fatty acid (macadamia oil) or whether the ingestion of an oil enriched with 50% of this fatty acid may be a therapeutic strategy to mitigate the effects of cafeteria diets, an experimental model to simulate Western diets. For this work, C57BL/6 mice were divided into four groups: standard diet, cafeteria diet, supplemented with macadamia oil or oil enriched with 50% palmitoleic acid (1g / kg mc orally) and one last group fed a cafeteria diet and supplemented with macadamia oil or oil enriched with 50% palmitoleic acid for 16 weeks. Two experimental models of cafeteria diets with different compositions were used in this study (Diet 1: 47% kcal from carbohydrates, 39% of kcal from fats and 14% of kcal from proteins and diet 2: 54% of kcal from carbohydrates, 34% kcal from fats and 12% of kcal from proteins). We observed that in the model 1, the cafeteria diet promoted an increase of the visceral adiposity, increase of the adipocyte area and increase of total cholesterol, without effect of the macadamia oil ingestion. In the model 2, the diet promoted an increase of total cholesterol and an increase of retroperitoneal adipose tissue only, however macadamia oil promoted an additional increment of this tissue and epididimal tissue and an increase of triacylglycerol. On the other hand, in a second moment, ingestion with an oil enriched with 50% palmitoleic acid, to prevent the increase of the retroperitoneal and epididimal tissue and attenuated metabolic changes related to glycemic homeostasis of mice fed an obesogenic diet. Therefore, supplementation with macadamia oil (1g/kg of b.m./day), when associated with a cafeteria diet containing a higher percentage of simple sugars (diet 2), promoted an increase in visceral fat. However, the ingestion of palmitoleic acid enriched oil concomitant with the cafeteria diet (diet 1) prevented the increase of adiposity.

Palavras-chave: Palmitoleic acid, macadamia oil, adipose tissue, cafeteria diet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos durante a vida.....	24
Figura 2 - Variadas funções biológicas reguladas por adipocinas	29
Figura 3 - Esquema relacionando o impacto da exposição do ácido graxo sobre as respostas celulares, teciduais e mecanismos associados.	35
Figura 4 - Desenho do estudo e procedimentos experimentais	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Termos de busca utilizados para o levantamento bibliográfico de artigos publicados até maio de 2019.	38
Quadro 2 - Estudos relacionados com suplementação de ácido palmitoleico em estudos com diferentes linhagens de células apresentados em ordem cronológica.....	40
Quadro 3 - Estudos relacionados com a suplementação de ácido palmitoleico ou óleo de macadâmia em modelo experimental com animais apresentados em ordem cronológica.	42
Quadro 4 - Estudos relacionados com a suplementação de ácido palmitoleico, óleo ou noz de macadâmia em seres humanos apresentados em ordem cronológica.	45
Quadro 5 - Estudos investigando associações com ácido palmitoleico com diferentes desfechos metabólicos em seres humanos apresentados em ordem cronológica.	47
Quadro 6 - Percentual de ácidos graxos presentes nas dietas a partir da cromatografia líquida de alta performance.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais características dos diferentes tipos de adipócitos.....	22
Tabela 2 - Percentual de calorias de macronutrientes e valor calórico total da dieta padrão e da dieta de cafeteria consumidas pelos camundongos.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AG – Ácidos graxos
- AGL – Ácidos graxos livres
- AGMI – Ácidos graxos monoinsaturados
- AP – Ácido palmitoleico
- AMPK - *AMP-activated protein kinase* (Proteína cinase ativada por AMP),
- ARG1 - Arginase-1
- C/EBP - *CCAAT-enhancer-binding proteins* (Proteínas de ligação potenciadoras CCAAT)
- CD – *Cafeteria diet* (Dieta de cafeteria)
- CAF – Grupo que recebeu dieta de cafeteria e água (1g/m.c./dia)
- CDO - Grupo que recebeu dieta de cafeteria e óleo (1g/m.c./dia)
- CT - Colesterol total
- DCAF – Dieta de cafeteria
- DCNT – Doenças Crônicas Não Transmissíveis
- DCV – Doenças cardiovasculares
- DEXA – Densitometria por dupla emissão de raios-X
- DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2
- DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)
- Foxp3 - *Forkhead box P3*
- GLUT4 - *Glucose transporter 4* (Transportador de glicose 4)
- HDLc - *High-density lipoprotein*
- HFD – *Hight fat diet*
- HIF1 α - Fator indutor de hipóxia alfa
- IFN – *Interferon* (Interferon)
- IGF-1 - *Insulin-like growth factor 1* (Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1)
- IL – Interleucinas
- IMC – Índice de massa corporal
- ipGTT - Teste de tolerância à glicose intraperitoneal
- ipITT - Teste de tolerância à insulina intraperitoneal
- iNOS - *Inducible nitric oxide synthase* (Sintase do óxido nítrico induzível)
- IRF5 - *Interferon regulatory factor 5* (Fator regulador de interferon – 5)
- LPS – Lipopolissacarídeos

MO – Grupo que recebeu dieta padrão e óleo de macadâmia (1g/m.c./dia)

MCP-1 - *Monocyte chemoattractant protein-1* (Proteína quimioatraente de monócitos 1)

MHC-II - *Major histocompatibility complex* (Complexo principal de histocompatibilidade da classe II)

mTOR - *Mammalian target of rapamycin* (Proteína cinase mTOR)

NF- κ B - *Nuclear factor kappa B* (Fator-nuclear kappa B)

O₂ – Oxigênio

OM – Óleo de macadâmia

OMS – Organização Mundial de Saúde

ON - óxido nítrico

PAMPs - *Pathogen-associated molecular pattern* (padrões moleculares associados a patógenos)

PCR - Proteína C-reativa

PFA - Proteínas de fase aguda

PGC-1 α - *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (Coativador do receptor ativado por proliferadores peroxisoma)

PI3K - *Phosphatidylinositide 3-kinases* (fosfatidilinositol 3-cinase)

pO₂ - Pressão parcial de oxigênio

PPAR γ - *Peroxisome proliferator-activated receptor γ* (Receptor ativado por proliferador de peroxisoma γ)

SD - Grupo que recebeu dieta padrão e água (1g/m.c./dia)

SDO – Grupo que recebeu dieta padrão e óleo (1g/m.c./dia)

SREBP1 - *Sterol regulatory element-binding transcription factor 1*

TA – Tecido adiposo

TAB – Tecido adiposo branco

TAM – Tecido adiposo marrom

TGF – *Transforming Growth Factor* (Fator de crescimento transformador)

Th1 - *T helper 1 cells* (Células T1 auxiliaadoras)

TLR – *Toll like receptor* (Receptores tipo Toll-like)

TNF- α - *Tumor necrosis factor- α* (Fator de necrose tumoral α)

Treg – Células T reguladoras

UCP-1 - *Thermogenin ou Uncoupling Protein-1* (Proteínas desacopladoras – 1)

WHO – World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO	16
2.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE A OBESIDADE.....	16
2.2 FATORES ETIOLÓGICOS DA OBESIDADE	17
2.3 TECIDO ADIPOSEO	19
2.4 TECIDO ADIPOSEO BRANCO - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E BIOLÓGICAS	24
2.4.1 Expansão do tecido adiposo: hiperplasia e hipertrofia	24
2.4.4 Hipóxia no tecido adiposo	27
2.4.5 Adipocinas	28
2.4.6 Alterações imunometabólicas no tecido adiposo	30
2.6 MODELO EXPERIMENTAL	32
2.7 ÁCIDOS GRAXOS MONOISATURADOS – NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS.....	34
4 OBJETIVOS	51
4.1 OBJETIVO GERAL.....	51
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
5 HIPÓTESES	52
6 MATERIAIS E MÉTODOS	53
6.2 ESTUDO EXPERIMENTAL.....	53
6.2.1 Animais	53
<i>6.2.1.1 Planejamento estatístico para o cálculo amostral</i>	<i>53</i>
6.2.2 Protocolo experimental e grupos experimentais	53
6.2.4 Consumo de ração e massa corporal	56
6.2.5 Parâmetros metabólicos	56
<i>6.2.5.1 Avaliação da glicose sanguínea em jejum</i>	<i>56</i>
<i>6.2.5.2 Avaliação da tolerância à glicose intraperitoneal (ipgtt)</i>	<i>56</i>
<i>6.2.5.3 Eutanásia dos animais</i>	<i>57</i>
<i>6.2.5.4 Pesagem de órgãos e tecidos</i>	<i>57</i>
<i>6.2.5.5 Análise bioquímica plasmática</i>	<i>57</i>
<i>6.2.5.6 Conteúdo de triacilglicerol e colesterol total hepático</i>	<i>58</i>
<i>6.2.5.7 Análise histológica do tecido adiposo branco</i>	<i>58</i>
<i>6.2.5.8 Determinação do perfil de ácidos graxos das hemácias e tecido adiposo</i>	<i>59</i>

6.2.5.9 <i>Dosagem de citocinas plasmáticas e tecido adiposo</i>	60
6.2.6 Tratamento e análise dos dados	60
7 RESULTADOS	62
7.1 MANUSCRITO 1	62
7.2 MANUSCRITO 2	90
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
9 REFERÊNCIAS	115

1 INTRODUÇÃO

Segundo a organização mundial da saúde (OMS) sobrepeso e obesidade são definidos como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura, que podem apresentar risco a saúde, sendo assim, principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas e aumento da mortalidade (OMS, 2019). De acordo com um relatório da OMS publicado no ano de 2016, mais de 1,9 bilhões de adultos apresentam excesso de peso, destes, 650 milhões têm obesidade (OMS, 2019).

Alguns estudos sugerem que o consumo excessivo de energia alimentar ou uma dieta rica em gordura saturada pode estimular o desenvolvimento da obesidade e desencadear alterações imunometabólicas relacionadas com o tecido adiposo (SCHUTZ, FLATT, JEQUIER, 1989; VANDEVIJVERE, 2015).

Considerando que a dieta típica dos países ocidentais é rico em gordura, camundongos alimentados com dieta de cafeteria (diferente de modelos hiperlipídicos que são mais agressivos e lipotóxicos), fornecem um modelo mais representativo para se investigar a dieta humana, possibilitando, um modelo de indução de obesidade adequado para identificar intervenções preventivas e terapêuticas no tratamento da obesidade humana (HIGA et al., 2014; TANG et al., 2012; OBICI et al., 2012).

Por outro lado, outros estudos demonstraram que uma dieta com maior quantidade de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) podem auxiliar no controle do peso corporal, se tornando uma estratégia eficaz para o controle de distúrbios metabólicos induzidos pelo excesso de ingestão calórica (ARAPOSTATHI et al., 2011; GILLINGHAM, HARRIS-JANZ, JONES, 2011).

Neste contexto, o ácido palmitoleico (C16:1n-7), recebeu interesse significativo na última década, começando com a sua descrição como uma lipocina, ou seja, um mensageiro lipídico liberado no tecido adiposo com ação biológica similar a de hormônios, capaz de aumentar a sensibilidade à insulina no músculo esquelético e reduzir o acúmulo de gordura no fígado de camundongos (CAO et al., 2008).

Entretanto, este ácido graxo é pouco obtido pela dieta, sendo encontrado em maior abundância no óleo da noz de macadâmia (~17-22%) e espinheira do mar (~43%) (CALDER, 2015; MAGUIRE et al., 2004).

A maioria dos estudos publicados até o momento, investigando o potencial efeito deste ácido graxo sobre a adiposidade, utilizaram o ácido palmitoleico isolado (AP), e seguiam diferentes protocolos. Alguns estudos observaram a redução da inflamação em adipócitos incubados com 250 μM de AP, apresentando menor expressão de genes relacionados à via do TLR4 (Receptores tipo *Toll-like* 4) (SHAW et al., 2013), enquanto macrófagos expostos ao ácido palmitoleico (600 μM) apresentaram menor expressão de genes e citocinas inflamatórias (SOUZA et al., 2017).

Outros estudos em cultura de adipócitos mostraram maior fosforilação de AMPK (Proteína cinase ativada por AMP) quando expostas ao ácido palmitoleico (200 μM e 0,5mM), promovendo um aumento da lipólise e do metabolismo oxidativo (BOLSONI-LOPES et al., 2013; CHAN et al., 2015).

Estudos com animais demonstraram que o tratamento com ácido palmitoleico (300 mg/kg/dia) durante 10 dias, concomitante a ingestão de HFD (*Hight fat diet*) aumentou a massa do tecido adiposo epididimal (eWAT) retroperitoneal (rWAT) assim como o índice de adiposidade, apesar do aumento destes tecidos, houve a atenuação de distúrbios imunometabólicos nestes camundongos (SOUZA et al., 2014).

Outro estudo realizado com camundongos, utilizando a mesma dose e tempo não observou diferenças nas massas destes tecidos, mas demonstrou que o AP modulou funções metabólicas no fígado e tecido adiposo, contudo, estes camundongos não estavam submetidos a um ambiente obesogênico (BOLSONI-LOPES, 2013).

Um único estudo publicado até o momento, demonstrou que a suplementação (2 g/kg/de peso corporal) com óleo de macadâmia (OM) três vezes por semana, durante 12 semanas, reduziu a hipertrofia do tecido adiposo em camundongos alimentados com HFD quando comparado com o grupo que recebeu dieta padrão, apesar deste resultado, foi observado um incremento na massa do eWAT e rWAT, no grupo que ingeriu a HFD concomitante ao OM quando comparado com o grupo que ingeriu somente HFD (LIMA et al., 2014).

Embora a relação entre a ingestão de alimentos energéticos e obesidade seja bem conhecida, os efeitos da ingestão do óleo de macadâmia, como fonte principal de ácido palmitoleico ou um óleo enriquecido com 50% deste ácido graxo sobre o tecido adiposo visceral de camundongos expostos a dieta de cafeteria, não foram explorados, além disso, nenhum destes estudos avaliou o perfil de ácidos graxos das hemácias ou tecido adiposo que representam importantes indicadores exógeno e endógeno.

Assim, neste estudo nós avaliamos o efeito da ingestão de dois óleos que apresentam quantidades diferentes de ácido palmitoleico (22% e 50%) sobre a adiposidade de camundongos C57BL/6 expostos a dieta de cafeteria.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE A OBESIDADE

A obesidade é definida como acúmulo anormal ou excessivo de gordura, podendo apresentar risco à saúde, sendo caracterizada, como uma doença crônica de natureza multifatorial, dentre os quais estão os fatores ambientais, nutricionais e genéticos (BRASIL, 2007). Em 1948 a Organização Mundial de Saúde (OMS) caracterizou a obesidade como um estado de “doença” (JAMES, 2008).

Em estudos epidemiológicos, o diagnóstico do estado nutricional de adultos é feito a partir do Índice de Massa Corporal (IMC), obtido pela divisão do peso, medido em quilogramas, pela altura ao quadrado, medida em metros (kg/m^2) (OMS, 1995). Desta maneira, o sobrepeso é diagnosticado quando o IMC alcança valor igual ou superior a $25 \text{ kg}/\text{m}^2$, enquanto a obesidade é diagnosticada com valor de IMC igual ou superior a $30 \text{ kg}/\text{m}^2$ (OMS, 1995).

Considerando esta ferramenta de diagnóstico, os dados publicados pela OMS no ano de 2016, demonstraram que mais de 1,9 bilhões de adultos apresentaram excesso de peso, destes, 650 milhões tinham obesidade (OMS, 2016).

Devido a importância destas condições físicas, um estudo multicêntrico, realizado através da coleta de dados de voluntários adultos e idosos, entre os anos 1990 à 2010 em 21 países, verificou que o sobrepeso e a obesidade poderiam causar 3,4 milhões de mortes e diminuir em 4% os anos de vida, assim como diminuir (no mesmo percentual) os anos de vida ajustados por incapacidade física (LIM, et al., 2010).

Pelo menos 2,8 milhões de pessoas por ano morrem em consequência das doenças relacionadas com a obesidade, sendo esta, considerada a principal causa de morte que poderia ser evitável, provocando um problema econômico global (MISRA, KHURANA, 2008; FINKELSTEIN et al., 2009; JIA, LUBETKIN, 2010).

Outro estudo epidemiológico demonstrou que o número de pessoas com sobrepeso e obesidade aumentou globalmente de 857 milhões em 1980 para 2,1 bilhões em 2013 (NG et al., 2014). Neste estudo, os pesquisadores realizaram uma análise de tendência abrangente da prevalência global do sobrepeso e obesidade em adultos e crianças, entre 1980 e 2013, em 188 países, sendo que o Brasil se encontrava na quinta posição com maior número de obesos (NG et al., 2014). Foi observado que em países desenvolvidos ou em desenvolvimento, os homens

apresentaram maior prevalência para obesidade, principalmente entre adultos de 20 a 40 anos (NG et al., 2014).

Para complementar o estudo acima, os dados da Vigitel publicados no ano de 2017, demonstraram que 54% dos brasileiros estavam acima do peso, sendo maior entre homens (57,3%) do que entre mulheres (51,2%). A frequência de adultos obesos foi de 18,9%, sem diferença entre os sexos. Em ambos os sexos, a frequência da obesidade foi menor nos adultos com até 34 anos de idade (VIGITEL, 2017).

Dentre todas as capitais brasileiras e o Distrito Federal, Florianópolis apresenta 15% de adultos com obesidade (VIGITEL, 2017).

Neste contexto, sobrepeso e obesidade são considerados importantes fatores de risco para uma série de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), incluindo diabetes tipo II (DM2), doenças cardiovasculares e câncer, além de outras complicações como artrose, colelitíase, artrite, cansaço e refluxo esofágico (ABALLAY et al., 2013; NG et al., 2014).

2.2 FATORES ETIOLÓGICOS DA OBESIDADE

A partir da segunda metade do Século XX, ambientes favoráveis à ocorrência de desnutrição e doenças infecciosas têm sido gradativamente substituídos por um cenário obesogênico, apropriado para ocorrência de DCNT relacionadas ao consumo excessivo e/ou inadequado de alimentos e à prática insuficiente de atividade física (WHO, 2003). Tal cenário pode ser observado em países desenvolvidos ou em desenvolvimento, incluindo o Brasil (POPKIN, GORDON-LARSEN, 2004).

Estudos sobre a tendência de mudanças nos padrões alimentares da população brasileira nas últimas décadas indicam a elevação do consumo de alimentos processados e industrializados e redução do consumo de fibras como, leguminosas, raízes, tubérculos, frutas e hortaliças (LEVY-COSTA et al., 2005; LEVY-COSTA et al., 2012). As principais alterações observadas, foram no aumento do consumo de alimentos com alto valor energético, baixo teor de nutrientes e altos teores de sódio e de gorduras saturadas, gorduras *trans* e carboidratos refinados (LEVY-COSTA et al., 2005; LEVY-COSTA et al., 2012).

Um estudo realizado por Pereira e colaboradores, utilizando os dados de consumo alimentar da população brasileira, coletados pela Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) de 2008-2009 demonstrou um aumento do consumo de gordura saturada, açúcares simples, alimentos processados e diminuição na disponibilidade e consumo de alimentos minimamente

processados em comparação com a POF anterior (2002-2003) (PEREIRA et al., 2012; MONTEIRO et al., 2010) destacando a grande participação das carnes vermelhas, óleos, gorduras, refrigerantes, doces, pão branco, bebidas alcoólicas e refeições prontas (ENES, SILVA, 2009).

Em concordância com os dados acima, outro estudo, realizado por Claro e colaboradores no ano de 2013, observou que adultos brasileiros apresentaram excesso no consumo de alimentos fonte de gordura saturada, industrializados, processados e ultra processados (CLARO et al., 2013).

O consumo de açúcar da população brasileira excede em mais de 50% o limite máximo recomendado pela OMS, de 10% das calorias totais (WHO, 2013; LEVY, CLARO, MONTEIRO, 2012). A frequência do consumo de refrigerantes e sucos artificiais é semelhante ao observado nos Estados Unidos da América em 2011, que foi de 26,3% (KUMAR et al., 2014). Tais evidências reforçam para o aumento do consumo de gordura saturada e açúcares livres no padrão do consumo alimentar da população brasileira (LEVY, CLARO, MONTEIRO, 2010).

Aliado a estes fatores, a frequência da prática de atividade física no tempo livre (equivalente a 150 minutos de atividade moderada por semana) foi de 37%, sendo maior entre homens (43,4%) do que entre mulheres (31,5%) (VIGITEL, 2017).

Além do consumo excessivo e/ou inadequado de alimentos, associado a prática insuficiente de atividade física, sugere-se que o desenvolvimento da obesidade poderia ter origem nos primeiros estágios da vida, isto é, durante o período fetal, por consequência de um mecanismo de programação, estimulando numerosos processos nutricionais, hormonais, físicos e psicológicos, que irão agir em períodos críticos da vida e definirão certas funções fisiológicas (TOUNIAN, 2011).

Portanto, não há dúvida de que a obesidade é uma doença crônica, complexa e multifacetada, relacionada com diferentes fatores etiológicos, incluindo componentes genéticos e endócrinos (VAN DER KLAAUW, FAROQI, 2015).

Como descrito anteriormente, o IMC, é a ferramenta mais utilizada para diagnosticar a obesidade em estudos populacionais, entretanto, esta técnica é apenas um substituto para avaliação da adiposidade corporal, pois não fornece uma medição precisa da composição corporal (PRENTICE, 2001).

Neste sentido, o desenvolvimento de ferramentas para aferir com maior precisão a composição corporal, incluindo a densitometria por dupla emissão de raios-X (DEXA),

pletismografia por deslocamento de ar ou bioimpedância elétrica, permitiram a classificação dos indivíduos de acordo com um grau aproximado para sua verdadeira adiposidade (BLUNDELL et al., 2014).

Os pontos de corte, frequentemente utilizados na literatura para avaliar o percentual de gordura corporal para classificação de sobrepeso são de, 20,1 à 24,9% para homens e 30,1 à 34,9% para mulheres e para a classificação de obesidade é de $\geq 25\%$ para os homens e $\geq 35\%$ para mulheres (WELLENS et al., 1996; GALLAGHER et al., 2000; DEURENBERG et al., 2001; BOSY-WESTPHAL et al., 2006; ROMERO-CORRAL et al., 2007; ROMERO-CORRAL et al., 2008; OKORODUDU et al., 2010).

Além da quantidade de gordura corporal, a distribuição desta gordura no organismo, também é importante para o desenvolvimento de patologias associadas com a obesidade (RODRÍGUEZ et al., 2007).

Assim, nas últimas décadas, alguns mecanismos moleculares e bioquímicos relacionados com as alterações da massa do tecido adiposo foram identificados e vem sendo utilizados para o entendimento dos fatores relacionados com o desenvolvimento destes tecidos que orquestram a homeostase energética (MUELLER, 2014).

2.3 TECIDO ADIPOSEO

Até o final de 1980, o tecido adiposo (TA) foi considerado um simples órgão de armazenamento energético (na forma de triacilglicerol), isolante térmico e protetor de órgãos contra danos mecânicos (ZHANG et al., 1994).

Posteriormente, algumas evidências (principalmente a partir da identificação da leptina em 1994) definiram este tecido como um importante órgão endócrino, capaz de secretar diferentes hormônios e citocinas, podendo influenciar o metabolismo sistêmico e desta forma, organizar a adaptação sistêmica às mudanças na disponibilidade de nutrientes (ZHANG et al., 1994; ; KERSHAW; FLIER, 2004; TRAYHURN, 2007; GUILHERME, 2008).

O tecido adiposo branco (TAB), ou unilocular, apresenta em seu interior, uma grande quantidade de lipídios, suas células apresentam forma de esfera, e desempenham importantes funções no armazenamento energético, bem como outras funções vitais, como a regulação do metabolismo, imunidade, resposta à lesão ou a produção de hormônios, citocinas inflamatórias e quimiocinas (OUCHI et al., 2011).

Este tecido é dividido em dois depósitos principais: gordura visceral e gordura subcutânea, que diferem no perfil da expressão gênica e origem embrionária (BERRY et al., 2013; CHAU et al., 2014; GERHARD et al., 2014).

O depósito subcutâneo apresenta algumas funções, incluindo o armazenamento de lipídios, secreção de adipocinas, como a leptina e adiponectina com efeitos metabólicos, dentre eles, a oxidação lipídica, aumento da ação da insulina e funções anti-inflamatórias (MA et al., 2015).

Em contraste, a gordura visceral em quantidade aumentada, está associada à síndrome metabólica, resistência à insulina e complicações cardiometabólicas (MATHIEU et al., 2010).

Os diferentes efeitos dos depósitos de gorduras subcutânea e visceral, são exemplificados pelas características do vírus da imunodeficiência humana, associados à lipodistrofia (CARR et al., 1998). Esta síndrome é caracterizada pela perda da gordura subcutânea (lipoatrofia) em detrimento do aumento da gordura visceral (lipohipertrofia), que está associada com o aumento do risco de desenvolver doença cardiovascular (DCV) e DM2 (BEVILACQUA et al., 2009; ALVES et al., 2014; FINKELSTEIN et al., 2015).

A função da gordura subcutânea é alterada em pessoas obesas, onde a massa excessiva desta gordura ocorre junto com disfunção tecidual, hipertrofia dos adipócitos, e a diminuição da adipogênese e angiogênese (PATEL; ABATE, 2013).

O tecido adiposo é composto principalmente por adipócitos (que compreendem aproximadamente 35 a 70% da massa adiposa (FRÜHBECK, 2008), e, em menor quantidade, por frações do estroma vascular que incluem pré-adipócitos, células-tronco, parede vascular, células endoteliais, macrófagos (ETO et al., 2013), linfócitos (LOLMEDE et al., 2011), eosinófilos (SCHIPPER et al., 2012), neutrófilos (ELGAZAR-CARMON et al., 2008), mastócitos (ANDERSON et al., 2010), e células progenitoras hematopoiéticas (DE TONI et al., 2011).

A capacidade do TA de se expandir ou reduzir depende principalmente dos adipócitos, pré-adipócitos e células-tronco com capacidade regenerativa (BAPTISTA et al., 2015). Em consequência, a obesidade está associada com o aumento da massa do TAB pelo aumento do número e tamanho dos adipócitos (SPALDING et al., 2008).

Os pré-adipócitos localizados dentro do TA, podem se diferenciar em adipócitos maduros durante toda a vida, permitindo a expansão do tecido para um maior armazenamento, quando necessário (GRAY; VIDAL-PUIG, 2007).

Adipócitos maduros, normalmente aumentam o tamanho durante períodos de balanço energético positivo, como na alimentação excessiva e estilo de vida sedentário, causando hipertrofia (GRAY; VIDAL-PUIG, 2007). A expansão patológica do TA durante o ganho de peso é acompanhada por fibrose e inflamação, que, em última instância, promovem alterações metabólicas associadas à obesidade (GRAY; VIDAL-PUIG, 2007).

Nos últimos anos vem sendo discutido sobre a descoberta de um perfil de adipócitos que induzem a processos termogênicos, chamados adipócitos bege (do inglês, "brite" ou "marrom-like" ou "inducible Brown") que em condições basais, apresentam baixa quantidade de moléculas tipo proteínas desacopladoras – 1 (UCP-1 do inglês: *Thermogenin* ou *Uncoupling Protein-1*, esta molécula atua interrompendo ou desacoplando o fluxo de elétrons da cadeia respiratória, gerando calor), entretanto, quando estimulados, promovem o aumento na expressão desta molécula, gerando maior consumo de energia (HARMS; SEALE, 2013, GIRALT; VILLARROYA, 2013).

A origem dos adipócitos bege residentes no TAB vem sendo foco de grande debate na literatura (KIM; PLUTZKY, 2016). Os adipócitos bege, assim como os brancos, são provenientes do TAB, porém, acredita-se que surgem a partir de um tipo de células precursoras diferentes (WU et al., 2012).

O tecido adiposo bege pode exercer atividade tanto como adipócito branco ou como adipócito marrom, dependendo dos estímulos ambientais, como por exemplo, temperaturas frias e sinalização β -adrenérgica são dois fortes estímulos para o desacoplamento mitocondrial de ambos os adipócitos, bege e marrom, contudo, cada tipo de adipócito pode ter um progenitor distinto (HARMS; SEALE, 2013).

Em um estudo publicado no ano de 2014, foi destacado, que os adipócitos bege poderiam estar estreitamente relacionados com o tecido muscular liso, no entanto, o preciso desenvolvimento da ascendência de cada linhagem ainda não está esclarecido (LONG et al., 2014).

O tecido adiposo marrom (TAM) ou multilocular, é outro tipo de TA existente em mamíferos, é constituído por diversas gotículas (vacúolos) de gordura, que se espalham por todo o citoplasma e suas células são menores que as do TAB (HARMS; SEALE, 2013).

Ressalta-se que o TAB e TAM eram os únicos tipos de adipócitos conhecidos antes da recente descoberta do bege (LONG et al., 2014). Contudo, o TAM também está envolvido com a manutenção da homeostase metabólica, particularmente, é mais abundante em recém-nascidos, entre suas características, destaca-se a alta vascularização, rico em mitocôndrias e

com elevado número de moléculas UCP-1, além de sua função termogênica, o TAM contribui para o metabolismo sistêmico em virtude da razão do alto gasto energético (SHIMIZU et al., 2015).

Desta forma, o TAM apresenta basicamente funções distintas ao TAB, ou seja, é especializado na produção de calor (termogênese), enquanto o TAB armazena o excesso de energia em forma de triacilglicerol (SAELY et al., 2012) conforme pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1 - Principais características dos diferentes tipos de adipócitos.

ADIPÓCITO	FUNÇÕES PRIMÁRIAS	MORFOLOGIA DAS GOTÍCULAS DE LIPÍDIOS	DEPÓSITO / LOCAL (FREQUENTEMENTE EM CAMUNDONGOS)	RELAÇÃO DA LINHAGEM
Branco	Estoque lipídico	Unilocular	Subcutâneo (inguinal) visceral (epidídimo, mesentérico, retroperitoneal)	Controverso (podem derivar de células tronco mesenquimais)
Bege	Estoque lipídico e desacoplamento mitocondrial	Multilocular	Dispersos dentro do tecido adiposo branco Depósitos de tecido Subcutânea > visceral (inguinal)	Relacionado com o tecido muscular liso (?)
Marrom	Desacoplamento mitocondrial	Multilocular	Interescapular e pescoço (interescapular até a idade adulta)	Relacionado com o músculo esquelético

Adaptado de Di Spirito; Mathis, 2015.

Alguns autores relatam que quantidades aumentadas de TAM estão relacionadas com menor peso corporal, entretanto, este tecido está presente em menor proporção nos adultos, considerando que este tecido diminui, assim como sua atividade funcional, com o processo de envelhecimento e quando o peso corporal aumenta, como na obesidade (SAELY et al., 2012; PENG et al., 2015; SHIMIZU et al., 2015).

A medida que envelhecemos a adiposidade e especialmente o percentual de gordura corporal aumentam, enquanto a massa magra e a densidade mineral óssea diminuem (ENZI et al., 1986). Outra mudança importante é que a massa de gordura tende a ser preferencialmente distribuída na região abdominal, um fenômeno reconhecido em ambos os sexos e tem sido associado com a resistência à insulina e maior risco de desenvolver doenças cardiovasculares, DM2 e câncer (KOHRT, HOLLOSZY, 1995; BARZILAI, GUPTA, 1999; ST-ONGE, 2005; SANCHIS-GOMAR et al., 2015).

O envelhecimento também promove a redistribuição de gordura fora dos reservatórios normais do TA, com a acumulação ectópica de lipídios ocorrendo não somente em depósitos viscerais, mas também no fígado ou músculo, entre outros tecidos e órgãos (TCHKONIA et al., 2013). Este fenômeno está relacionado a um maior risco de desenvolver distúrbios cardiometabólicos (SHIMIZU et al., 2015).

A massa do tecido adiposo é determinada pelo balanço energético entre o estoque líquido de gordura nos adipócitos (originalmente dos lipídios da dieta (exógeno) ou por precursores não lipídicos, principalmente, carboidratos) e a oxidação da gordura total (SCHUTZ, 2004).

Todavia, o balanço entre a gordura estocada e oxidada é progressivamente interrompida durante o envelhecimento, com a capacidade dos tecidos de oxidar gordura diminuindo gradativamente (ENZI et al., 1986). O aumento da adiposidade no envelhecimento pode também ser devido, a um balanço energético crônico positivo durante toda a vida associada à diminuição da atividade física e a taxa metabólica basal, que não foi acompanhada por reduções proporcionais do consumo energético (ENZI et al., 1986).

Está bem estabelecido na literatura, que o risco de desenvolver um quadro de obesidade, aumenta com a idade (VILLAREAL et al., 2005; CANNING et al., 2014). Por outro lado, a obesidade e os distúrbios metabólicos, relacionados com esta situação clínica podem acelerar o processo de envelhecimento e levar à mortalidade precoce (AHIMA et al., 2000; TZANETAKOU et al., 2012). Ambas condições, obesidade e envelhecimento, estão associados com o risco aumentado de desenvolver doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, dislipidemia, hipertensão e mortalidade (NORTH, SINCLAIR, 2012; CHEN, TSENG, 2013).

A obesidade e o envelhecimento também compartilham uma associação com inflamação de baixo grau, resistência à insulina, concentrações aumentadas de proteínas pró-coagulantes no local do tecido e sistemicamente, bem como a deposição ectópica de lipídio, com subsequente lipotoxicidade (XU et al., 2003).

A capacidade do TA de conseguir aumentar através da expansão dos adipócitos existentes (aumento do tamanho das células - hipertrofia) e/ou proliferar e diferenciar novos adipócitos (aumento no número de células - hiperplasia), por sua elasticidade, o torna “singular”, além disso, a contribuição de cada processo e como isso ocorre quando são utilizados modelos de dietas que induzem a obesidade é uma área em curso e de intenso debate (TCHKONIA et al., 2013).

2.4 TECIDO ADIPOSEO BRANCO - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E BIOLÓGICAS

2.4.1 Expansão do tecido adiposo: hiperplasia e hipertrofia

O crescimento do TA é um processo biológico fortemente regulado, uma vez que, tanto o excesso (sobrepeso e obesidade) quanto a parcial ou total ausência (lipodistrofia) de tecido estão associados com distúrbios metabólicos (ARNER et al., 2010). A massa do TA é determinada por dois mecanismos singulares descritos anteriormente: hipertrofia e hiperplasia (ARNER et al., 2010).

