



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas



BEATRIZ PIATEZZI SIQUEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA GORDURA INTERESTERIFICADA EM
MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NO CONTROLE CENTRAL DA
HOMEOSTASIA ENERGÉTICA**

Limeira
2024

BEATRIZ PIATEZZI SIQUEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA GORDURA INTERESTERIFICADA EM
MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NO CONTROLE CENTRAL DA
HOMEOSTASIA ENERGÉTICA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo na Área de concentração Ciências Nutricionais e Metabolismo.

Orientadora: Marciane Milanski
Coorientadora: Adriana Souza Torsoni

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA BEATRIZ
PIATEZZI SIQUEIRA, E ORIENTADA
PELA PROFA. DR(A). MARCIANE
MILANSKI.

Limeira
2024

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

Si75a Siqueira, Beatriz Piatezzi, 1998-
Avaliação dos efeitos da gordura interesterificada em mecanismos moleculares envolvidos no controle central da homeostasia energética / Beatriz Piatezzi Siqueira. – Limeira, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Marciane Milanski Ferreira.
Coorientador: Adriana Souza Torsoni.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Gordura interesterificada. 2. Hipotálamo. 3. Homeostase. 4. Leptina. 5. Insulina. I. Ferreira, Marciane Milanski, 1972-. II. Torsoni, Adriana Souza, 1973-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Evaluation of the effects of interesterified fat on molecular mechanisms involved in the central control of energy homeostasis

Palavras-chave em inglês:

Interesterified fat

Hypothalamus

Homeostasis

Leptin

Insulin

Área de concentração: Ciências Nutricionais e Metabolismo

Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Adriana Souza Torsoni [Coorientador]

Julio Beltrame Daleprane

Camila Libardi do Amaral

Data de defesa: 31-01-2024

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-1278-5485>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3502992971483507>

FOLHA DE APROVAÇÃO

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Adriana Torsoni (Presidente da Comissão Examinadora)

Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane

Dra. Camila Libardi do Amaral

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

DEDICATÓRIA

Com todo o meu coração, dedico este trabalho aos meus avós maternos José (in memoriam) e Edna, à minha avó paterna Evanete (in memoriam) e à minha mãe Gisele. À vocês, expressão do amor mais puro e genuíno que conheci nesta vida, minha eterna gratidão e saudade.

AGRADECIMENTOS

Neste espaço deixo meus agradecimentos aos que, de alguma forma, fizeram e fazem parte da minha caminhada até aqui.

Agradeço, primeiramente, à Deus, por ter me permitido chegar onde estou. Tantos caminhos pude percorrer graças a sua infinita bondade e misericórdia. Obrigada, Senhor.

Aos grandes amores da minha vida, meus avós maternos José (*in memoriam*) e Edna. Minha base forte, meu porto seguro. Sem vocês, eu não seria metade do que sou hoje. Obrigada pelo apoio, pelo abrigo, afeto, pelas orações e por todo suor derramado para permitir que pudéssemos estudar e alcançar nossos sonhos. Eu nunca conseguirei agradecer o suficiente pelo tanto que sempre fizeram por mim. Meu amor mais sincero, minha saudade e minha eterna gratidão.

Em especial, deixo minha saudosa lembrança ao meu avô José, que nos deixou há dois meses mas que é eterno. Queria que me visse cruzar a linha de chegada e que soubesse que deu certo. Nós conseguimos! Eu sinto muito sua falta e te amo pra sempre.

Aos meus amores, minha mãe Gisele e meus irmãos Thiago e Barbara. Obrigada por serem minha casa e por sonharem comigo cada sonho que me trouxe até aqui e assim, me permitirem voar, sempre que necessário. Eu os amo de todo o meu coração.

Aos meus tios Gustavo e Deva, que amo muito. Obrigada por serem esteio e por estarem presentes dia-a-dia, na vida real, em meio a tormentas e calmaria. Vocês são muito importantes pra mim e também fazem parte dessa conquista.

Aos meus demais familiares, em especial ao meu pai Everaldo e à minha avó paterna, Evanete (*in memoriam*) por todo apoio e encorajamento que sempre me deram. A torcida de vocês é e sempre foi essencial para me manter de pé e fazer com que eu chegasse aqui. À vocês, meu amor e gratidão.

À minha querida orientadora, profa. Marciane Milanski, pela oportunidade de elaboração e execução de mais este trabalho. Eu não teria chegado aqui sem sua presença na minha caminhada. Muito obrigada por me dar as ferramentas e as instruções para aprender e por acreditar no meu potencial em tantos momentos. Você é um ser humano admirável e seu conhecimento e amor pela ciência me inspiram a ser uma pesquisadora e uma pessoa melhor a cada dia. Posso afirmar com certeza que aqueles que te tem por perto tem sorte e, portanto, me sinto sortuda! Você é luz! Obrigada por tudo e por tanto, Marci.

À Andressa e Josi, minhas grandes amigas e parceiras da vida científica. Muito obrigada por toda generosidade e dedicação ao meu processo de aprendizagem e aperfeiçoamento na pesquisa científica. Muito do que sei devo a vocês! Sou muito grata por termos nos esbarrado nessa vida e termos tido a oportunidade de partilharmos, além da rotina, uma amizade generosa e sincera, caminhando sempre lado-a-lado, torcendo uma pela outra. Eu só tenho a agradecer por vocês!

À Bruna, minha irmã postiça, amiga e *roomie*. Obrigada pelas infinitas horas de conversa, conselhos, risos e choros regados a café. Você esteve comigo nos meus mais altos e baixos momentos ao longo desses três anos. Amiga, obrigada por tanto. Amo muito você.

À Ana Júlia, minha querida primeira aluna de iniciação científica. Obrigada por confiar a mim o seu primeiro contato com a pesquisa. Olho pra trás e só consigo ver o quanto crescemos e amadurecemos (juntas) ao longo desse processo. Sou muito grata por toda a paciência, pela dedicação e por ter sido meu braço direito nesse projeto. Obrigada, Aninha!

Ao meu querido e muito amado grupo Inter: João Víctor, Talita, Luiza, Manu e Raísa. Obrigada pela parceria e pelas incontáveis horas de experimentos regadas a risadas. Vocês trazem leveza para a rotina de bancada.

Aos professores do Labdime, profas. Adriana, Letícia, Marciane e prof. Marcio. A amizade de vocês transborda e transforma o nosso laboratório em casa. Sou muito grata pelo acolhimento desde o meu primeiro ano da graduação e por me permitirem crescer juntamente com todo o grupo. Agradeço pelas nossas ricas discussões científicas e por serem tão generosos e cuidadosos na nossa orientação. Vocês são inspiradores, eu os admiro demais!

Aos meus amigos *Labdimers*. A vida no laboratório não seria a mesma sem vocês. Sou muito grata pela nossa convivência harmoniosa e pela parceria que criamos. O que seria da pesquisa sem a colaboração? Agradeço por colaborarmos nos experimentos, nos reagentes emprestados, nas conversas durante o almoço e na vida para além da pesquisa.

Aos meus amigos, filhos da Unicamp, Letícia, Carol, Sabrina, Bianca e Rodrigo. Me sinto muito orgulhosa pelo vínculo que criamos. Vocês se fazem presentes nos momentos mais importantes da minha vida desde 2016. Isso é amizade! Amo todos.

E, especialmente, agradeço também à minha amiga-irmã xará Beatriz, que está na minha vida desde os meus quatro anos de idade. Crescemos, estudamos juntas e agora temos o privilégio de ver cada uma fazendo o cultivo e a colheita dos frutinhos que plantamos em nossas vidas profissional. Obrigada por me acompanhar em todos os meus ciclos. Te amo e te admiro, irmã!

Aos amigos brasileiros que Nova York me deu, em especial, Mari e Ale. Minha primeira experiência no exterior não teria sido tão divertida e memorável sem vocês. Obrigada por tornarem os dias no *Einstein* mais leves e por fazerem parte de muitas das melhores lembranças que carrego comigo.

À minha família multicultural do Bronx. Neel, Felipe, Jairam, Swetha e Gowri, vocês foram minha casa durante seis meses e eu não poderia ter pedido por pessoas melhores para compartilhar os meus dias. Que sorte tê-los encontrado. Obrigada pelas longas conversas, pelas muitas risadas, pelos passeios por Manhattan e pelos nossos jantares tipicamente indianos. Sinto muita saudade de todos.

Ao professor Rajat Singh e aos alunos do laboratório de Autofagia e Metabolismo pelo acolhimento no *Albert Einstein College of Medicine*. Deixo também um agradecimento especial à

Henrietta, que tanto me ajudou durante a minha estadia em NY e me socorreu em diversas tribulações. Sou e serei eternamente grata!

A todos os meus professores, do ensino fundamental ao ensino superior. Sem educação eu não seria nada, não saberia nada, eu não estaria aqui. O brilhantismo de educar e ajudar na formação de um ser humano e um profissional é um privilégio e um dom que poucos têm. Agradeço então a todos os meus mestres, com muito carinho.

Aos meus bichinhos, Billy (*in memoriam*), Snoopy e Theo, por contagiarem os meus dias com alegria, amor e lambeijos. Vocês preenchem minha vida!!!!

Aos animais experimentais, meu respeito e gratidão.

Agradeço, finalmente, às agências de fomento pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa e aos pesquisadores brasileiros: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo nº 2021/01322-8 e 2022/02128-3), ao Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades (OCRC), coordenado pelo professor Lício Velloso e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A todos que colaboraram de alguma forma...

Muito obrigada!

EPÍGRAFE

*“Minhas raízes estão no ar
Minha casa é qualquer lugar
Se depender de mim
Eu vou até o fim.
[...]
Cada célula
Todo fio de cabelo
Falando assim
Parece exagero
Mas se depender de mim
Eu vou até o fim.”*

Até o fim
Engenheiros do Hawaii

RESUMO

Recentemente a gordura interesterificada tem sido utilizada como uma alternativa ao uso das gorduras *trans*. A gordura interesterificada é obtida pelo processamento de óleos vegetais por meio de métodos químicos ou enzimáticos, o que resulta no rearranjo de ácidos graxos na molécula de glicerol, sem alterar o grau de saturação dos mesmos. Estudos recentes têm mostrado distúrbios metabólicos em resposta à ingestão crônica (oito semanas) de dieta rica em gordura interesterificada, como ganho de massa corporal, dislipidemia e intolerância à glicose. No entanto, os efeitos da ingestão dessa gordura em curto prazo e também no sistema nervoso central responsável pela homeostasia energética, são desconhecidos. O hipotálamo é a região responsável pelo controle central da ingestão alimentar e gasto energético por meio de neurônios especializados capazes de receber informações e sinalizar outras áreas cerebrais envolvidas na regulação da fome/saciedade. A ingestão de dieta rica em gordura leva à ativação hipotalâmica de resposta inflamatória crônica, produção de quimiocinas e citocinas, com consequente resistência à ação dos hormônios leptina e insulina, principais sinalizadores do balanço energético. Tivemos como objetivo entender o efeito do óleo de palma interesterificado em processos celulares que controlam a homeostasia energética em camundongos. Para tanto, foram utilizados camundongos *Swiss* machos submetidos a dieta com óleo de palma interesterificado e divididos em quatro grupos experimentais: grupo normolipídico óleo de palma (PO), grupo normolipídico óleo de palma interesterificado (IPO), grupo hiperlipídico (POHF) e grupo hiperlipídico interesterificado (IPOHF), os quais receberam a dieta experimental por uma ou quatro semanas e camundongos *Swiss* e/ou C57BL/6 machos suplementados com óleo de palma interesterificado (IPO) por sete dias consecutivos ou submetidos ao tratamento intracerebroventricular (icv) único com 2-palmitoilglicerol (PG). Os dados aqui apresentados sugerem que a ingestão em curto e médio prazo de gordura interesterificada ou suplementação com óleos parecem não modular o fenótipo dos animais ou causar grandes impactos sobre o metabolismo energético e glicêmico. Outros experimentos se fazem necessários para o completo entendimento dos efeitos metabólicos da gordura interesterificada em curto e médio prazo.