Os progenitores das células de gordura são definidos durante o período pré-natal, por conseguinte, o número de adipócitos aumenta após o nascimento e durante a adolescência, que representam períodos críticos para o subsequente desenvolvimento da obesidade, entretanto esta condição pode variar um pouco durante a vida adulta, onde o TA cresce principalmente por hipertrofia dos adipócitos, como pode ser observado na figura 1 (SPALDING et al., 2008; ARNER et al, 2013).

Figura 1 - Hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos durante a vida.

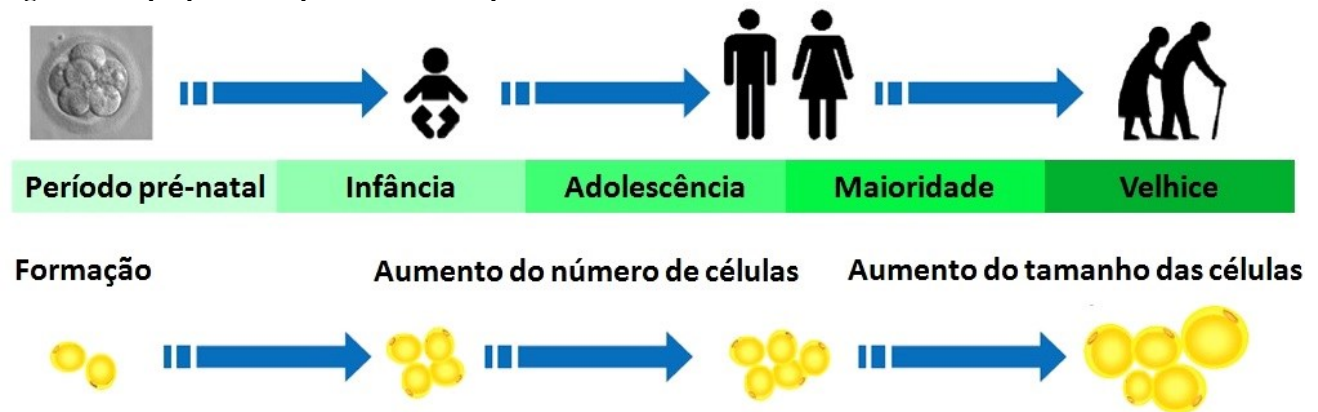


Fig. 1 - Células progenitoras do tecido adiposo se originam no período pré-natal. Durante a infância e adolescência, o tecido adiposo cresce principalmente pelo aumento do número de adipócitos (hiperplasia), sobretudo, após o nascimento e no período pré-púbere. A proliferação dos adipócitos diminui durante a adolescência e permanece estável durante a idade adulta, quando inicialmente o tecido adiposo se expande pelo aumento do tamanho dos adipócitos (hipertrofia). Traduzido e adaptado de Amaia et al., 2015.

Pode-se questionar se a obesidade é o resultado da hipertrofia ou hiperplasia, portanto, é importante destacar que a hipertrofia é o principal contribuinte para a expansão do tecido adiposo, a fim de satisfazer a necessidade do acúmulo de gordura com a progressão da obesidade. Enquanto a hiperplasia contribui menos com este aumento, porque este processo

normamente ocorre em células pequenas com menor capacidade de armazenamento de gordura (JO et al., 2009; HEINONEN et al., 2014).

Contudo, na obesidade, a hiperplasia pode ser correlacionada com propriedades metabólicas menos agressivas ao organismo, enquanto a hipertrofia está associada com o desenvolvimento de distúrbios imunometabólicos e aumento do risco de desenvolver doenças cardiovasculares (ARNER et al., 2010; HEINONEN et al., 2014; HOFFSTEDT et al., 2010). Neste sentido, sugere-se que a hipertrofia na gordura visceral é metabolicamente mais ativa do que na gordura subcutânea (TCHOUKALOVA et al., 2010).

Na adipogênese, pré-adipócitos se diferenciam em adipócitos em resposta ao fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) lipídios, glicocorticoides, grelina entre outros sinais (RODRÍGUEZ et al., 2009; ROSEN et al., 2000). Estes fatores estimulam uma cascata de proteínas sinalizadoras envolvendo a C/EBP (Proteínas de ligação potenciadoras CCAAT), PPAR γ (Receptor ativado por proliferadores de peroxisoma γ), SREBP-1 (proteínas de ligação de elemento regulador de esterol 1-c) e outros fatores de transcrição a aumentar a expressão de genes específicos em células adiposas (TCHOUKALOVA et al., 2010).

Na hipertrofia, o volume dos adipócitos aumentam pela acumulação excessiva de triacilglicerol, resultado da esterificação de três ácidos graxos livres (AGL) com um glicerol 3-fosfato (denominada lipogênese) sobre circunstâncias de um balanço energético positivo, como o excesso calórico, ou excesso de ácidos graxos saturados (por exemplo, ácido palmítico, ácido esteárico) associado a um estilo de vida sedentário (FRÜHBECK et al., 2014).

Por outro lado, dietas ricas em carboidratos simples, promovem o estímulo de vias metabólicas que fornecem substratos e estimulam a síntese de enzimas lipogênicas para a formação de ácidos graxos, chamada, lipogênese de novo (AMEER et al., 2014). Adicionalmente, a glicose “*per se*” pode promover a lipogênese pelo estímulo da secreção de insulina no pâncreas e pelo aumento da captação de glicose através da translocação do transportador de glicose 4 (GLUT4, do inglês *glucose transporter 4*) do citoplasma para a membrana plasmática (HANEY et al, 1991; AMEER et al., 2014).

Neste sentido, Gustafson e colaboradores (2015) descrevem que a insulina participa como um importante regulador da hipertrofia nos adipócitos, mas não da hiperplasia, uma vez que são encontrados baixos níveis do receptor da insulina em pré-adipócitos (GUSTAFSON et al, 2015).

Fatores transcricionais relacionados com a lipogênese neste tecido, estão associados com a ativação do PPAR γ que estimulará a diferenciação dos adipócitos e estoque de ácidos graxos ou inibição de genes que induzem a lipólise e a liberação de ácidos graxos livres (COCK, HOUTEN, AUWERX, 2004). Estímulo da proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidratos (ChREBP) que promove a atividade de enzimas lipogênicas e estimula a expressão gênica dessas enzimas envolvidas na lipogênese de novo. Receptores X do fígado (LXRs) que regulam a expressão de genes e enzimas envolvidas no metabolismo do colesterol e na síntese de ácidos graxos, como por exemplo, nas SREBP1-c, ácido graxo sintase (FAS), esteroil-CoA desaturase-1 (SCD-1), Acetil-CoA carboxilase (ACC) (REPA et al., 2000; FLOWERS, NTAMBI, 2009; HERMAN et al., 2012).

Particularmente, a expressão do SREBP-1c está elevado em condições de alta ingestão energética, conseqüentemente, os níveis deste fator de transcrição e lipogênese são reforçados no fígado e TA (SHIMANO, 2009; YABE et al., 2003).

O SREBP-1c ativa a lipogênese mediada por insulina, enquanto o glucagon, proteína cinase A e proteína cinase ativada por AMP (AMPK) inibem o SREBP-1c. Assim, os níveis de glicose no plasma afetam a expressão de enzimas lipogênicas por estímulo da liberação de insulina e inibição da liberação de glucagon pelo pâncreas. O efeito da insulina sobre a expressão de genes lipogênicos é regulado via SREBP-1c em hepatócitos e adipócitos (AMEER et al., 2014).

Além de papel chave na regulação da expressão gênica de enzimas lipogênicas, o SREBP-1 regula a deposição de triacilgliceróis no fígado. Contudo, distúrbios no balanço energético estimulam a ativação do SREBP-1c, desencadeando uma lipotoxicidade em vários tecidos (YAHAGI et al., 2002). Tem sido relatado que o SREBP-1c está envolvido na esteatose hepática e disfunção das células- β pancreáticas (YAHAGI et al., 2002; TAKAHASHI et al., 2005).

Em conjunto, estes fatores, demonstram a importância da capacidade do TA em estocar ácidos graxos, como um mecanismo de defesa para prevenir a lipotoxicidade em outros tecidos que possam desencadear disfunções imunometabólicas (MINEHIRA et al., 2004). Uma vez que a capacidade de defesa do TA pode estar prejudicada na obesidade, limitando o desenvolvimento adicional de massa de gordura (ORTEGA et al., 2010).

Assim, mudanças na capacidade de armazenamento e mobilização lipídica nos adipócitos, representam elementos importantes para a disfunção metabólica do organismo (AMEER et al., 2014).

Em pacientes obesos, o aumento do tamanho dos adipócitos, principalmente da gordura visceral, está associado com a função mitocondrial prejudicada, mutações nas proteínas de membrana, aumento da morte celular e inflamação, que contribuem para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos associados com a obesidade, como dislipidemias e alterações no metabolismo da glicose e a resistência à insulina (HEINONEN et al., 2014; HOFFSTEDT et al., 2010).

2.4.4 Hipóxia no tecido adiposo

A hipóxia dentro do TA, associada com a resposta inflamatória exacerbada, pode conduzir a doenças relacionadas com a obesidade (TRAYHURN; WANG; WOOD, 2008, TRAYHURN; WOOD, 2004).

Parte da base para utilização desta definição se deve à limitada vascularização do tecido adiposo na obesidade e à observação de que o fluxo sanguíneo para o tecido não aumenta em pessoas obesas (SKURK et al., 2007). Ou ainda, em detrimento da hipertrofia, os adipócitos podem apresentar diâmetro semelhante ou maior do que a distância normal da difusão do oxigênio sobre o tecido. Diante disso, a pressão parcial de oxigênio (pO_2) pode ser próximo de zero à $100\mu\text{m}$ do fornecimento de sangue (SKURK et al., 2007, BRAHIMI-HORN; POUYSSÉGUR, 2007).

Alguns estudos em modelos experimentais com animais demonstraram redução (de três à cinco vezes) da pO_2 no TA retroperitoneal de camundongos obesos (ob/ob) ou alimentados com uma dieta rica em gordura, quando comparados com camundongos magros (YE et al., 2007, RAUSCH et al., 2008, SUN et al., 2013).

Em um destes estudos citados acima, utilizando modelo de obesidade e técnicas de imunocoloração, foi demonstrado que os macrófagos recrutados no TA estão localizados nas áreas de hipóxia do tecido (RAUSCH et al., 2008), demonstrando uma associação direta entre a hipóxia e inflamação, uma vez que o principal papel dos macrófagos nos depósitos de gordura é digerir adipócitos mortos ou que estejam em processo de degradação, sugerindo uma relação entre a diminuição de O_2 (oxigênio), apoptose e sobrevivência celular (CINTI et al., 2008).

Outras características incluem o aumento das concentrações de lactato, assim como o aumento da expressão do gene que codifica o transportador de glicose 1 (GLUT1) que é amplamente utilizado como um marcador molecular de hipóxia, uma vez que a expressão

deste gene é estimulada pela diminuição de pO_2 (HOSOGAI et al., 2007, RAUSCH et al., 2008, YE et al., 2007).

Além disso, existe o aumento na quantidade do fator indutor de hipóxia alfa (HIF-1 α) que está envolvido na resposta celular a hipóxia, além de codificar proteínas envolvidas numa multiplicidade de processos celulares, incluindo a utilização de glicose, inflamação, metabolismo da matriz extracelular e apoptose (RAUSCH et al., 2008, YE et al., 2007, SEMENZA, 2003, HOPFL, OGUNSHOLA, GASSMANN, 2004, KENNETH; ROCHA, 2008, ROCHA, 2007).

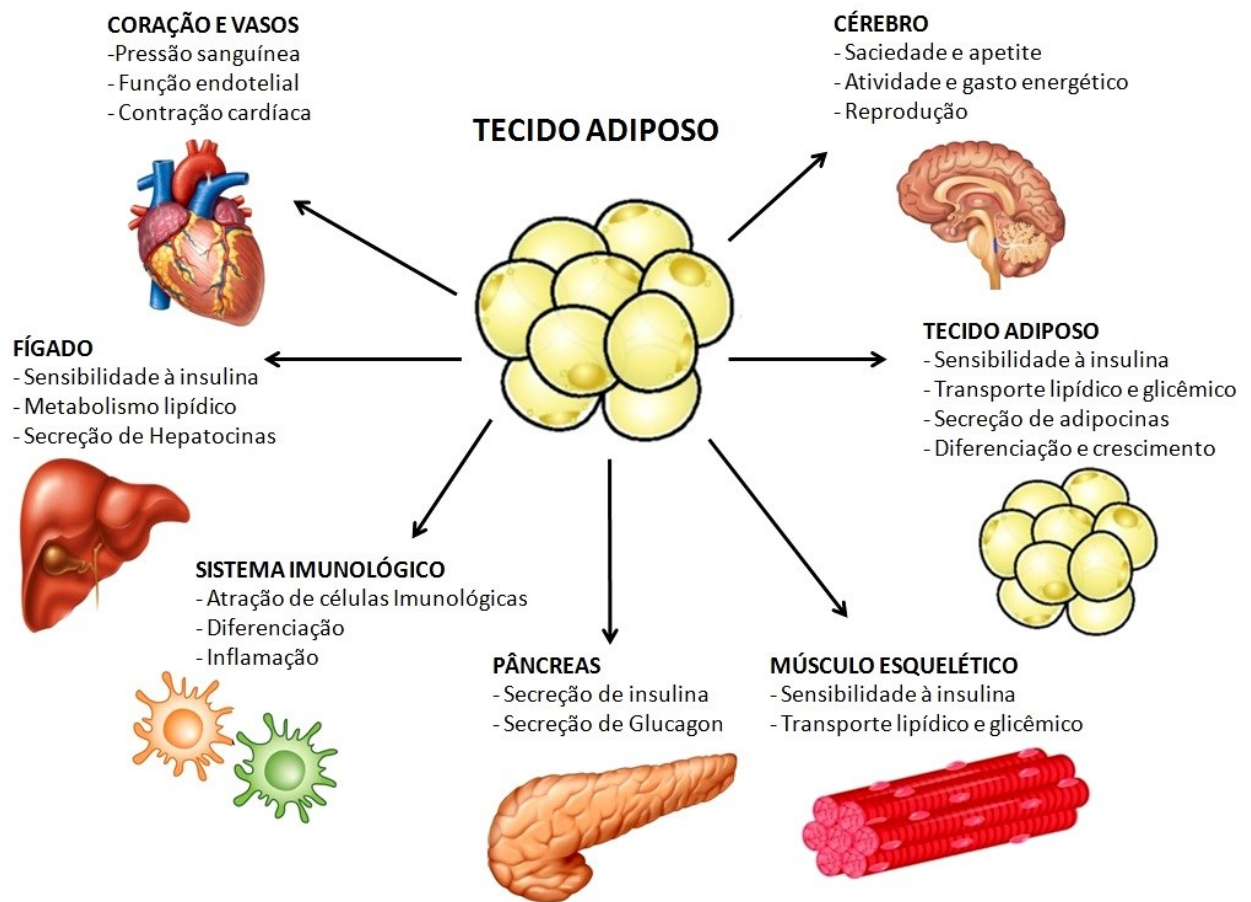
2.4.5 Adipocinas

O tecido adiposo, como descrito inicialmente, é reconhecido atualmente como um órgão capaz de sintetizar e secretar centenas de citocinas, chamadas de adipocinas (FÈVE et al., 2016). Estas moléculas, quando secretadas, exercem funções pleiotrópicas sobre a regulação na captação e utilização da glicose, do metabolismo lipídico, nos processos inflamatórios e angiogênese (FÈVE et al., 2016).

Ao longo dos últimos vinte anos, têm-se demonstrado progressos consideráveis em relação à fisiologia do sistema endócrino e do TA (com descobertas de citocinas, interleucinas, adipocinas, adiponectinas), entretanto, é desafiador, compreender sua complexidade biológica e implicações fisiopatológicas (FÈVE et al., 2016). A complexidade desta área é documentada por recentes pesquisas proteômicas, que indicam que o TA humano pode secretar mais de 700 proteínas diferentes (FÈVE et al., 2016).

As adipocinas regulam importantes processos biológicos em diferentes regiões do organismo (como o cérebro, fígado, músculo esquelético, pâncreas) e em diferentes sistemas (cardiovascular, imunológico e endócrino) conforme ilustra a figura 2. Isso pode explicar a estreita ligação entre a obesidade e as complicações cardiovasculares, metabólicas e imunológicas (BLÜHER, MANTZOROS, 2015; SAHIN-EFE, KATSIKERIS, MANTZOROS, 2012).

Figura 2 - Variadas funções biológicas reguladas por adipocinas



Fonte: Traduzido e adaptado de FÈVE et al, 2016.

A produção de muitas adipocinas está desregulada na obesidade e pode agir sobre os distúrbios do apetite, saciedade e nas mudanças da distribuição do TA, secreção de insulina, sensibilidade à insulina, gasto energético, função endotelial, angiogênese, inflamação, pressão arterial, homeostase, função osteoarticular e reprodução (BLÜHER, 2009).

Evidências mostram alta secreção de adipocinas e mediadores inflamatórios em indivíduos obesos, contribuindo para a formação de estado subinflamatório crônico (BOESING et al., 2010; FAIN, 2010; GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010; PARDINA et al., 2010; SOLÁ et al, 2009).

Consequentemente, estas citocinas revelam perspectivas promissoras para conduta nas morbidades relacionadas à obesidade (BLÜHER, MANTZOROS, 2015). Além disso, adipocinas não são necessariamente derivadas de adipócitos, mas também a partir de outros tipos de células presentes no TA (que representam menos da metade do número total de células presentes neste tecido), de células imunológicas (como, macrófagos, linfócitos,

granulócitos, mastócitos), ou células endoteliais e fibroblastos (BLÜHER, 2009; BLÜHER, MANTZOROS, 2015).

Leptina e adiponectina são derivados principalmente de adipócitos, enquanto que citocinas pró-inflamatórias (como a IL-1 β , IL-6 e TNF- α) são produzidas principalmente por macrófagos e células do sistema imunológico, além disso, o perfil de células secretadas deste tecido heterogêneo pode ser diferente, de acordo com a localização dos depósitos de gordura (FÈVE et al, 2016).

Estas adipocinas, em nível plasmático, estão relacionadas com a resposta inflamatória na obesidade, particularmente a IL-6 estimula a produção de proteínas de fase aguda (PFA), como a proteína C-reativa (PCR) e a inibição da produção de Albumina (DU CLOS; MOLD, 2004; PETERS et al., 2010).

Investigações confirmam o perfil pró-inflamatório em obesos, caracterizado como inflamação de baixo grau, que é evidenciado por maiores concentrações plasmáticas de adipocinas, tais como PCR, TNF- α , IL-6, quando comparado a indivíduos não obesos saudáveis. TNF- α e IL-6, por exemplo, suprimem a síntese de adiponectina e induzem a produção de leptina e outros mediadores inflamatórios (SIMONS et al., 2007).

O estado inflamatório sistêmico resultante exerce um importante papel no desenvolvimento das comorbidades associadas à obesidade (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010). A elevação das concentrações plasmáticas destas adipocinas está associada a maiores concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicerídeos e insulina, bem como glicose sanguínea no jejum, comparado a indivíduos não obesos (BOESING et al., 2010; FAIN, 2010; PARDINA et al., 2010; SOLÁ et al., 2009).

Os efeitos negativos da obesidade sobre o sistema imunológico estão associados com as modificações na arquitetura do tecido linfóide e sua integridade, desencadeando alterações da população linfocitária e fenótipos celulares com características inflamatórias (KANNEGANTI, DIXIT, 2012).

2.4.6 Alterações Imunometabólicas no tecido adiposo

A obesidade causada pela hipertrofia e/ou hiperplasia do TA, está associada com o aumento da infiltração de macrófagos, neutrófilos, células espumosas, as células T e B, mastócitos, e células dendríticas no TA (ELGAZAR-CARMON et al., 2008; LIU et al., 2009; SHAPIRO et al., 2013, WEISBERG et al., 2003, WU et al., 2011). Adicionalmente, com o

aumento da morte celular, desencadeado pelo recrutamento de macrófagos, que formam estruturas características tipo “*crown-like*” em torno das células de gordura (CINTI et al., 2005, STRISSEL et al., 2007).

Neste contexto, a hipertrofia do adipócito induz a produção de quimiocinas que promovem o recrutamento de monócitos pró-inflamatórios circulantes, que se diferenciam em macrófagos com fenótipo M1 (CURAT et al., 2004; DI GREGORIO et al., 2005; KEOPHIPHATH et al., 2010; LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007, LUMENG et al., 2007).

Por outro lado, em um estado “magro” o TA demonstra um número considerável de células T reguladoras (Treg) que expressam a transcrição do fator Foxp3 (*forkhead box P3*), e estas células vêm sendo sugeridas para diminuir as respostas pró-inflamatórias e o recrutamento de macrófagos M1 pela liberação de IL-10 (ODEGAARD, CHAWLA, 2011).

Complementarmente, as células T auxiliares tipo 2 apresentam características de regular a abundância de macrófagos M2 no tecido adiposo através da secreção de IL-4 e IL-13, gerando uma resposta anti-inflamatória (ODEGAARD, CHAWLA, 2011).

Na obesidade, células T auxiliares tipo 1 e citotóxicas (CD8+) contribuem para a disfunção metabólica estimulando macrófagos M1 a liberar citocinas com características pró-inflamatórias como $INF\gamma$, $TNF\alpha$ e IL-6 (YANG et al., 2010; NISHIMURA et al., 2009).

O aumento na expressão de células com características pró-inflamatórias, também, pode ser devido, ao aumento das quantidades de outros fatores, incluindo ácidos graxos livres, colesterol e lipopolissacarídeos que se ligam e ativam vias de sinalização através do TLR4 (WANG et al., 2008; KOSTELI et al., 2010; OLEFSKY, GLASS, 2010; CARICILLI et al., 2011).

Com o aumento da produção de citocinas a partir de macrófagos M1 (TNF, IL-6, e IL-1), em conjunto com a redução de sinais anti-inflamatórios, característicos dos macrófagos M2 (IL-10), ocorre um incremento da disfunção do TA com conseqüente diminuição da sensibilidade à insulina (PATSOURIS et al., 2008).

Diante disso, os macrófagos podem ser estimulados por pelo menos dois mecanismos independentes:

1) Pela ligação do ácido palmítico, a receptores de superfície celular tipo “*toll-like*” especificamente TLR2 e TLR4, que estimula a produção de citocinas através de mecanismos dependentes do fator de transcrição nuclear NFkB (KRATZ et al., 2014).

2) Pela ativação do PPAR γ induzido pela incorporação do ácido palmítico, que desencadeia o metabolismo lipídico e os limites da inflamação (KRATZ et al., 2014).

O saldo destas duas vias determina respostas pró ou anti-inflamatórias dos macrófagos para uma disfunção metabólica (KRATZ et al., 2014).

Sumariamente, a amplificação da inflamação desencadeada pela hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, estimula o TA a diminuir a sensibilidade à insulina como uma tentativa de defesa, gerando um microambiente catabólico que se contrapõe a lipogênese (HOTAMISLIGIL, 2006). Contudo, esta situação estimula o acúmulo ectópico de gordura, intolerância à glicose e dislipidemia (TCHERNOF, DESPRÉS, 2013).

Neste contexto, identificar substâncias que modulem processos imunometabólicos, são importantes ferramentas que possam ser utilizadas para diminuir o aparecimento e agravamento de doenças relacionadas com a obesidade.

2.6 MODELO EXPERIMENTAL

Para reproduzir a etiologia, e os resultados das doenças relacionadas com a obesidade, são comumente realizados ensaios pré-clínicos adotando modelos experimentais, com a integração de alimentos palatáveis e com densidade energética elevada (BUETTNER et al., 2006, CESARETTI; KOHLMANN, 2006, GHITZA et al., 2006).

Em particular, camundongos C57BL/6 são amplamente utilizados em pesquisas que envolvem o estudo de doenças imunometabólicas e para testar novas substâncias terapêuticas (BUETTNER, SCHOLMERICH, BOLLHEIMER, 2007).

A disponibilidade de um modelo animal bem caracterizado pode ser útil para investigar aspectos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento e progressão de várias disfunções metabólicas (CESARETTI; KOHLMANN, 2006).

Embora os modelos pré-clínicos de obesidade, que incluem alterações genéticas, forneçam *insights* valiosos sobre as bases bioquímicas da obesidade, modelos de obesidade induzido por dieta, são mais representativos para se estudar a obesidade observada nos seres humanos (KENNEDY et al., 2010; JPHONSON, MAKAWSKI, 2015).

Dietas ricas em sacarose, dextrose, frutose, gordura ou qualquer destes elementos combinados, promovem mudanças importantes no metabolismo dos carboidratos, resultando em resistência à insulina e diabetes tipo 2, ganho de peso e aumento da adiposidade,

dislipidemia e hipertensão arterial em roedores (CESARETTI; KOHLMANN, 2006; KOHLI et al., 2010; CUNHA et al., 2007; CALLIGARIS et al., 2013).

Contudo, grande parte das investigações sobre o desequilíbrio energético, responsável pela maior parte da obesidade humana, foi realizada utilizando modelos experimentais de obesidade induzido por dietas ricas em gordura saturada (~60%), conhecidas também como *High fat Diet* (HFD) (KENNEDY et al., 2010).

Tradicionalmente, estas dietas são compostas, por banha, em maior quantidade (~51%) e óleos, em menor quantidade (~6%), apresentando maior lipotoxicidade (KENNEDY et al., 2010).

Por outro lado, existem outros modelos experimentais de dieta, conhecidas como dietas de cafeteria ou *cafeteria diets*, que refletem com maior precisão a dieta ocidental, através da oferta de alimentos altamente energéticos e palatáveis (SCLAFANI, SPRINGER, 1976; ROTHWELL, STOCK, 1979).

Neste modelo, é oferecido aos animais uma dieta altamente palatável, com densidade energética elevada, promovendo hiperfagia voluntária que resulta em um rápido ganho de peso, aumento da massa gorda e alterações dos parâmetros glicêmicos, como a glicose e a insulina (MORRIS et al., 2008; CAIMARI et al., 2010; HEYNE et al., 2009). Heyne e colaboradores (2009) demonstraram que quando a palatabilidade da dieta é melhorada, a disfunção metabólica pode ser exacerbada devido à hiperfagia voluntária.

Entretanto, outros estudos demonstram que ratos alimentados com uma dieta altamente palatável podem diminuir a frequência e a quantidade alimentar em resposta a homeostase e a ingestão energética total, por estarem saciados (ALMIRON-ROIG et al., 2013; SOUTH et al., 2014).

Outros estudos, se baseiam na hipótese da influência da proteína na dieta, sugerindo que a ingestão energética total pode ser impulsionada pelo declínio do teor de energia da proteína da dieta e que os animais consomem o alimento, principalmente para atingir um alvo calórico proteico (HAWLEY et al., 2016; FELTON et al., 2009; SORENSEN et al., 2008; RAUBENHEIMER AND SIMPSON, 1997).

Apesar destes fatores, a dieta de cafeteria é considerada o modelo mais eficaz para reproduzir as alterações observadas na obesidade humana, como resistência à insulina, intolerância à glicose e inflamação, quando comparadas com HFD. (ROTHWELL, STOCK, 1979; MITTELMAN et al., 2000; SAMPEY et al., 2011; SAMPEY et al., 2012; MACEDO et al., 2012; BRANDIMARTI et al., 2013; ZEENI et al., 2015).

Alguns modelos de dieta de cafeteria incluem a exposição dos animais a diferentes alimentos altamente palatáveis, ricos em carboidratos simples e gorduras saturadas. Contudo, são modelos difíceis de padronizar, dependendo da região, pode existir a variação do conteúdo nutricional, ou que cada animal mostre uma preferência alimentar diferente, desencadeando diferenças fenotípicas (SMYTH, HERON, 2006; CORDAIN et al., 2005).

Para minimizar estes fatores, Higa e colaboradores (2014) desenvolveram uma dieta de cafeteria, contendo alimentos processados e ultraprocessados, com quantidades substanciais de gordura, açúcar, proteínas e baixo teor de fibras, simulando uma dieta humana ocidental, fornecida na forma de *pellet*. Este estudo demonstrou que esta dieta, foi mais eficiente em estimular a disfunção metabólica, induzir a hipertrofia dos adipócitos, hiperfagia, hiperglicemia, intolerância à glicose e resistência à insulina em camundongos C57BL/6 quando comparados com o grupo que recebeu HFD.

Neste contexto, entender como os macronutrientes estão envolvidos no processo obesogênico é desafiador, aliado a isso, a utilização de um modelo pré-clínico de indução de obesidade mais representativo para as tendências alimentares modernas, pode ser útil para identificar intervenções preventivas e terapêuticas no tratamento de obesidade humana, ou mesmo, entender mecanismos moleculares envolvidos nesta situação clínica (HIGA et al., 2014; SAMPEY et al., 2011).

2.7 ÁCIDOS GRAXOS MONOISATURADOS – NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS

Muito progresso tem sido realizado para compreensão de processos inflamatórios e metabólicos em tecidos metabolicamente ativos, contudo, ainda é uma questão mal compreendida (JOHNSON, MILNER, MAKOWSKI, 2012).

A resolução desta questão é importante porque vias celulares e moleculares reguladas por metabólitos, como mediadores lipídicos bioativos, podem apresentar importantes alvos terapêuticos (JOHNSON, MAKOWSKI; 2015).

Dentre estes mediadores lipídicos, os ácidos graxos (AGs) podem influenciar muitas propriedades celulares, resultando em alterações metabólicas, expressão de genes, capacidade de resposta aos hormônios e produção de substâncias biologicamente ativas, desta maneira, estimulando funções fisiológicas a saúde e bem-estar (CALDER, 2015).

Ácidos graxos são ácidos carboxílicos compostos, em sua maioria, por uma cadeia hidrocarbônica longa, não ramificada e com número par de átomos de carbono, podendo ser

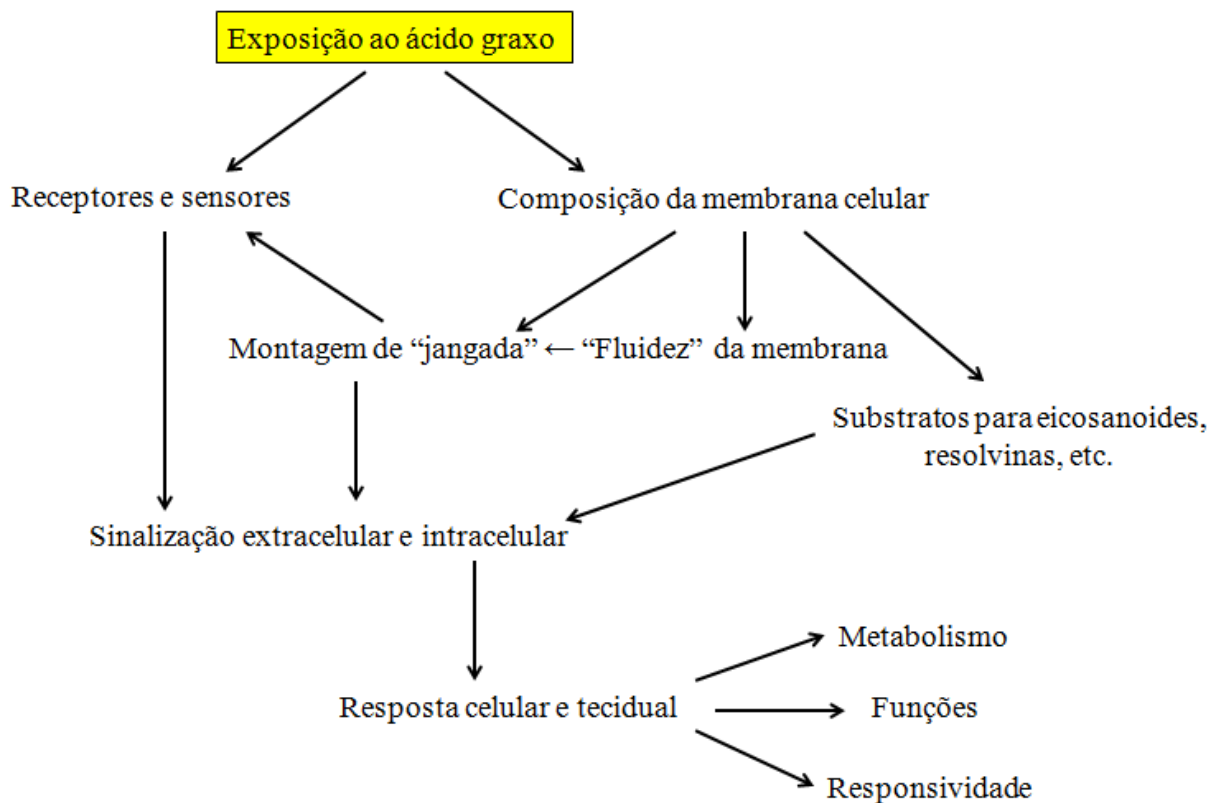
saturados ou conter uma ou mais duplas ligações (insaturações) e são classificados como AG de cadeia curta (2 a 4 carbonos), média (6 a 10 carbonos) e longa (acima de doze carbonos) (SOUZA, MATSUSHITA, VISENTAINER, 1998).

São os principais componentes dos triacilgliceróis, fosfolipídios e outros complexos lipídicos, estes lipídios e seus componentes são amplamente encontrados na natureza (CALDER,2015).

Diferentes células, membranas, e fosfolipídios apresentam diferentes composições de AGs, e estes podem ser influenciados por alguns fatores, dentre eles, pela própria dieta, ao mesmo tempo que, diferentes alimentos contêm diferentes tipos de AGs (CALDER,2015).

Alguns AGs são capazes de regular a expressão ou atividade de fatores de transcrição e/ou individualmente, apresentam ações específicas próprias, estes efeitos permitem que os AGs regulem processos metabólicos e inflamatórios (CALDER, 2015). Desta maneira, é evidente que AGs, apresentem uma gama de atividades biológicas gerais e específicas conforme ilustrado na figura 3.

Figura 3 - Esquema relacionando o impacto da exposição do ácido graxo sobre as respostas celulares, teciduais e mecanismos associados.



Fonte: Traduzido e adaptado de Calder, 2015.

Entre os AGs encontrados na natureza, os ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), são classificados por conter uma dupla ligação em sua cadeia, além disso, possuem pontos de fusão mais elevados que ácidos graxos poli-insaturados e podem ser líquidos na temperatura ambiente, semissólidos ou sólidos quando refrigerados (GILLINGHAM, HARRIS-JANZ, JONES, 2011).

Altas proporções plasmáticas de ácidos graxos saturados (AGS) e baixas proporções de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e poli-insaturados (AGPI) estão fortemente associadas com a obesidade (MICALLEF et al., 2009; KIM et al., 2010, FERNANDES et al., 2013). Adicionalmente, o desequilíbrio entre AGS e AGMI podem estimular fatores de transcrição a promover a lipogênese de novo, a biossíntese de colesterol e a dessaturação do estearoil-CoA (LEE et al., 2015; ABBOTT et al., 2012).

Em 2010, pesquisadores da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura juntamente com a OMS, recomendaram que a ingestão de AGMI deveria ser de 15-20% do valor energético, de acordo com a ingestão de gordura total, ao contrário de outros ácidos graxos que tem uma recomendação limite, a ingestão de AGMI deve ser determinada através do cálculo da diferença: $AGMI (\% \text{ energia}) = \text{Gordura total} (\% \text{ de energia}) - \text{ácidos graxos saturados} (\% \text{ de energia}) - \text{ácidos graxos poli-insaturados} (\% \text{ de energia}) - \text{ácidos graxos trans} (\% \text{ de energia})$. Assim a ingestão de AGMI variará em relação à gordura total e a composição de ácidos graxos da dieta (FAO/WHO, 2010).

Estruturalmente, os AGMI mais comuns encontrados na natureza, são o ácido oléico (ou 18: 1n-9) e o ácido palmitoleico (também chamado de palmitoleato ou 16: 1n-7 ou 16: 1 ω -7), ambos apresentam predominantemente isomeria *cis* (GILLINGHAM, HARRIS-JANZ, JONES, 2011).

Em comum com outros AG o ácido palmitoleico (AP) circula na corrente sanguínea como componente de lipídios complexos (triglicerídeos, fosfolipídios, ésteres de colesterol, dentro de lipoproteínas e na forma livre (CALDER, 2015). No TA humano existem importantes reservas de AP, que contribuem com mais de 5% dos AGs (WALKER; BROWNING, 2015).

Este AG é pouco obtido pela dieta, sendo encontrado em maior abundância no óleo da noz de macadâmia (~17-22%) e espinheira do mar (~43%) (MAGUIRE et al., 2004; CALDER, 2015). Pode ser sintetizado no tecido adiposo ou fígado, pela dessaturação- $\Delta 9$ do ácido palmítico, catalisado pela SCD-1 (CAO et al., 2008). Altas concentrações de PA podem

inibir a atividade desta enzima, enquanto AGSs, sacarose, frutose e álcool podem estimular a atividade desta enzima (CAO et al., 2008).

Observou-se que camundongos deficientes desta enzima foram protegidos contra alterações da síndrome metabólica (MACDONALD et al., 2008). Com base em tais observações, o ácido palmitoleico (AP) recebeu interesse significativo na última década, começando com a sua descrição como uma lipocina, ou seja, um mensageiro lipídico liberado no tecido adiposo com ação biológica similar à de hormônios, capaz de aumentar a sensibilidade à insulina no músculo esquelético e reduzir o acúmulo de gordura no fígado de camundongos (CAO et al., 2008).

Posteriormente, houve maior atenção sobre a relevância do papel fisiológico deste ácido graxo. Contudo, para investigar seus potenciais efeitos, a maioria dos estudos publicados até o momento, utilizam o ácido palmitoleico isolado. Neste sentido, alguns estudos observaram a redução da inflamação em adipócitos incubados com 250 μM de AP, apresentando menor expressão de genes relacionados à via do TLR4 (SHAW et al., 2013), enquanto macrófagos expostos ao ácido palmitoleico (600 μM) apresentaram menor expressão de genes e citocinas inflamatórias (SOUZA et al., 2017).

Outros estudos em cultura de adipócitos e macrófagos mostraram maior fosforilação de AMPK quando expostas ao ácido palmitoleico (200 μM e 0,5 mM), promovendo um aumento da lipólise e do metabolismo oxidativo (BOLSONI-LOPES et al., 2013; CHAN et al., 2015).

Outro estudo demonstrou que o tratamento com ácido palmitoleico (300 mg/kg/dia) durante 10 dias, concomitante a ingestão de HFD aumentou a massa do tecido adiposo epididimal (eWAT) retroperitoneal (rWAT) assim como o índice de adiposidade, apesar do aumento destes tecidos, houve a atenuação de distúrbios imunometabólicos nestes camundongos (SOUZA et al., 2014).

Outro estudo realizado com camundongos, utilizando a mesma dose e tempo não observou diferenças nas massas destes tecidos, mas demonstrou que o AP modulou funções metabólicas no fígado e tecido adiposo, contudo, estes camundongos não estavam submetidos a um ambiente obesogênico (BOLSONI-LOPES, 2013).

Um único estudo publicado até o momento, demonstrou que a suplementação (2 g/kg/de peso corporal) com óleo de macadâmia (OM) três vezes por semana, durante 12 semanas, reduziu a hipertrofia do tecido adiposo em camundongos alimentados com HFD quando comparado com o grupo que recebeu dieta padrão, apesar deste resultado, foi

observado um incremento na massa do eWAT e rWAT, no grupo que ingeriu a HFD concomitante ao OM quando comparado com o grupo que ingeriu somente HFD (LIMA et al., 2014).

Além dos efeitos na adiposidade, vários estudos pré-clínicos em camundongos observaram que o ácido palmitoleico aumentou a sensibilidade à insulina e a eliminação de glicose, melhorou o perfil lipídico, reduzindo as concentrações circulantes de colesterol total e triglicerídeos e aumentando o colesterol HDL (CAO et al., 2008; BOLSONI-LOPES, 2013; SOUZA et al., 2014; YANG et al., 2019).

Para organizar e complementar as informações referente aos potenciais efeitos do óleo de macadâmia ou ácido palmitoleico foi realizado um levantamento bibliográfico de artigos relacionados com o ácido palmitoleico ou óleo de macadâmia publicados até maio de 2019 nas bases de dados, Scielo, Scopus e PubMed, utilizando os termos de busca apresentados no quadro 1 que segue abaixo.

Quadro 1 - Termos de busca utilizados para o levantamento bibliográfico de artigos publicados até maio de 2019.

UNITERMOS
SUPLEMENTO “palmitoleic acid” OR “palmitoleate acid” OR “Macadamia Oil” OR “monounsaturated fatty acids” OR (macadamia AND oil) OR omega-7 OR “n-7” OR MUFA OR “ω-7”
DESENHO DO ESTUDO “supplementation” OR “mice” OR “c57/bl” OR “Cafeteria Diet” OR “HFD” OR “obesity”
MARCADORES INFLAMATÓRIOS “Adiposity” OR “interleukin” OR “adipose tissue” OR (adipose tissue and macrophages)

A estratégia consistiu em buscar todos os estudos publicados cruzando um unitermo de cada grupo (suplemento *vs* desenho do estudo *vs* desfechos relacionados aos marcadores inflamatórios) ou utilizar separadamente um único unitermo do grupo suplemento, para não restringir a busca e facilitar o encontro dos artigos relacionados ao tema.

A seleção dos estudos potencialmente elegíveis foi realizada inicialmente pela leitura dos títulos e resumos, caso fosse relevante, procedeu-se com a análise do texto completo para confirmar a elegibilidade. Também, foi efetuada a conferência manual das referências dos artigos elegíveis para identificar outros artigos potencialmente elegíveis. Dos quais os

resultados da busca estão apresentados nos quadros 2, 3 e 4 em ordem cronológica separados por modelo experimental.

Quadro 2 - Estudos relacionados com suplementação de ácido palmitoleico em estudos com diferentes linhagens de células apresentados em ordem cronológica.

Autores/ano	Objetivos	Modelo experimental	Resultados/conclusões principais
Dimopoulos et al., 2006	Comparar os efeitos de palmitoleato e palmitato na ação da insulina e a utilização da glicose em células do músculo esquelético de ratos L6.	Células L6 foram incubadas com 0,75 mM de oleato, palmitoleato, linoleato ou linoleato durante 16 e 48 horas.	AGMI e AGS exercem efeitos diferentes sobre a sinalização de insulina e captação de glicose em células L6 musculares, sugerindo que uma dieta enriquecida com AGMI pode facilitar a absorção e utilização de glicose no músculo esquelético.
Akazawa et al., 2010	Examinar mecanismos responsáveis pela citoproteção nos hepatócitos incubadas com diferentes ácidos graxos.	Hepatócitos primários humanos e de ratos isolados e linhagens celulares Huh-7 e Hep 3B incubadas na presença e ausência de palmitato, estearato e ou palmitoleato.	O palmitoleato ↓ significativamente a apoptose tanto em células primárias ou linhagem celular, pelo bloqueio no estresse do retículo endoplasmático.
Burns et al., 2012	Determinar se a suplementação com ácido palmitoléico em adipócitos primários de boi regulam a expressão gênica, lipogênica e taxas de lipogênese.	Células primárias do estroma vascular foram isoladas a partir da gordura subcutânea e intramuscular de boi e incubadas com diferentes concentrações de ácido palmitoleico (0, 50, 150, ou 300 μ M).	A suplementação exógena com ácido palmitoleico agiu como um regulador da lipogênese, dessaturação e β -oxidação nos adipócitos de boi.
Bolsoni-Lopes et al., 2013	Modelo “ex vivo” - Investigar se o ácido palmitoléico modula o metabolismo do triacilglicerol em adipócitos de camundongos C57/B16 e knockout para PPAR α .	Células diferenciadas 3T3-L1 tratadas com ácido palmitoleico (200 μ M) ou ácido palmítico (200 μ M) por 24h e Adipócitos primários de camundongos C57/B16 e knockout para PPAR α tratados com ácido palmitoleico (300mg.kg ⁻¹ .day ⁻¹) ou ácido oleico (300mg.kg ⁻¹ .day ⁻¹) por gavagem durante 10 dias.	O ácido palmitoleico ↑ a lipólise e o conteúdo de lipases nos adipócitos por um mecanismo dependente de PPAR α .
Shaw et al., 2013	Examinar fatores transcricionais de adipócitos regulados por AGS e ASMI	Pré-adipócitos diferenciados foram tratados com 250 μ M de ácido palmítico, esteárico, palmitoleico e oleico por 48 h	A incubação com ácido palmítico induziu a via de sinalização de TLR, enquanto o palmitoleico apresentou o efeito oposto.
Chan et al., 2015	Modelo “ex vivo” - Investigar se os macrófagos derivados da medula óssea de animais alimentados com high fat diet alteram seu fenótipo e aumentam ou diminuem após incubação com palmitoleato.	A medula óssea foi extraída do fêmur e da tíbia dos camundongos C57/B16 tratados ou não com dieta <i>high fat</i> e tratados com 0,5 mM de palmitato ou cis-palmitoleato ou cis-oleato ou trans-palmitoleato.	A suplementação com a forma cis-palmitoleato demonstrou alteração fenotípica para uma polarização anti-inflamatória em macrófagos. Além de ↑ a fosforilação da AMPK, promovendo ↑ da lipólise.

Autores/ano	Objetivos	Modelo experimental	Resultados/conclusões principais
Souza et al., 2017	Investigar os efeitos do ácido palmitoleico em macrófagos de camundongos C57BL/6	Macrófagos ativados de camundongos foram isolados foram tratados com 600 μ M com ácido palmitoleico por 24 h	O ácido palmitoleico \downarrow a expressão de TLR4 e promoveu efeito anti-inflamatório em macrófagos expostos ao LPS

Abreviaturas: PPAR α : Receptores de ativadores de peroxisoma α , AGMI: Ácidos graxos monoinsaturados, AGS: Ácidos graxos saturados, \downarrow diminuir \uparrow aumentou, AMPK: proteína cinase ativada por AMP. Fonte: O autor.

Quadro 3 - Estudos relacionados com a suplementação de ácido palmítico ou óleo de macadâmia em modelo experimental com animais apresentados em ordem cronológica.

Autores/ano	Objetivos	Modelo experimental	Resultados/conclusões principais
Matthan et al., 2009	Avaliar o efeito do óleo de macadâmia em relação aos óleos de palma, canola, cártamo sobre o perfil das lipoproteínas plasmáticas, hemácias e aórtica, perfil de ácidos graxos, teor de lipídio hepático e acúmulo de colesterol aórtico em hamsters.	Hamsters F1B Golden Syrian machos receberam diferentes dietas enriquecidas com 10% de gordura ou 0,1% de colesterol ou 10% de óleo de macadâmia, palma, canola ou cártamo.	Hamsters alimentados com óleo de macadâmia apresentaram menores concentrações de colesterol, TG e fração não-HDL em comparação com os hamsters alimentados com óleo de palma e ↑ de HDL-colesterol em comparação com os grupos que receberam os outros óleos. Sugerindo que o óleo de macadâmia não afeta negativamente os perfis de lipoproteínas plasmáticas ou a acumulação de colesterol aórtico.
Yang, Miyahara, Hatanaka, 2011	Verificar o efeito “antidiabético” do ácido palmítico em camundongos geneticamente modificados para diabetes tipo 2.	Camundongos KK-A ^y machos, foram separados em 3 grupos e receberam suplementação oral, com veículo (1,5% de éster de poliglicero) ou 300 mg / kg de ácido palmítico, ou 300 mg / kg de ácido palmítico, diariamente durante 4 semanas.	A suplementação com ácido palmítico, ↓ peso corporal, e o TG hepático, melhorou hiperglicemia e hipertrigliceridemia, ↑ a sensibilidade à insulina, em parte devido à supressão da expressão dos genes pró-inflamatórios.
Guo et al., 2012	Verificar os efeitos do ácido palmítico, em respostas metabólicas e inflamatórias do fígado de camundongos.	Camundongos C57/Bl6 foram alimentados com uma dieta high fat durante 12 semanas e tratados por gavagem com palmítico (600mg/kg/dia conjugado com albumina de soro bovina e suspensão em PBS) nas últimas 4 semanas.	A suplementação com palmítico ↑ a sensibilidade à insulina, ↓ o número de células de kupffer, a fosforilação do NFκB (p65) e expressão de citocinas pró-inflamatórias (também observado nos experimentos com hepatócitos), e ↑ a deposição de gordura hepática. Suprimindo a inflamação, mas induzindo a esteatose.

Abreviaturas: PBS: Tampão fosfato-salina, TG: Triacilglicerol, NFκB: fator-nuclear kappa B, ↓diminuiu, ↑aumentou, Fonte: O autor.

Autores/ano	Objetivos	Modelo experimental	Resultados/conclusões principais
Poudyal et al., 2013	Investigar as alterações na adiposidade, estrutura e função cardiovascular e fígado, composição dos ácidos graxos no tecido em resposta a suplementação com óleo de macadâmia, cártamo e linhaça em modelo experimental para síndrome metabólica em ratos.	Ratos machos wistar, separados em oito grupos distintos: alimentados com amido de milho (AM); AM + óleo de macadâmia; AM + óleo de cártamo; AM + óleo de linhaça; e dieta rica em carboidratos e gordura; dieta rica em carboidratos e gordura + óleo de macadâmia; dieta rica em carboidratos e gordura + óleo de cártamo e dieta rica em carboidratos e gordura + óleo de linhaça. Os óleos foram preparados por adição de 3% do respectivo óleo e substituído a uma quantidade equivalente de água na dieta.	A suplementação com óleo de macadâmia ↓ o colesterol, marcadores plasmáticos de danos no fígado e pressão arterial, entretanto ↑ a adiposidade, e as concentrações basais de glicose plasmática. Estes resultados demonstram diferentes respostas fisiológicas e bioquímicas frente a um modelo experimental para síndrome metabólica.
Barrena et al., 2014	Comparar os efeitos do enriquecimento da dieta com óleo de linhaça ou óleo de macadâmia, sobre as alterações metabólicas induzidas por dieta <i>high fat</i> , em camundongos, com ênfase nos níveis de glicose sanguínea e gliconeogênese hepática em camundongos.	Camundongos machos swiss foram divididos em quatro grupos que receberam por 14 dias, dieta normocalórica; dieta <i>high fat</i> ; dieta <i>high fat</i> + óleo de linhaça e dieta <i>high fat</i> + óleo de macadâmia.	Observou-se ↑ dos níveis de glicose sanguínea, peso corporal e soma das gorduras epididimária, mesentérica, retroperitoneal e inguinal nos grupos que receberam os óleos, comparado com o grupo que recebeu dieta normocalórica. Sugerindo novas investigações para avaliar o efeito dos óleos.
Lima et al., 2014	Avaliar o efeito da suplementação com óleo de macadâmia sobre a sensibilidade à insulina, inflamação, perfil lipídico, e o tamanho dos adipócitos induzido por dieta <i>high fat</i> em camundongos.	Camundongos C57/Bl6 foram divididos em quatro grupos: dieta controle, <i>high fat</i> , dieta controle + suplementação com óleo de macadâmia e dieta <i>high fat</i> + suplementação com óleo de macadâmia, por gavagem a 2g / kg de peso corporal, três vezes por semana, durante 12 semanas.	Suplementação com óleo de macadâmia atenuou a hipertrofia dos adipócitos e inflamação no tecido adiposo mediada por macrófagos.
Siddiqui et al., 2015	Verificar o efeito de diferentes misturas contendo ácidos graxos complexos no desenvolvimento da esteatose hepática induzida por sacarose/frutose em camundongos.	Camundongos C57/Bl6 foram randomizados em grupo que receberam dietas de base normocalórica que variaram no tipo de carboidrato (Amido, sacarose, frutose) e depois foram randomizados novamente para dietas que variaram em tipo de lipídio (sem lipídio adicional, óleo de soja, óleo de peixe, azeite/óleo de soja, óleo de macadâmia). Administração das emulsões por gavagem fornecendo 90mg/dia de lipídio.	A ingestão moderada com diferentes fórmulas lipídicas inibiu similarmente a esteatose e a lipogênese.

Autores/ano	Objetivos	Modelo experimental	Resultados/conclusões principais
Souza et al., 2014	Investigar os efeitos do ácido palmitoleico na homeostase glicêmica e na função hepática de camundongos C57BL/6	Camundongos C57BL6 knockout para PPAR α foram alimentados por 12 semanas com dieta padrão ou dieta HFD, e nas últimas 2 semanas foram tratados com 300 mg/kg/dia palmitoleico	A suplementação de ácido palmitoleico estimulou a captação de glicose no fígado através da ativação de AMPK e FGF-21, dependente do PPAR α .
Yang et al., 2019	Investigar o efeito do ácido palmitoleico sobre a aterosclerose de camundongos fêmeas C57Bl/6J	Camundongos fêmeas knockout do receptor LDL (LDLR) foram alimentadas com dieta ocidental suplementadas com 5% de ácido palmitoleico por 12 semanas.	A suplementação com ácido palmitoleico melhorou o metabolismo da glicose e o perfil lipídico no plasma e no fígado (diminuição de 40% nos triglicerídeos) e ↓ a área da placa aterosclerótica em aproximadamente 45% em comparação com o grupo controle.

Quadro 4 - Estudos relacionados com a suplementação de ácido palmitoleico, óleo ou noz de macadâmia em seres humanos apresentados em ordem cronológica.

Autores/ano	Objetivos	Modelo experimental	Resultados/conclusões principais
Nestel, Clifton, Noakes, 1994	Verificar o efeito do ácido palmitoleico sobre o perfil lipídico e sua diferença em relação ao ácido oleico e ácido palmítico.	Trinta e quatro homens que apresentaram colesterol moderadamente elevado, após o período de dez dias foram randomizados em três grupos diferentes com dietas em ordem aleatórias contendo: grupo 1: palmitoleico, oleico, palmítico; grupo 2: palmítico, palmitoleico, oleico; grupo 3: oleico, palmítico, palmitoleico, durante três semanas. Os óleos foram emulsionados com leite desnatado sabor de baunilha e foram alíquotadas em porções de 350ml (42 g de gordura) fornecidas aos voluntários na forma congelada.	Com a ingestão de palmitoleico houve ↑ do CT e LDL-c e ↓ de HDL-c nesta amostra. Entretanto, o consumo maior de ácido palmitoleico pode levar a resultados diferentes que necessitam de maiores investigações.
Curb et al., 2000	Verificar as variações séricas do perfil lipídico em resposta a uma dieta rica em AGMI com nozes de macadâmia.	Ensaio randomizado tipo “ <i>crossover</i> ”, com a ingestão de três dietas (rica em gordura saturada ou <i>Step 1</i> da Associação Americana do Coração - da 30% gordura da energia total ou dieta rica em AGMI com macadâmia) durante trinta dias, realizado com 30 voluntários.	Observou-se a ↓ do CT e LDL-c na dieta com macadâmia, observada também na dieta com baixo teor de gordura, sugerindo que as duas dietas tiveram efeitos potencialmente benéficos nestes parâmetros lipídicos.
Hiraoka-Yamamoto et al., 2004	Verificar as variações dos níveis de lipídios séricos em resposta a ingestão de uma dieta com noz de macadâmia.	Foi verificada as variações dos níveis de lipídios séricos em resposta a uma dieta rica em AGMI (macadâmia) com 3 semanas de intervenção com noz de macadâmia, coco e manteiga em mulheres japonesas, estudantes e saudáveis	Após 3 semanas com as diferentes intervenções as concentrações séricas do CT e a LDL-c ↓ significativamente no grupo das dietas com macadâmia e coco. Peso corporal e o IMC ↓ no grupo que recebeu a macadâmia. Entretanto não se sabe se estas diferenças possam ser devidas as diferentes composições dos ácidos graxos.

Abreviaturas: CT: Colesterol total, IMC: índice de massa corporal, AGMI: Ácidos graxos monoinsaturados, AGS: Ácidos graxos saturados, ↓diminuiu, ↑aumentou, Fonte: O autor.

Autores/ano	Objetivos	Modelo experimental	Resultados/conclusões principais
Garg et al., 2007	Verificar os efeitos do consumo de nozes de macadâmia em indivíduos do sexo masculino com hipercolesterolemia sobre biomarcadores plasmáticos de estresse oxidativo, coagulação e inflamação.	Dezessete indivíduos do sexo masculino com hipercolesterolemia receberam macadâmia (40-90 g/dia), o equivalente a 15% do consumo de energia, por um período de quatro semanas.	Após as quatro semanas de intervenção houve ↑ dos AGMI plasmáticos (16:1n-7, 18:1n-9 e 20:1n-9), ↓ dos Leucotrienos ⁴ , 8-isoprostano, tromboxanos ² e prostaglandinas ² . Sugerindo que o consumo regular de nozes de macadâmia pode auxiliar na prevenção de doença arterial coronariana.
Griel et al., 2008	Avaliar as respostas do perfil lipídico e das lipoproteínas para diminuição do colesterol sanguíneo através da dieta que continha macadâmia.	Um estudo randomizado, tipo “ <i>crossover</i> ”, com alimentação controlada (períodos de dieta 5-semana) comparou uma dieta rica Macadâmia (42.5g) 33% de gordura total (7% AGS, 18% AGMI, 5% de AGPI) vs. uma dieta americana média (33% de gordura total (13% AGS, 11% AGMI, 5% de AGPI).	A deita com macadâmia ↓ as concentrações de colesterol total, LDL-c, fração não-HDL colesterol, e a razões do CT:HDL-c e HDL-c:LDL-c. Sugerindo que a macadâmia pode ser incluída em um padrão alimentar saudável.
Bernstein, Roizen, Martínez, 2014	Realizar o primeiro estudo randomizado, controlado com a suplementação de um óleo enriquecido (52%) com ácido cis-palmitoleico em seres humanos.	Adultos com dislipidemia e evidência de inflamação sistêmica leve (Proteína c-reativa entre 2 e 5 mg/L) foram randomizados aleatoriamente para receber 220,5 mg de ácido cis-palmitoleico ou placebo que continha (1,000 mg de triglicérides de cadeia média) uma vez por dia durante 30 dias. Os participantes foram orientados a manter a sua dieta atual normal.	Após 30 dias no grupo suplementado com cis-palmitoleico houve ↓ significativa da PCR, TG e LDL-c, e ↑ significante do HDL-c. Sugerindo que a forma purificada de ácido palmitoleico pode ser utilizada no tratamento de hipertrigliceridemia.

Abreviaturas: AGMI: Ácidos graxos monoinsaturados, ↓diminuiu, ↑aumentou, IMC: Índice de massa corpórea, TG: Triacilglicerol, PCR: Proteína C-reativa. Fonte:

O autor

Quadro 5 - Estudos investigando associações com ácido palmitoleico com diferentes desfechos metabólicos em seres humanos apresentados em ordem cronológica.

Autores/ano	Objetivos	Modelo experimental	Resultados/conclusões principais
Paillard et al., 2008	Avaliar a associação do teor de ácido palmitoleico plasmático, um produto da atividade da esteroil-coenzima A-dessaturase 1 (SCD1), em relação aos triglicérides e a adiposidade abdominal em homens.	Foram avaliados 134 homens saudáveis e o percentual de ácido palmitoleico plasmático, que foi utilizado como uma medida indireta da atividade de SCD1.	O teor de ácido palmitoleico foi fortemente e independentemente associado com a trigliceridemia, e com a circunferência da cintura quando a trigliceridemia não foi incluída na análise. Sugerindo que o ácido palmitoleico é um marcador independente da trigliceridemia e adiposidade abdominal em homens.
Mozaffarian et al., 2010	Investigar os determinantes independentes de palmitoleato circulantes em seres humanos e se o palmitoleato está associado com menor risco metabólico e incidência de diabetes	Estudo de Saúde Cardiovascular, uma coorte prospectiva com 3630 homens e mulheres. Foram mencionados a concentração de ácidos graxos e fosfolípidios plasmáticos, variáveis antropométricas, perfil glicêmico e lipídico, marcadores inflamatórios entre os anos de 1992 e 2006.	As concentrações de palmitoleato mais elevadas foram correlacionadas com maior índice de massa corporal, ingestão de carboidratos, ingestão de proteínas e uso de álcool. Em análises ajustadas para os fatores de confusão foi observado que as concentrações elevadas de palmitoleato foram associadas menor LDL-c e fibrinogênio e maior HDL-c. Palmitoleato não foi associado com a incidência de diabetes. Sugerindo que o palmitoleato circulante está associado a fatores de riscos metabólicos, porém em direções distintas.
Stefan et al., 2010	Investigar se o palmitoleato pode prever a sensibilidade a insulina em humanos.	Sujeitos com risco aumentado de desenvolver diabetes tipo 2. Foi verificado o perfil de ácidos graxos plasmáticos e glicêmicos após nove meses de intervenção sobre o estilo de vida.	O palmitoleato circulante foi correlacionado positivamente com a sensibilidade a insulina, mas não com ácidos graxos livres. Sugerindo um desempenho importante na fisiopatologia da resistência a insulina em humanos.
Gong et al., 2011	Investigar se os efeitos do ácido palmitoleico no tecido adiposo e sobre a atividade da esteroil-coenzima A-dessaturase 1 (SCD1) estão associados com a diminuição da prevalência de obesidade e se esta associação é modificada pela ingestão de carboidratos.	Estudo transversal com 1926 adultos verificou as razões de prevalência para obesidade (IMC). Utilizou-se dois índices de dessaturação (16:1/16:0 e 18:1/18:0) como medições alternativas para a atividade da SCD1 no tecido adiposo.	Observou-se uma associação positiva entre as concentrações de ácido palmitoleico no tecido adiposo e a obesidade. Também foi observado associação positiva entre a obesidade e os índices de dessaturação adiposa. A associação entre concentrações de ácido palmitoleico do tecido adiposo e obesidade foram atenuadas em pessoas com baixa ingestão de carboidrato.

Autores/ano	Objetivos	Modelo experimental	Resultados/conclusões principais
Mozaffarian et al., 2013	Investigar associação da forma trans-palmitoleato com o risco metabólico e incidência de diabetes em um estudo de coorte multicêntrico.	Ácidos graxos de fosfolípidios e fatores de risco metabólicos foram mensurados no período de 2000-2002 entre 2617 adultos em um estudo denominado Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA), uma coorte com brancos, negros, hispânicos, americanos e chineses. Em 2281 participantes livre da linha de base para diabetes, também foi avaliado prospectivamente o risco recente de diabetes (205 casos) a partir da linha de base de 2005-2007.	As concentrações de trans-palmitoleato foram associadas com o ↑ do LDL-c, ↓ do TG, insulina de jejum e pressão arterial sistólica. Em análises prospectivas, trans-palmitoleato foi independentemente associado com a menor incidência para diabetes, incluindo um risco menor de 48%. Todos os resultados foram semelhantes entre homens e mulheres e entre os diferentes subgrupos étnico-raciais.

Abreviaturas: ↓diminuiu, ↑aumentou, IMC: Índice de massa corpórea, TG: Triacilglicerol, PCR: Proteína C-reativa. Fonte: O autor.

Como podemos perceber, a obesidade, particularmente, o aumento da gordura visceral está associado com desfechos imunometabólicos que favorecem o aparecimento de DCNT, como DM2, doenças cardiovasculares, hipertensão arterial e câncer, que podem apresentar complicações, gerando incapacidade física ou óbito.

Atualmente, estas doenças, são consideradas um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. No Brasil, no ano de 2018, o gasto primário da União, totalizou R\$ 117,1 bilhões com despesas do SUS para o tratamento de doenças relacionadas com a obesidade. A projeção é para que os próximos anos este quadro aumente.

Como a intervenção dietética continua a ser a principal estratégia de prevenção e tratamento para doenças associadas à obesidade, estudos que utilizam intervenções não farmacológicas, associadas a modelos pré-clínicos, que mimetizam as alterações metabólicas presentes nas DCNT, representam importantes implicações translacionais.

Além disso, estudos pré-clínicos permitem o esclarecimento quanto à eficácia e segurança do nutriente antes de ser recomendado para população, favorecendo uma melhor interpretação dos potenciais resultados encontrados em ensaios clínicos, e fornecendo a possibilidade de uma investigação mais aprofundada após intervenção.

Podemos observar, através da revisão de literatura, que poucos estudos realizados com animais utilizaram o óleo de macadâmia (OM) como intervenção nutricional, são escassos, alguns estudos utilizam a administração de óleo diretamente na dieta. Este fato influencia a quantidade de óleo ingerida o que pode impactar na quantidade consumida dos diferentes ácidos graxos e repercutir nos potenciais efeitos biológicos desencadeados por eles. A simples adição à dieta pode fazer com que não sejam ingeridas doses suficientes dos ácidos graxos de interesse para que seus respectivos efeitos possam ser identificados pelas metodologias utilizadas.

Sendo assim, intervenções que administrem doses padronizadas do óleo podem chegar a resultados diferenciados aos já publicados com modelos *in vivo*.

Embora a associação entre a ingestão de alimentos energéticos e obesidade seja bem conhecida, os efeitos do óleo de macadâmia, como fonte principal de ácido palmitoleico, expostos a diferentes concentrações de macronutrientes, sobre o tecido adiposo visceral de camundongos, foram pouco explorados. Além disso, nenhum dos estudos pré-clínicos avaliou o perfil de ácidos graxos no TA e hemácias que representam um importante indicador endógeno e exógeno de ingestão do ácido graxo de interesse.

Portanto, continua a ser investigado se o óleo de macadâmia, como fonte de PA, é capaz de neutralizar ou melhorar o desenvolvimento do tecido adiposo branco. Diante disso, este estudo utiliza diferentes dietas obesogênicas, contendo alimentos processados e ultraprocessados, com o objetivo de investigar se o óleo de macadâmia ou um óleo comestível, enriquecido com 50% de ácido palmitoleico, poderiam modificar o incremento de adiposidade esperado causado por essas dietas em camundongos.

Adicionalmente, não são conhecidos os efeitos funcionais da ingestão de óleos comestíveis com teor de ácido palmitoleico maior de 35% em modelos pré-clínicos.

Neste contexto, entender como os nutrientes estão envolvidos no processo obesogênico aliado a utilização de um modelo pré-clínico de indução de obesidade mais representativo para dietas ocidentais, pode ser útil para identificar intervenções preventivas e terapêuticas no tratamento de obesidade humana e passíveis de serem transportados para recomendações populacionais.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da ingestão de óleo de macadâmia ou óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico sobre o tecido adiposo de camundongos expostos a dieta de cafeteria.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar parâmetros (massa corporal, consumo de ração e massa de órgãos e tecidos) do modelo pré-clínico com diferentes composições de açúcares simples de dieta de cafeteria.

Avaliar o efeito da ingestão de óleo de macadâmia em camundongos alimentados com diferentes dietas de cafeteria durante 16 semanas, sobre:

- Perfil lipídico plasmático;
- Perfil de ácidos graxos de eritrócitos;
- Adiposidade.

Avaliar o efeito da ingestão de óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico em camundongos alimentados com dieta de cafeteria durante 16 semanas, sobre:

- Adiposidade
- Glicemia de jejum, tolerância à glicose e insulinemia;
- Perfil lipídico plasmático e hepático;
- Perfil de ácidos graxos em eritrócitos e tecido adiposo;
- Concentrações de citocinas plasmáticas e tecido adiposo.

5 HIPÓTESES

Diante do apresentado até o momento, sugerem-se as seguintes hipóteses a serem confirmadas ou refutadas:

H_{nula} : A ingestão de óleo de macadâmia / ou óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico não altera a massa do tecido adiposo e parâmetros metabólicos induzido pelo consumo de dieta de cafeteria.