Palavras-chave: Gordura interesterificada; Hipotálamo; Homeostase energética; Leptina; Insulina.

ABSTRACT

Recently, interesterified fat has been used as an alternative to trans fats. Interesterified fat is obtained through the processing of vegetable oils using chemical or enzymatic methods, resulting in the rearrangement of fatty acids on the glycerol molecule without altering their degree of saturation. Recent studies have shown metabolic disorders in response to chronic intake (eight weeks) of a diet rich in interesterified fat, such as body mass gain, dyslipidemia, and glucose intolerance. However, the effects of short-term intake of this fat and its impact on the central nervous system responsible for energy homeostasis are unknown. The hypothalamus is the region responsible for the central control of food intake and energy expenditure through specialized neurons capable of receiving information and signaling other brain areas involved in the regulation of hunger/satiety. Consumption of a high-fat diet leads to hypothalamic activation of chronic inflammatory response, production of chemokines and cytokines, resulting in resistance to the action of the hormones leptin and insulin, the main signaling molecules of energy balance. Our aim was to understand the effect of interesterified palm oil on cellular processes that control energy homeostasis in mice. For this purpose, male Swiss mice were subjected to a diet with interesterified palm oil and divided into four experimental groups: normolipidic palm oil group (PO), normolipidic interesterified palm oil group (IPO), hyperlipidic group (POHF), and hyperlipidic interesterified group (IPOHF), which received the experimental diet for one or four weeks. Swiss and/or C57BL/6 male mice were also supplemented with interesterified palm oil (IPO) for seven consecutive days or subjected to a single intracerebroventricular (icv) treatment with 2-palmitoylglycerol (PG). The data presented here suggest that short- and medium-term intake of interesterified fat or supplementation with oils does not appear to modulate animal phenotypes or cause significant impacts on energy and glycemic metabolism. Further experiments are necessary for a complete understanding of the metabolic effects of interesterified fat in the short and medium term.

Keywords: Interesterified fat; Hypothalamus; Energy homeostasis; Leptin; Insulin.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	20
1.1 Obesidade, um problema mundial de saúde.....	20
1.2 O impacto metabólico do padrão alimentar atual.....	20
1.3 Óleos e gorduras - caracterização e efeitos metabólicos.....	21
1.3.1 Ácidos graxos <i>trans</i>	21
1.3.2 Gordura interesterificada.....	22
1.4 Homeostasia energética e sensibilidade hipotalâmica à leptina.....	23
1.4.1 Insulina.....	25
1.4.2 Leptina.....	26
1.5 Justificativa.....	28
2. Objetivos.....	29
2.1 Geral.....	29
2.2 Específicos.....	29
3. Materiais e métodos.....	30
3.1 Questões éticas.....	30
3.2 Animais e condições experimentais.....	30
3.3 Caracterização química das fontes lipídicas das dietas.....	31
3.4 Parâmetros metabólicos.....	33
3.4.1 Avaliação do consumo alimentar e da massa corporal dos animais.....	33
3.4.2 Análise da composição corporal por Ressonância Magnética (MRI).....	33
3.4.3 Teste de tolerância oral à glicose.....	34
3.4.4 Administração dos tratamentos.....	34
3.4.4.1 Tratamento intraperitoneal (ip) de leptina e intracerebroventricular (icv) com leptina.....	34
3.4.4.2 Tratamento icv com 2-palmitoilglicerol.....	34
3.5 Cirurgia de estereotaxia.....	35
3.5.1 Microagulhamento no hipotálamo e/ou implante de cânulas.....	35

3.6	Coleta de tecidos.....	35
3.7	Preparo dos tratamentos.....	35
3.8	Protocolo <i>Ex Vivo</i>	36
3.9	Bioenergética celular (<i>Seahorse</i>).....	36
3.10	Isolamento da fração vascular estromal (FVS).....	36
3.11	Citometria de Fluxo.....	37
3.12	Estratégia de <i>gating</i>	37
3.13	Western Blot.....	37
3.14	Expressão gênica.....	38
3.15	Análise estatística.....	38
4.	Resultados.....	39
	Etapa 1: Avaliação de parâmetros metabólicos e resistência à leptina em animais alimentados com dieta rica em gordura interesterificada.....	39
	4.1 Protocolo experimental 1 - Avaliação de parâmetros metabólicos e moleculares de animais alimentados com dieta hiperlipídica composta com gordura interesterificada.....	39
	4.2 Protocolo experimental 2 - Avaliação de parâmetros metabólicos e moleculares de animais alimentados com dieta normolipídica composta com gordura interesterificada.....	45
	Etapa 2: Avaliação de parâmetros metabólicos e resistência à insulina em animais alimentados com dieta rica em gordura interesterificada ou suplementados com óleo de palma interesterificado.....	48
	4.3 Protocolo experimental 3 - Avaliação da homeostase glicêmica e expressão gênica hipotalâmica de animais alimentados com dieta composta com gordura interesterificada.....	48
	4.4 Protocolo experimental 4 - Avaliação da homeostase glicêmica e expressão gênica hipotalâmica de animais submetidos ao tratamento intracerebroventricular com 2-palmitoilglicerol.....	51
	4.5 Protocolo experimental 5 - Avaliação da composição corporal, disponibilidade bioenergética e contagem de células de camundongos suplementados com óleo de palma natural ou interesterificado.....	57
	4.6 Protocolo experimental 6 - Avaliação da sinalização da insulina em explantes hipotalâmicos de camundongos suplementados com óleo de palma natural ou interesterificado.....	61

5. Discussão.....	66
6. Conclusão.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Interesterificação.....	22
Figura 2.	Hipotálamo e a organização das estruturas nucleares hipotalâmicas envolvidas na homeostase energética.....	24
Figura 3.	Via de sinalização da leptina.....	27
Figura 4.	Delineamento referente ao protocolo experimental 1.....	39
Figura 5.	O efeito da dieta hiperlipídica rica em óleo de palma natural ou interesterificado no ganho de massa corporal de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> após uma semana.....	40
Figura 6.	O efeito da dieta hiperlipídica rica em óleo de palma natural ou interesterificado na ingestão alimentar de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> após uma semana.....	40
Figura 7.	O efeito da dieta hiperlipídica rica em óleo de palma natural ou interesterificado na glicemia de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> após uma semana.....	41
Figura 8.	O efeito da dieta hiperlipídica rica em óleo de palma natural ou interesterificado na massa corporal de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> após o tratamento intraperitoneal (ip) com leptina ao final de uma semana.....	41
Figura 9.	O efeito da dieta hiperlipídica rica em óleo de palma natural ou interesterificado na ingestão alimentar de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> após o tratamento intraperitoneal (ip) com leptina ao final de uma semana.....	42
Figura 10.	O efeito da dieta hiperlipídica rica em óleo de palma natural ou interesterificado no ganho de massa corporal de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> após quatro semanas.....	42
Figura 11.	O efeito da dieta hiperlipídica rica em óleo de palma natural ou interesterificado na ingestão alimentar de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> após quatro semanas.....	43
Figura 12.	O efeito da dieta hiperlipídica rica em óleo de palma natural ou interesterificado na massa corporal de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> após o tratamento intracerebroventricular (icv) com leptina ao final de quatro semanas.....	43
Figura 13.	O efeito da dieta hiperlipídica rica em óleo de palma natural ou interesterificado na ingestão alimentar de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> após o tratamento intracerebroventricular (icv) com leptina ao final de quatro semanas.....	44

Figura 14.	Conteúdo transcrito de RNA de neuropeptídeos após o tratamento icv com leptina em camundongos da linhagem <i>Swiss</i> submetidos à dieta hiperlipídica rica em óleo de palma natural e interesterificado.....	44
Figura 15.	Conteúdo transcrito de RNA de citocinas após o tratamento icv com leptina em camundongos da linhagem <i>Swiss</i> submetidos à dieta hiperlipídica rica em óleo de palma natural e interesterificado.....	45
Figura 16.	Delineamento referente ao protocolo experimental 2.....	46
Figura 17.	O efeito da dieta normolipídica rica em óleo de palma natural ou interesterificado em parâmetros metabólicos de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> após uma semana.....	46
Figura 18.	Expressão de proteínas em extrato protéico hipotalâmico obtido após o tratamento icv com leptina em camundongos da linhagem <i>Swiss</i> submetidos à dieta composta com óleo de palma natural ou interesterificado por uma semana.....	47
Figura 19.	Expressão de proteínas em extrato protéico hipotalâmico obtido após o tratamento icv com leptina em camundongos da linhagem <i>Swiss</i> submetidos à dieta composta com óleo de palma natural ou interesterificado por quatro semanas.....	47
Figura 20.	Delineamento do protocolo experimental 3.....	48
Figura 21.	O efeito das dietas normolipídica e hiperlipídica ricas em óleo de palma natural ou interesterificado na glicemia em jejum de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> após uma semana.....	49
Figura 22.	O efeito das dietas normolipídica e hiperlipídica ricas em óleo de palma natural ou interesterificado no ganho de massa corporal de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> ao longo de quatro semanas.....	49
Figura 23.	O efeito das dietas normolipídica e hiperlipídica ricas em óleo de palma natural ou interesterificado na ingestão alimentar de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> ao longo de quatro semanas.....	50
Figura 24.	O efeito das dietas normolipídica e hiperlipídica ricas em óleo de palma natural ou interesterificado na homeostase glicêmica de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> após quatro semanas.....	50
Figura 25.	Conteúdo transcrito de RNA de citocinas e do estresse de retículo endoplasmático do hipotálamo de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> submetidos à dieta com óleo de palma natural e interesterificado por quatro semanas.....	51
Figura 26.	Delineamento referente ao protocolo experimental 4.....	52

Figura 27.	Massa corporal e glicemia de jejum de camundongos da linhagem C57BL/6 após tratamento intracerebroventricular com BSA, palmitato ou palmitoilglicerol.....	52
Figura 28.	Conteúdo transcrito de RNA de neuropeptídeos após tratamento icv com palmitato ou palmitoilglicerol em camundongos da linhagem C57BL/6.....	53
Figura 29.	Conteúdo transcrito de RNA de genes pró-inflamatórios após tratamento icv com palmitato ou palmitoilglicerol em camundongos da linhagem C57BL/6.....	54
Figura 30.	Conteúdo transcrito de RNA de genes relacionados à autofagia e ao ciclo circadiano após tratamento icv com palmitato ou palmitoilglicerol em camundongos da linhagem C57BL/6.....	54
Figura 31.	Estratégia de <i>gating</i> aplicada à análise geral de citometria de fluxo.....	55
Figura 32.	Análise de citometria de fluxo da fração vascular estromal isolada de tecido adiposo inguinal após tratamento icv com palmitato ou palmitoilglicerol em camundongos da linhagem C57BL/6.....	56
Figura 33.	Delineamento referente ao protocolo experimental 5.....	57
Figura 34.	O efeito do óleo de palma natural e interesterificado na ingestão alimentar de camundongos da linhagem C57BL/6 após uma semana de suplementação com óleo de palma natural ou interesterificado.....	58
Figura 35.	O efeito do óleo de palma natural e interesterificado na glicemia em jejum de camundongos da linhagem C57BL/6 após uma semana de suplementação com óleo de palma natural ou interesterificado.....	58
Figura 36.	Relação peso do tecido adiposo/massa corporal corporal de camundongos da linhagem C57BL/6 após uma semana de suplementação com óleo de palma natural ou interesterificado.....	59
Figura 37.	Medições de OCR de tecidos de camundongos da linhagem C57BL/6 após uma semana de suplementação com óleo de palma natural ou interesterificado.....	59
Figura 38.	Análise por citometria de fluxo da fração vascular estromal isolada de tecido adiposo inguinal de camundongos da linhagem C57BL/6 após uma semana de suplementação com óleo de palma natural ou interesterificado.....	60
Figura 39.	Composição corporal por ressonância magnética de camundongos da linhagem C56BL/6 de camundongos após uma semana de suplementação com óleo de palma natural ou interesterificado.....	61
Figura 40.	Delineamento referente ao protocolo experimental 6.....	62