$H_{alternativa}$: A ingestão de óleo de macadâmia / ou óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico pode atenuar a massa do tecido adiposo e parâmetros metabólicos induzido pelo consumo de dieta de cafeteria.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2 ESTUDO EXPERIMENTAL

6.2.1 Animais

Foram utilizados 125 camundongos C57BL/6 (machos) produzidos e mantidos no biotério do laboratório de neurobiologia da dor e inflamação (LANDI), coordenado pelo professor, doutor Adair Roberto Soares dos Santos, localizado no Campus da Universidade Federal de Santa Catarina - Trindade, Florianópolis, SC. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (5 animais por gaiolas) 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. Todos os protocolos e procedimentos experimentais relativos ao trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC, da UFSC, sob número do protocolo 5855301015 (ANEXO A). O projeto foi aprovado pela chamada MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 - Faixa A - até R\$ 30.000,00 sobre o processo de número: 445044/2014-4.

6.2.1.1 Planejamento estatístico para o 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.

6.2.2 Protocolo experimental e grupos experimentais

A dieta de cafeteria utilizada foi baseada na composição proposta por Higa et al. (2014). 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 na tabela 2. Para o melhor entendimento utilizamos a denominação de Dieta 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 Dieta 2.

Tabela 2 - Percentual de calorias de macronutrientes e valor calórico total da dieta padrão e da dieta de cafeteria consumidas pelos camundongos.

	Dieta padrão	Dieta de cafeteria 1	Dieta de cafeteria 2
Carboidratos (%)	59	47	54
Proteínas (%)	29	14	12
Gorduras totais (%)	12	39	34
Kcal/grama	3,00	4,41	4,35

Fonte: O autor.

Para a determinação dos ácidos graxos presentes na dieta padrão, na dieta de cafeteria e óleo de macadâmia nós realizamos a cromatografia líquida de alta performance. Decidimos realizar a cromatografia somente de uma das dietas, porque os ingredientes que fornecem gordura não foram modificados, conforme detalhado no quadro 6.

Para execução do primeiro protocolo utilizou-se o óleo de macadâmia da marca Pазze, disponível no site (<http://www.pazze.com.br/brasil/linha-de-produtos/oleos-vegetais>).

Para execução do segundo protocolo utilizou-se o óleo 50% palmitoleico da marca ALASK OMEGATM. A Matéria prima para a fabricação deste óleo é o peixe Alaska Walleye Pollok (*theragra chalcogramma*). Os ácidos graxos presentes neste óleo estão na forma de etil ester e são, o ácido palmitoleico (558 mg/g), ácido palmítico (257mg/g) e ácido oleico (1mg/g).

Quadro 6 - Percentual de ácidos graxos presentes nas dietas a partir da cromatografia líquida de alta performance.

Ácidos graxos	Dieta padrão	Dieta de cafeteria	Óleo de macadâmia
Mirístico 14:0	2,99	1,35	1,00
Palmítico 16:0	36,92	14,32	7,67
Esteárico 18:0	1,84	5,15	3,81
Palmitoleico 16:1n-7	1,12	0,14	22,32
Oleico 18:1n-9	17,73	40,39	57,04
Linoleico 18:2n-6	18,24	24,79	7,49
Araquidônico 20:4n-6	19,39	13,70	ND
α -linolenico 18:3n-3	0,46	0,06	0,68
EPA 20:5n-3	0,89	0,06	ND
DHA 22:6n-3	0,42	0,05	ND

Abreviações: EPA: Ácido graxo eicosapentaenóico, DHA: ácido graxo docosahexaenóico, ND: valores não detectáveis.

Foi realizado dois modelos de protocolos experimentais:

O primeiro protocolo experimental foi realizado utilizando os dois modelos de dietas de cafeterias (Dieta 1 e Dieta 2) em duas remessas diferentes de animais, para testarmos a reprodutibilidade dos dados e a intervenção concomitante com óleo de macadâmia. Portanto, Nestes protocolos experimentais foi utilizado a intervenção com óleo de macadâmia concomitante ao consumo das diferentes dietas de cafeterias (Dieta 1 e Dieta 2) para a análise dos seguintes desfechos: Tamanho e peso do tecido adiposo retroperitoneal e epididimal, perfil de ácidos graxos em hemácias, determinação da concentração de colesterol total, triacilglicerol plasmáticos, determinação da concentração citocinas plasmáticas (dados não mostrados) e análises histológicas do tecido adiposo epididimal.

Após finalizar este primeiro protocolo experimental, observamos resultados mais expressivos sobre o tecido adiposo e parâmetros metabólicos quanto ao efeito da ingestão da dieta 1, então, decidimos seguir para o segundo protocolo experimental utilizando somente este modelo de dieta.

Portanto, neste segundo protocolo experimental, utilizamos somente a dieta de cafeteria 1 (Dieta 1) e realizamos a intervenção somente com óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico. Diante disso, foram avaliados os seguintes desfechos: Glicemia de jejum, avaliação da tolerância à glicose intraperitoneal, concentrações plasmáticas de insulina, determinação do perfil de ácidos graxos (hemácias e tecido adiposo), determinação da concentração de colesterol total, triacilglicerol (plasmáticos e hepáticos), determinação de citocinas no plasma e no tecido adiposo e análises histológicas do tecido adiposo.

Em ambos protocolos experimentais (que ocorreram em períodos diferentes) os animais foram divididos em quatro grupos diferentes. Portanto, 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 deles. 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 ou óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico.

O grupo controle, recebeu dieta padrão e água (1g/kg de m.c.). O grupo dieta de cafeteria, recebeu dieta de cafeteria e água (1g/kg de m.c.). O grupo óleo, recebeu dieta padrão e óleo de macadâmia ou dieta padrão mais óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico (1g/kg de m.c.). O grupo dieta de cafeteria-óleo, recebeu dieta de cafeteria e óleo

de macadâmia ou dieta de cafeteria mais óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico, (1g/kg de m.c.), durante 16 semanas. A água e os óleos utilizados foram administrados via oral com o auxílio de uma micropipeta, uma vez ao dia, somente pelas manhãs, no horário entre 7:00 e 8:00 horas. A dose dos óleos por dia foi baseada em trabalhos prévios de nosso grupo com outros tipos de óleo (BARBOSA et al., 2016).

6.2.4 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.

6.2.5 Parâmetros metabólicos

6.2.5.1 Avaliação da glicose sanguínea 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.

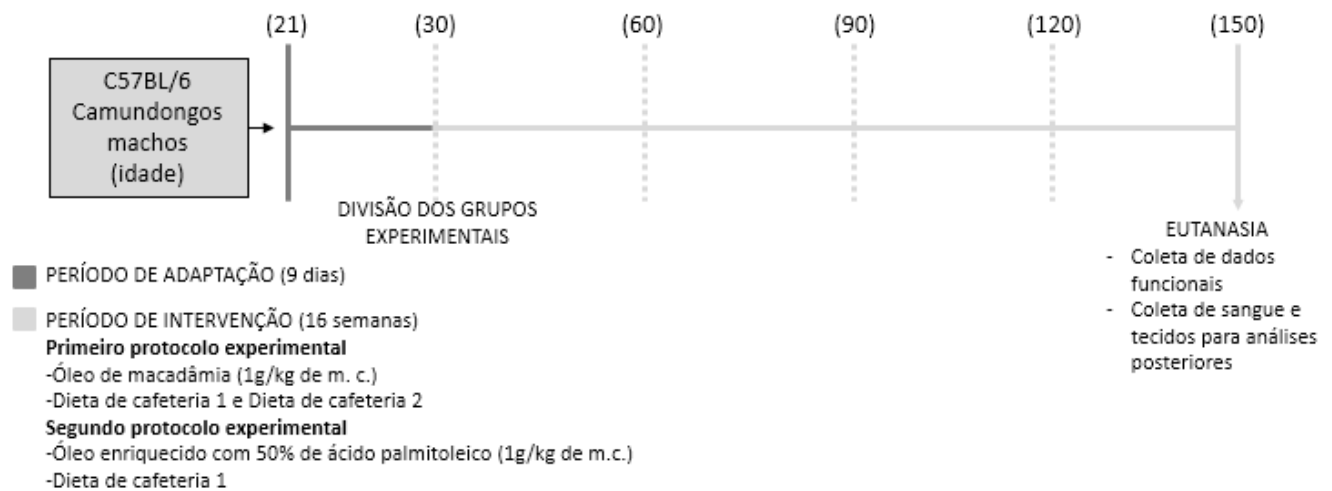
6.2.5.2 Avaliação da tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT)

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 30, 60, 90 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.

6.2.5.3 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 para coleta de sangue e posterior retirada de tecidos. A figura abaixo representa o desenho do estudo (Modelo 1 e 2).

Figura 4 - Desenho do estudo e procedimentos experimentais



Fonte: O autor.

6.2.5.4 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.

6.2.5.5 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 aliquoteado 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[®]. 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).

6.2.5.6 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 ressuspensa 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).

6.2.5.7 Análise histológica do tecido adiposo branco

Imediatamente após a morte dos animais, as amostras do tecido adiposo (epididimal) foram transferidas para cassetes histológicos de plástico e fixadas em paraformaldeído 4% por 48 horas a 8° C desidratadas em 70% de etanol e incluídas em parafina. Após esta etapa foi realizada a microtomia (0.5µm) de amostras de tecido adiposo de cada grupo experimental obtidas em micrótomo e aderidas em lâminas de vidro, em seguida foram desparafinadas em xilol e reidratadas para coloração com Hematoxilina-Eosina cobertas com Balsamo do Canadá e então as imagens foram capturadas pelo digitalizador de lâminas automatizado (ZEISS, Oberkochen, Alemanha) e posteriormente analisadas pelo software Zenlite[®] (edição Blue, ZEISS, Oberkochen, Alemanha). O perímetro celular foi obtido pelo contorno manual de células com membranas plasmáticas intactas. Dez a quinze campos (aproximadamente 150 células por seção) foram analisados cegamente e aleatoriamente para determinação da área média dos adipócitos. Decidimos trabalhar apenas com tecido epididimal, pois a adição dessa gordura está relacionada ao maior risco de desenvolver doenças metabólicas, e por ser a mais abundante nesses animais.

6.2.5.8 Determinação do perfil de ácidos graxos das hemácias e tecido adiposo

O perfil lipídico do tecido adiposo epididimal (0,010g) e hemácias (200 µl) dos animais, foram determinados por cromatografia líquida de alta performance (*High Performance Liquid Chromatography*- HPLC). Extração dos lipídeos das amostras foi efetuada de acordo com o método descrito por FOLCH et al., 1957. O tecido adiposo e hemácias 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 se adicionou 0,48 ml de clorofórmio e 0,41ml de água, para formação de emulsão. Após a formação espontânea de sistema bifásico, cada amostra foi adicionada 1 ml da solução de Folch (clorofórmio:metanol:água, 3:48:47 v/v) para eluição da fração hidrometanólica.

Os extratos lipídicos foram submetidos a secagem em fluxo de nitrogênio gasoso, em banho-maria a 37° C. 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 (BMMC) (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 100 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 acetonitrila 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 excitação 398 nm.

A incorporação lipídica foi estimada através da diferença entre os percentuais de cada ácido graxo, quando comparados com o percentual no grupo controle. Para realização deste experimento, foram utilizados dez padrões de ácidos graxos: eicosapentaenoico, alfa linolênico, docosahexaenoico, mirístico, araquidônico, palmitoleico, linoleico, palmítico, oleico, esteárico.

6.2.5.9 Dosagem de citocinas plasmáticas e tecido adiposo

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 ~150 gramas de tecido adiposo e 50 µL de plasma.

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.

6.2.6 Tratamento e análise dos dados

Os 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 deles, seguido do post hoc de Holm-Sidak para comparação múltipla de dados paramétricos. O método *extreme studentized deviate* foi aplicado para determinar se um valor atingiu um outlier significativo (teste de Grubb, disponível online no GraphPad QuickCalcs). Para todos os testes, foi adotado o nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

7 RESULTADOS

7.1 MANUSCRITO 1

Pretendemos enviar este manuscrito para a revista: Archives of Endocrinology and Metabolism

TITLE: Macadamia oil ingestion increases visceral fat gains in c57bl/6 mice receiving a cafeteria diet rich in table sugar

Authors: Thayz Rodrigues Chagas^a, Amanda Marreiro Barbosa^b, Priscila de Cássia Francisco^d, Bruna Aparecida Comotti de Oliveira^e, Everson Araújo Nunes^{a,b,c}

Author information:

^aNutrition Postgraduate Program, Federal University of Santa Catarina, Brazil. PC: 88040-900.

^bMulticentric Postgraduate Program in Physiological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Brazil. PC: 88040-900.

^cDepartment of Physiological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Brazil. PC: 88040-900.

^dMedicine graduate Program, Federal University of Santa Catarina, Brazil. PC: 88040-900.

^d Postgraduate Program in Molecular Cell Biology, Federal University of Paraná, Brazil. PC: 81531-970

Authors e-mails:

Thayz Rodrigues Chagas - thayzchagas@gmail.com

Amanda Marreiro Barbosa - amanda.marreiro@yahoo.com.br

Priscila de Cássia Francisco - Priscilacsf@yahoo.com.br

Bruna Aparecida Comotti de Oliveira - brunacomotti89@gmail.com

Everson Araújo Nunes - everson.nunes@ufsc.br

Corresponding author:

Everson Araújo Nunes.

Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima, Trindade, Florianópolis – Santa Catarina –
Brasil – CEP: 88040-900.

Departamento de Ciências Fisiológicas.

Fone: +55 48 3721-2289.

Email: everson.nunes@ufsc.br

ABBREVIATED TITLE: Macadamia oil ingestion during obesity

Keywords: Cafeteria Diet. Macronutrients. Palmitoleic acid. Macadamia oil. Adipose tissue.

Number of words in the main text: 3.752

ORIGINAL ARTICLE

ABSTRACT

Objective: Palmitoleic acid (PA) is described in the literature has metabolic immunomodulatory potential. Here, we tested whether the ingestion an edible oil containing this fatty acid (macadamia oil) can be a therapeutic strategy to mitigate the effects of cafeteria diets, which are more representative for modern food trends. Subjects and methods: C57BL6 mice fed with a standard diet (SD) or Cafeteria diet (CAF) for 16 weeks were treated with macadamia oil (1g/kg of b.m.). Two experimental cafeteria diet models were used with different compositions DIET 1: 47% kcal of carbohydrates, 39% of kcal of fats and 14% of kcal of proteins and DIET 2: 54% of kcal of carbohydrates, 34% kcal of fats and 12% of kcal of proteins. Results: There was an increased energy ingestion in the groups that received cafeteria diets. Diet 1 increased total plasma cholesterol and increased the mass of the epididymal (eWAT) and retroperitoneal (rWAT). This increase in WAT was potentiated by the ingestion of macadamia oil when associated with a diet 2, the one with a higher quantity of simple sugars. In addition, the ingestion of DIET 2 with macadamia oil increased SFA in erythrocytes membranes, suggesting and increased de novo lipogenesis response. Conclusion: Ingestion of macadamia oil associated with a cafeteria diet does not seem to prevent the deleterious effects of such diets and in fact enhanced the expansion of visceral fat when associated to a diet enriched in simple sugars in C57 / BL6 mice.

Introduction

According to the World Health Organization (WHO) overweight and obesity are defined as the abnormal or excessive accumulation of fat, which may represent a health risk, thus considered a significant risk factor for the development of chronic diseases and increased mortality (WHO, 2019). In addition, according to a WHO report, published in the year 2016, more than 1.9 billion adults are overweight, and, of these, 650 million have obesity (WHO, 2016).

It is suggested that excessive dietary energy intake (EI) or a diet high in saturated fatty acids (SFA) may induce the development of obesity (VANDEVIJVERE, 2015). Specifically, the increased visceral adipose tissue (VAT) is associated with an increased risk of metabolic disorders (GILLINGHAM, HARRIS-JANZ, JONES, 2011). Cafeteria diet (CD) is a commonly used model to induce enhanced adiposity and dyslipidemia, hypertrophy of adipocytes, and to provide a representative model to investigate the human diet when compared to high-fat diet (HFD) (HIGA et al., 2014; MAHMOUDI et al., 2018).

Some studies have demonstrated that a diet with higher monounsaturated fatty acid (MUFA) might help control body mass, an effective strategy for controlling metabolic disorders induced by excessive EI (ARAPOSTATHI et al., 2011; GILLINGHAM, HARRIS-JANZ, JONES, 2011). One specific MUFA, palmitoleic acid (PA), has received significant focus in the last decade. Starting with its description as a potential lipocin (ie. a lipid messenger released into the blood with the purpose to produce biological responses in target tissues like that of hormones), it has been shown that PA is able to increase insulin sensitivity in skeletal muscle and reduce fat accumulation in the liver of mice (CAO et al., 2008). However, this PA is not much abundant in the human diet. It is found in greater abundance in the oil of macadamia nuts (17-22%) and in sea buckthorn (43%) (MAGUIRE et al., 2004; CALDER, 2015). Therefore, most of the studies carried out in pre-clinical experimental

models use isolated PA to investigate its potential therapeutic effects (BOLSONI-LOPES et al., 2013, SOUZA et al., 2014).

One study demonstrated that PA treatment (300 mg/kg/b.m.) for 10 days, concomitant with HFD intake increased the mass of the epididymal (eWAT) and retroperitoneal (rWAT) white adipose tissue, as well as the adiposity index. Despite the increase of these adipose tissues, there was attenuation of immunometabolic disorders in these mice (SOUZA et al., 2014). Another study carried out with mice using the same dose and time did not observe differences in the mass of these tissues but showed that PA modulated some metabolic functions in liver and adipose tissue (BOLSONI-LOPES et al., 2013). However, these animals were not submitted to an obesogenic diet (BOLSONI-LOPES et al., 2013). Interestingly, another study carried out with mice during 14 days of ingestion of HFD enriched with 4% of macadamia oil showed an increase of eWAT (HELENTON et al., 2014).

On the contrary, a single study published until now has shown that supplementation with macadamia oil (2 g/kg/b.m.) three times a week for 12 weeks, attenuated adipose tissue hypertrophy in HFD-fed mice (LIMA et al., 2014). Besides such effect in adipocyte size, the data in the paper suggests that macadamia oil ingestion increased the mass of eWAT and rWAT in mice receiving HFD when compared to the group receiving sole HFD (LIMA et al., 2014). However, it is essential to highlight that the authors did not explore such increase in visceral adipose tissue mass when macadamia oil was associated with HFD.

Therefore, it remains to be further investigated if MO, as a source of PA, is able to counteract or enhance adipose tissue expansion. On the face of that, this study uses different obesogenic diets, containing processed and ultra-processed food, aiming to investigate whether macadamia oil could modify the expected adiposity increment caused such diets in mice.

Materials and Methods

Experimental design

Approximately 100 mice were used in this study. The 21-day-old male C57BL/6 mice, from the Laboratory of Investigation in Chronic Diseases of the Federal University of Santa Catarina (UFSC) were kept in collective cages, with free access to food and water, in a controlled environment with temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) humidity ($55 \pm 10\%$), light cycle period (07:00am to 07:00pm).

After going through an environmental adjustment period of nine days, mice completed 30 days of age. A fasting blood glucose measurement was made and a random distribution was performed in four experimental groups: Control Group (SD), who received standard diet (commercial standard chow diet, BIOBASE[®] 9301; Águas Frias, SC, Brazil) and water (1g/b.m./day), group supplemented with macadamia oil (1g/b.m./day) and standard chow diet (MO), group that received a cafeteria diet and water (1g/b.m./day) (CAF), and group that received a cafeteria diet and macadamia oil (1g/b.m. /day) (CDO).

Subsequent to the division of the groups, the animals were exposed to the respective diets and supplemented orally with the oil for a period of 16 weeks. Then, at the end of the experimental period, after 6-hour food deprivation, the animals were euthanized by direct decapitation with the use of surgical scissors for blood collection, in which blood samples were separated for analysis of plasma triglycerides, plasma total cholesterol and subsequent removal of tissues.

The tissues and organs of interest (epididymal and retroperitoneal adipose tissue) were carefully removed and weighed in digital analytical balance (TECNAL[®], SP, Brazil). Subsequently, fragments of epididymal adipose tissue were immediately fixed in paraformaldehyde for future analyzes. Figure 1 shows a schematic representation of the timeline and experimental procedures. All experimental protocols and procedures were submitted

and approved by the Animal Research Ethics Committee (AREC) da UFSC, protocol number: 5855301015, which meets the Brazilian and international requirements guidelines for animal well-being and use.

Diets

The standard chow diet was composed of a percentage of calories as follows: 59% of carbohydrates, 29% of proteins, 12% of total fats, and 3.00 kcal/gram. The cafeteria diet used was based on the composition proposed by Higa et al. (2014). It contains milk chocolate (10g), peanut (10g), corn starch cracker (5g), sugar (5g), and standard chow diet (15g).

For the execution of the experimental protocol, two cafeteria diets with different macronutrient and calorific values were used. The cafeteria diet 1 had 47% calories from carbohydrates, 14% from proteins and 39% from total fat, and 4.41 kcal/gram. The cafeteria diet 2 had 54% of calories from carbohydrates, 12% from proteins and 34% from total fat, and 4.35 kcal/gram. In Table 1, we present the fatty acid profile observed in the standard diet, cafeteria diet, and macadamia oil.

Food intake evaluation

Food intake and body mass of the animals were monitored weekly by the measurement of the remaining chow discounted from the total of that deposited in the previous week. The average amount of food ingested per animal was obtained by summing the body mass of all animals per cage, divided by the body mass of each animal in the cage, multiplied by the amount of food that was ingested by the animals in the cage during the week divided by seven, resulting in consumption per day per animal. All residual food present in cages was discounted to avoid imprecisions to obtain food intake data.

Analysis of plasma biochemical parameters

Plasma samples isolated from blood collected after the death of the animals were used to quantify total cholesterol and triacylglycerol by colorimetric methods, following the recommendations of the manufacturer of commercial systems Biotécnica[®], values were expressed as in mg/dL.

Fatty acid composition in red blood cells

The samples were submitted to lipid extraction by the method of Folch (1957). Total lipids extracted from the cell membranes were saponified in 0.5 M NaOH in methanol (90 % v/v). The saponified fatty acids were extracted into 3 ml of hexane and dried under nitrogen gas.

For detection in a high precision liquid chromatography (HPLC), the fatty acids were resuspended in acetonitrile and derivatized using methoxy coumarin (1 mg; ml) at 60° C for 15 minutes. After the derivation, the fatty acids were injected into the Varian Pro-Star liquid chromatographer and the elements in the C8 silica column, with an internal particle of 5 µm of the 100 Å output.

Election of an employee in the execution phase, in an isocratic gradient of acetonitrile and water (70/30 - v/v). Once eluted, the fatty acids were detected by a fluorescence detector, with excitation at 325 nm and excitation at 398 nm. The lipid incorporation was estimated by the difference between the percentages of each acid fatty acid when compared to the non-control group percentage.

Epididymal Adipocyte morphometry

Samples of epididymal adipose tissue were collected on the day of euthanasia and transferred to a histological plastic cassette. Samples were fixed in a 4% paraformaldehyde solution for 48 h at 8°C, dehydrated in ethanol, and embedded in paraffin.

Representative tissue sections (5 µm) were obtained using a hand microtome and placed on individual glass slides. Then, the sections were dewaxed in xylol and rehydrated.

Finally, the sections were stained with hematoxylin and eosin and coverslipped using Canada's balsam. The stained sections were scanned using the Axio Scan slide scanner (ZEISS, Oberkochen, Germany) and ZenLite software (Blue edition, ZEISS, Oberkochen, Germany) was used for determination of morphometric parameters. Cell perimeter was obtained by the manual contouring blindfold of cells with intact plasma membranes.

Ten to fifteen fields (approximately 150 cells per section) were randomly analyzed for determination of adipocyte mean area. We decided to work only with epididymal tissue, because the addition of this fat is related to the higher risk of developing metabolic diseases, and because it is the most abundant in these animals.

Data analysis

All analyses were performed using Graphpad Prism[®] version 6.01 (Graphpad Inc.; La Jolla, USA). The results were expressed as the mean ± EPM for parametric data of the number (n) of animals. The symmetry of the data was tested by Shapiro–Wilk normality test. Analysis of variance (two-way ANOVA) followed by Holm-Sidak's *post hoc* test was used for multiple comparisons of parametric data. Extreme studentized deviate method was applied to determine whether a piece of data reached significant outlier (Grubb's test, available online on GraphPad QuickCalcs). Significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Energy intake is increased in the cafeteria diets groups

Our study showed that there was an increase ($p < 0.01$) in mean total energy intake in the groups CAF when compared to groups SD, due mainly of carbohydrate and fats caloric ingested (Table 2). It should be noted that the energy from the oil in the groups that were ingested OM is included in this calculation.

In both SD models the mean percentage of total kcal of carbohydrate, increased significantly ($p < 0.1$) during the whole intervention period (120 days), when compared to the CAF groups, with a significant interaction ($F = 5.04$; $p < 0.01$), of both factors: diet ($F = 298.5$; $p < 0.01$) and oil ($F = 26.0$; $p < 0.01$). But it is important to mention here, that the cafeteria diet is composed of carbohydrates of sugar and starch.

The mean percentage of total kcal of lipids ingested increased significantly ($p < 0.01$) in groups CAF when compared to groups SD (table 2) and decreased significantly ($p < 0.01$) in CDO groups when compared to their respective controls. In the diet 1 there was an interaction of both diet ($F = 1904$; $p < 0.01$) and oil ($F = 19.8$; $p < 0.01$) and in model 2 there was a significant interaction ($F = 5.63$; $p < 0.05$) influenced by both factors, diet ($F = 1385$; $p < 0.01$) and oil ($F = 11.2$; $p < 0.01$). Here, that percentages of total calories from lipids do not include the percentage of calories from macadamia oil ingestion.

Total plasma cholesterol and TAG

As shown in table 2, the plasma total cholesterol concentrations in the diet 1 model increased significantly ($p < 0.01$) in group CAF when compared to the group SD, by the influence of the cafeteria diet ($F = 24.2$; $p < 0.01$). However, in the diet model 2, although there is an influence of macadamia oil ($F = 3.93$; $p = 0.054$), we did not observe significant differences when comparing group by group, by *post hoc* test.

It can be seen in Table 2 that in the diet model 1, TAG concentrations were significantly lower ($p < 0.01$) in group CAF when compared to the group SD, of the interaction ($F = 9.21$; $p < 0.01$) and diet ($F = 7.24$; $p < 0.05$). In the diet model 2, this reduction ($p < 0.01$) was observed in the CAF group when compared to the SD group and CDO group when compared to their respective control, having significant influence of both the interaction ($F = 17.2$; $p < 0.01$) and diet factor ($F = 9.27$; $p < 0.01$).

Lipid ingestion associated simple sugar increases SFA in erythrocytes membranes

The fatty acid profile in the erythrocyte membrane is considered the best indicator in the medium and long term of fat intake (HODSON, SKEAFF, FIELDING, 2008) and it is shown in table 3. Because they are similar groups and went through the same intervention, we decided to present only the data of the percentage of the fatty acid profile of one set of SD and MO groups (table 3).

In diet 1, fatty acids, myristic (14:0), palmitic (16:0), eicosapentaenoic (20:5n-3), alpha linolenic (18:3n-3), linoleic (18:2n-6) and palmitoleic (16:1n-7), significantly decreased ($p < 0.05$ respectively) in the CAF group compared with the SD group. We observe the opposite in the percentage of oleic (18:1n-9) and stearic (18:0) fatty acids ($p < 0.05$, respectively). Even in this model, when comparing the CAF group with the CDO group, we observed a significant increase in palmitoleic fatty acid ($p < 0.01$).

On the other hand, in Diet 2 we observed that myristic, palmitic, docosahexaenoic (20:6-n3) and arachidonic FA significantly decreased ($p < 0.01$ respectively) in the CAF group when compared with the SD group. However, we observed a significant increase of the oleic and linoleic FA ($p < 0.01$).

When comparing the CAF group with the CDO group (diet 2), we observed a significant increase of the myristic, palmitic, eicosapentaenoic, palmitoleic ($p < 0.01$

respectively) and a substantial decrease of linoleic fatty acid ($p < 0.01$). The increase in palmitic acid was caused by a significant interaction ($F=6.93$; $p < 0.05$) by influence of both factors, diet ($F=9.08$; $p < 0.01$) and oil ingestion ($F=28.7$; $p < 0.01$). In addition, we found a significant increase of palmitoleic acid in the CDO group when compared to respective control ($p < 0.01$).

The data showed that the ratio of SFA to UFA, was significant decrease in both diets (1 and 2) in the CAF groups when compared to the groups SD, ($p < 0.01$ e $p < 0.05$ respectively), since in the diet model 1 there was a significant interaction ($F=112.7$; $p < 0.01$) by influence of both factors, diet ($F=4.45$; $p < 0.05$) and oil ($F=130.1$; $p < 0.01$). However, the inverse of this parameter was observed in the CDO group when compared to the CAF group ($p < 0.01$) in the diet model 2 (figure S1), caused by a significant interaction ($F=8.57$; $p < 0.01$) by the influence of the oil ($F=19.2$; $p < 0.01$).

Macadamia oil ingestion associated with simple sugar increases visceral tissue

As we have observed so far, the caloric intake of macronutrients caused alteration in the fatty acid and lipid profile. These changes impacted the increase in visceral adipose tissue in the diet model 2. As shown in figure 2A the CDO group there is a significant increase ($p < 0.01$) of the epididymal tissue mass when compare with your respective controls, caused by significant interaction ($F=10.9$; $p < 0.01$) for dietary influence ($F=31.6$; $p < 0.01$). And an additional increase ($p < 0.01$) of the retroperitoneal tissue (figure 2B) caused by significant interaction ($F=11.4$; $p < 0.01$) also influenced by diet ($F=50.1$; $p < 0.01$).

The differences observed in such tissues of these groups were reflected in the sum of the masses of these fat pads ($p < 0.01$) by significant interaction ($F=11.26$; $p < 0.01$) of diet factor ($F=32.1$; $p < 0.01$). However, we did not observe significant differences in the mean area

of the adipocytes (figure 3B) or numbers of cells per range of area (figure 3F) between the groups in this diet model.

In the diet model 1, the CAF group showed a significant increase in the mass of the epididymal tissue ($p<0.01$) and the retroperitoneal tissue ($p<0.05$) when compared to the group SD (figure S2A e S2B), both by the influence of the diet factor ($F=31.8$; $p<0.01$; $F=26.2$; $p<0.01$ respectively).

This difference observed in these groups was reflected in the sum of the masses of these tissues (figure S2C), and the mean area of the adipocytes (figure 3A), both also influenced by the diet factor ($F=34.3$; $p<0.01$; $F=28.8$; $p<0.01$ respectively). In these groups, we observed a significant increase ($p<0.01$) in the number of cells per area in the range of $1500-2499\mu\text{m}^2$ (figure 3E).

DISCUSSION

We have shown in this work that macadamia oil effects on WAT expansion caused by cafeteria diet ingestion seem to depend on the composition of the diet. A diet with a higher quantity of simple sugars initially had a smaller effect on adipose tissue expansion when compared to a diet with increased fat. However, when mice ingested a diet with an increased amount of sugar (diet 2) and were exposed to daily doses of macadamia oil, the visceral adipose tissue expansion response was similar to the one caused by a diet increased in fat (diet 1). Therefore, according to our data, supplementing mice with macadamia oil ingestion does increase adipose tissue mass in mice, but that might be the fact depending on the amount of fat and sugar present in the diet used in association with the oil.

These findings provide new evidence the effects of macadamia oil ingestion on visceral adiposity associated with diets that contain processed foods and substantial amounts of fat, sugar, protein, low fiber, and more closely simulates a Western human diet. Also, when

reproducing two models of CD, we demonstrated different results on body fat mass (figure 2); therefore, we showed that not every "obesogenic" diet induces obesity in the same proportion.

The mass of retroperitoneal and epididymal adipose tissue increased significantly in the group that received the cafeteria diet 1, affecting the increase of adipocyte area. On the other hand, animals submitted to diet 2, we observed a significant increase only of retroperitoneal adipose tissue. These results demonstrate that high consumption of kilocalories, mainly from dietary fat, maybe one of the main factors contributing to the increase in adiposity in mice. Similar results have been shown by others (HU et al., 2018; HIGA et al., 2014; SAMPEY et al., 2011).

In diet 2 model, we observed that ingestion of macadamia oil promoted an increase in epididymal fat and an additional increase of retroperitoneal fat. These results corroborate with a previous study on the effect of macadamia oil on visceral adiposity (LIMA et al., 2014). Some factors that may be associated with these effects could possibly be related to the increase in the availability of simple sugars concomitant with the supplementation with macadamia oil in the activation of lipogenic pathways (DE MELO et al., 2018; LEE et al., 2015; CARTA et al., 2017). That is because excessive dietary glucose and fructose "*per se*" might be stimulating lipogenesis via activation of the transcription factor carbohydrate sensitive response element-binding protein (ChREBP) (UYEDA, REPA, 2006). Another possibility is that additional oleic acid, coming from macadamia oil, could modulate the activity of liver X receptors (LXR), promoting LXR-dependent hepatic lipogenesis without detrimental effects on the liver (DUCHEIX et al., 2017). In addition to that, it is known that palmitic acid is the main product of fatty acid synthesis (CARTA et al., 2017). Therefore, the increased proportion of this fatty acid in mice ingesting diet 2 and supplemented with macadamia oil may be a result of increased de novo lipogenesis (HUDGINS et al., 2011). Also, it has been shown that increased proportion of saturated fatty acids (mainly stearic acid)

causes decrement in β -adrenergic receptor affinity and hormone-sensitive lipase activity, increased expression of transcriptional factors such as PPAR γ and reduction of sympathetic activity in skeletal muscle (MATSUO, SUZUKI, 1994; TAKEUCHI et al., 1995; WAJCHENBERG, 2000). Nevertheless, the imbalance between saturated and unsaturated fatty acids incorporated in tissues and plasma (Table 3) could further stimulate transcription factors to promote a positive lipogenic balance (LEE et al., 2015; ABBOTT et al., 2012).

Other possible explanation to the increased expansion of the visceral adipose tissue in mice ingesting diet 2 and macadamia oil might be related to the obesogenic effect of the total amount of fat ingested. By feeding daily doses of macadamia oil to the mice ingesting diet 2, we increased their fat consumption in ~13%. Therefore, this additional dietary fat might be a relevant factor and cannot rule out.

Our study has the advantage of using edible oil as an intervention. Our dose is equivalent to approximately half a tablespoon of oil per day (~4.6g) when normalized for humans (NAIR; JACOB., 2016). Differently, previous studies used the isolated form of PA 300 mg/kg/b.m. (BOLSONI-LOPES et al., 2013; SOUZA et al., 2014). Nevertheless, they also revealed similar results on visceral adiposity in mice of the same strain used by us. One study carried out in mice also used macadamia oil as an intervention. However, at a dose twice as higher as ours (LIMA et al., 2014). This study demonstrated that ingestion of macadamia oil caused attenuation in adipocyte hypertrophy when compared to a standard chow diet group (LIMA et al., 2014).

The diets used in this study represent a good model to study the obesogenic effects of nutritional interventions, mainly when compared to high-fat diet traditional models that are difficult to translate to humans. However, one significant limitation is that they are difficult to standardize and reproduce, depending on the products available to produce diets, products brand and the nutritional content of the rodent chow used to create the diet. Those several

sources of variation may lead to different obese phenotypic profiles for distinct laboratories preventing them from finding the same results (SMYTH, HERON, 2006; CORDAIN et al., 2005). Also, we were unable to test different doses of macadamia oil because of the time, the number of experimental animals available and the human resources needed to repeat the experimental design.

In conclusion, macadamia oil ingestion increased the expansion of visceral adipose tissue when associated with the cafeteria diet enhanced in simple sugars. Also, macadamia oil ingestion did not increase or prevent the adipogenic effect of a cafeteria diet with higher amounts of lipids. Therefore, macadamia oil ingestion induces different outcomes depending on the composition of the diet ingested by an individual. Such feature insights further investigation.

Conflict of Interest

The authors declare there is no conflict of interest to be disclosed

Funding and Acknowledgments

We appreciate the support given by the MCTI/CNPQ/Universal 14/2014, Coordination of Improvement of Higher-Level Personnel (CAPES) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) from received scholarships. A special thank you to Professor, Katya Naliwaiko and professor Luis Claudio Fernandes for making the HPLC equipment facility.

References:

ABBOTT, S. K., ELSE, P. L., ATKINS, T. A., AND HULBERT, A. J. Fatty acid composition of membrane bilayers: importance of diet polyunsaturated fat balance. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1818, p. 1309–1317, 2012.

ARAPOSTATHI C, TZANETAKOU IP, KOKKINOS AD, TENTOLOURIS NK, VLACHOS IS., et al. A diet rich in monounsaturated fatty acids improves the lipid profile of mice previously on a diet rich in saturated fatty acids. A diet rich in monounsaturated fatty acids improves the lipid profile of mice previously on a diet rich in saturated fatty acids. **Angiology**, v. 62, p. 636-40, 2011.

BOLSONI-LOPES A, FESTUCCIA WT, FARIAS TS, CHIMIN P, TORRES-LEAL FL, DEROGIS PB, DE ANDRADE PB, MIYAMOTO S, LIMA FB, CURI R, ALONSO-VALE MI. Palmitoleic acid (n-7) increases white adipocyte lipolysis and lipase content in a PPAR α -dependent manner. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 305, p.1093-102, 2013.

BARRENA et al., Effect of linseed oil and macadamia oil on metabolic changes induced by high-fat diet in mice. **Cell Biochem Funct**, v. 32, p. 333–340, 2014.

CALDER PHILIP C., Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 39, p. 18–32, 2105.

CAO H, et al. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. **Cell**, v. 134, p. 933-944, 2008.

CARTA G, MURRU E, BANNI S, MANCA C. Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications. **Front Physiol**, v. 8; p. 902, 2017.

CORDAIN L, EATON SB, SEBASTIAN A, MANN N, LINDEBERG S, WATKINS BA et al. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. **Am J Clin Nutr** v. 81, p. 341–354, 2005.

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.

DUCHEIX S, MONTAGNER A, POLIZZI A, LASSERRE F, RE'GNIER M, MARMUGI A, et al. Dietary oleic acid regulates hepatic lipogenesis through a liver X receptor-dependent signaling. **PLoS ONE**. v. 7, p. 181-393, 2017.

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

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**, vol. 46, no. 3, pp. 209–228, 2011.

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.

HODSON, L. SKEAFF, C. M. FIELDING, B. A. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Prog Lipid Res* , v. 47, p. 348–380, 2008.

HU S, WANG L, et al., Dietary Fat, but Not Protein or Carbohydrate, Regulates Energy Intake and Causes Adiposity in Mice. ***Cell Metab.*** v. 4, p. 415-431, 2018.

HUDGINS LC, PARKER TS, LEVINE DM, HELLERSTEIN MK. A dual sugar challenge test for lipogenic sensitivity to dietary fructose. ***J Clin Endocrinol Metab*** v. 96, p. 861–878, 2011.

LEE, J. J., LAMBERT, J. E., HOVHANNISYAN, Y., RAMOS-ROMAN, M. A., TROMBOLD, J. R., WAGNER, D. A., et al. Palmitoleic acid is elevated in fatty liver disease and reflects hepatic lipogenesis. ***Am. J. Clin. Nutr.*** v. 101, p. 34–43, 2015.

LIMA EA, et al., Macadamia oil supplementation attenuates inflammation and adipocyte hypertrophy in obese mice. ***Mediators Inflamm.*** v.8, p. 706-734, 2014.

MAGUIRE L. S., S. M. O’SULLIVAN, K. GALVIN, T. P. O’CONNOR, AND N. M. O’BRIEN. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. ***International Journal of Food Sciences and Nutrition***, v. 55, n. 3, p. 171–178, 2004.

MAHMOUDI, M., CHARRADI, K., LIMAM, F., AOUANI, E. Grape seed and skin extract as an adjunct to xenical therapy reduces obesity, brain lipotoxicity and oxidative stress in high fat diet fed rats. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 12, n. 1, p. 115–126, 2018.

MATSUO T, SUZUKI M. Beef tallow diet decreases lipoprotein lipase activities in brown adipose tissue, heart, and soleus muscle by reducing sympathetic activities in rats. **J Nutr Sci Vitaminol**, v. 40, p. 569-581, 1994.

NAIR AB, JACOB S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm.* v. 7, n. 2, p.27-31, 2016.

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.

SMYTH S, HERON A. Diabetes and obesity: the twin epidemics. **Nat Med**, v. 12, p. 75–80, 2006.

SOUZA CO, TEIXEIRA AA, LIMA EA, BATATINHA HA, GOMES LM, CARVALHO-SILVA M, MOTA IT, STRECK EL, HIRABARA SM, ROSA NETO JC. Palmitoleic acid (n-7) attenuates the immunometabolic disturbances caused by a high-fat diet independently of PPAR α . **Mediators Inflamm.** p. 582-197, 2014.

TAKEUCHI, H.; MATSUO, T.; TOKUYAMA, K.; SHIMOMURA, Y.; SUZUKI, M. Diet-induced thermogenesis is lower in rats fed a lard diet than in those fed a high oleic acid safflower oil diet, a safflower oil diet or a linseed oil diet. **J. Nutr.** v. 125, p. 920–925, 1995.

UYEDA, K., AND REPA, J. J. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. **Cell Metab**, v. 4, p. 107–110, 2006.

VANDEVIJVERE S, CHOW CC, HALL KD, UMALI E, SWINBURN BA. Increased food energy supply as a major driver of the obesity epidemic: a global analysis, **Bull. World Health Organ**, v. 93, p. 446–456, 2015.

WAJCHENBERG BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocr Rev**, v. 21, p. 697-738, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity and overweight. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Updated March 16, 2019.

Table and figures.

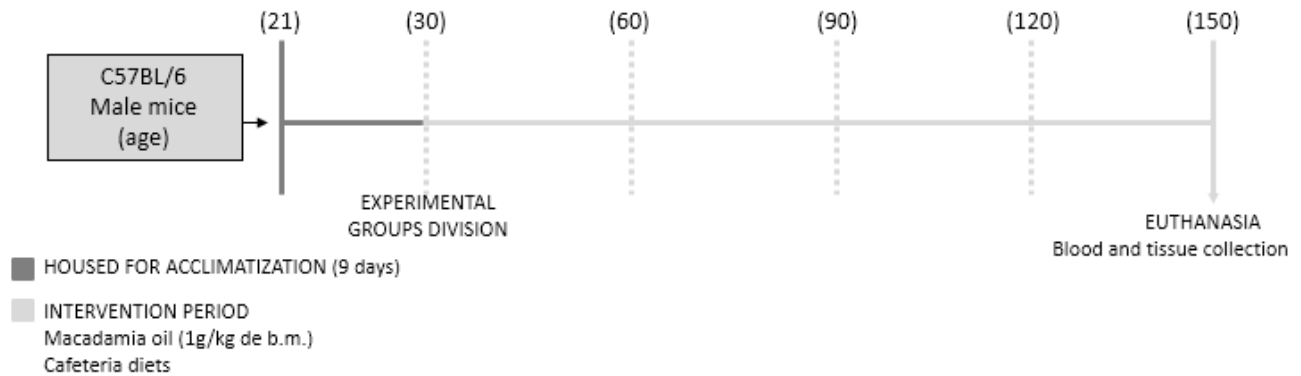


Figure 1. Schematic timeline.

Table 1. Percentage (%) of fatty acids present in diets and macadamia oil from high precision liquid chromatography.

Fatty Acids	Standard chow diet	Cafeteria diet	Macadamia oil
Miristic 14:0	2.99	1.35	1.00
Palmitic 16:0	36.92	14.32	7.67
Palmitoleic 16:1n-7	1.12	0.14	22.32
Stearic 18:0	1.84	5.15	3.81
Oleic 18:1n-9	17.73	40.39	57.04
Linoleic 18:2n-6	18.24	24.79	7.49
α-linolenic 18:3n-3	0.46	0.06	0.68
Arachidonic 20:4n-6	19.39	13.70	ND
EPA 20:5n-3	0.89	0.06	ND
DHA 22:6n-3	0.42	0.05	ND

Abbreviations: EPA: Eicosapentaenoic fatty acid, Docosahexaenoic fatty acid, ND: not detected.

Table 2. Averaged consumption, energy intake, macronutrients, total body mass triacylglycerol and total cholesterol of mice over 16 weeks of experimental period supplemented or not with macadamia oil.

Group	DIET 1				DIET 2			
	SD	MO	CAF	CDO	SD	MO	CAF	CDO
<i>n</i>	10	10	10	10	12	10	12	9
Total Food Intake (g)	363.0±9.5	293.0±15.4 [#]	286.6±5.0*	266.9±4.5	341.8±9.1	327.6±6.4	286.8±5.3*	262.0±4.9
Mean food intake (g/week)	27.9±0.7	23.6±0.5	22.0±0.3*	20.5±0.3	26.2±0.7	25.2±0.4	22.0±0.4*	20.1±0.3 [#]
EI (mean/kcal/week)	82.6±2.1	70.5±1.6 [#]	97.8±1.7*	90.0±1.4	78.8±2.1	75.8±1.4	95.9±1.7*	87.3±1.7 [#]
EI (mean/kcal/last 3 weeks)	87.0±3.8	72.1±2.1 [#]	102.6±1.9*	97.1±2.6	77.6±2.2	75.9±1.9	89.7±1.4*	84.2±2.0
CARBOHYDRATE (Percentage of total kcal)								
Mean of week	16.2±0.4	14.0±0.3 [#]	10.4±0.1*	9.5±0.1 [#]	15.5±0.4	14.8±0.2	11.9±0.2*	10.8±0.2
Mean of last 3 weeks	17.1±0.7	14.1±0.4 [#]	10.9±0.2*	10.3±0.2	15.2±0.4	14.8±0.3	11.1±0.1	10.5±0.2
PROTEIN (Percentage of total kcal)								
Mean of week	8.0±0.2	6.9±0.1 [#]	3.0±0.0*	2.8±0.0	7.6±0.2	7.3±0.1	2.6±0.0*	2.4±0.0
Mean of last 3 weeks	8.4±0.3	6.9±0.2 [#]	3.2±0.0*	3.0±0.0	7.5±0.2	7.3±0.1	2.4±0.0*	2.3±0.0
LIPIDS (Percentage of total kcal)								
Mean of week	3.3±0.0	2.8±0.0 [#]	8.5±0.1*	8.0±0.1 [#]	3.1±0.0	3.0±0.0	7.5±0.1*	6.8±0.1 [#]
Mean of last 3 weeks	3.4±0.1	2.8±0.0 [#]	9.0±0.1*	8.5±0.2 [#]	3.1±0.0	3.0±0.0	7.0±0.1*	6.6±0.1
Mean total body mass (g)^{&}	18.2±0.3	17.3±0.2	19.1±0.3	18.9±0.2	20.8±0.9	19.9±0.6	20.7±0.4	20.2±0.5
Mean total body mass (g)[§]	28.6±1.0	27.4±0.7	27.7±1.0	28.9±1.0	29.6±1.0	30.8±0.6	27.0±0.6	28.3±0.9
Mean total body mass (g)[§]	24.7±0.5	23.2±0.5	24.3±0.5	24.6±0.4	25.4±0.8	25.0±0.4	24.0±0.4	23.8±0.4
TAG (mg/dL)	85.9±5.6	65.0±3.6 [#]	59.8±3.8*	66.6±4.4	68.1±3.0	55.1±4.6	35.0±3.6*	60.2±7.3 [#]
TC (mg/dL)	76.1±2.5	76.7±4.6	101.6±7.0*	103.2±6.2	71.1±4.6	97.0±9.6	92.9±5.9	103.1±8.0

All values are presented as mean ± EPM. Two-way ANOVA followed by the Holm-Sidak's multiple comparisons test; p<0.05.

*Different from standard chow diet within the cafeteria diet group. # Different from the respective control group. &-First three weeks. §-Last week. §- all experimental time. Abbreviations: SD: standard chow diet group; MO: standard chow diet plus macadamia oil group; CAF: cafeteria diet group; CDO: cafeteria diet plus macadamia oil group; EI: Energy intake; TAG: Triacylglycerol; TC: Total cholesterol.

Table 3. Percentage (%) of red blood cells fatty acids in mice over 16 weeks of experimental period supplemented or not with macadamia oil.

<i>Group</i>	DIET 1				DIET 2	
	SD	MO	CAF	CDO	CAF	CDO
<i>n</i>	5	6	5	6	5	5
<i>Fatty acids</i>						
Myristic 14:0	8.20±0.2	3.37±0.29	5.28±0.4*	5.40±0.7	6.10±0.63*	8.28±0.81 [#]
Palmitic 16:0	28.66±0.94	19.34±1.67	25.47±1.26*	24.90±0.97	21.95±0.68*	28.82±3.33 [#]
Palmitoleic 16:1n-7	1.01±0.10	1.16±0.11	0.37±0.06*	2.00±0.28 [#]	0.91±0.25	1.92±0.28 [#]
Stearic 18:0	7.99±0.14	5.586±0.55	8.996±0.48*	8.886±0.77	9.31±0.91*	10.15±2.5
Oleic 18:1n-9	15.10±1.36	46.93±2.96	27.57±1.03*	29.55±1.53	25.76±1.91*	28.06±4.10
Linoleic 18:2n-6	16.67±1.20	10.19±0.59	10.84±0.43*	11.31±0.81	23.20±1.67*	11.02±1.36 [#]
α-linolenic 18:3n-3	0.14±0.06	0.09±0.02	0.05±0.03*	0.04±0.03	0.07±0.04*	0.06±0.02
AA 20:4n-6	21.91±0.69	12.12±0.64	21.28±0.61	17.82±1.61 [#]	10.12±0.34	8.95±2.46
EPA 20:5n-3	0.25±0.13	0.16±0.01	0.10±0.07*	0.06±0.03	0.11±0.07*	0.36±0.11 [#]
DHA 22:6n-3	0.02±0.04	0.01±0.02	0.00±0.01	0.00±0.00	0.05±0.03	0.05±0.01
Ratio SFA/UFA	0,81±0,02	0,41±0,04	0,66±0,04*	0,64±0,05	0,60±0,05*	0,90±0,16 [#]

All values are presented as mean ± EPM. Two-way ANOVA followed by the Holm-Sidak's multiple comparisons test; p<0.05.

* Different from Standard chow diet within the cafeteria diet group. # Different from the respective control group. Abbreviations: SD: standard chow diet group; MO: standard chow diet plus macadamia oil group; CAF: cafeteria diet group; CDO: cafeteria diet plus macadamia oil group, AA: Arachidonic fatty acid, EPA: Eicosapentaenoic fatty acid, Docosahexaenoic fatty acid. Percentage (%) ratio of saturated fatty acid (SFA)/unsaturated fatty acid(UFA).

WHITE ADIPOSE TISSUE

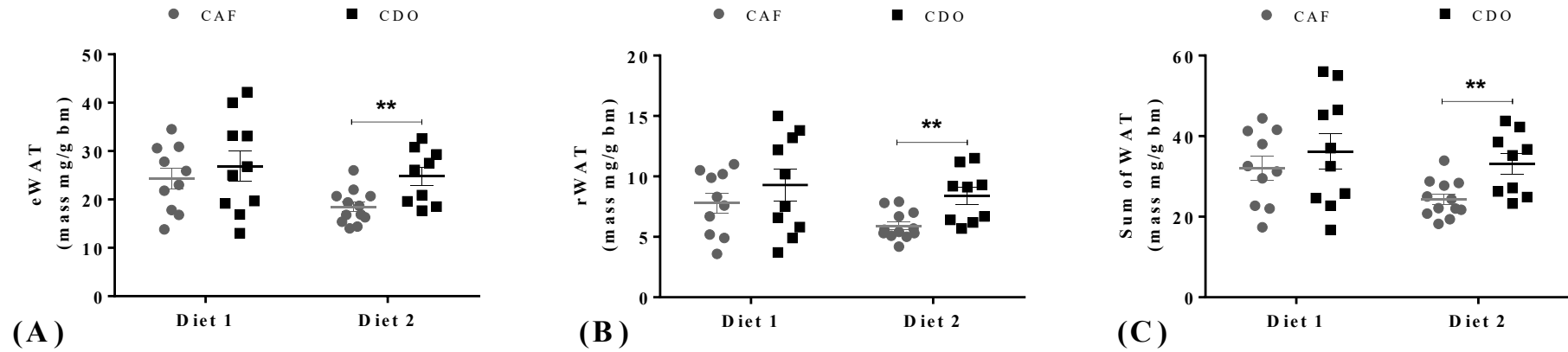


Figure 2. Comparison of the different fractions of body fat in mice over 16 weeks of experimental period supplemented or not with macadamia oil. (A) Epididymal adipose tissue (B) Retroperitoneal Adipose Tissue. (C) Sum of Epididymal and retroperitoneal adipose tissue. All values are presented as mean \pm EPM. Two-way ANOVA followed by the Holm-Sidak's multiple comparison test; ** $p < 0.01$. CAF: cafeteria diet group (diet 1 $n = 10$; diet 2 $n = 12$); CDO: cafeteria diet plus macadamia oil group (diet 1 $n = 10$; diet 2 $n = 09$).

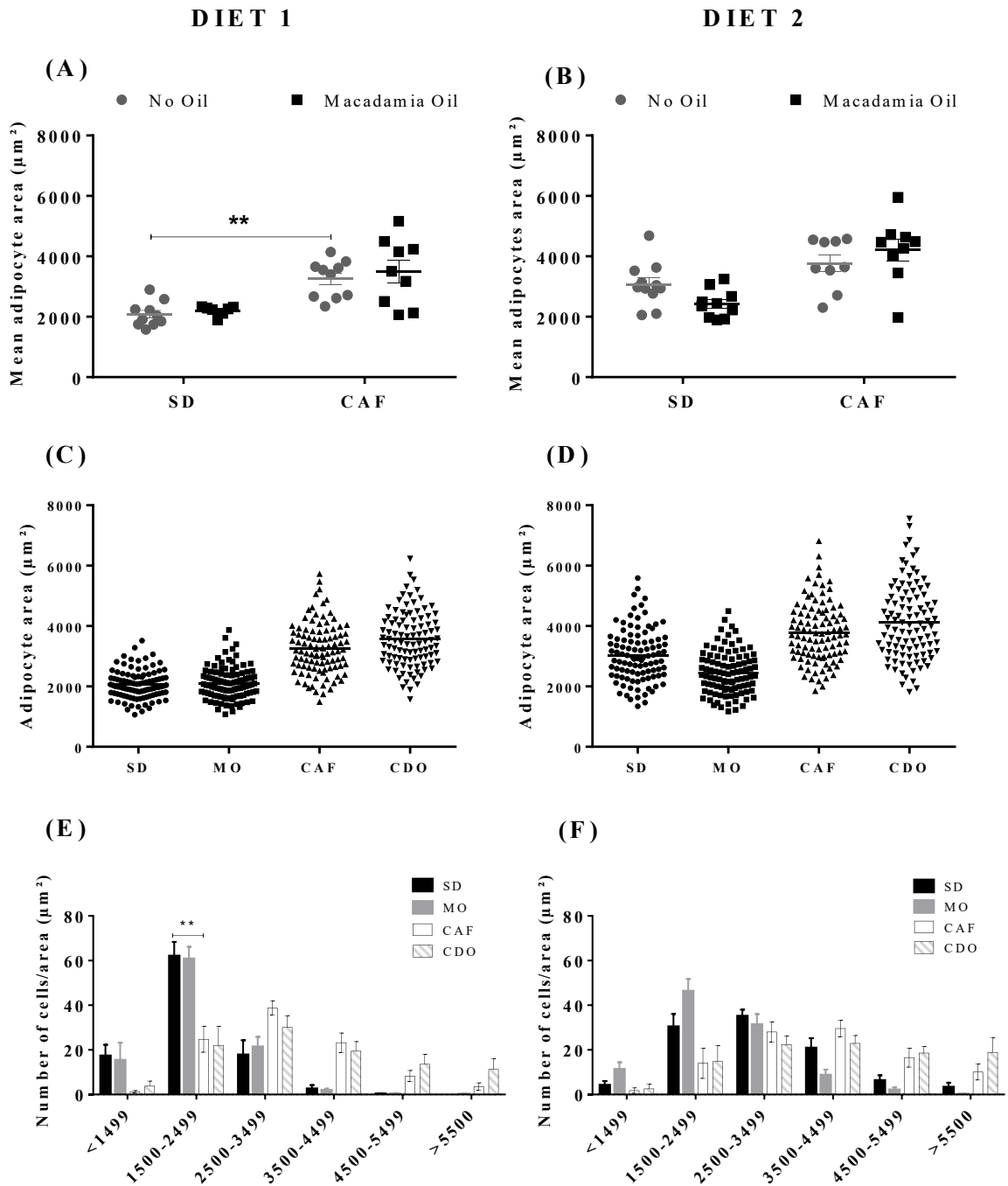


Figure 3. Area and distribution of adipocytes per range of area in epididymal adipose tissue in mice over 16 weeks fed different diets, supplemented or not with macadamia oil. (A) and (B) Represented mean the area of the adipocytes. (C) and (D) represented adipocytes area. (E) and (F) Represented the number of cells per area. Abbreviations: SD: standard chow diet group (diet 1 $n=10$; diet 2 $n=11$); MO: standard chow diet plus macadamia oil group (diet 1 $n=7$; diet 2 $n=10$); CAF: cafeteria diet group (diet 1 $n=10$; diet 2 $n=11$); CDO: cafeteria diet plus macadamia oil group (diet 1 $n=10$; diet 2 $n=9$). All representative graphs were measured using Zenlite® software. All values are presented as mean \pm SEM. Two-way ANOVA followed by the Holm-Sidak's multiple comparisons test; ** $p<0.01$.

Supplementary materials:

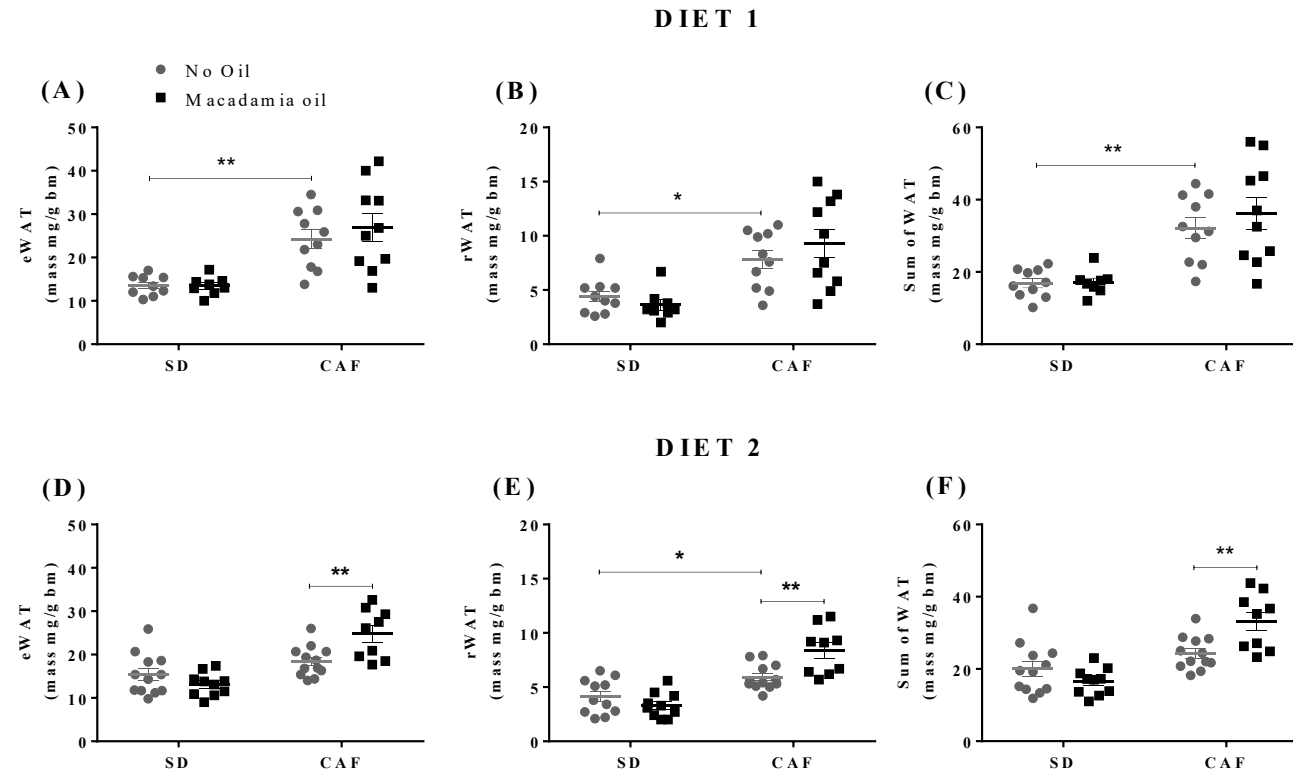


Figure S1. Comparison of the different fractions of body fat in mice over 16 weeks of experimental period supplemented or not with macadamia oil. (A) and (D) Epididymal adipose tissue (B) and (E) Retroperitoneal Adipose Tissue. (C) and (F) Sum of Epididymal and retroperitoneal adipose tissue. All values are presented as mean \pm SEM. SD: standard chow diet group (diet 1 $n=10$; diet 2 $n=11$); MO: standard chow diet plus macadamia oil group (diet 1 $n=7$; diet 2 $n=10$); CAF: cafeteria diet group (diet 1 $n=10$; diet 2 $n=11$); CDO: cafeteria diet plus macadamia oil group (diet 1 $n=10$; diet 2 $n=9$). Two-way ANOVA followed by the Holm-Sidak's multiple comparisons test; * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

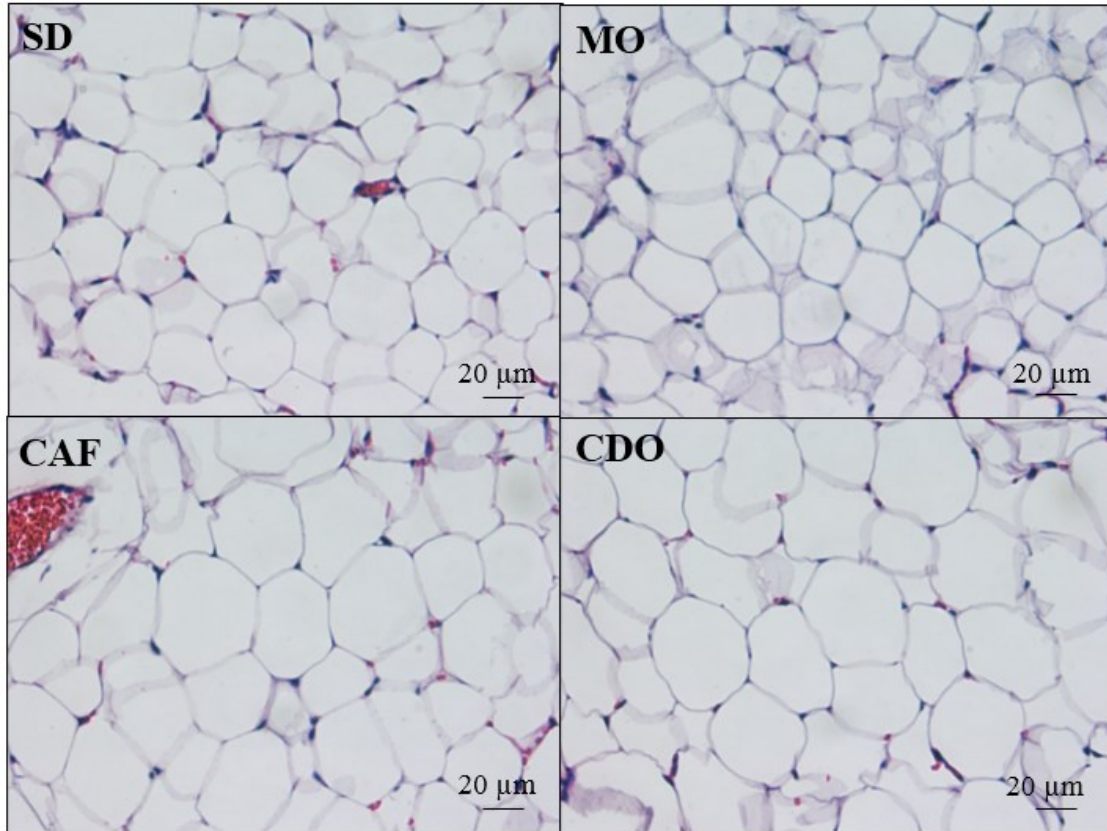
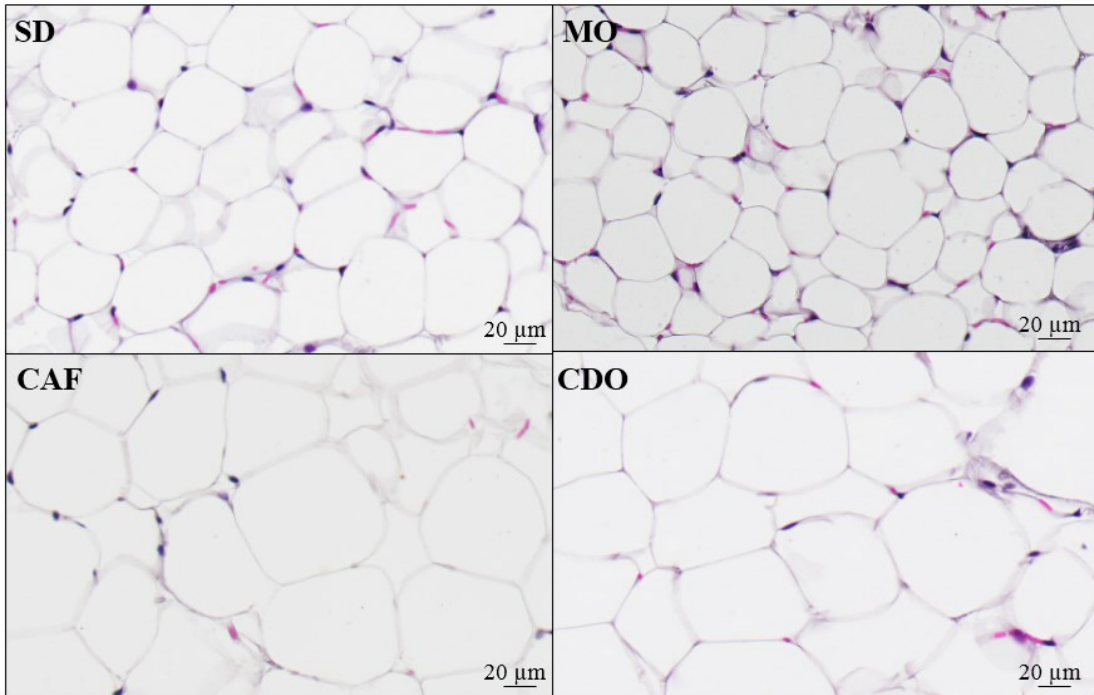
A) DIET 1**B) DIET 2**

Figure S2. Representative images of epididymal adipose tissue. (A) Diet 1, (B) Diet 2. Abbreviations: SD: standard chow diet group; MO: standard chow diet plus macadamia oil group; CAF: cafeteria diet group; CDO: cafeteria diet plus macadamia oil group.

7.2 MANUSCRITO 2

Pretendemos enviar este manuscrito para a revista: Nutrition Research

ARTIGO ORIGINAL

TÍTULO: Ingestão de óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico previne o aumento do tecido adiposo visceral em camundongos c57bl/6 alimentados com dieta de cafeteria

Autores: Thayz Rodrigues Chagas^a, Natália Engroff do Canto^b, Cinthia Rejane Correa^a, Bruna Aparecida Comotti de Oliveira^d, Everson Araújo Nunes^{a,b,c}.

Afiliação:

^aPrograma de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. CEP: 88040-900.

^bPrograma Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. CEP: 88040-900.

^cDepartamento de Fisiologia e Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. CEP: 88040-900.

^dPrograma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Brasil. CEP: 81531-970

Email de cada autor:

Thayz Rodrigues Chagas - thayzchagas@gmail.com

Natália Engroff do Canto - ne.docanto@gmail.com

Cinthia Rejane Correa - cinthia89@gmail.com

Bruna Aparecida Comotti de Oliveira - brunacomotti89@gmail.com

Everson Araújo Nunes - everson.nunes@ufsc.br

Autor correspondente:

Everson Araújo Nunes.

Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima, Trindade, Florianópolis – Santa Catarina – Brasil – CEP: 88040-900.

Departamento de Ciências Fisiológicas.

Fone: +55 48 3721-2289.

Email: everson.nunes@ufsc.br

RESUMO

Introdução/Objetivos: Embora os ácidos graxos da dieta possam modular respostas metabólicas e imunológicas, os efeitos do ácido palmitoleico (16:1n-7) sobre o tecido adiposo não estão esclarecidos. Assim, nós verificamos se a ingestão de um óleo enriquecido com 50% deste ácido graxo pode ser uma estratégia terapêutica para mitigar o efeito de uma dieta de cafeteria mais representativa para tendências alimentares modernas. *Métodos:* para este trabalho, camundongos c57bl/6 foram divididos em quatro grupos: alimentados com uma dieta padrão, alimentados com dieta de cafeteria, alimentado com uma dieta padrão e suplementados com óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico (1g/kg de m.c. por dia) por via orale um último grupo alimentados com dieta de cafeteria e suplementados com óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico, durante 16 semanas. *Resultados:* Observamos que a ingestão do óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico, preveniu o aumento do tecido retroperitoneal e epididimal e atenuou alterações na homeostase glicêmica causadas por dieta obesogênica camundongos. *Conclusões:* a suplementação com o óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico durante 16 semanas, na dose de 1g/kg/m.c. por dia preveniu o aumento da gordura visceral e atenuou as alterações metabólicas induzidas por uma dieta obesogênica.

Palavras-chave: Obesidade. Dieta de cafeteria. Ácidos Graxos Ômega-7. Metabolismo. Inflamação.

INTRODUÇÃO

A obesidade é definida pelo acúmulo ou excesso de gordura corporal resultante de um desequilíbrio energético, influenciado por fatores comportamentais, ambientais, culturais e genéticos (OKORODUDU et al., 2010). Frequentemente associada às desordens metabólicas, incluindo, disfunção tecidual, diminuição da tolerância a glicose, resistência à insulina (BAYNARD et al., 2012). De acordo com um relatório da OMS publicado no ano de 2016, 650 milhões de adultos têm obesidade (WHO, 2019). Diante disso, abordagens nutricionais representam importantes alvos terapêuticos, uma vez que vias celulares e moleculares são continuamente reguladas por metabólitos, como por exemplo, mediadores lipídicos bioativos (JOHNSON, MAKOWSKI; 2015).

Dentro do campo das intervenções nutricionais, o ácido palmitoleico (C16:1n-7), recebeu interesse significativo na última década, começando com a sua descrição como uma lipocina, ou seja, um mensageiro lipídico liberado no tecido adiposo com ação biológica similar à de hormônios, capaz de aumentar a sensibilidade à insulina no músculo esquelético e reduzir o acúmulo de gordura no fígado de camundongos. (CAO et al., 2008). Este ácido graxo pode ser sintetizado pela dessaturação do ácido palmítico (C16:0) em uma reação catalisada pela esteroil-CoA dessaturase-1 (SCD-1), dessa forma, os principais locais da atividade desta enzima são, tecido adiposo e o fígado (WALKER et al., 2015). Contudo, o ácido palmitoleico, foi descrito como um importante bloqueador, da expressão e atividade, da SCD-1, reduzindo a resistência à insulina e a doença hepática gordurosa não alcoólica em camundongos (CAO et al., 2008; YANG ZH1, MIYAHARA H, HATANAKA A., 2011).

Além disso, estudos demonstraram em cultura de adipócitos e macrófagos, um aumento da fosforilação da AMP ativada por proteína cinase (AMPK) quando expostas (200 μ M e 0,5mM) de ácido palmitoleico, promovendo um aumento da lipólise e do metabolismo oxidativo (BOLSONI-LOPES et al., 2013; CHAN et al., 2015).

Além disso, outros estudos observaram que o ácido palmitoleico aumentou a sensibilidade à insulina e a redução da glicemia em roedores com uma dose de 300 mg/kg/dia durante 10 dias, concomitante a ingestão de uma dieta hiperlipídica (BOLSONI-LOPES et al., 2013; SOUZA et al., 2014)

Em concordância com os estudos *in vitro*, a suplementação oral de 300mg/kg/dia de ácido palmitoleico, em camundongos obesos, aumentou a fosforilação da AMPK nos hepatócitos, melhorando a sensibilidade à insulina pela ativação do (Receptor ativado do

proliferador peroxisoma alpha) PPAR α (SOUZA et al., 2017). Adicionalmente, a infusão intravenosa de ácido palmitoleico com 10 mg/kg/dia em ovinos obesos, aumentou a expressão da AMPK no tecido adiposo e no músculo esquelético, favorecendo a lipólise e a oxidação de ácidos graxos nestes tecidos (DUCKETT et al., 2014; BURNS et al., 2012).

Além disso, outros estudos evidenciaram efeitos imunomoduladores do ácido palmitoleico, demonstrando menor expressão de genes relacionados à via do TLR-4 em adipócitos de camundongos incubados com ácido palmitoleico (SHAW et al., 2013). Contudo, em macrófagos expostos ao ácido palmitoleico, foi observado menor expressão de genes inflamatórios com consequente redução na produção de citocinas pró-inflamatórias e maior diferenciação de macrófagos para um fenótipo anti-inflamatório (CHAN et al., 2015; CIMEN et al., 2016; SOUZA et al., 2017).

Apesar dos efeitos promissores sobre as alterações metabólicas relacionadas à obesidade, não são conhecidos os efeitos biológicos da ingestão de óleos com teor de ácido palmitoleico maiores de 35% em modelos obesogênicos mais representativos para dieta humana. Portanto, o objetivo do nosso trabalho, foi investigar o efeito da suplementação do óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico, sobre o tecido adiposo e desfechos metabólicos funcionais em camundongos C57BL/6 ingerindo ou não dieta de cafeteria.

METODOLOGIA

Desenho experimental

Foram utilizados 44 camundongos C57BL/6 machos com 21 dias de idade, provenientes do Laboratório de Pesquisa de Doenças Crônicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), estes animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com livre acesso a alimentos e água, em ambiente controlado, com temperatura (22 ± 2 ° C) umidade ($55 \pm 10\%$) e período de ciclo de luz (07:00 às 19:00).

Após passar por um período de adaptação de nove dias, no 30º foi verificado a glicemia de jejum e realizado a distribuição dos animais em quatro grupos experimentais: Grupo Controle (SD), que recebeu dieta padrão (dieta padrão comercial BIOBASE® 9301; Águas Frias, SC, Brasil) e água (1g/m.c./dia), grupo suplementado com óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico (1g/m.c./dia) e ração padrão (SDO50%), grupo que recebeu dieta de cafeteria e água (1g/m.c./dia) (CAF) e grupo suplementado com óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico (1g/m.c./dia) e dieta de cafeteria (CDO50%).

Após a divisão dos grupos, os animais foram expostos as respectivas dietas e suplementados por via oral, com óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico por 16 semanas, sendo que, ao final do período experimental, após 6 horas de privação alimentar, os animais foram eutanasiados por punção cardíaca, após anestesiados por inalação com Isoflurano na qual foram separadas amostras de sangue para análise de colesterol total, triglicerídeos, insulina. Posteriormente órgãos e tecidos foram cuidadosamente removidos e pesados em balança eletrônica analítica digital (TECNAL[®], SP, Brasil). Fragmentos dos tecidos de interesse (Tecido adiposo epididimal e fígado) foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido para armazenagem em freezer -80°C. Contudo, o tecido adiposo epididimal esquerdo dos animais, foram imediatamente fixados em paraformaldeído para futuras análises. A figura 1 mostra uma representação esquemática do protocolo completo. Todos os protocolos e procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da UFSC, sobre o protocolo número: 5855301015, que atende às diretrizes brasileiras e internacionais de requisitos para bem-estar animal e uso.

Dietas e ingestão alimentar

A dieta padrão foi composta por um percentual calórico de 59% de carboidratos, 29% de proteínas, 12% do total de gorduras e 3,00 kcal/grama. A dieta da cafeteria utilizada, baseou-se na composição proposta por Higa et al. (2014). Contém chocolate ao leite (10g), amendoim (10g), maizena cracker (5g), açúcar (5g) e ração padrão (15g), composta por um percentual de calorias de carboidratos de 47%, 14% de proteínas e 39% de gordura total e 4,41 de kcal/grama. Na Tabela 1, apresentamos o perfil de ácidos graxos encontrados na dieta padrão e dieta cafeteria. A matéria prima para a fabricação do óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico utiliza o peixe Alaska Walleye Pollok (*theragra chalcogramma*). Os ácidos graxos presentes neste óleo estão na forma de éster e são, o ácido palmitoleico (558 mg/g), ácido palmítico (257mg/g) e ácido oleico (1mg/g).

A ingestão de alimentos e a massa corporal, foram registrados uma vez por semana. A ingestão de alimentos foi determinada subtração do restante do alimento descontado do total daquele depositado na semana anterior. Então, uma média do consumo individual foi calculada pela soma do peso de todos os animais por gaiola, dividido pelo peso de cada animal na gaiola, multiplicado pela quantidade de ração que foi ingerida pelos animais da gaiola durante a semana.

Avaliação da tolerância à glicose intraperitoneal (TTGip)

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 30, 60, 90 e 120 minutos (HIGA et al., 2014). A partir desses valores calculou-se a área sob a curva (ASC). Esta avaliação foi realizada após 120 dias de execução do protocolo experimental.

Determinação de parâmetros plasmáticos após a morte dos animais

Amostras de plasma isoladas do sangue coletadas após a morte dos animais foram utilizadas para determinar o colesterol total, triacilglicerol por métodos colorimétricos, de acordo com as recomendações do fabricante de sistemas comerciais Biotécnica®. A concentração plasmática de insulina foi realizada por meio do sistema de microesferas utilizando o kit AlphaLISA®, de acordo com as orientações do fabricante (AL204C) (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA). As concentrações plasmáticas e teciduais de citocinas (IL-6, IL-10, MCP-1, IFN γ , TNF e IL-12p70) foram determinadas por citometria de fluxo (BD Biosciences FACSCantoII flow cytometer® - BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) utilizando o kit comercial BD Cytometric Bead Array (CBA) mouse Inflammation Kit® (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e seguindo as instruções do fabricante. Foram expressas em pg/mL. Os limiares mínimos de detecção de foram 5 pg/mL, 17,5 pg/mL, 52,7 pg/mL, 2,5 pg/mL, 7,3 pg/mL e 10,7 pg/mL, respectivamente.

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 ressuspensa 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).

Análise histológica do tecido adiposo branco

Imediatamente após a morte dos animais, as amostras do tecido adiposo (epididimal) foram transferidas para cassetes histológicos de plástico e fixadas em paraformaldeído 4% por 48 horas a 8° C desidratadas em 70% de etanol e incluídas em parafina. Após esta etapa foi realizada a microtomia (0.5µm) de amostras de tecido adiposo de cada grupo experimental obtidas em micrótomo e aderidas em lâminas de vidro, em seguida foram desparafinadas em xilol e reidratadas para coloração com Hematoxilina-Eosina cobertas com Balsamo do Canadá e então as imagens foram capturadas pelo digitalizador de lâminas automatizado (ZEISS, Oberkochen, Alemanha) e posteriormente analisadas pelo software Zenlite® (edição Blue, ZEISS, Oberkochen, Alemanha). O perímetro celular foi obtido pelo contorno manual de células com membranas plasmáticas intactas. Dez a quinze campos (aproximadamente 150 células por seção) foram analisados cegamente e aleatoriamente para determinação da área média dos adipócitos. Decidimos trabalhar apenas com tecido epididimal, pois a adição dessa gordura está relacionada ao maior risco de desenvolver doenças metabólicas, e por ser a mais abundante nesses animais.

Determinação do perfil ácidos graxos das hemácias e tecido adiposo

O perfil lipídico do tecido adiposo (0,010g) e hemácias (200 µl) dos animais, foram determinadas por cromatografia líquida de alta performance (*High Performance Liquid Chromatography*- HPLC). As amostras foram submetidas à extração lipídica pelo método de Folch (1957). Os lipídios totais, extraídos das membranas celulares foram saponificados em NaOH 0,5 M em metanol (90% v/v). Os ácidos graxos saponificados foram extraídos em 3 mL de hexano e secos em fluxo de nitrogênio gasoso. Para detecção em cromatógrafo líquido de alta precisão (HPLC), os ácidos graxos foram ressuspensos em acetonitrila e derivatizados usando metoxi-coumarina (1 mg; mL), a 60° C por 15 minutos em sonicador. Após derivatização, 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 100Å. A eluição aconteceu pela injeção de fase móvel, em gradiente isocrático de acetonitrila 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 excitação 398 nm. A incorporação lipídica foi estimada através da diferença entre os percentuais de cada ácido graxo, quando comparados com o percentual no grupo controle.

Tratamento e análise dos dados

Os 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 deles, seguido do post hoc de Holm-Sidak para comparação múltipla de dados paramétricos. O método *extreme studentized deviate* foi aplicado para determinar se um valor atingiu um outlier significativo (teste de Grubb, disponível online no GraphPad QuickCalcs). Para todos os testes, foi adotado o nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Ingestão energética e massa corporal

Para avaliar a quantidade energética ingerida pelos animais durante o protocolo experimental, descrevemos na tabela 1 os dados de ingestão alimentar. Nosso estudo demonstrou que houve um aumento significativo ($p < 0,01$) na média da ingestão energética semanal no grupo CAF, quando comparado com o grupo SD, por influência da dieta ($F = 17,84$; $p < 0,01$) durante o protocolo experimental de 16 semanas. Ao final do protocolo não observamos diferenças no ganho de massa corporal total entre os grupos.

Perfil lipídico plasmático e hepático

Os lipídios plasmáticos foram utilizados para avaliar os parâmetros metabólicos associados com a ingestão energética da dieta e óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico. Nós demonstramos na tabela 1 que as concentrações de triacilglicerol plasmáticas estavam aumentadas no grupo CAF e diminuíram significativamente ($p < 0,05$) no grupo CDO quando comparado com o grupo CAF, por uma interação significativa ($F = 8,09$; $p < 0,01$) mas que não foi influenciada pelos fatores dieta ou óleo.

As concentrações hepáticas de colesterol total aumentaram significativamente ($p < 0,01$) no grupo CAF quando comparado com o grupo SD, por influência dos dois fatores,

dieta ($F=76,36$; $p < 0,01$) e óleo ($F=9,75$; $p < 0,01$), e observamos um incremento adicional no grupo CDO ($p < 0,01$) quando comparado com o grupo CAF.

Tolerância à glicose e insulina de jejum

Para avaliarmos se o consumo de dieta de cafeteria associado a ingestão de óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico promoveria alterações na glicemia, avaliamos a tolerância da glicose no 120º dia de experimento.

Nós demonstramos (tabela 1) que houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da glicemia de jejum do grupo CAF quando comparado com o grupo SD, por influência da dieta ($F= 23,71$; $p < 0,01$). Adicionalmente, podemos observar que houve uma discreta diminuição da glicemia de jejum no grupo CDO quando comparado com o grupo CAF, contudo, esta diminuição não foi significativa.

Nós demonstramos na figura 2, que a dieta de cafeteria foi eficiente em causar uma diminuição da tolerância à glicose no grupo CAF ($p < 0,01$) quando comparado com o grupo SD refletindo no aumento da área abaixo da curva, por uma interação significativa ($F= 12,93$; $p < 0,01$). Adicionalmente, observamos um aumento da tolerância à glicose no grupo CDO, refletindo uma melhor responsividade durante o desafio com a glicose quando comparado com o grupo CAF, e isto contribuiu para a diminuição significativa da área abaixo da curva, por efeito da interação entre os fatores ($F = 12,93$; $p < 0,01$).

Ao final do período de intervenção, associado a estes experimentos funcionais, avaliamos as concentrações plasmáticas de insulina de jejum e observamos uma diminuição significativa ($p < 0,01$) no grupo CDO quando comparado com seu controle, sem influência dos fatores (tabela 1).

Massa adiposa

Para confirmarmos se estas alterações funcionais, observadas entre os grupos CAF e CDO poderiam estar relacionadas com o a massa do tecido adiposo branco, no dia da eutanásia dos animais nós retiramos cuidadosamente os tecidos retroperitoneal, inguinal e epididimal para pesagem e realizamos a análise histológica do tecido epididimal. Decidimos utilizar para esta análise esta gordura visceral, por ser mais abundante nestes camundongos e por ser mais representativa para doenças metabólicas.

Nós demonstramos na figura 3ABC, que a dieta de cafeteria foi eficiente em aumentar as massas de gorduras (epididimal, retroperitoneal e inguinal quando comparamos os grupos

CAF com o grupo SD ($F=12,45$; $F= 18,23$; $F= 5,224$; $p<0,05$) por influência da dieta ($F= 40,06$; $F= 38,39$; $F= 18,41$; $p<0,05$) respectivamente. Adicionalmente, este aumento das massas, refletiram no aumento significativo do índice de adiposidade no grupo CAF quando comparado com o grupo SD por interação ($F= 14,73$; $p<0,01$) influenciada pela dieta ($F= 40,99$; $p<0,01$). Na figura 4A observamos um aumento significativo ($p<0,01$) da média das áreas dos adipócitos, causada pela interação significativa ($F= 4,35$; $p<0,05$) por influência da dieta ($F= 30,79$; $p<0,01$). Os dados do número de células por área demonstraram que houve uma hipertrofia dos adipócitos causada pela dieta (figura 4B).

Evidenciamos nas figuras 3ABC que as massas do tecido epididimal e retroperitoneal estavam diminuídos significativamente ($p<0,01$) no grupo CDO quando comparado com o grupo CAF, ambos por interação dos fatores ($F= 12,45$ e $F= 18,23$; $p<0,01$) e influência da dieta ($F= 40,06$; $F= 38,39$; $p<0,01$). Ainda, observamos uma sutil diminuição, porém sem significância, da massa do tecido inguinal no grupo CDO quando comparado com o grupo CAF. Demonstramos também, uma diminuição significativa no índice de adiposidade do grupo CDO quando comparado com o grupo CAF ($p<0,01$), por influência significativa ($F = 14,73$; $p<0,01$) da dieta ($F= 40,99$; $p<0,01$).

Perfil de ácidos graxos em membranas de eritrócitos e tecido adiposo

Devido à natureza da intervenção nutricional utilizada concomitante à ingestão de dieta de cafeteria, verificamos a incorporação de alguns ácidos graxos presentes nas membranas de eritrócitos e tecido adiposo.

De maneira geral, podemos observar na tabela 3, que existiram diferenças no perfil dos ácidos graxos nos eritrócitos e tecido adiposo. Como esperávamos, observamos um incremento significativo do ácido palmitoleico nos grupos que ingeriram o óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico, nestas amostras.

Dentre os ácidos graxos saturados, nos eritrócitos, observamos um aumento significativo ($p<0,05$) do ácido graxo esteárico no grupo CAF quando comparado com o grupo SD por influência significativa ($F= 11,90$; $p<0,01$) da dieta ($F= 7,873$; $p<0,05$). Ainda, houve um aumento significativo ($p<0,01$) deste ácido graxo no tecido adiposo do grupo CDO quando comparado com o grupo CAF, por influência tanto da dieta ($F= 16,79$; $p<0,01$) quanto do óleo ($F= 35,65$; $p<0,01$).

O ácido mirístico diminuiu significativamente ($p < 0,01$) nos eritrócitos do grupo CDO quando comparado com o grupo CAF, por influência da dieta ($F = 237,0$; $p < 0,01$) e do óleo ($F = 7,95$; $p < 0,05$).

O ácido palmítico aumentou significativamente nas membranas do tecido adiposo do grupo CDO quando comparado com o grupo CAF ($p < 0,01$) por uma influência significativa ($F = 33,4$; $p < 0,01$) da dieta ($F = 269,7$; $p < 0,01$) e do óleo ($F = 46,14$; $p < 0,01$).

Citocinas

Como a obesidade é reconhecida por apresentar uma inflamação crônica de baixo grau (KANNEGANTI, DIXIT, 2012), avaliamos a concentração de algumas citocinas nas hemácias e no tecido adiposo epididimal, contudo, não foram observadas alterações significativas nas concentrações destas moléculas, nestas amostras (dados não mostrados).

DISCUSSÃO

Nós demonstramos neste trabalho, que a dieta de cafeteria foi eficiente em estimular um ambiente obesogênico e que a ingestão concomitante de óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico preveniu o estímulo lipogênico causado pela dieta, repercutindo nos parâmetros metabólicos plasmáticos.

O ganho de massa visceral, desencadeado principalmente pela hipertrofia dos adipócitos associado a outros fatores, pode estimular o tecido adiposo a desencadear alterações metabólicas (HEINONEN et al., 2014). Portanto, como observamos em nosso trabalho, o menor ganho de massa adiposa, pode ser um fator importante para prevenir estas alterações.

Uma das explicações para este desfecho, se deve ao fato de que molecularmente, o ácido palmitoleico pode inibir a atividade e expressão da enzima stearoil-CoA desaturase 1 (SCD-1), sendo esta, considerada um marcador de lipogênese, expressa principalmente em tecidos lipogênicos, como fígado e tecido adiposo. Neste contexto, alguns estudos demonstraram que a inibição de SCD-1 foi capaz de prevenir a obesidade induzida por dieta hiperlipídica (BROWN et al., 2008; MACDONALD et al., 2008; NTAMBI et al., 2002).

Contudo, como exposto por Cao 2008 e Yang 2011, a SCD-1 é modulada por componentes dietéticos e isto indica que altos níveis de ácido palmitoleico podem inibir a

expressão e a atividade da SCD-1, portanto, pode ser que em nosso trabalho, devido a suplementação exógena de ácido palmitoleico, esta enzima esteja inibida.

Adicionalmente, podemos sugerir que o ácido palmitoleico pode estar estimulando a redução da síntese de novo de ácidos graxos, possivelmente por inibir a expressão de genes lipogênicos como o ácido graxo sintase (FAS) e pelo complexo de alongação da ELOVL6, como observado por outros autores em cultura de células adiposas (BOLSONI L, et al., 2013).

Podem existir outros fatores e mecanismos relacionados com o efeito do ácido palmitoleico, ainda não explorados na literatura, que estejam estimulando outros componentes da via de sinalização da lipólise, e desta maneira liberando ácidos graxos livres e glicerol (o que não foi investigado no nosso trabalho) ou ainda, favorecendo e/ou atuando sinergicamente com a termogênese de outros tecidos.

Outros estudos têm demonstrado que o ácido palmitoleico pode modular o metabolismo e favorecer o gasto energético ao invés de armazenamento (CHAN et al., 2015; DUCKETT et al., 2014; SOUZA et al., 2017). E desta maneira, poderiam estar estimulando o aumento e a captação de glicose via GLUT4 inibindo a lipogênese de novo, ou ainda pelo aumento da fosforilação da (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato) AMPK promovendo o aumento da lipólise e do metabolismo oxidativo como observados em cultura de adipócitos (BOLSONI-LOPES et al; 2014; CHAN et al., 2015).

A hipertrofia dos adipócitos causada pela ingestão da dieta de cafeteria foi capaz de gerar uma condição similar a “pré-diabética” precoce, também observada por outros estudos (SAISHO,2014; HIGA et al., 2014). Contudo a ingestão do óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico diminuiu significativamente a insulina de jejum e possivelmente, favoreceu sua responsividade, promovendo desta maneira, uma sutil diminuição da glicemia no momento basal do TTGip, sendo expressa de maneira significativa pelo cálculo individual da área sobre a curva (ASC).

As menores concentrações de glicose observadas durante o desafio com a glicose e conseqüentemente menor ASC, no grupo CDO, quando comparado com o grupo CAF, podem estar relacionadas com a maior responsividade à insulina do tecido hepático. Isto pode ocorrer porque o fígado, junto com o tecido adiposo são importantes órgãos responsáveis pela captação de glicose dependente de insulina, e desta maneira, contribuem para a redução da glicemia após estímulo. Portanto, o óleo enriquecido possivelmente promoveu uma melhor responsividade da insulina, que mesmo em quantidades menores, favoreceu a sensibilidade hepática, refletindo em uma diminuição da glicose durante o teste.

Este efeito pode estar relacionado pelo estímulo do ácido palmitoleico na absorção de glicose no fígado pela ativação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) e fator de crescimento do fibroblasto 21 (FGF-21) dependente de PPAR α . (por SOUZA et al., 2017). Ou ainda este ácido graxo poderia estar estimulando o aumento da captação de glicose muscular e desta maneira melhorando a resposta periférica à insulina por mecanismos que não são regulados via PPAR α (SOUZA,2014).

Finalmente, destacamos que este é o primeiro estudo pré-clínico que avaliou o efeito de um óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico em um modelo experimental de dieta palatável, mimetizando um ambiente obesogênico.

Embora a falta de evidências moleculares tenha sido uma limitação, podemos concluir que a suplementação com o óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico durante 16 semanas, na dose de 1g/kg/m.c. preveniu o aumento da gordura visceral e atenuou as alterações metabólicas induzidas por uma dieta obesogênica. Estes achados, em conjunto com o que se tem na literatura científica atual, demonstram a relevância e contribuição deste ácido graxo sobre o metabolismo glicêmico e fornecem suporte para estudos futuros, como um potencial tratamento nutricional.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesse a ser divulgado

Financiamento e Reconhecimentos

Agradecemos pelo apoio dado ao CNPQ/Universal 14/2014, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Pela bolsa de estudos recebida. Um agradecimento especial à professora Katya Naliwaiko e ao professor Luis Claudio Fernandes por disponibilizarem o laboratório e HPLC.

Referências:

BAYNARD, T., VIEIRA-POTTER, V. J., VALENTINE, R. J., & WOODS, J. A. 2012. Exercise training effects on inflammatory gene expression in white adipose tissue of young mice. *Mediators. Inflamm.* 2012:767953. doi: 10.1155/2012/767953. The Global BMI Mortality Collaboration. Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. *Lancet.* 2016;388:776–786.

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

BOLSONI-LOPES A1, FESTUCCIA WT, FARIAS TS, CHIMIN P, TORRES-LEAL FL, DEROGIS PB, DE ANDRADE PB, MIYAMOTO S, LIMA FB, CURI R, ALONSO-VALE MI. Palmitoleic acid (n-7) increases white adipocyte lipolysis and lipase content in a PPAR α -dependent manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013 Nov 1;305(9):E1093-102. doi: 10.1152/ajpendo.00082.2013. Epub 2013 Sep 10.

BOLSONI-LOPES, WILLIAM T FESTUCCIA, PATRICIA CHIMIN , TALITA SM FARIAS1 , FRANCISCO L TORRES-LEAL1 , MAYSA M CRUZ2 , PAULA B ANDRADE3 , SANDRO M HIRABARA3 , FABIO B LIMA1 AND MARIA ISABEL C ALONSO-VALE. Palmitoleic acid (n-7) increases white adipocytes GLUT4 content and glucose uptake in association with AMPK activation. *Lipids in Health and Disease* 2014, 13:199.

BROWN JM1, CHUNG S, SAWYER JK, DEGIROLAMO C, ALGER HM, NGUYEN T, ZHU X, DUONG MN, WIBLEY AL, SHAH R, DAVIS MA, KELLEY K, WILSON MD, KENT C, PARKS JS, RUDEL LL. Inhibition of stearoyl-coenzyme A desaturase 1 dissociates insulin resistance and obesity from atherosclerosis. *Circulation*. 2008 Sep 30;118(14):1467-75.

BURNS TA, DUCKETT SK, PRATT SL, JENKINS TC. Supplemental palmitoleic (C16:1 cis-9) acid reduces lipogenesis and desaturation in bovine adipocyte cultures. *J Anim Sci*. 2012 Oct;90(10):3433-41.

CAO H, et al. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell*, v. 134, p. 933-944, 2008.

CHAN KL, et al. Palmitoleate Reverses High Fat-induced Proinflammatory Macrophage Polarization via AMP-activated Protein Kinase (AMPK). *J Biol Chem.*, v. 290, p. 169-179, 2015.

CHAN KL1, PILLON NJ2, SIVALOGANATHAN DM2, COSTFORD SR2, LIU Z2, THÉRET M3, CHAZAUD B3, KLIP A4. Palmitoleate Reverses High Fat-induced Proinflammatory Macrophage Polarization via AMP-activated Protein Kinase (AMPK). *J Biol Chem*. 2015 Jul 3;290(27):16979-88.

ÇIMEN I, KOCATÜRK B, KOYUNCU S, TUFANLI Ö, ONAT UI, YILDIRIM AD, APAYDIN O, DEMIRSOY S, AYKUT ZG, NGUYEN UT, WATKINS SM, HOTAMIŞLIGİL GS, ERBAY E. Prevention of atherosclerosis by bioactive palmitoleate through suppression of organelle stress and inflammasome activation. *Sci Transl Med*. 2016 Sep 28;8(358):358ra126.

DUCKETT SK, VOLPI-LAGRECA G, ALENDE M, LONG NM. Palmitoleic acid reduces intramuscular lipid and restores insulin sensitivity in obese sheep. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 20;7:553-63, 2014.

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

HEINONEN S, et al. Adipocyte morphology and implications for metabolic derangements in acquired obesity. *Int J Obes*, v. 38, p. 1423–1431, 2014.

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.

JOHNSON AR, MAKOWSKI L. Nutrition and metabolic correlates of obesity and inflammation: clinical considerations. *J Nutr.*, v. 145, n.5, p.1131S-1136S, may. 2015.

KANNEGANTI TD, DIXIT VD. Immunological complications of obesity. *Nat Immunol*, v.13, p. 707–712, 2012.

MACDONALD ML1, SINGARAJA RR, BISSADA N, RUDDLE P, WATTS R, KARASINSKA JM, GIBSON WT, FIEVET C, VANCE JE, STAELS B, HAYDEN MR. Absence of stearoyl-CoA desaturase-1 ameliorates features of the metabolic syndrome in LDLR-deficient mice. *J Lipid Res*. 2008 Jan;49(1):217-29. Epub 2007 Oct 24.

NISHIYAMA – NARUKE, A.; SOUZA, J. A.; CARNELLÓS, M.; CURI, 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.

NTAMBI JM1, MIYAZAKI M, STOEHR JP, LAN H, KENDZIORSKI CM, YANDELL BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM, Attie AD. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *J Lipid Res*. 2008 Jan;49(1):217-29. Epub 2007 Oct 24.

OKORODUDU DO, JUMEAN MF, MONTORI VM, ROMERO-CORRAL A, SOMERS VK, ERWIN PJ, et al. Diagnostic performance of body mass index to identify obesity as defined by body adiposity: a systematic review and meta-analysis. *Int J Obes* 2010;34:791e9.

SHAW B, LAMBERT S, WONG MH, RALSTON JC, STRYJECKI C, MUTCH DM. Individual saturated and monounsaturated fatty acids trigger distinct transcriptional networks in differentiated 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2013;6(1):1-15. Epub 2013

SOUZA CO, TEIXEIRA AA, BIONDO LA, SILVEIRA LS, CALDER PC, ROSA NETO JC. Palmitoleic acid reduces the inflammation in LPS-stimulated macrophages by inhibition of NFκB, independently of PPARs. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2017;44(5):566-575.

SOUZA CO, TEIXEIRA AA, LIMA EA, BATATINHA HA, GOMES LM, CARVALHO-SILVA M, MOTA IT, STRECK EL, HIRABARA SM, ROSA NETO JC. Palmitoleic acid (n-7) attenuates the immunometabolic disturbances caused by a high-fat diet independently of PPARα. *Mediators Inflamm*. 2014:582197.

SOUZA CO, TEIXEIRA AAS, BIONDO LA, LIMA JUNIOR EA, BATATINHA HAP, ROSA NETO JC. Palmitoleic Acid Improves Metabolic Functions in Fatty Liver by PPAR α -Dependent AMPK Activation. *J Cell Physiol.* 2017, 232(8):2168-2177. 2017.

SOUZA CO1, TEIXEIRA AA1, LIMA EA1, BATATINHA HA1, GOMES LM2, CARVALHO-SILVA M2, MOTA IT2, STRECK EL2, HIRABARA SM3, ROSA NETO JC1. Palmitoleic acid (n-7) attenuates the immunometabolic disturbances caused by a high-fat diet independently of PPAR α . *Mediators Inflamm.* 2014;2014:582197.

TRINH, K.Y., O'DOHERTY, R.M., ANDERSON, P., LANGE, A.J., AND NEWGARD, C.B. 1998. Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats. *J. Biol. Chem.* 273(47): 31615–31620. doi:10.1074/jbc.273.47.31615. PMID:9813078.

WALKER CG, BROWNING LM, STECHER L, WEST AL, MADDEN J, JEBB SA, CALDER PC. Fatty acid profile of plasma NEFA does not reflect adipose tissue fatty acid profile. *Br J Nutr.* 2015.

Saisho, Y Importance of beta cell function for the treatment of type 2 diabetes, *J. Clin. Med.* 3 (2014) 923–943

YANG ZH, 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 Health Dis.* 2011 Jul 21;10:120.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity and overweight. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Updated March 16, 2019.

Tabelas e figuras.