Figura 41.	O efeito da suplementação com óleo de palma natural e interesterificado no ganho de massa corporal e ingestão alimentar de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> ao final de sete dias.....	62
Figura 42.	O efeito da suplementação do óleo de palma natural e interesterificado na glicemia em jejum de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> ao final de sete dias de suplementação com óleo de palma interesterificado.....	63
Figura 43.	Relação peso do tecido adiposo/massa corporal de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> ao final de sete dias de suplementação com óleo de palma natural ou interesterificado.....	63
Figura 44.	Expressão de proteínas em extrato protéico hipotalâmico obtido após tratamento <i>ex vivo</i> com insulina em camundongos da linhagem <i>Swiss</i>	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição das dietas experimentais.....	31
Tabela 2.	Composição de ácidos graxos do óleo de palma natural e interesterificado.....	32
Tabela 3.	Posição dos ácidos graxos obtidos pela análise de distribuição regioespecífica do óleo de palma natural e interesterificado.....	33
Tabela 4.	Resumo dos resultados obtidos em diferentes protocolos experimentais...	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade, um problema mundial de saúde

A obesidade é caracterizada como uma doença crônica não transmissível em que o acúmulo de gordura corporal excessivo é evidenciado pelo índice de massa corporal (IMC) maior ou igual a 30,0 kg/m². O aumento do ganho de peso está associado ao desenvolvimento e progressão de doenças associadas como, por exemplo: doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensão arterial sistêmica (HAS), doenças neurodegenerativas, alguns tipos de cânceres, entre outras (WHO, 2020; Koopman et al., 2009).

De acordo com dados epidemiológicos recentes, no mundo, o número de casos de obesidade triplicou nos últimos 40 anos (WHO, 2020). No Brasil, a realidade se equipara ao restante do mundo. De acordo com dados levantados pela Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), em dez anos, a população adulta obesa aumentou de 15,0 % para 21,5% (Brasil, 2010, 2020). Este quadro é preocupante, uma vez que a obesidade é uma doença complexa e multifatorial que abarca uma gama de contribuintes importantes, como variáveis genéticas e ambientais (Hruby e Hu, 2015).

Entre as variáveis ambientais, o padrão alimentar tem sido implicado como um dos fatores de risco com maior impacto epidemiológico.

1.2 O impacto metabólico do padrão alimentar atual

O padrão alimentar ocidental atual, consiste majoritariamente na substituição de alimentos *in natura*, minimamente processados e refeições caseiras por alimentos ultraprocessados, que são pobres nutricionalmente. Além de serem ricos em sal, açúcares e aditivos, apresentam em sua composição um alto teor de gorduras saturadas e modificadas, como a gordura *trans* (Monteiro et al., 2018).

Estudos pré e clínicos já mostraram que o consumo de dietas ricas em gordura pode facilmente induzir a obesidade. Em humanos, a ingestão de ácidos graxos saturados favorece o ganho de peso em maior magnitude quando comparado a ingestão de ácidos graxos insaturados (Piers et al., 2003; Kien et al., 2005). Em roedores, a exposição crônica a gordura predominantemente saturada foi suficiente para aumentar o peso e o nível de adiposidade dos animais, além de promover resistência aos hormônios leptina e insulina (Woods et al., 2003) e mesmo em períodos agudos, foi capaz de ativar a inflamação hipotalâmica (Thaler et al., 2012).

No que diz respeito aos ácidos graxos *trans*, estudos epidemiológicos robustos associaram o seu consumo ao maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e mortalidade associada (Wang et al., 2016; de Souza et al., 2015; Jiao et al., 2019).

Portanto, a qualidade da gordura dietética exerce um papel importante na composição corporal e nos parâmetros metabólicos (Hu; Van Dam; Liu, 2001; Bray et al., 2002). Dessa forma, cada vez mais estudos têm sido conduzidos para investigar o efeito metabólico desses óleos e gorduras largamente disponíveis nos alimentos processados e ultraprocessados.

1.3 Óleos e gorduras - caracterização e efeitos metabólicos

Os óleos e gorduras, de maneira geral, podem ser classificados de acordo com o grau de saturação de suas cadeias de carbono (Ander et al., 2003). Os ácidos graxos que possuem apenas ligações simples em sua cadeia são classificados como saturados (Santos et al., 2013). Estes são encontrados principalmente em alimentos de origem animal, como a banha e a manteiga e na composição de alguns óleos vegetais, como na gordura de palma e de coco (Grundy, 2002). O alto consumo deste tipo de ácido graxo está relacionado com o aumento de doenças cardiovasculares, assim como alteração do perfil lipídico sanguíneo, com elevação de LDL e do peso corporal (Mensink et al., 2016).

Os ácidos graxos insaturados que possuem uma dupla ligação são denominados monoinsaturados e aqueles com mais de uma dupla ligação em sua cadeia de carbonos são classificados como poliinsaturados. Os ácidos graxos também podem ser classificados de acordo com o tipo de insaturação, podendo ser *cis* ou *trans*. As ligações do tipo *cis* são aquelas que proporcionam à molécula uma “dobra”, enquanto as ligações do tipo *trans* apresentam uma cadeia carbônica linear (Marchand, 2010).

1.3.1 Ácidos graxos *trans*

Os ácidos graxos *trans* podem ser produzidos tanto endogenamente quanto induzido por um processo químico. O primeiro consiste na síntese natural de ácidos graxos *trans* pelas bactérias presentes no estômago de ruminantes (Wanders; Zock; Brouwer, 2017; Mendis; Cruz-Hernandez; Ratnayake, 2008). O segundo é resultado da hidrogenação parcial de óleos vegetais, como o ácido elaídico (C18:1, *trans*-9), pela indústria de alimentos, visando aumentar a vida útil de seus produtos (Wanders; Zock; Brouwer, 2017).

Estudos apresentam forte correlação com o consumo de gorduras *trans* e o aumento no risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes, processos inflamatórios e ganho de peso (Mozaffarian; Aro; Willett, 2009; Iqbal, 2014). Já está bem descrito na

literatura que o consumo de gordura *trans* é prejudicial para o organismo sustentando as recomendações de redução e do banimento progressivo do uso de ácidos graxos *trans* pela indústria alimentícia impostas por órgãos governamentais (WHO, 2018; Brasil, 2019). A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 332/2019, estabeleceu que, no Brasil, até janeiro de 2023, as gorduras *trans* fossem banidas da formulação de produtos.

Dessa forma, para substituir o processo de hidrogenação parcial de óleos vegetais, a interesterificação química tem sido utilizada para a obtenção de gorduras funcionais, sem geração de isômeros *trans*, de baixo custo e ao mesmo tempo com elevada aplicabilidade, como as gorduras interesterificadas, por exemplo (Brasil, 2019; Santos et al., 2013).

1.3.2 Gordura interesterificada

Aproximadamente 95% da gordura dietética é composta por triacilgliceróis (TAG), em que uma molécula de glicerol apresenta em sua estrutura três ácidos esterificados, numerados por uma nomenclatura estereoespecífica (sn). Os ácidos graxos localizados na parte exterior da estrutura do TAG são denominados por sn -1 e sn -3, enquanto o ácido graxo localizado no centro é sn-2 (Mills; Hall; Berry, 2017).

A interesterificação é um processo em que se utilizam métodos químicos ou enzimáticos, cujo resultado é o rearranjo dos ácidos graxos da molécula de glicerol, sem alterar o grau de saturação dos mesmos (Santos et al., 2013). O rearranjo destes ácidos graxos na molécula de TAG pode ser direcionado de forma aleatória (para posições não específicas) ou direta (para posições específicas) (**Figura 1**). A variação na troca das posições desses ácidos graxos é utilizada pela indústria de alimentos para gerar gorduras com propriedades específicas, de acordo com a formulação do produto.

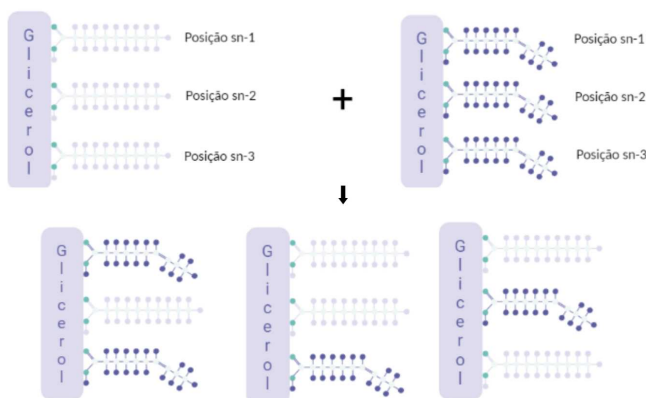


Figura 1. Interesterificação. Representação do processo de interesterificação através da mistura de dois triacilgliceróis de composição distintas. Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Figura produzida no biorender.com.

Pouco se sabe sobre os efeitos da gordura interesterificada no organismo, tendo em vista que os estudos populacionais ou até mesmo em modelos experimentais sobre o tema ainda são escassos. A saber, Reena e colaboradores (2011) demonstraram que o emprego da gordura interesterificada ao uso de outros óleos foi capaz de promover uma redução de LDL, colesterol e triglicerídeos em roedores. Em contrapartida, outros estudos realizados em modelos experimentais sugeriram efeitos nocivos à homeostase metabólica.

O uso da gordura modificada pareceu comprometer a composição de ácidos graxos do hipocampo (Magri et al., 2015), aumentar a deposição de tecido em proles de mães alimentadas com a gordura (D'ávila et al., 2017), promover ganho de peso e a expressão de citocinas pró-inflamatórias no tecido hepático de camundongos (Miyamoto et al., 2018).

Menta e cols (2022) também mostraram que o consumo da gordura interesterificada é capaz de desencadear eventos inflamatórios e prejudicar a barreira intestinal em camundongos. Além disso, quando consumida por oito semanas numa dieta normolipídica, a gordura interesterificada parece interferir na sinalização da insulina em tecidos periféricos e promover resistência à insulina. (dos Santos et al., 2024).

1.4 Homeostasia energética e sensibilidade hipotalâmica à insulina e leptina

O hipotálamo é o órgão responsável pelo controle energético. Localizado próximo ao terceiro ventrículo e concomitante à eminência média (EM), é composto por cinco principais núcleos: núcleo arqueado (ARC), núcleo paraventricular (PVN), núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH), núcleo hipotalâmico dorsomedial (DMH) e área hipotalâmica lateral (LHA), além de corpos neuronais responsivos também à circulação hormonal periférica (Williams et al., 2001).

A EM possui capilares fenestrados que permitem o transporte de hormônios e nutrientes provenientes da circulação periférica através da barreira hematoencefálica (BHE), acessando assim o ARC, responsável pelo controle da ingestão alimentar e da homeostase energética. No ARC estão presentes duas subpopulações neuronais que exercem atividades antagonistas, sendo uma responsável por expressar neurotransmissores orexígenos como AgRP/NPY enquanto a outra expressa neurotransmissores anorexígenos, como α -MSH, clivado a partir de POMC, e CART (Timper e Brüning, 2017; Velloso, 2006) (**Figura 2**).

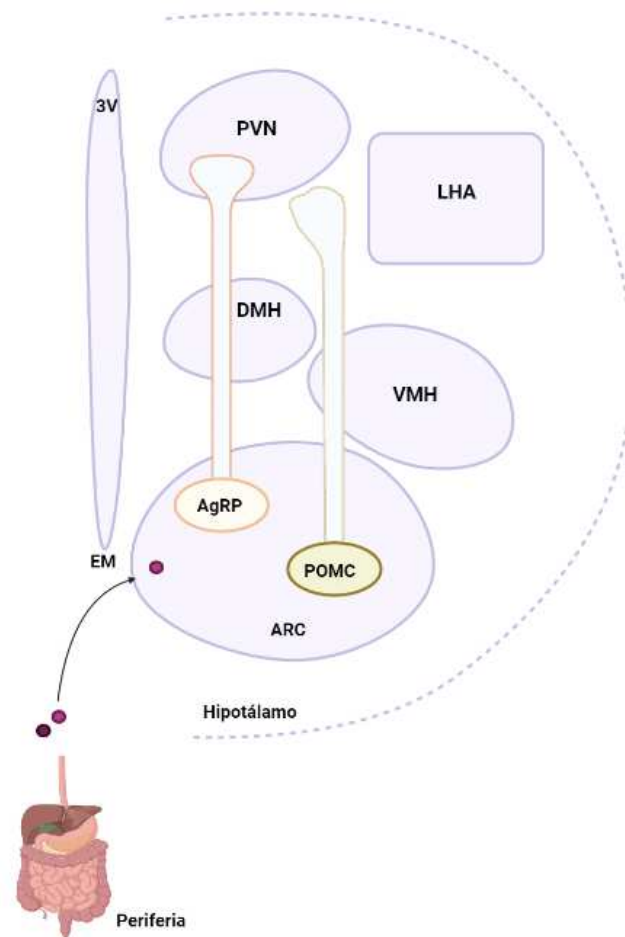


Figura 2. Hipotálamo e a organização das estruturas nucleares hipotalâmicas envolvidas na homeostase energética. Localizado próximo ao terceiro ventrículo (3V) e à eminência média (EM), o hipotálamo apresenta distintos núcleos responsáveis pelo controle do balanço energético: núcleo paraventricular (PVN), núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH), núcleo hipotalâmico dorsomedial (DMH), área hipotalâmica lateral (LHA) e núcleo arqueado (ARC). O ARC possui duas populações neuronais: neurônios AgRP/NPY de atividade orexígena e os neurônios POMC/CART, que possuem efeitos anorexígenos. O hipotálamo recebe sinais provenientes de órgãos periféricos através da EM, e acessam o ARC, responsável pelo controle da ingestão alimentar e da homeostase energética. Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Adaptada de: Timper; Brüning, 2017. Figura produzida no biorender.com.

Os neurônios produtores de AgRP/NPY são ativados no jejum. O AgRP atua como um agonista inverso de α -MSH, inativando sua ação anorexígena e o NPY reduz o gasto energético e estimula a ingestão alimentar. Neurônios AgRP/NPY são capazes de inibir a atividade de neurônios POMC por meio da liberação de NPY assim como do ácido γ -aminobutírico (GABA).

No estado alimentado, os neurônios produtores de POMC são ativados. O POMC é então clivado por peptidases, liberando em seus terminais axônios α -MSH, que ativa os receptores melanocortina 3 e 4 (MCR3 e MCR4) em neurônios de segunda ordem e no PVN. Essa ação promove a inibição da ingestão alimentar e aumento do gasto energético (Timper e

Brüning, 2017; Waterson e Horvath, 2015). Ambas populações neuronais AgRP/NPY e POMC são responsivas a hormônios metabólicos periféricos, como insulina e leptina.

1.4.1 Insulina

A insulina é um hormônio polipeptídico secretado pelas células β -pancreáticas essencial para o metabolismo glicídico, proteico e lipídico. A ação da insulina em tecidos periféricos envolve o controle da síntese de glicogênio, proteínas, ácidos graxos por meio da inibição da produção hepática de glicose, proteólise e lipólise, respectivamente (Tokarz; Macdonald; Klip, 2018). No sistema nervoso central (SNC), a insulina participa do funcionamento neurossináptico, captação de catecolaminas, modulação da plasticidade sináptica e regulação da captação de glicose pelas células da glia, que dão aporte nutricional e apoio físico aos neurônios (Scherer; Sakamoto; Buettner, 2021).

Além disso, a insulina participa de diversas vias de sinalização, como a via da PI3K-Akt destacada abaixo.

A secreção de insulina pelo pâncreas acontece, principalmente, em resposta à oscilação de glicose na corrente sanguínea. A insulina circulante acessa o SNC mediante um transporte saturável na barreira hematoencefálica (BHE). Uma vez na região central, ela se liga na subunidade α no seu receptor transmembrana (IR) e inicia a cascata de sinalização intracelular, levando a auto fosforilação da subunidade β em resíduos de tirosina. Isso permite a fosforilação dos substratos do receptor de insulina (IRS 1/2) por meio da atividade quinase de IR. Em seguida, a PI3 kinase (PI3K) é ativada ao ligar-se aos substratos IRS 1/2. Uma vez ativada, na porção intracelular da membrana plasmática, a PI3K converte o lipídio de membrana fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). PIP3 se liga a Akt que é fosforilada e ativada pela proteína PDK1 (Könner; Klöckener; Brüning, 2009; Scherer; Sakamoto; Buettner, 2021; Saltiel e Kahn, 2001).

Na cascata de sinalização de insulina no SNC, a Akt regula o fator de transcrição FOXO1, que transcreve genes relacionados ao crescimento e a sobrevivência neuronal e de células gliais, induzindo, por exemplo, a captação de glicose nos astrócitos. Em contrapartida, FOXO1 quando fosforilado, migra do núcleo para o citoplasma resultando na inibição da transcrição de genes. E, além disso, como *feedback* negativo desta mesma via, temos, entre outros, a proteína-tirosina fosfatase 1B (PTP1B) e supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS3), que desfosforilam e inativam o receptor de insulina (Scherer; Sakamoto; Buettner, 2021).

No sistema nervoso central, a sinalização da insulina é importante para a manutenção da glicose, fundamental para as funções fisiológicas e homeostase energética (ONO, 2019). No entanto, na disrupção metabólica, como é o caso da obesidade e também, mediante o excesso de nutrientes, como o alto consumo de gorduras, a regulação central da insulina é afetada, inviabilizando vias de sinalização importantes como a PI3K-Akt, por exemplo (Chen; Balland; Cowley, 2017).

A resistência à insulina provocada por ácidos graxos *trans* e gordura interesterificada parece contribuir de forma significativa para a progressão da prevalência da obesidade. Estudos mostram que o consumo de gorduras *trans* promove ganho de peso, aumento na expressão de citocinas inflamatórias como *Il6*, *Tnfa* e contribui para a redução da sensibilidade à insulina (Prentice, 2001). Por sua vez, um trabalho realizado com humanos demonstrou que o consumo de dietas ricas em gordura interesterificada por quatro semanas, foi capaz de alterar o perfil de ácidos graxos plasmáticos dos participantes, além de contribuir para distúrbios na sinalização insulinêmica e aumento nos níveis de glicose plasmática (Sundram; Karupaiah; Hayes, 2007).

1.4.2 Leptina

A leptina é um hormônio peptídico produzido principalmente pelas células do tecido adiposo branco, conhecidas como adipócitos e a sua produção e circulação são proporcionais à expansão deste tecido. Frente a alterações no status energético metabólico, a leptina atua sobre a ingestão alimentar e o gasto energético, majoritariamente no hipotálamo, região responsável pela homeostase energética. Assim como a insulina, a leptina circulante também acessa o SNC mediante um transporte saturável pela BHE e a cascata de sinalização intracelular é ativada a partir da sua ligação à isoforma longa do seu receptor transmembrana (ObRb). Essa ação promove a sua dimerização e formação do complexo com a proteína janus kinase 2 (JAK2), que fosforila a si mesma e aos seus três principais resíduos de ligação, Tyr985, Tyr1077 e Tyr1138. A fosforilação de JAK2 em tirosina no resíduo Tyr1138 recruta a proteína citoplasmática STAT3, amplamente expressa no SNC. Ligada ao receptor ObRb, a STAT3 é fosforilada e ativada. Em seguida, se dimeriza e migra para o núcleo, onde se liga ao DNA promovendo a transcrição de genes como *Pomc* envolvido na ingestão alimentar e no gasto energético. Além disso, a ativação de STAT3 induz a expressão de SOCS3 e PTP1B, que ao sair do núcleo, atua como um regulador negativo da via (**Figura 3**) (Park e Ahima, 2014; Kwon; Kim; Kim, 2015; Könner e Bruning, 2012).

No sistema nervoso central, em condições metabólicas basais, a leptina exerce atividade anorexígena, ativando neurônios POMC e inibindo neurônios AgRP, regulando assim o balanço energético. No entanto, na obesidade, esse controle é perdido, uma vez que o consumo de dietas hiperlipídicas é capaz de induzir a resistência à leptina devido a prejuízos na ativação de neurônios responsivos ao hormônio e ativação de vias inflamatórias (Git e Adan, 2015; Pérez-Pérez, A. et al., 2020).

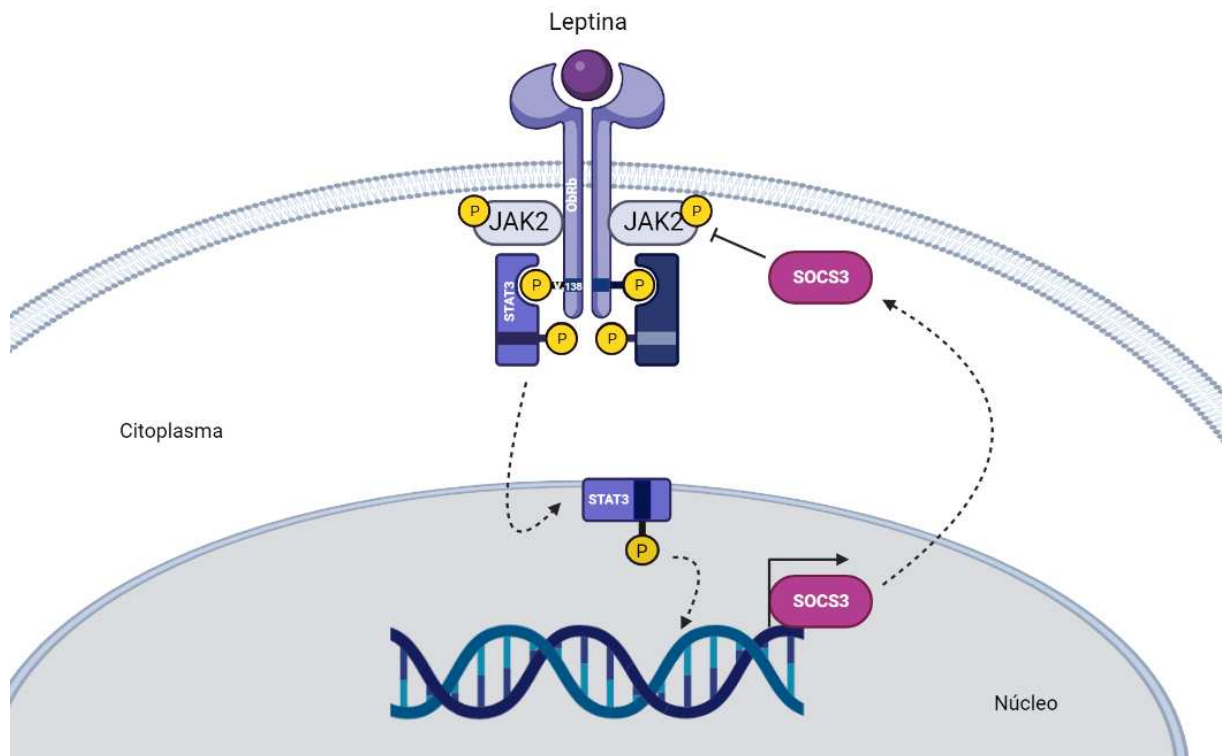


Figura 3. Via de sinalização da leptina. A leptina se liga ao receptor transmembrana (ObRb), ativa a proteína JAK2 e promove a sua autofosforilação e do receptor Tyr1138. A STAT3 é recrutada e fosforilada, migrando para o núcleo, onde induz a expressão de genes relacionados com a homeostase energética e da SOCS3, que inativa a via. Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Adaptado de: Könnner e Bruning, 2012. Figura produzida no biorender.com.