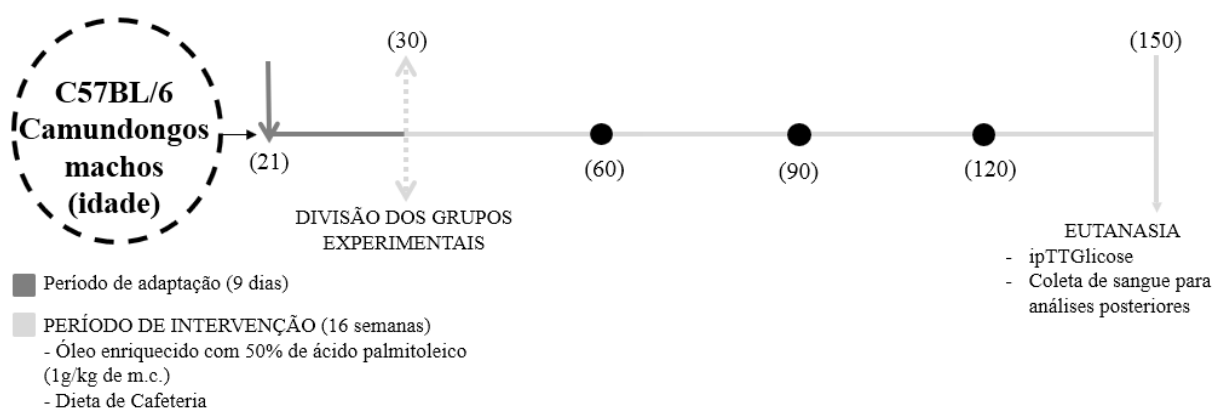


Figura 1. Desenho experimental. Abreviaturas: ipGTT-teste de tolerância à glicose intraperitoneal.

Tabela 1. Percentual de ácidos graxos presentes nas dietas a partir da cromatografia líquida de alta performance.

Ácidos graxos	Dieta padrão	Dieta de cafeteria
Mirístico 14:0	2.99	1.35
Palmítico 16:0	36.92	14.32
Palmitoleico 16:1n-7	1.12	0.14
Estearico 18:0	1.84	5.15
Oleico 18:1n-9	17.73	40.39
Linoleico 18:2n-6	18.24	24.79
α-linolenico 18:3n-3	0.46	0.06
Araquidônico 20:4n-6	19.39	13.70
EPA 20:5n-3	0.89	0.06
DHA 22:6n-3	0.42	0.05

Abreviações: EPA: Ácido graxo ecosapentaenóico, DHA: ácido graxo docosahexaenóico, ND: valores não detectáveis.

Tabela 2. Consumo médio calórico e ingerido, massa dos tecidos, glicemia de jejum, triacilglicerol e colesterol total plasmático e hepático de camundongos após 16 semanas de período experimental, suplementados ou não com óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico.

Grupo	SD	SDO	CAF	CDO
<i>n</i>	10	12	10	12
Ingestão média (g/sem.)	30.4±3.8	27.9±2.7	22.3±1.6*	22.3±1.4
Média da Ingestão energética (kcal/sem.)	91.3±11.6	84.0±8.2	98.4±7.1*	98.6±6.3
Ganho de massa corporal	10.3±1,7	9.8±2.3	10.5±1,5	9.4±1,2
Órgãos[§]				
Baço	3.6±1.0	4.0±1.3	3.9±1.2	4.0±0.9
Estômago	12.6±1.8	11.6±3.7	8.9±1.8*	10.4±1.9
Mesentério[‡]	86.4±6.3	90.0±8.3	71.0±12.2*	77.1±8.1
Coração	5.5±0.7	5.4±0.7	5.1±0.6	5.0±0.6
Pulmões	7.1±0.8	6.8±0.7	7.4±1.1	7.1±0.9
Pâncreas	8.0±2.4	8.2±1.9	8.0±2.0	7.1±2.0
Rins	11.3±0.3	10.8±0.6	10.3±1.5	10.8±1.5
Fígado	50.8±3.5	47.2±3.6	37.1±5.2*	37.7±4.8
Massa do tecido muscular[§]				
Sóleo	0.9±0.2	1.0±0.2	0.9±0.2	0.9±0.2
Gastrocnêmio	11.5±0.5	11.6±0.5	11.7±1.2	12.0±0.8
Massa de gordura[§]				
Interscapula	3.6±0.7	4.7±1.1 [#]	7.0±1.0*	4.8±1.0 [#]
r				
Inguinal	9.3±3.7	12.5±4.4	21.8±7.6*	16.3±8.0
Índice de adiposidade (%)	1,5±0,4	2.2±0.5 [#]	3.8±0.9*	2.7±0.8 [#]
Parâmetros plasmáticos				
Glicose de jejum	140±16.8	139±13.4	170±15.9*	154±16.4
Insulina de jejum	72.8±15.8	83.2±35.4	94.8±10.9	64.6±13.1 [#]
TGL	45.9±7.9	48.8±11.9	57.9±15.1*	41.8±7.8 [#]
CT	97.7±13.7	97.0±13.7	114.3±14.9	125.2±22.9
Perfil lipídico hepático (mg/g of tissue)				
TGL	3.5±1.7	2.9±0.8	5.3±1.1	5.8±2.5
CT	0.7±0.1	0.8±0.2	1.3±0.1*	1.7±0.3 [#]

Todos os valores estão apresentados em média ± DP. Teste two-way ANOVA seguido por *post hoc* Holm-Sidak's, $p < 0.05$. *Diferenças observadas entre o grupo controle (SD) vs grupo dieta de cafeteria (CAF). #Diferenças observadas entre seus respectivos controles. § Massa dos tecidos em mg/g/p.c. ‡ Tecido mesentérico mais intestino. Abreviações: SD: Grupo controle; SDO: grupo controle suplementado com óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico; CAF: grupo dieta de cafeteria; CDO: Dieta de cafeteria suplementado com óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico. TGL: triglicerídeos; CT: Colesterol total.

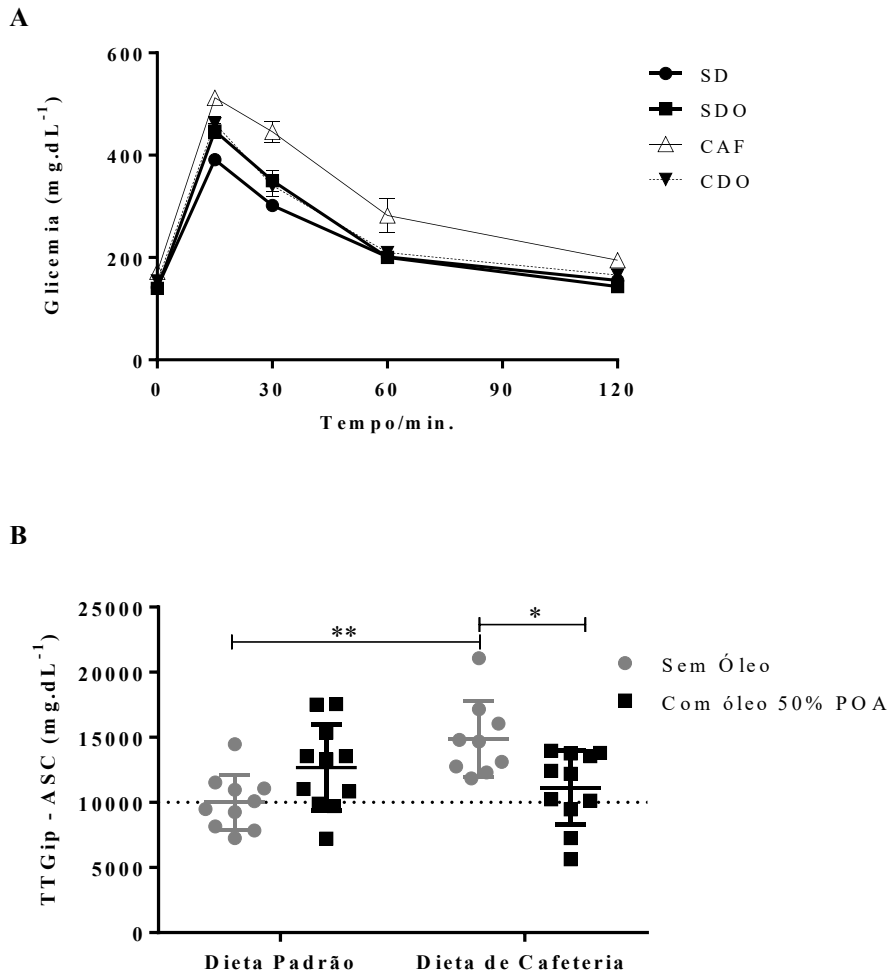
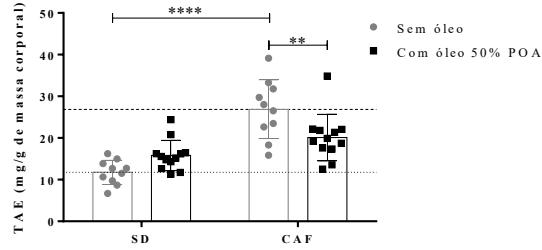


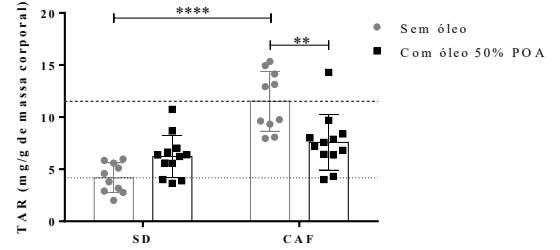
Figura 2. Teste de tolerância a glicemia intraperitoneal (TTGip) de camundongos após 16 semanas de período experimental, suplementados ou não com óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico. (A) Representa a curva glicêmica no período de 120 minutos. (B) representa os valores individuais da área sobre a curva. Os valores da área sobre a curva estão apresentados em média \pm DP. Teste two-way ANOVA seguido por *post hoc* Holm-Sidak's, $p < 0.05$. Abreviações: SD: Grupo controle; SDO: grupo controle suplementado com óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico; CAF: grupo dieta de cafeteria; CDO: Dieta de cafeteria suplementado com óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico. TGL: triglicédeos; CT: Colesterol total.

Massa do tecido adiposo branco

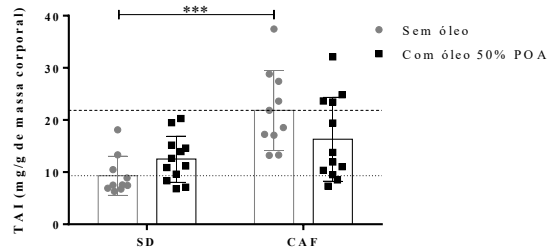
A



B



C



D

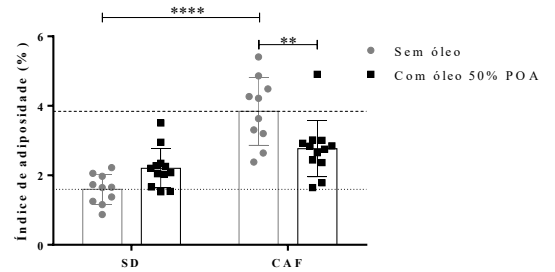


Figura 3. Massa do tecido adiposo Branco de camundongos após 16 semanas de período experimental, suplementados ou não com óleo enriquecido com 50% de ácido palmítico. (A) Massa do tecido epididimal. (B) Massa do tecido Retroperitoneal. (C) Massa do tecido inguinal. (D) Índice de adiposidade (%). Os valores estão apresentados em média \pm DP. Teste two-way ANOVA seguido por post hoc Holm-Sidak's, $p < 0.05$. Abreviações: SD: Grupo controle; CAF: grupo dieta de cafeteria.

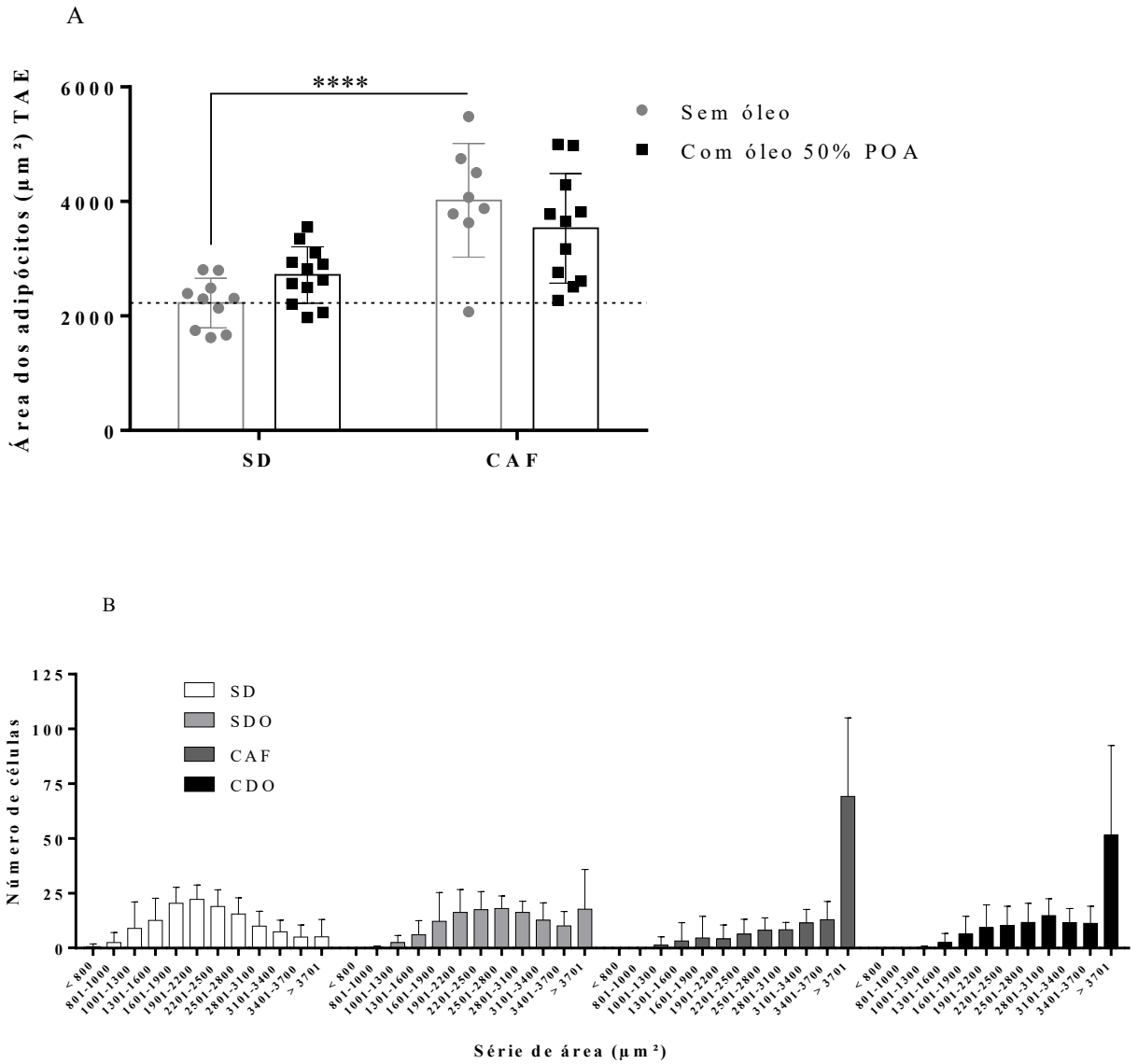


Figura 4. Média da área dos adipócitos (A) e número de células por área (B) do tecido adiposo epididimal de camundongos após 16 semanas de período experimental, suplementados ou não com óleo enriquecido com 50% de ácido palmítico. Abreviações: SD: Grupo controle; SDO: grupo controle suplementado com óleo enriquecido com 50% de ácido palmítico; CAF: grupo dieta de cafeteria; CDO: Dieta de cafeteria suplementado com óleo enriquecido com 50% de ácido palmítico. Os valores estão apresentados em média \pm DP. Teste two-way ANOVA seguido por post hoc Holm-Sidak's, $p < 0.05$.

Tabela 3. Percentual (%) de ácidos graxos em membranas de eritrócitos e tecido adiposo epididimal de camundongos alimentados com dieta padrão ou dieta de cafeteria, durante 16 semanas de período experimental, suplementados ou não com óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico

	Eritrócitos				
	Grupo	SD	SDO	CAF	CDO
	<i>n</i>	6	6	6	6
Ácidos Graxos					
14:0		9.1±0.8	8.7±0.3	5.9±0.2*	5.1±0.4 [#]
16:0		29.0±0.9	23.2±2.3	26.6±1.2	26.9±0.8
16:1n-7		0.5±0.0	4.4±0.3	0.4±0.0	4.0±0.1 [#]
18:0		8.2±0.5	9.0±0.2	9.7±0.2*	8.8±0.8
18:1n-9		13.0±0.3	13.7±1.0	21.6±0.7*	20.8±0.7
18:2n-6		16.1±0.8	15.4±0.4	10.3±0.4*	11.6±0.6 [#]
18:3n-3		0.2±0.03	0.1±0.0	0.0±0.0*	0.0±0.0
20:4n-6		23.0±0.3	24.5±1.7	24.7±0.4	22.1±0.9 [#]
20:5n-3		0.2±0.0	0.4±0.0 [#]	0.1±0.0*	0.1±0.0
22:6n-3		0.1±0.0	0.01±0.00 [#]	0.1±0.0	0.1±0.0
Tecido adiposo epididimal					
14:0		1.2±0.1	1.2±0.0	0.8±0.0*	1.1±0.1 [#]
16:0		14.7±0.6	14.9±0.6	9.8±0.5*	12.6±0.3 [#]
16:1n-7		0.5±0.0	7.0±0.2	1.4±0.0*	5.7±0.1 [#]
18:0		1.3±0.1	1.5±0.0	1.1±0.1*	1.4±0.0 [#]
18:1n-9		32.6±1.1	30.9±1.1	70.7±1.0*	61.5±0.9 [#]
18:2n-6		38.5±1.4	35.0±1.2 [#]	9.2±0.6*	11.3±1.2 [#]
18:3n-3		1.3±0.1	1.3±0.1	0.2±0.0*	0.1±0.0
20:4n-6		8.7±0.2	7.5±0.2 [#]	5.8±0.1*	5.3±0.8 [#]
20:5n-3		0.5±0.1	0.5±0.0 [#]	0.2±0.0*	0.1±0.0 [#]
22:6n-3		0.1±0.0	0.3±0.0 [#]	0.0±0.0*	0.1±0.0 [#]

Todos os valores estão apresentados em média ± DP. Teste two-way ANOVA seguido por *post hoc* Holm-Sidak's, $p < 0.05$. *Diferenças observadas entre o grupo controle (SD) vs grupo dieta de cafeteria (CAF). #Diferenças observadas entre seus respectivos controles. Abreviações: SD: Grupo controle; SDO: grupo controle suplementado com óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico; CAF: grupo dieta de cafeteria; CDO: Dieta de cafeteria suplementado com óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico. Ácido mirístico (14:0), Ácido palmítico (16:0); Ácido palmitoleico (16:1n-7); Ácido esteárico (18:0); Ácido oleico (18:1n-9); Ácido linoleico (18:2n-6); Ácido alfa linolênico (18:3n-3); Ácido araquidônico (20:4n-6); Ácido eicosapentaenoico (20:5n-3); Ácido docosahexaenoico (22:6n-3).

Material suplementar:

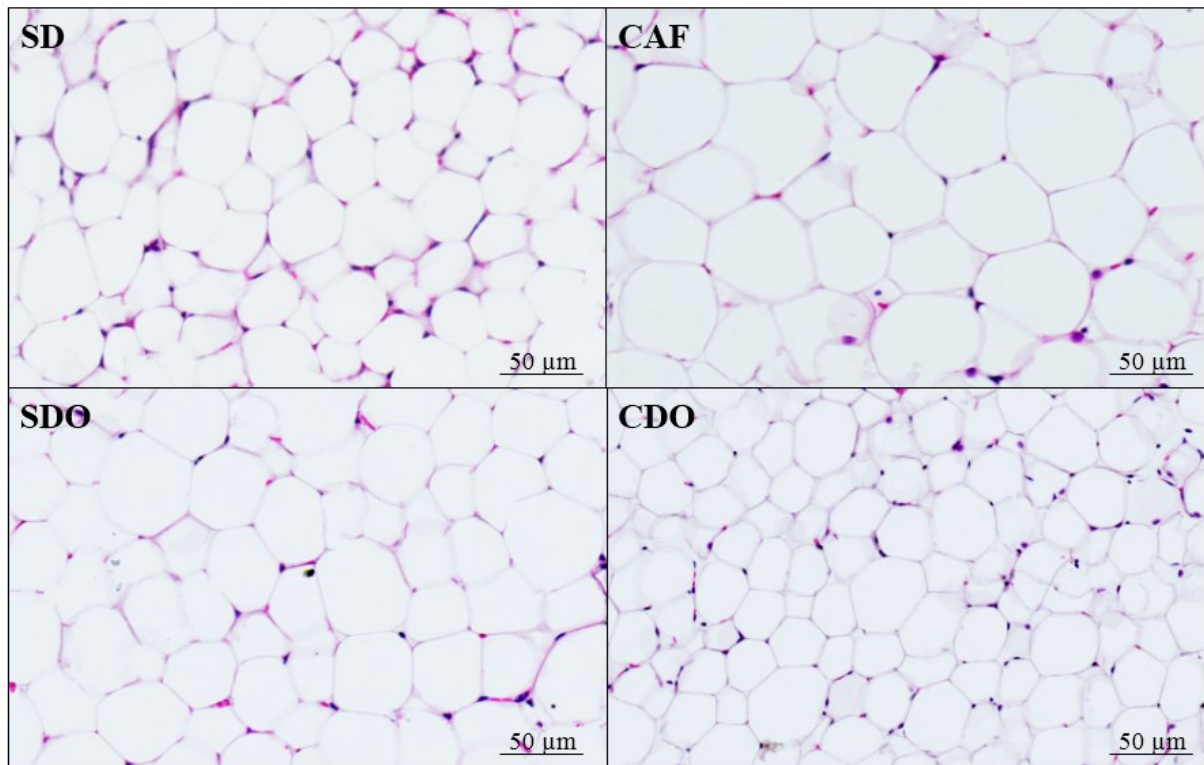


Figura S1. Imagens representativas do tecido adiposo epididimal. Abreviações: SD: Grupo controle; SDO: grupo controle suplementado com óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico; CAF: grupo dieta de cafeteria; CDO: Dieta de cafeteria suplementado com óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho nós demonstramos que o consumo elevado de quilocalorias provenientes da gordura da dieta pode ser um dos principais fatores que contribuem com o aumento da adiposidade, sugerindo a ativação de fatores de transcrição envolvidos na lipogênese e lipogênese de novo.

Neste contexto, nós utilizamos duas fontes alimentares diferentes de ácido palmitoleico para avaliar seu efeito sobre a adiposidade causada pela ingestão de uma dieta hiperlipídica. Nós observamos que a ingestão de óleo de macadâmia não apresentou efeito significativo sobre a adiposidade de camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura. Contudo, a ingestão do óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico preveniu o aumento da adiposidade em camundongos expostos a mesma dieta lipogênica.

Diante disso, destacamos que o óleo de macadâmia foi composto por diferentes tipos de ácidos graxos (em maior abundância, de ácido oleico) e apesar da quantidade aproximada de 20% de ácido palmitoleico, este se encontrava na forma de triacilglicerol reesterificado, enquanto que o óleo enriquecido com ácido palmitoleico se encontrava na forma de etil ester, sugerindo que o aproveitamento do ácido palmitoleico pelo organismo seja diferente devido as diferentes formas químicas presentes nos óleos.

Esta característica do perfil de ácidos graxos presente no óleo de macadâmia, pode estar relacionada com um efeito lipogênico potencializado pela ingestão concomitante de uma dieta hiperglicídica.

Sendo assim, a suplementação de 1g/kg de m.c. com óleo de macadâmia associado a uma dieta de cafeteria com maior proporção de açúcares simples promoveu um aumento da gordura visceral e não impediu ou melhorou o efeito adipogênico causado por uma dieta com maior proporção de lipídios.

Por outro lado, a ingestão de 1g/kg de m.c. de óleo enriquecido com 50% de ácido palmitoleico preveniu o estímulo lipogênico causado por uma dieta hiperlipídica e atenuou as alterações metabólicas relacionadas com a homeostase glicêmica neste modelo obesogênico.

Apesar de não investigarmos vias moleculares, podemos sugerir que estes resultados observados estejam relacionados com a capacidade do ácido palmitoleico, na forma de etil ester, inibir a expressão de genes lipogênicos ou estimular a expressão de proteínas envolvidas nas vias de sinalização da lipólise e estimular a captação de glicose via hepática dependente de PPAR α .

Em conjunto, estes resultados demonstraram que dependendo da dieta ingerida por um indivíduo a ingestão de óleo de macadâmia pode apresentar resultados diferentes na adiposidade, no entanto a ingestão de 50% de ácido palmitoleico, na forma de etil ester, fornece evidências positivas como um tratamento não farmacológico para distúrbios metabólicos causados pela obesidade.

9 REFERÊNCIAS

- ABALLAY LR, et al. Overweight and obesity: a review of their relationship to metabolic syndrome, cardiovascular disease, and cancer in South America. **Nutr Rev.** v.71, n.3, p.168-79, mar. 2013.
- ABELL LL, et al. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. **J. Biol. Chem.**, v. 195, p.357-366, 1952.
- AHIMA RS, et al. Leptin regulation of neuroendocrine systems. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 21, p. 263-307, 2000.
- AKAZAWA Y, et al. Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. **J Hepatol.**, v. 52, p 586-593, 2010.
- ALKHOURI N, et al. Adipocyte apoptosis, a link between obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. **J Biol Chem**, v. 285, p. 3428–3438, 2009.
- ALVES MD, BRITES C, SPRINZ E. HIV-associated lipodystrophy: a review from a Brazilian perspective. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 10, p. 559-566, 2014.
- AMANO SU, et al. Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. **Cell Metab**, v. 19, p. 162–171, 2014.
- AMEER F, L. et al. De novo lipogenesis in health and disease. **Metabolism Clinical and Experimental**. v. 63, n. 7, p. 895–902, 2014.
- ANDERSON EK, GUTIERREZ DA, HASTY AH. Adipose tissue recruitment of leukocytes. **Curr Opin Lipidol**, v. 21, p. 172-177, 2010.
- ARNER E, et al. Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. **Diabetes**, v. 59, p. 105–109, 2010.
- ARNER E, et al. Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. **Diabetes**, v. 59, p. 105–109, 2010.
- ARNER P, et al. Variations in the size of the major omentum are primarily determined by fat cell number. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, p. E897–E901, 2013.
- ARNOLD CE, et al. A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M1 macrophage activation and function in vitro and in vivo. **Immunology**, v. 141, p. 96–110, 2014.
- ATAMANIUK J, et al. Analysing cell-free plasma DNA and SLE disease activity. **Eur. J. Clin. Invest**, v. 41, p.579–583, 2011.
- ATAMANIUK J, et al. Apoptotic cell-free DNA promotes inflammation in haemodialysis patients. **Nephrol. Dial. Transplant**, v. 27, p. 902–905, 2012.
- BAPTISTA LS, SILVA KR, BOROJEVIC R. Obesity and weight loss could alter the properties of adipose stem cells? **World journal of stem cells**, v.7, p. 165-173, 2015.

- BARRAT FJ, et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. **J. Exp. Med**, v. 202, p.1131–1139, 2005.
- BARRENA C H, et al. Effect of linseed oil and macadamia oil on metabolic changes induced by high-fat diet in mice. **Cell Biochem Funct**, v. 32, p.333-340, 2014.
- BARZILAI N, GUPTA G. Interaction between aging and syndrome X: new insights on the pathophysiology of fat distribution. **Ann N Y Acad Sci**, v. 892, p, 58-72, 1999.
- BERNSTEIN AM, ROIZEN MF, MARTINEZ L. Purified palmitoleic acid for the reduction of high-sensitivity C-reactive protein and serum lipids: a double-blinded, randomized, placebo-controlled study. **J Clin Lipidol.**, v. 8, p. 612-617, 2014.
- BERRY DC, et al. The developmental origins of adipose tissue. **Development**, v. 140, p. 3939-3949, 2013.
- BEVILACQUA M, DOMINGUEZ LJ, BARBAGALLO M. Insulin Resistance and the cardiometabolic syndrome in HIV infection. **Journal of the cardiometabolic syndrome**, v.4, p. 40-43, 2009.
- BLAGIH J, JONES RG. Polarizing macrophages through reprogramming of glucose metabolism. **Cell Metab**, v. 15, p. 793–795, 2012.
- BLÜHER M, MANTZOROS CS. From leptin to other adipokines in health and disease: facts and expectations at the beginning of the 21st century. **Metabolism**, v. 64, p. 131–145, 2015.
- BLÜHER M. Adipose tissue dysfunction in obesity. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 117, p. 241–50, 2009.
- BLUNDELL JE, et al. BMI - phenotyping the obesities. **Obes Facts**, v. 7, p. 322–328, 2014.
- BOESING, F. et al. Roux-en-Y bypass gastroplasty: markers of oxidative stress 6 months after surgery. **Obesity Surgery**, v. 20, n. 9, p. 1236-1244, 2010.
- BOGDAN C, ROLLINGHOFF M, DIEFENBACH A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunol Rev**, v. 173, p. 17–26, 2000.
- BOHLSON SS, et al. Complement, c1q, and c1q-related molecules regulate macrophage polarization. **Front Immunol**, v. 5, p. 402, 2014.
- BOLSONI-LOPES A, et al. Palmitoleic acid (n-7) increases white adipocyte lipolysis and lipase content in a PPAR α -dependent manner. **Am J Physiol Endocrinol Metab** v. 305, p. E1093–E1102, 2013.
- BORISSOFF IJ, et al. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**, v. 33, p. 2032–2040, 2013.
- BOSY-WESTPHAL A, et al. Value of body fat mass vs anthropometric obesity indices in the assessment of metabolic risk factors. **Int J Obes**, v. 30, p. 475–483, 2006.
- BRAHIMI-HORN MC, POUYSSÉGUR J. Oxygen, a source of life and stress. **FEBS Lett**, v.581, p. 3582–3591, 2007.

BRANDIMARTI P, et al. Cafeteria diet inhibits insulin clearance by reduced insulin-degrading enzyme expression and mRNA splicing. **J Endocrinol.**, v. 4. n. 219, p. 173-82. Oct, 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.

BUCOLO, G.; DAVID, H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes *Clin. Chem.* v.19, p.476-482, 1973.

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.

BUETTNER R, SCHOLMERICH J, BOLLHEIMER L. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obes Res**, v. 15, p. 798, 2007.

BURNS TA, et al. Supplemental palmitoleic (C16:1 cis-9) acid reduces lipogenesis and desaturation in bovine adipocyte cultures. **J Anim Sci.**, v. 90, p. 3433-3441, 2012.

BURSTEIN, M.; SCHOLNICK, H. R.; MORFIN, R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. **J. Lipid Res.** v.11, p.583-595, 1970.

CAIMARI A, et al. Peripheral blood mononuclear cells as a model to study the response of energy homeostasis-related genes to acute changes in feeding conditions. **OMICS**, v. 14, p. 129–141, 2010.

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.

CANNING KL, et al. Relationship between obesity and obesity-related morbidities weakens with aging. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 69, p. 87-92, 2014.

CAO H, et al. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. **Cell**, v. 134, p. 933-944, 2008.

CARICILLI AM, et al. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. **PLoS Biol**, v. 9, p.121-129, 2011.

CARR A, et al. A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. **AIDS**, v. 12, p. 51-58, 1998.

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

CHAN KL, et al. Palmitoleate Reverses High Fat-induced Proinflammatory Macrophage Polarization via AMP-activated Protein Kinase (AMPK). **J Biol Chem.**, v. 290, p. 169-179, 2015.

CHAU YY, et al. Visceral and subcutaneous fat have different origins and evidence supports a mesothelial source. **Nat Cell Biol**, v. 16, p. 367-375, 2014.

CHEN SC, TSENG CH. Dyslipidemia, kidney disease, and cardiovascular disease in diabetic patients. **The review of diabetic studies: RDS**, v. 10, p. 88-100, 2013.

CINTI S, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **J Lipid Res**, v. 46, p. 2347–2355, 2005.

CINTI SG, et al, Obin, Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **J. Lipid Res**, v. 46, p. 2347–2355, 2005.

CLARO R, et al. Consumo de alimentos não saudáveis relacionados a doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 24, n. 2, p. 257-265, June 2015.

COCK T. A, S. M. HOUTEN, AND J. AUWERX. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ : too much of a good thing causes harm. **EMBO Reports**, v. 5, n. 2, p. 142–147, 2004.

COOPER, M.D, ALDER, M.N. The evolution of adaptive immune systems. **Cell**, v. 124, p. 815–822, 2006.

CRAMER, T; JOHNSON R. S. A novel role for the hypoxia inducible transcription factor HIF-1 α : critical regulation of inflammatory cell function. **Cell Cycle**, v. 2, n. 3, p. 192–193, 2003.

CUCAK H, GRUNNET LG, ROSENDAHL A. Accumulation of M1-like macrophages in type 2 diabetic islets is followed by a systemic shift in macrophage polarization. **J Leukoc Biol**, v. 95, p. 149–160, 2014.

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.

CURAT CA, et al. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. **Diabetes**, v. 53, p. 1285–1292, 2004.

CURB JD, et al. Serum lipid effects of a high-monounsaturated fat diet based on macadamia nuts. **Arch Intern Med.**, v. 160, p.1154-1158, 2000.

DALMAS E, et al. Irf5 deficiency in macrophages promotes beneficial adipose tissue expansion and insulin sensitivity during obesity. **Nat Med**, v. 21, p. 610–618, 2015.

DAVIES, L.C, et al. Tissue-resident macrophages. **Nat. Immunol**, v. 14, p. 986–995, 2013.

DAVIS, JE, et al. Absence of Tlr2 protects against high-fat diet–induced inflammation and results in greater insulin-stimulated glucose transport in cultured adipocytes. **J. Nutr. Biochem**, v. 22, p.136–141, 2011.

DEURENBERG P, et al. The validity of predicted body fat percentage from body mass index and from impedance in samples of five European populations. **Eur J Clin Nutr**, v, 55 p. 973–979, 2001.

DE TONI F, et al. Human adipose-derived stromal cells efficiently support hematopoiesis in vitro and in vivo: a key step for therapeutic studies. **Stem Cells Dev**, v. 20, p. 2127-2138, 2011.