Os hormônios leptina e insulina, além dos hormônios produzidos no trato gastrointestinal e os nutrientes, são os sinalizadores periféricos que controlam a atividade neuronal fisiológica central (Sande-lee e Velloso, 2012). Porém, em decorrência da alta ingestão de ácidos graxos saturados e também de gorduras modificadas, a ação/função destes sinalizadores apresenta importantes alterações, prejudicando o controle hipotalâmico da homeostasia energética (Pimentel et al., 2012; Albuquerque et al., 2006; Sande-lee e Velloso, 2012; Bispo et al., 2014).

1.5 Justificativa

O uso da gordura interesterificada como substituto da gordura *trans* pela indústria de alimentos vem sendo acelerado nos últimos anos tendo em vista mudanças em legislações e necessidade de manutenção das características físico-químicas que garantem maior estabilidade e dos efeitos sensoriais dos produtos que contribuem para o aumento no consumo desse tipo de lipídio pela população em geral.

Estudos recentes têm mostrado efeitos metabólicos adversos em resposta à ingestão de gorduras interesterificadas. Em 2018, nosso grupo de pesquisa publicou dados referentes aos efeitos da gordura interesterificada no metabolismo de ratos *Wistar*. Miyamoto e colaboradores (2018) encontraram que a dieta contendo óleo de soja interesterificado, quando ofertada por um período crônico, é capaz de aumentar a massa corporal e de tecido adiposo branco retroperitoneal, a glicose em jejum, além de aumentar a expressão de genes inflamatórios como *Atf3* e *Tnf* no tecido hepático.

Em outro trabalho foram analisados os efeitos da dieta enriquecida com gordura interesterificada nos parâmetros metabólicos e glicêmicos de camundongos. Após oito semanas os animais que receberam dieta normocalórica contendo gordura de palma interesterificada apresentaram intolerância à glicose e maior área sob a curva de glicose durante o ipITT, assim como maior ganho de massa corporal e glicemia de jejum elevada. No tecido hepático, o conteúdo proteico de PEPCCK e a expressão de *I11β* e *I16* também estavam aumentadas (Miyamoto et al., 2020), semelhante ao trabalho citado anteriormente (Miyamoto et al., 2018). Além disso, Menta e colaboradores (2022) mostraram que o consumo da gordura interesterificada aumenta o estresse oxidativo e a expressão de citocinas pró inflamatórias, além de induzir alterações celulares na parede intestinal de camundongos.

Destacamos que os diferentes tipos de ácidos graxos, seu grau de processamento e saturação impactam em parâmetros metabólicos, como ganho de peso e alteração da homeostase glicêmica e na resposta inflamatória em tecidos periféricos. No entanto, apesar dos recentes avanços na compreensão do papel de lipídeos na ativação hipotalâmica de resposta inflamatória crônica, ainda não se sabe o impacto que gorduras interesterificadas, recentemente presentes nos produtos alimentícios industrializados, podem desencadear em processos celulares que controlam a homeostasia energética em camundongos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

- Avaliar o balanço energético em resposta ao consumo de dieta com gordura interesterificada em camundongos.

2.2 Específicos:

Em animais alimentados com dieta rica em gordura interesterificada e/ou tratados com os seus metabólitos via intracerebroventricular ou suplementados com óleo interesterificado em diferentes tempos de exposição e/ou tratamento, foram avaliados:

- Ganho de massa corporal, gasto energético e ingestão de dieta;
- Sensibilidade hipotalâmica aos hormônios leptina e insulina e marcadores das vias de sinalização;
- Marcadores das vias de sinalização de leptina e insulina no hipotálamo;
- Marcadores de vias inflamatórias, de estresse de retículo endoplasmático e de autofagia no hipotálamo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Questões éticas

Os protocolos experimentais realizados com animais *Swiss* foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNICAMP, registrados sob o número 5763-1/2021 (**Anexo I**). Os demais, realizados com camundongos C57BL/6 foram aprovados pelo *AECOM Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC), New York, United State* registrados sob o número #00001051 (**Anexo II**).

3.2 Animais e condições experimentais

Foram utilizados camundongos de duas linhagens diferentes. Camundongos machos da linhagem *Swiss* provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP) foram obtidos com três semanas de vida. Os camundongos machos da linhagem C57BL/6 provenientes do *Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)* foram obtidos com dois meses de vida.

Os animais foram alocados individualmente em gaiolas, mantidos no biotério em condições controladas de temperatura ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$), ciclo de luminosidade (12h claro e 12h escuro) e separados aleatoriamente nos diferentes grupos experimentais. Os delineamentos dos protocolos experimentais e as linhagens utilizadas estão descritos nas legendas das respectivas figuras.

As dietas foram preparadas de acordo com o *American Institute of Nutrition* (Reeves; Nielsen; Fahey, 1993), recomendada para roedores, e mantidas congeladas a -20°C até o momento do oferecimento. Os óleos de palma natural e interesterificado foram fornecidos pela Empresa Agropalma - SA. A composição das dietas oferecidas está listada na **Tabela 1**.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais

	NORMOCALÓRICA NORMOLIPÍDICA	NORMOCALÓRICA NORMOLIPÍDICA INTERESTERIFICADA	HIPERCALÓRICA HIPERLIPÍDICA	HIPERCALÓRICA HIPERLIPÍDICA INTERESTERIFICADA
Ingredientes (g)	10% de óleo de palma natural	10% de óleo de palma interesterificado	45% de óleo de palma natural	45% de óleo de palma interesterificado
	PO	IPO	POHF	IPOHF
Amido	515,7	515,7	167,1	167,1
Caseína	140	140	167	167
Maltodextrose	155	155	125	125
Sacarose	50	50	201	201
Óleo de palma natural	40	---	240	---
Óleo de palma interesterificado	---	40	---	240
Fibras (celulose)	50	50	50	50
Mix minerais	35	35	35	35
Mix vitaminas	10	10	10	10
L-cistina	1,8	1,8	2,4	2,4
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Valor energético (kcal/kg)	3800	3800	4800	4800

3.3 Caracterização química das fontes lipídicas das dietas

A análise da composição em ácidos graxos foi realizada utilizando cromatógrafo em fase gasosa com coluna capilar – CGC Agilent 6850 Series GC System, após esterificação. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados de acordo com o método AOCS Ce 2-66 (AOCS, 2009) em coluna capilar DB – 23 Agilent (50% cyanopropyl-methylpolysiloxano), com as seguintes dimensões: 60m, diâmetro interno: 0,25 mm e 0,25 µm de espessura filme. Condições de análise: temperatura do forno: 110°C por 5min, 110°C-215°C (5°C/min), 215°C por 24 min; temperatura do detector: 280°C; temperatura do injetor 250°C; gás de arraste: hélio; razão split 1:50; volume injetado: 1,0µL. A composição qualitativa foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos com os dos respectivos padrões de ácidos graxos. A composição quantitativa foi realizada por normalização de área, sendo expressa

como porcentagem em massa. O perfil de ácidos graxos encontrado no óleo de palma natural e interesterificado se encontra na **Tabela 2**.

Tabela 2. Composição de ácidos graxos do óleo de palma natural e interesterificado

Ácido graxo	Óleo de palma natural (%)	Óleo de palma interesterificado (%)
C 10:0 (Cáprico)	0,046	0,033
C 12:0 (Láurico)	0,549	0,404
C 14:0 (Mirístico)	1,316	0,922
C 15:0 (Pentadecanóico)	0,057	0,053
C 16:0 (Palmitico)	41,935	41,436
C 16:1 (Palmitoléico)	0,173	0,160
C 17:0 (Heptadecanóico)	0,109	0,109
C 17:1 (cis-9-heptadecenóico)	0,033	0,026
C 18:0 (Esteárico)	5,181	4,956
C 18:1 <i>trans</i> (Elaidico)	0,000	0,000
C 18:1 (Oleico)	40,732	41,739
C 18:2 <i>trans</i> (Linoelaídico)	0,100	0,150
C 18:2 (Linoleico)	8,770	9,065
C 18:3 (Linolênico)	0,251	0,227
C 20:0 (Araquídico)	0,428	0,412
C 20:1 (Gadoleico)	0,153	0,150
C 22:0 (Behênico)	0,074	0,077
C 24:0 (Lignocérico)	0,093	0,080
Total (%)	100	100
AG SATURADO	49,787	48,483
AG INSATURADO	50,213	51,517
AG MONO	41,092	42,075
AG POLI	9,121	9,442
TOTAL	100	100

O valor obtido representa a média de duas análises.

Para análise da distribuição regioespecífica dos óleos de palma natural e interesterificado, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de alta resolução de carbono-13 (^{13}C RMN) das cadeias acila dos triacilgliceróis foi utilizada como método quantitativo para análise regioespecífica. A análise foi realizada no Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) Bruker Advance DPX 300 (Silberstreifen, Rheinstetten, Germany). A determinação do ^{13}C foi realizada na frequência de 75.8 MHz, com probe multinuclear de 5 mm e operação a 30°C, segundo a metodologia de Vlahov (1998). O resultado da distribuição regioespecífica é apresentado na **Tabela 3**.

Tabela 3. Posição dos ácidos graxos obtidos pela análise de distribuição regioespecífica do óleo de palma natural e interesterificado

Posição do ácido graxo	Óleo de palma natural (%)	Óleo de palma interesterificado (%)
Saturados sn-1,3	77,6	24,2
Insaturados sn-1,3	22,4	75,8
Total (%)	100,0	100,0
Saturados sn-2	18,1	65,9
Insaturados sn-2	81,9	34,1
Total (%)	100,0	100,0

3.4 Parâmetros metabólicos

3.4.1 Avaliação do consumo alimentar e da massa corporal dos animais

Foram aferidos massa corporal e consumo alimentar dos animais ao longo de todo o período experimental, diariamente e/ou semanalmente, em balança analítica. Para o cálculo da quantidade de ingerida ingerida, foi calculada a diferença entre a quantidade total de ração colocada e o peso da ração que restou na gaiola.

3.4.2 Análise da composição corporal por Ressonância Magnética (MRI)

A composição corporal dos grupos experimentais realizados com camundongos da linhagem C57BL/6 foi analisada por MRI nos tempos 0 e 7 dias de dieta. O tempo “0” representa o antes da separação dos grupos e início dos protocolos experimentais experimentais.

3.4.3 Teste de tolerância oral à glicose

Os animais ficaram em jejum durante 4 horas antes do teste com glicose. Por meio de corte na extremidade da cauda do animal, foi efetuada uma primeira coleta de sangue para a dosagem de glicemia, equivalente ao tempo zero (t0) do teste. Em seguida, realizamos a injeção de uma solução glicosada a 50% (2,5 g/Kg de peso corporal), que foi administrada via oral com o auxílio da agulha de gavagem e, posteriormente, coletamos amostras sanguíneas nos tempos 15, 30, 60, 120 minutos, para as dosagens de glicose. Os valores de glicemia foram mensurados usando monitor de glicose (*Accu-Check Performa, Roche*).

3.4.4 Administração dos tratamentos

3.4.4.1 Tratamento intraperitoneal (ip) de leptina e intracerebroventricular (icv) com leptina

Os camundongos foram mantidos em jejum por 12 horas, com acesso *ad libitum* à água durante o período. No período subsequente, os animais receberam uma dose intraperitoneal (ip) (5µg/g) (Garcia-Galiano et al., 2017) ou intracerebroventricular (icv) (0,5µg/uL) (El-Haschimi et al., 2000) de leptina ou veículo PBS no início do ciclo escuro e foram alocados nas gaiolas com acesso livre às respectivas dietas. Após 1h, 3h e 12h, foram aferidos massa corporal e ingestão alimentar. Para análise de proteínas específicas da cascata de sinalização da leptina, após 12 horas de jejum, os animais receberam o estímulo icv (0,5µg/uL) com leptina e foram aguardados 15 minutos. Em seguida, os animais foram eutanasiados e o tecido hipotalâmico foi coletado.

3.4.4.2 Tratamento icv com 2-palmitoilglicerol

Os camundongos foram mantidos com acesso *ad libitum* à água e ração comercial no período anterior ao procedimento cirúrgico. Os animais foram submetidos à cirurgia de estereotaxia e microagulhamento da região hipotalâmica e receberam injeção icv de 2µL (180 uM) de 2-palmitoilglicerol (PG), palmitato (PA) ou BSA (CT). Posteriormente à cirurgia, receberam analgésico e foram novamente alocados nas gaiolas com acesso livre à ração comercial e água. No final do dia, foram deixados em jejum por 16 horas. Após este período, os animais foram eutanasiados e o tecido hipotalâmico foi coletado.

3.5 Cirurgia de estereotaxia

3.5.1 Microagulhamento no hipotálamo e/ou implante de cânulas

Os animais foram anestesiados via inalação com isofluorano (3 - 5%) e alocados no aparelho estereotático. Usando o bregma como ponto de referência, o crânio foi então perfurado de acordo com as coordenadas estereotáticas (AP: -0,34; L: -1,00; DV: -2,2) (Paxinos e Watson, 2007) e a agulha foi inserida cuidadosamente no ventrículo lateral hipotalâmico.

Microagulhamento no hipotálamo: Os animais receberam injeção icv imediata de leptina, massa corporal e ingestão foram avaliados nos tempos citados anteriormente ou 15 minutos após estímulo, os animais foram eutanasiados e o tecido hipotalâmico foi coletado para análise de proteínas por *Western Blot*.

Implantação de cânulas: A cânula foi implantada e fixada ao crânio do animal com cimento acrílico polimerizante. Após a cirurgia, os animais receberam uma dose ip do anti-inflamatório carprofeno (10µl/5g do animal) e foram mantidos em descanso pós cirúrgico por cinco dias. Após este período, o correto posicionamento da cânula foi testado com injeção icv de angiotensina II. Os animais que responderam ao teste (aumento da polidipsia) foram incluídos no experimento. No dia posterior ao teste, os animais foram estimulados icv com leptina e a massa corporal e a ingestão alimentar foram avaliados.

3.6 Coleta de tecidos

Para a coleta de tecidos, foi realizada a administração intraperitoneal de anestésicos nas seguintes proporções: Ketamina (100 mg/kg), Xilazina (10 mg/kg) e Diazepam (5 mg/kg). Como controle da anestesia, a perda do reflexo pedal foi utilizada. Os tecidos foram extraídos e em seguida congelados a -80°C para posterior análise. O sangue foi coletado por decapitação e os tubos com as amostras foram instantaneamente colocados em gelo e, posteriormente, centrifugados a 4°C, 1000 RPM, por 30 minutos. O soro foi coletado e congelado a -80° C para análise posterior.

3.7 Preparo dos tratamentos

A solução de estoque de palmitato (PA) (Sigma-Aldrich-P0500) e 2-palmitoilglicerol (PG) (sc-203465) foram preparadas a partir da dissolução dos reagentes em DMSO e conjugados com BSA. Para melhor solubilização, as misturas foram aquecidas brevemente no banho seco a 65°C e homogeneizadas em agitação.

A solução de estoque de leptina foi diluída em PBS 1x estéril. A solução de estoque de insulina foi preparada a partir da diluição em *CO2 Independent Medium* (ThermoFisher Scientific 18045088). Todas as soluções de estoque foram armazenadas em -80°C.

3.8 Protocolo *Ex vivo*

Os animais foram eutanasiados e submetidos à extração e isolamento do hipotálamo conforme descrito anteriormente. Em seguida, os tecidos extraídos foram lavados com solução de PBS (Phosphate-buffered saline) 1x. Posteriormente, foram colocados em placas 6-well contendo meio *CO2 independent medium* adicionado do tratamento com insulina Humulin® (10 nM). Por fim, as amostras foram lavadas com o tampão PBS 1x e, em seguida, congeladas no nitrogênio em uma temperatura de aproximadamente -80°C. Os marcadores da cascata de sinalização da insulina foram avaliados por *Western Blot*.

3.9 Bioenergética celular (*Seahorse*)

A bioenergética tecidual foi determinada usando um respirômetro Seahorse. Resumidamente, o tecido adiposo inguinal, fígado e tecido adiposo marrom foram coletados rapidamente após o sacrifício e enxaguados com tampão Krebs-Henseleit (KHB) (NaCl 111 mM, KCl 4, 7 mM, MgSO₄ 2 mM, Na₂HPO₄ 1, 2 mM, carnitina 0, 5 mM, glicose 2, 5 mM e piruvato de sódio 10 mM). Os tecidos foram cortados em pequenos pedaços (6-10 mg) e rapidamente transferidos para poços individuais de uma placa XF24. Peças individuais foram estabilizadas contra movimento excessivo por telas de captura de ilhotas (Seahorse Bioscience) e 450 µL de KHB foram adicionados a cada poço. Digitonina foi adicionada para aumentar a permeabilidade da membrana plasmática. As taxas de consumo basal de oxigênio (OCR) foram determinadas de acordo com o seguinte plano: leituras basais registradas a cada 2 minutos durante 10 leituras, seguidas de exposição à digitonina. As leituras subsequentes foram registradas após 2 minutos de mistura e 2 minutos de descanso. Os valores basais de OCR foram normalizados para pesos individuais de cada tecido.

3.10 Isolamento da fração vascular estromal (FVS)

O tecido adiposo inguinal foi coletado e os linfonodos foram isolados. A gordura foi suavemente picada em pedaços finos usando duas lâminas e colocada em tubos de 50 mL contendo HBSS 1X (sem Mg²⁺ ou Ca²⁺) suplementado com 0,5% de BSA. Após a eutanásia, uma solução de colagenase tipo II foi adicionada aos tubos e incubada em agitador rotativo (200 rpm) a 37 °C por 30/40 minutos. A lise de glóbulos vermelhos foi realizada com 1x tampão de lise de glóbulos vermelhos diluído em água deionizada. As células em

suspensão de células foram filtradas através de um filtro de células de 100 µm e depois de 50 µm. O sedimento celular foi coletado como fração vascular estromal (FVS) por centrifugação e ressuspensionado para análise por citometria de fluxo.

3.11 Citometria de fluxo

A fração vascular estromal (FVS) foi ressuspensionada em PBS 1x contendo 5% de FBS e 2mM de EDTA e pipetado em uma placa de 96 poços para coloração. As células foram primeiro incubadas com corantes “*Live/Deads*”, depois, o bloqueio dos receptores Fc durante 15 min/4°C. Em segundo lugar, as amostras foram lavadas e incubadas com anticorpos extracelulares durante 30 min/4°C. Após esta etapa, as células foram novamente lavadas e ressuspensionadas em tampão intracelular/permeabilização (Invitrogen 512343 e 00522356) por mais 30 min/4°C, seguido pela coloração intracelular. Os pellets de células foram ressuspensionados e adquiridos usando Cytex Aurora Flow Cytometer e analisados pelo software BD FlowJo v10.8.

3.12 Estratégia de *gating*

As células Lin foram bloqueadas para avaliação de progenitores de adipócitos usando CD24, PDGFRα e PDGFRβ. As células endoteliais foram identificadas como CD31+. Para análise de linfócitos, primeiro excluimos marcadores de macrófagos (CD206-, CD11c-, CD11b-, F4/80-). Para macrófagos utilizamos populações duplamente positivas CD11B e F480. Macrófagos semelhantes a M1 expressam CD11C e macrófagos semelhantes a M2 expressam CD206. Para células B usamos B220. Para células NK usamos NK1.1 e CD3. De células não B usamos CD3, CD4, CD8 e Treg para células T.

3.13 Western Blot

Os extratos proteicos totais foram ressuspensos em tampão de Laemmli e aplicados em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). Em seguida, as proteínas foram separadas em SDS-PAGE e transferidas em sistema “molhado” para a membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD. A ligação do anticorpo a proteínas não-específicas foi minimizada pela pré-incubação da membrana de nitrocelulose com tampão de bloqueio (Albumina 5%) por 2 horas. Após esse processo, a membrana de nitrocelulose foi incubada *overnight* com anticorpos específicos para detecção das bandas das proteínas da via da leptina como STAT3 (Rhea Biotech IM-0447), p-STAT3 (Cell Signaling #91455), JAK2 (Bioss Bs-0908R) e proteínas da cascata de sinalização de insulina AKT (Cell Signaling #4691T), p-AKT (Cell Signaling #4060), PTP1B (Abcam

Ab52650). Tubulina (Sigma-Aldrich-T5268) e GAPDH (Santa Cruz sc25778), foram selecionados como controles endógenos. O sinal foi detectado por meio de quimioluminescência utilizando *kit Pierce ECL Western Blot Substrate* (ThermoFisher), identificadas na autoradiografia e quantificadas através de densitometria óptica, pelo *software* ImageJ (Rasband, 1997–2014).

3.14 Expressão gênica

As amostras foram descongeladas em gelo e o RNA total foi extraído com o reagente TRIzol (ThermoFisher Scientific) segundo o manual do fabricante. Os tecidos foram homogeneizados no *beadruptor* por 45 segundos. Em seguida, foi adicionado clorofórmio e o homogenato foi centrifugado 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubos novos. Assim, iniciou-se a etapa de solubilização do conteúdo através da adição de isopropanol e centrifugação a 4°C por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Para as etapas de lavagem, utilizou-se o etanol 75% e 100%, respectivamente. O material foi centrifugado pela última vez a 4°C por 5 minutos. O etanol foi descartado e o *pellet* das amostras hipotalâmicas foi ressuspendido em 10 µL de água ultrapura (Invitrogen). A leitura da concentração e pureza do RNA foi obtida por espectrofotometria (Nanodrop, Thermo Scientific). Para a transcrição reversa, o *kit High Capacity cDNA* para reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR, Invitrogen®, São Paulo, Brasil) foi utilizado para a síntese de 20µL de DNA complementar (cDNA). O conteúdo de mRNA dos genes avaliados foram analisados por RT-qPCR utilizando-se o sistema TaqMan (AppliedBiosystems) ou SYBR (Bio-Rad). A expressão alvo foi normalizada em relação à expressão de GAPDH e a consequente obtenção de *fold change* foi realizada pelo método $\Delta\Delta Ct$.