- DI GREGORIO GB, et al. Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues: association with cytokine expression, insulin resistance, and reduction by pioglitazone. **Diabetes**, v. 54, p. 2305–2313, 2005.
- DI SPIRITO J, MATHIS D. Immunological contributions to adipose tissue homeostasis. **Seminars in Immunology**, V. 27, n. 5, p. 315-321, 2015.
- DIMOPOULOS N, et al. Differential effects of palmitate and palmitoleate on insulin action and glucose utilization in rat L6 skeletal muscle cells. **Biochem J.**, v. 399, p. 473-481, 2006.
- DIVOUX A, CLÉMENT K. Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. **Obes Rev**, v. 12, p. 494– 503, 2011.
- DULF F, V. Fatty acids in berry lipids of six sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L., subspecies *carpatica*) cultivars grown in Romania. **Chemistry Central Journal**, v. 6, p. 106, 2012.
- ELGAZAR-CARMON V, et al. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. **Journal of lipid research**, v. 49, p. 1894-1903, 2008.
- ENES CC, SILVA MV. Disponibilidade de energia e nutrientes nos domicílios: o contraste entre as regiões Norte e Sul do Brasil. **Cien Saude Colet**, v. 14, n. 4, p. 1267-1276, 2009.
- ENZI G, et al. Subcutaneous and visceral fat distribution according to sex, age, and overweight, evaluated by computed tomography. **Am J Clin Nutr**, v. 44, p. 739-746, 1986.
- EPELMAN, S, et al. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. **Immunity**, v. 40, p. 91–104, 2014.
- ETO H, et al. Characterization of human adipose tissue-resident hematopoietic cell populations reveals a novel macrophage subpopulation with CD34 expression and mesenchymal multipotency. **Stem Cells Dev**, v. 22, p. 985-997, 2013.
- EVELAZIO S. N., MATSUSHITA M., VISENTAINER J. V. Ácidos graxos: estrutura, classificação, nutrição e saúde. **Arq. Apadec**, v.2, p. 102-107, 1998.
- FAIN, J.N. Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review. **Mediators of Inflammation**, 2010:513948, 2010.
- FERNANDES, R. et al. Relationship between acute phase proteins and serum fatty acid composition in morbidly obese patients. **Disease Markers**, v.35, p105-112, 2013.
- FÈVE B, et al. *Ann Endocrinol (Paris)*, v. 77, p. 49-56. Epub, fev, 2016.
- FINKELSTEIN EA, et al. Annual medical spending attributable to obesity: payer-and service-specific estimates. **Health Aff (Millwood)**, v.28, p.822–831, 2008.
- FINKELSTEIN JL, et al. HIV/AIDS and lipodystrophy: implications for clinical management in resource-limited settings. **Journal of the International AIDS Society**, v. 18, p. 190- 193, 2015.

FLOWERS M. T, AND J. M. NTAMBI, Stearoyl-CoA desaturase and its relation to high-carbohydrate diets and obesity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1791, n. 2, p. 85–91, 2009.

FONSECA AB, et al. Modernidade alimentar e consumo de alimentos: contribuições sócio-antropológicas para a pesquisa em nutrição. **Cien Saude Colet**, v. 16, p. 3853-3862, 2011.

FREEMERMAN AJ, et al. Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory pheno-type. **J Biol Chem**, v. 289, p. 7884–7896, 2014.

FRÜHBECK G, et al. Regulation of adipocyte lipolysis. **Nutr Res Rev**, v. 27 p. 63–93, 2014.

FRÜHBECK G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. **Methods Mol Biol**, v. 456, p. 1–22, 2008.

FUENTES L, ROSZER T, RICOTE M. Inflammatory mediators and insulin resistance in obesity: role of nuclear receptor signaling in macrophages. **Mediators Inflamm**, v. 21, p. 95–83, 2010.

GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G.R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 316, n. 2, p. 129-139, 2010.

GALLAGHER D, et al. Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. **Am J Clin Nutr**, v. 72, p. 694–701, 2000.

GALVAN-PENA S, O'NEILL LA. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. **Front Immunol**, v. 5, p. 420, 2014.

GANESHAN K, CHAWLA A. Metabolic regulation of immune responses. **Annu Rev Immunol**, v. 32, p. 609–634, 2014.

GARG ML, et al. Macadamia nut consumption modulates favourably risk factors for coronary artery disease in hypercholesterolemic subjects. **Lipids**, v. 42, p. 583-587, 2007.

GERHARD GS, et al. Gene expression profiling in subcutaneous, visceral and epigastric adipose tissues of patients with extreme obesity. **Int J Obes (Lond)**, v. 38, p. 371-378, 2014.

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

GILLINGHAM LG, HARRIS-JANZ S, JONES PJ. Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. **Lipids**, v. 46, p. 209-228, 2011.

GILLINGHAM, L. G, HARRIS-JANZ, S, JONES, J.H.P, Dietary Monounsaturated Fatty Acids Are Protective Against Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease Risk Factors. **Lipids**, v. 46, p. 209–228, 2011.

GINHOUX, F, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. **Science**, v. 330, p. 841–845, 2010.

GIORDANO A, et al. Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis. **J Lipid Res**, v. 54, p. 2423–2436, 2009.

GIRALT M, VILLARROYA F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? **Endocrinology**, v. 154, p. 2992-3000, 2013.

GOERDT S, et al. Alternative versus classical activation of macrophages. **Pathobiology**, v. 67, p. 222–226, 1999.

GONG J, et al. Adipose tissue palmitoleic acid and obesity in humans: does it behave as a lipokine? **Am J Clin Nutr.**, v. 93, p. 186-91, 2011.

GOZUACIK D, KIMCHI A. Autophagy and cell death. **Curr Top Dev Biol**, v. 78, p. 217–245, 2007.

GRAY SL, VIDAL-PUIG AJ. Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. **Nutr Rev**, v. 65, p. 7–12, 2007.

GRIEL AE, et al. A macadamia nut-rich diet reduces total and LDL-cholesterol in mildly hypercholesterolemic men and women. **J Nutr.**, v. 138, p.761-777, 2008.

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.

GUILLIAMS, M, et al. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. **J. Exp. Med**, v. 210, p. 1977–1992, 2013.

GUO X, et al. Palmitoleate induces hepatic steatosis but suppresses liver inflammatory response in mice. **PLoS One**, v. 7, p. 392-396, 2012.

GUO X, et al. Palmitoleate induces hepatic steatosis but suppresses liver inflammatory response in mice. **PLoS One.**, v. 7, p. 392-386, 2012.

GUSTAFSON B, et al. Insulin resistance and impaired adipogenesis. **Trends Endocrinol Metab**, v. 26, p. 193–200, 2015.

HALBERG N, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. **Mol Cell Biol**, v. 29, p. 4467–4483, 2009.

HAN JM, LEVINGS MK. Immune regulation in obesity-associated adipose inflammation. **J Immunol**, v. 191, p. 527–532, 2013.

HANEY PM, et al. Intracellular targeting of the insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4) is isoform specific and independent of cell type. **J Cell Biol**, v. 114, p. 689–699, 1991.

HAO NB, et al. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. **Clin Dev Immunol**, v. 94, p. 80-98, 2012.

HARMS M, SEALE P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nat Med**, v. 19, p. 1252-63, 2013.

HARMS MP, SEALE. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential, **Nat. Med**, v. 19, n. 10, p. 1252–1263, 2013.

HASCHEMI A, et al. The sedoheptulose kinase CAR1L directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. **Cell Metab**, v. 15, p. 813–826, 2012.

HASHIMOTO, D, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. **Immunity**, v. 38, p. 792–804, 2013.

HEINONEN S, et al. Adipocyte morphology and implications for metabolic derangements in acquired obesity. **Int J Obes**, v. 38, p. 1423–1431, 2014.

HENEGAR C, et al. Clement K. Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. **Genome Biol**, v. 9, p. 14, 2008.

HERMAN, M. A. et al. A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. **Nature**, v. 484, p. 333–338, 2012.

HEYNE A, et al. An animal model of compulsive food-taking behavior. **Addic Biol**, v.14, p. 373-383, 2009.

HIGA ST, et al. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. **Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol**, v. 6, n.1, p. 47-54, 2014.

HILLGARTNER F. B, L. M. SALATI, AND A. G. GOODRIDGE. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. **Physiological Reviews**, v. 75, n. 1, p. 47–76, 1995.

HIRAOKA-YAMAMOTO J, et al. Serum lipid effects of a monounsaturated (palmitoleic) fatty acid-rich diet based on macadamia nuts in healthy, young Japanese women. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 31, p. 37-38, 2004.

HOFFSTEDT J, et al. Regional impact of adipose tissue morphology on the metabolic profile in morbid obesity. **Diabetologia**, v. 53, p. 2496–2503, 2010.

HOFMANN C et al. Altered gene expression for tumor necrosis factor-alpha and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. **Endocrinology**, v. 134, p. 264–70, 1994.

HOPFL G, OGUNSHOLA O, GASSMANN M. HIFs and tumors—causes and consequences. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**, v. 286, p. 608–23, 2004.

HOSOGAI N, et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. **Diabetes**, v. 56, p. 901–911, 2007.

HOTAMISLIGIL GS, et al. Differential regulation of the p80 tumor necrosis factor receptor in human obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 46, p. 451–455, 1997.

HOTAMISLIGIL GS, et al. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. **J Clin Invest**, v. 94, p. 1543–9, 1994.

HOTAMISLIGIL GS, SPIEGELMAN BM. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. **Diabetes**, v. 43, p. 1271–8, 1994.

HOTAMISLIGIL GS: Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v.444, p. 860-7, 2006.

JAKUBZICK, C, et al. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. **Immunity**, v. 39, p. 599–610, 2013.

JAMES WP. WHO recognition of the global obesity epidemic. **Int J Obes (Lond)**, v.32, n. 7 p. S120–S126, 2008.

JANSEN HJ, et al. Autophagy activity is up regulated in adipose tissue of obese individuals and modulates proinflammatory cytokine expression. **Endocrinology**, v. 153, p.5866–5874, 2012.

JIA H, LUBETKIN EI. Trends in quality-adjusted life-years lost contributed by smoking and obesity. **Am J Prev Med**, n. 38, p. 138–44. 2010.

JO J et al. Hypertrophy and/or hyperplasia: dynamics of adipose tissue growth. **PLoS Comput Biol**, v. 5, p. 100-324, 2009.

JOHNSON AR, MILNER JJ, MAKOWSKI L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. **Immunol Rev**, v. 249, p. 218–38, 2012.

JOHNSON AR, MAKOWSKI L. Nutrition and metabolic correlates of obesity and inflammation: clinical considerations. **J Nutr.**, v. 145, n.5, p.1131S-1136S, may. 2015.

JOHNSON AR, MAKOWSKI L. Nutrition and metabolic correlates of obesity and inflammation: clinical considerations. **J Nutr.**, v. 145, p. 1131-1136, 2015.

JUNG K, M. FLEISCHHACKER, A. RABIEN, Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker, a critical appraisal of the literature. **Clin. Chim. Acta**, v. 411, p. 1611–1624, 2010.

KALISH, B, T; FALLON, E, M; PUDER, M. A Tutorial on Fatty Acid Biology, **J. Parenter Enteral Nutr.** V.36, p. 380-388, 2012.

KANNEGANTI TD, DIXIT VD. Immunological complications of obesity. **Nat Immunol**, v.13, p. 707–712, 2012.

KENNEDY AJ, ELLACOTT KL, KING VL, et al. Mouse models of the metabolic syndrome. **Dis Model Mech**, v.3, p156–66, 2010.

KENNEDY AJ, et al. Mouse models of the metabolic syndrome. **Dis Model Mech**, v.3, p.156–166, 2010.

KENNETH NS, ROCHA S. Regulation of gene expression by hypoxia. **Biochem. J**, v. 414, p. 19–29, 2008.

- KEOPHIPHATH M, et al. CCL5 promotes macrophage recruitment and survival in human adipose tissue. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 30, p, 39–45, 2010.
- KERSHAW EE, FLIER JS. Adipose tissue as an endocrine organ. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, p. 2548-2556, 2004.
- KHAN T, et al. Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. **Mol Cell Biol**, v. 29, p. 1575–1591, 2009.
- KIM SH, PLUTZKY J. Brown Fat and Browning for the Treatment of Obesity and Related Metabolic Disorders. **Diabetes Metab J**, v. 40, p. 12-21, 2016.
- KIM. Y.B.; HICKNER, R.C.; CORTRIGHT, R.L.; DOHM, G.L, HOUMARD. J.A. Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.279, p.1039–44. 2010.
- 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.
- KOVRT WM, HOLLOSZY JO. Loss of skeletal muscle mass with aging: effect on glucose tolerance. **J Gerontol a Biol Sci Med Sci**, v. 50, p. 68-72, 1995.
- KOSTELI A, et al. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 3, p. 466–479, 2010.
- KOVSAN J, et al. Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, p. E268–E277, 2011.
- KRATZ M, et al. Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. **Cell Metab**, v. 20, p. 614–625, 2014.
- KRAUSGRUBER T, et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. **Nat Immunol**, v. 12, p. 231–238, 2011.
- KUMAR GS, et al. Sugar-sweetened beverage consumption among adults-18 States, 2012. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 63, n. 32, p. 86-90, 2014.
- LEE JG, et al. A combination of Lox-1 and Nox1 regulates TLR9-mediated foam cell formation. **Cell. Signal**, v. 20, p.2266–2275, 2008.
- LEVY RB, CLARO RM, MONTEIRO CA. Aquisição de açúcar e perfil de macronutrientes na cesta de alimentos adquirida pelas famílias brasileiras (2002-2003). **Cad Saude Publica**, v. 26, p. 472-80, 2010.
- LEVY RB, CLARO RM, MONTEIRO CA. Disponibilidade de “açúcares de adição” no Brasil: distribuição, fontes alimentares e tendência temporal. **Rev Bras Epidemiol**, v. 15, p. 3-12, 2012.
- LEVY RB, et al. Distribuição regional e socioeconômica da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil em 2008- 2009. **Rev Saude Publica**, v. 46, n. 1, p. 6-15, 2012.

- LEVY-COSTA RB, et al. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: distribuição e evolução (1974-2003). **Rev Saude Publica**, v. 39, n.4, p.530-540, 2005.
- LIM SS, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, v. 380, p. 2224–60, 2012.
- LIMA EA, et al. Macadamia oil supplementation attenuates inflammation and adipocyte hypertrophy in obese mice. **Mediators Inflamm.**, p. 06-34, 2014.
- LIU J, et al. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. **Nat Med**, v. 15, p. 940–945, 2009.
- LOLMEDE K. et al. Immune cells in adipose tissue: key players in metabolic disorders. **Diabetes & metabolism**, v, 37, p. 283-290, 2011.
- LONG J.Z., et al. A smoothmuscle-like origin for beige adipocytes, **Cell Metab**, v. 19, p. 810–820, 2014.
- LUMENG CN, BODZIN JL, SALTIEL AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J Clin Invest**, v. 117, p. 175-184, 2007.
- LUMENG CN, et al. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet induced obesity. **Diabetes**, v. 56, p.16–23, 2007.
- M. HARMS, P. SEALE, Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential, **Nat. Med**, v.19, p. 1252–1263, 2013.
- MA X et al. Control of adipocyte differentiation in different fat depots; implications for pathophysiology or therapy. **Frontiers in endocrinology**, v. 6, p. 1, 2015.
- MACEDO IC, et al. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. **Peptides.**, v. 38, n. 1, p. 189-96, nov. 2012.
- MACDONALD ML, SINGARAJA RR, BISSADA N, RUDDLE P, WATTS R, et al., Absence of stearoyl-CoA desaturase-1 ameliorates features of the metabolic syndrome in LDLR-deficient mice. **J Lipid Res**, v 49, p. 217-229, 2008.
- MALIK VS, SCHULZE MB, HU FB. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. **Am J Clin Nutr**, v. 84, p. 274-288, 2006.
- MANTOVANI A, et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **J Pathol**, v. 229, p. 176–185, 2013.
- MANTOVANI A, et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**, v. 25, p. 677–686, 2004.
- MARSHAK-ROTHSTEIN A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. **Nat. Rev. Immunol**, v. 6, p. 823–835, 2006.
- MARTINEZ FO, et al. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. **J Immunol**, v. 177, p.7303–7311, 2006.

MATHIEU P, LEMIEUX I, DESPRES JP. Obesity, inflammation, and cardiovascular risk. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 87, p. 407-416, 2010.

MATTHAN R. N, et al. Effects of Dietary Palmitoleic Acid on Plasma Lipoprotein Profile and Aortic Cholesterol Accumulation Are Similar to Those of Other Unsaturated Fatty Acids in the F1B Golden Syrian Hamster. **J. Nutr**, v. 139, p. 215–221, 2009.

MINEHIRA K, N. et al. Effect of carbohydrate overfeeding on whole body macronutrient metabolism and expression of lipogenic enzymes in adipose tissue of lean and overweight humans. **International Journal of Obesity**, v. 28, n. 10, p. 1291–1298, 2004.

MISRA A, KHURANA L. Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. **J Clin Endocrinol Metab**, v.93, p.19–30, 2008.

MITTELMAN SD, et al. Longitudinal compensation for fat-induced insulin resistance includes reduced insulin clearance and enhanced b-cell response. **Diabetes**, v. 49, p. 2116–2125, 2000.

MONTEIRO CA, et al. A new classification of foods based on the extent and purpose of food processing. **Cad Saude Publica**, v. 26, n. 11, p.2039-2049, 2010.

MORAES-VIEIRA PM, et al. RBP4 activates antigen-presenting cells, leading to adipose tissue inflammation and systemic insulin resistance. **Cell Metab**, v. 19, p. 512–526, 2014.

MORRIS MJ, et al. Cameron-Smith D. Brain neuropeptide Y and CCK and peripheral adipokine receptors: temporal response in obesity induced by palatable diet. **Int J Obes (Lond)**, v. 32, p. 249–258, 2008.

MOZAFFARIAN D, et al. Circulating palmitoleic acid and risk of metabolic abnormalities and new-onset diabetes. **Am J Clin Nutr.**, v. 92, p. 1350-1358, 2010.

MOZAFFARIAN D, et al. Trans-Palmitoleic acid, other dairy fat biomarkers, and incident diabetes: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). **Am J Clin Nutr.**, v. 97, p. 854-61, 2013.

MUELLER E. Understanding the variegation of fat: Novel regulators of adipocyte differentiation and fat tissue biology. **Biochim Biophys Acta**, v. 3, p. 352-357, 2014.

MURANO IG, et al. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. **J. Lipid Res**, v. 49, p. 1562–1568, 2008.

MUTCH DM, et al. Needle and surgical biopsy techniques differentially affect adipose tissue gene expression profiles. **Am J Clin Nutr**, v. 89, p. 51–57, 2009.

NASKA A, et al. Eating out, weight and weight gain. A cross-sectional and prospective analysis in the context of the EPIC-PANACEA study. **Int J Obes (Lond)**, v. 35, p. 416–26, 2011.

NESTEL P, CLIFTON P, NOAKES M. Effects of increasing dietary palmitoleic acid compared with palmitic and oleic acids on plasma lipids of hypercholesterolemic men. **J Lipid Res.**, v. 35, p. 656-662, 1994.

- NG, MARIE, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, v. 384, n. 9945, p. 766 – 781, august, 2014.
- NIEDBALA W, CAI B, LIEW FY. Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. **Ann Rheum Dis**, v. 65, p. 37–40, 2006.
- NISHIMOTO S, et al. Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. **Sci Adv.**, v. 2, p. 1501-1532, 2016.
- NISHIMURA, S. et al. **Nat. Med**, v. 15, p. 914–920, 2009.
- NIZET V, Johnson RS. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. **Nat Rev Immunol**, v. 9, p. 609–617, 2009.
- NOEL W, et al. Alternatively activated macrophages during parasite infections. **Trends Parasitol**, v. 20, p. 126–133, 2004.
- NORTH BJ, SINCLAIR DA. The intersection between aging and cardiovascular disease. **Circ Res**, v. 110, p. 1097-1108, 2012.
- ODEGAARD, J.I, CHAWLA, A. **Annu. Rev. Pathol**, v. 6, p. 275–297, 2011.
- OKA T, et al. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. **Nature**, v. 485, p. 251–255, 2012.
- OKORODUDU DO, et al. Diagnostic performance of body mass index to identify obesity as defined by body adiposity: a systematic review and meta-analysis. **Int J Obes**, v. 34, p. 791–799, 2010.
- OLEFSKY JM, GLASS CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. **Annu Rev Physiol**, v. 72, p. 219–226, 2010.
- ORR JS, et al. Obesity alters adipose tissue macrophage iron content and tissue iron distribution. **Diabetes**, v. 63, p. 421–432, 2014.
- ORR JS, et al. Toll-like receptor 4 deficiency promotes the alternative activation of adipose tissue macrophages. **Diabetes**, v. 61, p. 2718–2727, 2012.
- ORTEGA J. F, D. et al. The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. **Obesity**, v. 18, n. 1, p. 13–20, 2010.
- OST A, et al. Attenuated mTOR signaling and enhanced autophagy in adipocytes from obese patients with type 2 diabetes. **Mol Med**, v. 16, p. 235–246, 2010.
- OUCHI N, et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, p. 85-97, 2011.
- PAILLARD F, et al. Plasma palmitoleic acid, a product of stearoyl-coA desaturase activity, is an independent marker of triglyceridemia and abdominal adiposity. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.**, v. 6, p. 436-440, 2008.
- PATEL P ABATE N. Body fat distribution and insulin resistance. **Nutrients**, v. 5, p. 2019-2027, 2013.

- PATSOURIS D, et al. Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. **Cell Metab**, v. 8, p. 301–309, 2008.
- PENG XR, et al. Unlock the Thermogenic Potential of Adipose Tissue: Pharmacological Modulation and Implications for Treatment of Diabetes and Obesity. **Frontiers in endocrinology**, v. 6, p. 174, 2015.
- PEREIRA RA, et al. Sources of excessive saturated fat, trans fat and sugar consumption in Brazil: an analysis of the first Brazilian nationwide individual dietary survey. **Public Health Nutr**, v. 17, p. 113-21, 2012.
- PHILIP C. CALDER, Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 39, p. 18–32, 2105.
- POPKIN BM, GORDON-LARSEN P. The nutrition transition: worldwide obesity dynamics and their determinants. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 28, n. 3, p. S2-S9, Nov 2004.
- POUDYAL H, et al. Responses to oleic, linoleic and α -linolenic acids in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. **J Nutr Biochem.**, v. 24, p. 381-392, 2013.
- PRENTICE AM, JEBB SA. Beyond body mass index. **Obes Rev**, v. 2, p. 141–147, 2001.
- QUINTERO, P, et al. Effects of hyperoxia exposure on metabolic markers and gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 68, n. 4, p. 663–669, 2012.
- RAUSCH ME, et al. Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. **Int. J. Obes**, v. 32, p. 451–463, 2008.
- ROCHA S. Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. **Trends Biochem. Sci**, v. 32, p. 389–397, 2007.
- RODRÍGUEZ A, et al. Acylated and desacyl ghrelin stimulate lipid accumulation in human visceral adipocytes. **Int J Obes**, v. 33, p. 541–552, 2009.
- RODRÍGUEZ A, et al. The ghrelin O-acyltransferase-ghrelin system reduces TNF- α -induced apoptosis and autophagy in human visceral adipocytes. **Diabetologia**, v. 55, p. 3038–3050, 2012.
- RODRÍGUEZ A, et al. Visceral and subcutaneous adiposity: are both potential therapeutic targets for tackling the metabolic syndrome? **Curr Pharm Des**, v.13, p 2169–2175, 2007.
- RODRIGUEZ-PRADOS JC, et al. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. **J Immunol**, v. 85, p. 605–614, 2010.
- ROMERO-CORRAL A, et al. Diagnostic performance of body mass index to detect obesity in patients with coronary artery disease. **Eur Heart J**, v. 28, p. 2087–2093, 2007.
- ROMERO-CORRAL A, et al. Accuracy of body mass index in diagnosing obesity in the adult general population. **Int J Obes**, v. 32, p. 959–966, 2008.
- ROSEN ED, et al. Transcriptional regulation of adipogenesis. **Genes Dev**, v. 14, p. 1293–1307, 2000.

ROTHWELL NJ, STOCK MJ. Combined effects of cafeteria and tube-feeding on energy balance in the rat. **Proc Nutr Soc**, v. 38, p. 5, 1979.

ROTHWELL NJ, STOCK MJ. Regulation of energy balance in two models of reversible obesity in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 93, p. 1024–1034, 1979.

SACRAMENTO, C.K.; PEREIRA, F.M. Fenologia da floração da noqueira macadâmia (*Macadami integrifolia* Maiden & Betche) nas condições climáticas de Jaboticabal, São Paulo, Brasil. **R. Bras. Frutic.**, v.25, n.1, p.19-22, 2003.

SAELY CH, GEIGER K, DREXEL H. Brown versus white adipose tissue: a mini review. **Gerontology**, v. 58, p. 15-23, 2012.

SAHIN-EFE A, KATSIKERIS F, MANTZOROS CS. Advances in adipokines. **Metabolism**, v.61, p. 1659–1669, 2012.

SAMPEY BP, et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity**, v. 19, p. 1109-1117, 2011.

SAMPEY BP, et al. Metabolomic profiling reveals mitochondrial-derived lipid biomarkers that drive obesity-associated inflammation. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. 388-392, 2012.

SANCHIS-GOMAR F, et al. Physical inactivity and low fitness deserve more attention to alter cancer risk and prognosis. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 8, p. 105-110, 2015.

SCHARFE-NUGENT A, et al. TLR9 provokes inflammation in response to fetal DNA: Mechanism for fetal loss in preterm birth and preeclampsia. **J. Immunol**, v.188, p. 5706–5712 2012.

SCHIPPER HS, et al. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. **Trends Endocrinol Metab**, v. 23, p. 407-415, 2012.

SCHULZ, C, et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. **Science**, v. 336, p. 86–90, 2012.

SCHUTZ Y. Concept of fat balance in human obesity revisited with particular reference to de novo lipogenesis. International journal of obesity and related metabolic disorders. **journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 28, n. 4, p. 3-11, 2004.

SCLAFANI A, SPRINGER D. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. **Physiol Behav**, v. 17, p. 461–471, 1976.

SEMENZA GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, p. 721–732. 2003.

SHAPIRO H, et al. Adipose tissue foam cells are present in human obesity. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, p. 1173–1181, 2013.

SHAW B, LAMBERT S, WONG MH, RALSTON JC, STRYJECKI C, MUTCH DM. Individual saturated and monounsaturated fatty acids trigger distinct transcriptional networks in differentiated 3T3-L1 preadipocytes. **J Nutrigenet Nutrigenomics**. V. 6, p:1-15, 2013.

- SHIMIZU I, YOSHIDA Y, MINAMINO T. Pathological role of adipose tissue dysfunction in cardio-metabolic disorders. **International heart journal**, v. 56, p.255-259, 2015.
- SIDDIQUI RA, et al. Comparative study of the modulation of fructose/sucrose-induced hepatic steatosis by mixed lipid formulations varying in unsaturated fatty acid content. **Nutr Metab (Lond)**, v. 14, p. 12-41, 2015.
- SIEWEKE, M.H, ALLEN, J.E. Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. **Science**, v. 342, p. 1242974, 2013.
- SINGH R, Cuervo AM. Autophagy in the cellular energetic balance. **Cell Metab**, v. 13, p. 495–504, 2011.
- SINGH R, et al. Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. **J Clin Invest**, v. 119, p. 3329–3339, 2009.
- SINGH R. Autophagy in the control of food intake. **Adipocyte**, v. 1, p. 75–79, 2012.
- SKURK T, et al. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 92, p. 1023–1033, 2007.
- SOLÁ, E. et al. Parameters of inflammation in morbid obesity: lack of effect of moderate weight loss. **Obesity Surgery**, v. 19, n. 5, p. 571-576, 2009.
- SOUZA CO, TEIXEIRA AA, BIONDO LA, SILVEIRA LS, CALDER PC, ROSA NETO JC. Palmitoleic acid reduces the inflammation in LPS-stimulated macrophages by inhibition of NFκB, independently of PPARs. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. v. 44 p:566-575, 2017.
- SOUZA CO, TEIXEIRA AA, LIMA EA, BATATINHA HA, GOMES LM, et al. Palmitoleic acid (n-7) attenuates the immunometabolic disturbances caused by a high-fat diet independently of PPARα. **Mediators Inflamm**, v. 8, p: 2197-2232, 2014.
- SPALDING KL, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. **Nature**, v. 453, p.783–787, 2008.
- STEFAN N, et al. Circulating palmitoleate strongly and independently predicts insulin sensitivity in humans. **Diabetes Care**, v. 33, p. 405-407, 2010.
- ST-ONGE MP. Relationship between body composition changes and changes in physical function and metabolic risk factors in aging. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.8, p. 523-528, 2005.
- STRISSEL KJ, et al. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. **Diabetes**, v. 56, p. 2910–2918, 2007.
- SUGANAMI T, J. NISHIDA, Y. OGAWA, A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: Role of free fatty acids and tumor necrosis factor α. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**, v. 25, p. 2062–2068, 2005.
- SUN K, et al. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. **Cell Metab**, v. 18, p. 470–477, 2013.
- SUN K, et al. Selective inhibition of hypoxia-inducible factor 1αameliorates adipose tissue dysfunction. **Mol. Cell. Biol**, v. 33, p. 904–917, 2013.

SWINBURN B, SACKS G, RAVUSSIN E. Increased food energy supply is more than sufficient to explain the US epidemic of obesity. **Am J Clin Nutr**, v. 90, p.1453– 1456, 2009.

SWINBURN BA, et al. Estimating the changes in energy flux that characterize the rise in obesity prevalence. **Am J Clin Nutr**, v. 89, p. 1723–1728, 2009.

TAUBER, A.I. Metchnikoff and the phagocytosis theory. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**, v. 4, p. 897–901, 2003.

TCHKONIA T, et al. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots, **Cell Metab**, v.17, p. 644–656, 2013.

TCHOUKALOVA YD, et al. Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 107, p. 18226 – 18231, 2010.

THE JOINT FAO/WHO EXPERT CONSULTATION ON FATS AND FATTY ACIDS IN HUMAN NUTRITION NOVEMBER 10–14, 2008, Geneva, Switzerland (2010) Interim summary of conclusions and dietary recommendations on total fat & fatty acids. <http://www.fao.org/ag/agn/nutrition/docs/Fats%20and%20Fatty%20Acids%20Summaryfin.pdf>.

TOUNIAN P. Programming towards Childhood Obesity. **Ann Nutr Metab**, v. 58, p, 30-41, 2011.

TRAYHURN P, WANG B, WOOD IS. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? **Br. J. Nutr**, v. 100, n. 227, p.351-377, 2008.

TRAYHURN P, WOOD IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **Br. J. Nutr**, v. 92, p. 347–355, 2004.

TRAYHURN P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 1–21, 2013.

TRAYHURN, P. Adipocyte biology. **Obesity reviews**, v. 8, p. 41S-44S, 2007.

TZANETAKOU IP, et al. Is obesity linked to aging? adipose tissue and the role of telomeres. **Ageing Res Rev**, v. 11, p. 220-229, 2012.

UNGER H. R, et al. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1801, no. 3, p. 209–214, 2010.

VAN DER KLAAUW AA, FAROOQI IS. The hunger genes: pathways to obesity. **Cell**, v. 161, p. 119–132, 2015.

VATS D, et al. Oxidative metabolism and PGC-1beta attenuate macrophage-mediated inflammation. **Cell Metab**, v. 4, p. 13–24, 2006.

VILLAREAL DT, et al. Obesity in older adults: technical review and position statement of the American Society for Nutrition and NAASO, **The Obesity Society**. *Obes Res*, v. 13, p. 1849-1863, 2005.

VIRTUE S, VIDAL-PUIG A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome an allostatic perspective. **Biochim Biophys Acta**, v. 1801, p. 338–349, 2010.

- VOLLMER J. TLR9 in health and disease. **Int. Rev. Immunol**, v. 25, p. 155–181, 2006.
- WANG N, LIANG H, ZEN K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. **Front Immunol**, v. 5, p. 614, 2014.
- WANG P, et al. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. **J Cell Physiol**, v. 216, p. 3–13, 2008.
- WEISBERG SP, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 112, p. 1796–1808, 2003.
- WELLENS RI, et al. Relationships between the body mass index and body composition. **Obes Res**, v. 4, p. 35–44, 1996.
- WOOD I.S, et al. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 68, n. 4, p. 370–377, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. BMI classification. Available at: http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html. (accessed fev. 9 2016), 2008.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. Geneva: **World Health Organization**; 2003.
- 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: World Health Organization; 1995.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION: obesity and overweight. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>>. Acesso em: 09 fev. 2016.
- WU D, et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. **Science**, v. 332, p. 243–247, 2011.
- WU J, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. **Cell**, v. 150, p. 366–76, 2012.
- WYNN, T.A., CHAWLA, A., POLLARD, J.W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v. 496, p. 445–455, 2013.
- XU H, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 112, p. 1821–1830, 2003.
- YANG B, KALLIO H, P, Fatty Acid Composition of Lipids in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Berries of Different Origins **J. Agric. Food Chem**, v. 49, p. 1939–1947, 2001.
- YANG ZH, 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 Health Dis.**, v. 10, p. 120, 2011.
- YANG ZH, TAKEO J, KATAYAMA M. Oral administration of omega-7 palmitoleic acid induces satiety and the release of appetite-related hormones in male rats. **Appetite.**, v. 65, p. 1–7, 2013.

YANG ZH, PRYOR M, NOGUCHI A, SAMPSON M, JOHNSON B, et al. Dietary Palmitoleic Acid Attenuates Atherosclerosis Progression and Hyperlipidemia in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. **Mol Nutr Food Res**, v. 28, p. 190-200, 2019

YANG, H. et al. **J. Immunol**, v. 185, p. 1836–1845, 2010.

YE J, et al. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**, v. 293, p. 1118–1128, 2007.

YONA, S, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. **Immunity**, v. 38, p. 79–91, 2013.

ZEENI N, et al. Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation. **Inflamm. Res**, v. 64, p. 501–512, 2015.

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.

ZHANG Y, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, p. 425–432, 1994.

ANEXO A – Certificado da comissão ética no uso de animais



Universidade Federal
de Santa Catarina

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 Símonato 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 Símonato 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:	C57BL/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 □ LIDeC / 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