3.15 Análise estatística

Os dados obtidos foram testados para a distribuição normal (*Shapiro-Wilk*). Constatada a normalidade, as amostras foram submetidas à análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*) ou a análise de variância de duas vias (*Two-way ANOVA*). Quando constatada a presença de diferença estatística, foram realizados os testes *post-hoc* de *Tukey*. Para avaliação do efeito isolado da qualidade lipídica da dieta, foi aplicado o teste *t student* ou *U de Mann-Whitney* para comparação entre dois grupos (POxIPO ou POHFxIPOHF). Em todos os casos foi considerada uma significância de $p < 0,05$. Os resultados foram processados pelo programa *GraphPad Prism* versão 9.0 (*GraphPad Software*, La Jolla-Ca, USA) e expressos como média $\pm$ erro padrão.

4. RESULTADOS

Nós investigamos os efeitos da interesterificação sobre a homeostasia energética e sensibilidade hipotalâmica à insulina e leptina. Para isso, dividimos o estudo em duas etapas:

- **Etapa 1:** Avaliação de parâmetros metabólicos e resistência à leptina em animais alimentados com dieta rica em gordura interesterificada;
- **Etapa 2:** Avaliação de parâmetros metabólicos e resistência à insulina em animais alimentados com dieta rica em gordura interesterificada ou suplementados com óleo de palma interesterificado..

Etapa 1: Avaliação de parâmetros metabólicos e resistência à leptina em animais alimentados com dieta rica em gordura interesterificada.

4.1 Protocolo experimental 1 - Avaliação de parâmetros metabólicos e moleculares de animais alimentados com dieta hiperlipídica composta com gordura interesterificada

Investigamos os efeitos da ingestão da gordura interesterificada em parâmetros metabólicos e moleculares. Para isso, foram utilizados camundongos *Swiss*, provenientes do CEMIB/UNICAMP com três semanas de idade. Com seis semanas de idade, após período de aclimação, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais, submetidos às dietas hiperlipídicas compostas com óleo de palma natural (POHF) e óleo de palma interesterificado (IPOHF), contendo 45% de lipídios na composição. O delineamento do protocolo experimental está descrito na **figura 4**.

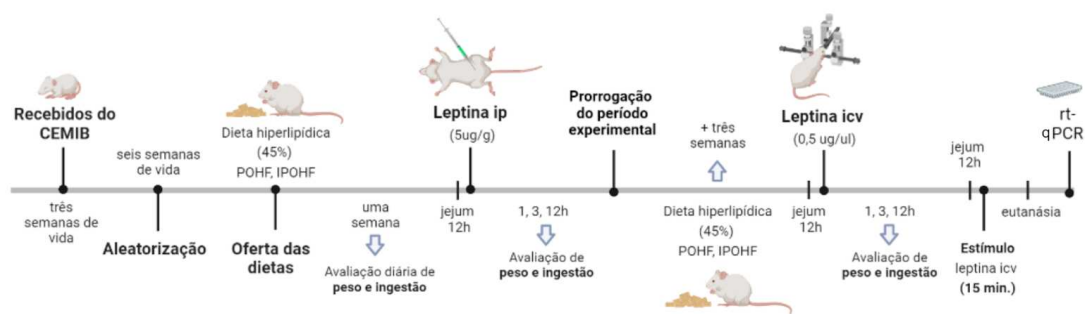


Figura 4. Delineamento referente ao protocolo experimental 1. Os animais foram separados, com três semanas de idade, em gaiolas individuais, passando a receber dieta controle comercial e água *ad libitum*, até que completassem seis semanas de vida. Ao atingir a idade, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: grupo alimentado com dieta hiperlipídica com óleo de palma natural (POHF) e grupo alimentado com dieta hiperlipídica com óleo de palma interesterificado (IPOHF). Os animais receberam as dietas por uma semana. Massa corporal e ingestão alimentar foram avaliados diariamente. No sétimo dia, os grupos foram deixados em jejum por 12 horas. Ao final do período, aplicou-se leptina intraperitoneal (ip) e ganho de massa corporal (g) e ingestão alimentar (g) foram avaliados nos seguintes tempos: 1, 3, 12 horas. Ao final da primeira semana de dieta, o período experimental foi prorrogado até a quarta semana. Ingestão alimentar e ganho de massa corporal foram avaliados semanalmente. Ao final da quarta semana, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de cânula no hipotálamo. Os mesmos ficaram cinco dias em recuperação pós cirurgia. Após o período, os grupos foram deixados em jejum por 12 horas para injeção de leptina via intracerebroventricular (icv) e avaliação da ingestão alimentar (g) e ganho de massa corporal (g) nos seguintes tempos: 1, 3, 12 horas. Posteriormente, os animais foram deixados novamente em jejum de 12 horas para o estímulo com leptina via icv.

Depois de 15 minutos, foi realizada a eutanásia para coleta do tecido hipotalâmico e posterior análise de expressão gênica. Figura produzida no biorender.com.

Em um primeiro momento, os grupos receberam a dieta por uma semana. Os mesmos foram alocados em gaiolas individuais ($n=9-10/\text{grupo}$) com dieta e água *ad libitum* no decorrer do tempo experimental. Massa corporal e ingestão alimentar foram mensurados diariamente (**Figura 5 e 6**). Não foram observadas diferenças estatísticas nos parâmetros analisados (**Fig. 5 A, B e 6 A, B**).

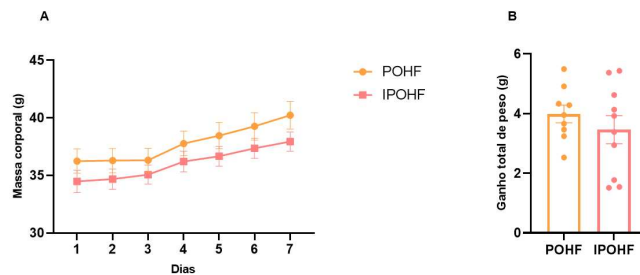


Figura 5. O efeito da dieta hiperlipídica rica em óleo de palma natural ou interesterificado no ganho de massa corporal de camundongos da linhagem *Swiss* após uma semana. **A)** Evolução da massa corporal (g) e **B)** Ganho total de peso (g) de camundongos *Swiss* alimentados com dieta hiperlipídica composta com óleo de palma natural (POHF) ou óleo de palma interesterificado (IPOHF) por uma semana. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão da média. $p \leq 0,05$. $n = 9-10$ animais/grupo. (A) *Two-Way* ANOVA, (B) Teste *t de Student*.

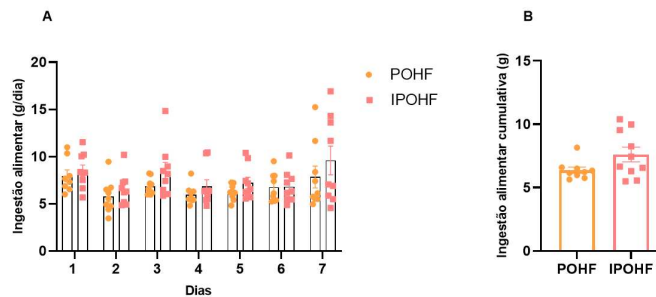


Figura 6. O efeito da dieta hiperlipídica rica em óleo de palma natural ou interesterificado na ingestão alimentar de camundongos da linhagem *Swiss* após uma semana. **A)** Ingestão alimentar (g/dia), **B)** Ingestão alimentar cumulativa (g) de camundongos *Swiss* alimentados com dieta hiperlipídica composta por óleo de palma natural (POHF) ou óleo de palma interesterificado (IPOHF) por uma semana. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão da média. $p \leq 0,05$. $n = 8-10$ animais/grupo. (A) *Two-Way* ANOVA, (B) Teste *t de Student*.

Para determinarmos se o estado metabólico é influenciado pela ingestão da dieta hiperlipídica composta com gordura interesterificada, os animais ficaram em jejum por um período breve de quatro horas e a glicemia foi analisada.

De acordo com os dados obtidos, tanto POHF quanto IPOHF tiveram um aumento acentuado na glicemia em jejum (**Fig. 7 A, B**), indicando a possibilidade de prejuízos na homeostase glicêmica. No entanto, quando comparados, não foram observadas diferenças entre os grupos (**Fig. 7 C**).

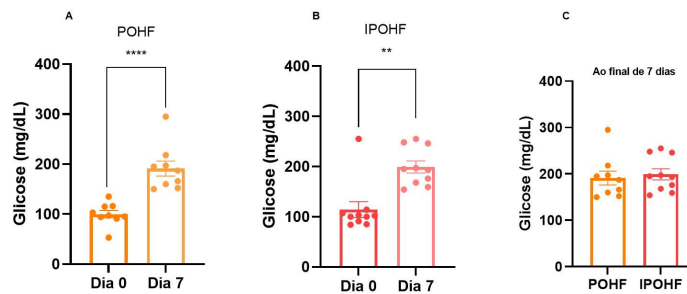


Figura 7. O efeito da dieta hiperlipídica rica em óleo de palma natural ou interesterificado na glicemia de camundongos da linhagem *Swiss* após uma semana. A, B) Glicemia (mg/dL) antes (dia 0) e após sete dias (dia 7) de dieta com 12 horas de jejum nos grupos POHF, IPOHF, respectivamente, C) Glicemia (mg/dL) após 12 horas de jejum em camundongos *Swiss* alimentados com dieta hiperlipídica composta por óleo de palma natural (POHF) e óleo de palma interesterificado (IPOHF) por uma semana. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão da média. * $p \leq 0,05$. $n = 9-10$ animais/grupo. A, B, C) Teste U de *Mann-Whitney*.

A leptina é um dos principais sinalizadores periféricos que controlam a atividade neuronal do hipotálamo, região do sistema nervoso central responsável pelo controle fisiológico da fome. Porém, em decorrência da alta ingestão de ácidos graxos modificados, especialmente de gordura *trans* e interesterificada, a capacidade destes sinalizadores de regular a fome-saciedade pode apresentar alterações, comprometendo o controle hipotalâmico da homeostasia energética.

Portanto, buscamos analisar se e a partir de qual momento o consumo da gordura interesterificada poderia interferir na ação da leptina no hipotálamo. Para isso, os animais alimentados com dieta rica em gordura interesterificada por uma semana receberam uma dose intraperitoneal (ip) de leptina e/ou veículo PBS após 12 horas de jejum para acompanhamento da ganho de massa corporal e da ingestão alimentar com 1, 3 e 12 horas (**Figura 8 e 9**).

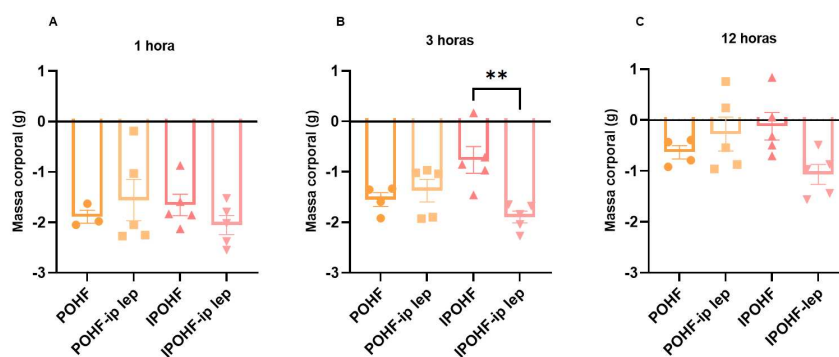


Figura 8. O efeito da dieta hiperlipídica rica em óleo de palma natural ou interesterificado na massa corporal de camundongos da linhagem *Swiss* após o tratamento intraperitoneal (ip) com leptina ao final de uma semana. A, B, C) Ganho de massa (g) com 1, 3 e 12 horas, respectivamente, após a aplicação intraperitoneal (ip) de leptina (5 μ g/g de animal) (-ip lep) em camundongos *Swiss* alimentados com dieta hiperlipídica composta com óleo de palma natural (POHF) ou óleo de palma interesterificado (IPOHF) ao final de uma semana. Os valores são mostrados média $\pm$ erro padrão. * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,005$. $n = 4-5$ animais/grupo. *Two-Way* ANOVA seguido pelo pós-teste *Tukey* para múltiplas comparações.

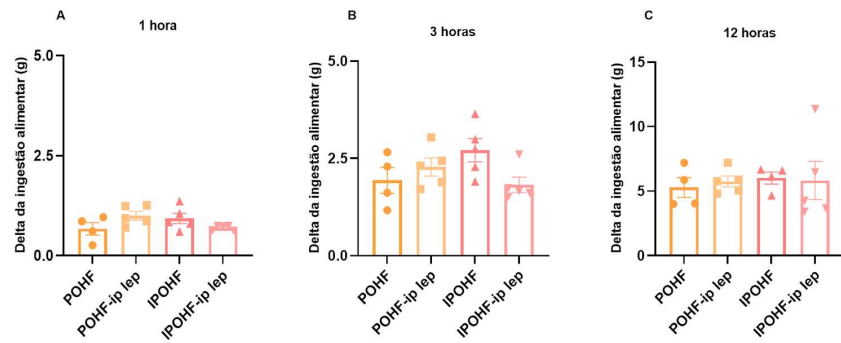


Figura 9. O efeito da dieta hiperlipídica rica em óleo de palma natural ou interesterificado na ingestão alimentar de camundongos da linhagem *Swiss* após o tratamento intraperitoneal (ip) com leptina ao final de uma semana. A, B, C) Delta da ingestão alimentar (g) com 1, 3 e 12 horas, respectivamente, após a aplicação intraperitoneal (ip) de leptina (5 ug/g de animal) (-ip lep) em camundongos *Swiss* alimentados com dieta hiperlipídica composta com óleo de palma natural (POHF) ou óleo de palma interesterificado (IPOHF) por uma semana. Os valores são mostrados média $\pm$ erro padrão da média. * $p \leq 0,05$. $n = 4-5$ animais/grupo. *Two-Way* ANOVA.

Os resultados mostram que após três horas do tratamento com leptina, os animais IPOHF-lep tiveram uma redução da massa corporal em relação ao seu controle (IPOHF) (Fig. 8 B). No entanto, não foram observadas diferenças na massa corporal e na ingestão alimentar nos demais tempos analisados para ambos os grupos.

Uma vez que a exposição à dieta rica em gordura interesterificada por uma semana e a administração de leptina via ip não modulam a massa corporal e a ingestão alimentar em ambos os grupos, o próximo passo foi prolongar o período experimental para quatro semanas. Os animais seguiram com acesso livre às dietas e a massa corporal e a ingestão foram avaliados semanalmente (Figura 10, 11).

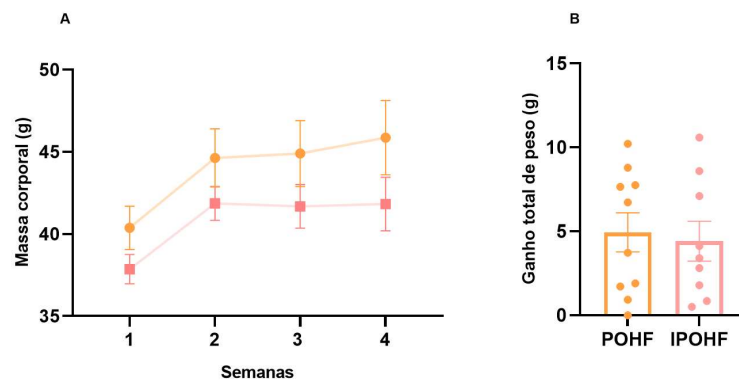


Figura 10. O efeito da dieta hiperlipídica rica em óleo de palma natural ou interesterificado no ganho de massa corporal de camundongos da linhagem *Swiss* após quatro semanas. A) Evolução semanal da massa corporal (g) e B) Ganho total de peso (g) de camundongos *Swiss* alimentados com dieta hiperlipídica composta com óleo de palma natural (POHF) ou óleo de palma interesterificado (IPOHF) ao final de quatro semanas. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão da média. * $p \leq 0,05$. $n=9-10$ animais/grupo. A) *Two-Way* ANOVA, B) Teste t de *student*.

Ao longo de quatro semanas, também não observamos diferença na evolução da massa corporal e na ingestão alimentar.

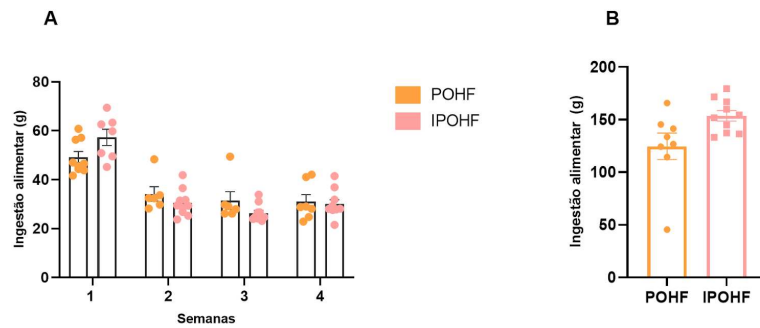


Figura 11. O efeito da dieta hiperlipídica rica em óleo de palma natural ou interesterificado na ingestão alimentar de camundongos da linhagem *Swiss* após quatro semanas. A) Ingestão alimentar (g) semanal B) Ingestão alimentar (g) cumulativa de camundongos *Swiss* alimentados com dieta hiperlipídica composta por óleo de palma natural (POHF) ou óleo de palma interesterificado (IPOHF) ao final de quatro semanas. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão da média. * $p \leq 0,05$. $n=9-10$ animais/grupo. A) *Two-Way* ANOVA, B) Teste t de *student*.

Uma vez que com a administração periférica de leptina não observamos diferenças importantes na massa corporal e na ingestão de dieta, passamos a investigar resistência central à leptina por meio da injeção intracerebroventricular (icv) deste hormônio, em animais alimentados com gordura interesterificada. Após um período de quatro semanas de exposição à dieta, os animais foram submetidos à cirurgia de estereotaxia e à implantação de uma cânula no ventrículo lateral para estímulo icv de leptina. Foram realizadas as avaliações das medidas mostradas abaixo, nos tempos determinados anteriormente (Fig. 12 e 13).

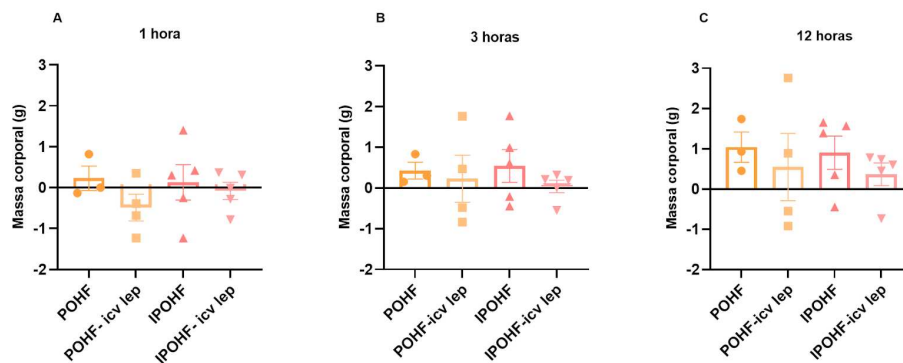


Figura 12. O efeito da dieta hiperlipídica rica em óleo de palma natural ou interesterificado na massa corporal de camundongos da linhagem *Swiss* após o tratamento intracerebroventricular (icv) com leptina ao final de quatro semanas. A, B, C) Ganho de massa corporal (g) com 1, 3 e 12 horas, respectivamente, após a injeção icv de leptina (0,5 ug/uL) (-icv lep) em camundongos *Swiss* alimentados com dieta hiperlipídica composta por óleo de palma natural (POHF) ou interesterificado (IPOHF) após quatro semanas. Os valores são mostrados média $\pm$ erro padrão da média. * $p \leq 0,05$. $n = 3-5$ animais/grupo. *Two-Way* ANOVA.

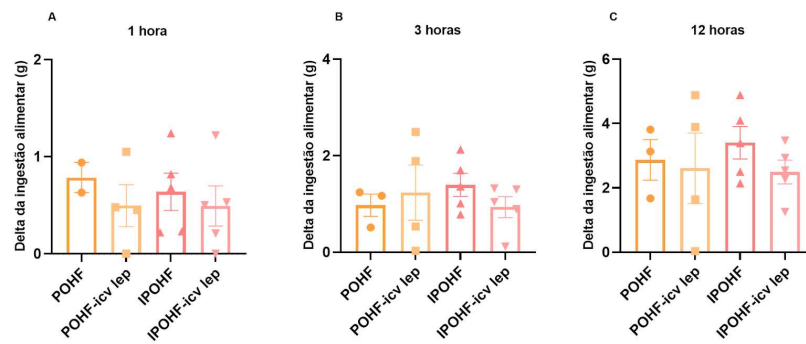


Figura 13. O efeito da dieta hiperlipídica rica em óleo de palma natural ou interesterificado na ingestão alimentar de camundongos da linhagem *Swiss* após o tratamento intracerebroventricular (icv) com leptina ao final de quatro semanas. **A, B, C)** Delta da ingestão alimentar (g) com 1, 3 e 12 horas, respectivamente, após a aplicação icv de leptina (0,5µg/uL) (-icv lep) em camundongos *Swiss* alimentados com dieta hiperlipídica composta por óleo de palma natural (POHF) ou interesterificado (IPOHF) após quatro semanas. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão da média. * $p \leq 0,05$. $n = 3-5$ animais/grupo. *Two-Way* ANOVA.

Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos submetidos às dietas hiperlipídicas compostas por óleo de palma natural (POHF) e interesterificado (IPOHF).

Também investigamos se ocorreu alguma modulação importante a nível hipotalâmico nesses animais. Os mesmos foram estimulados icv com leptina (15 minutos) após 12 horas de jejum anterior à eutanásia para extração do tecido e análise do conteúdo de transcritos de neuropeptídeos e citocinas inflamatórias (**Fig. 14 e 15**).

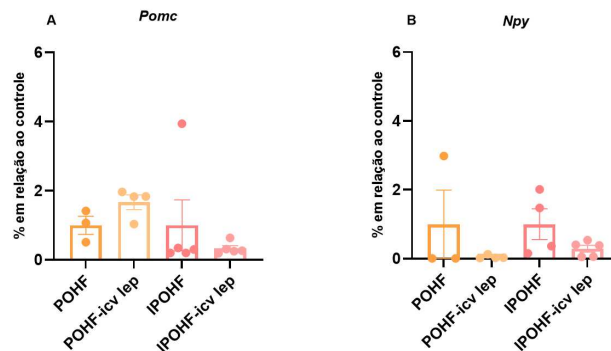


Figura 14. Conteúdo transcrito de RNA de neuropeptídeos após o tratamento icv com leptina em camundongos da linhagem *Swiss* submetidos à dieta hiperlipídica rica em óleo de palma natural e interesterificado. Expressão do conteúdo transcrito de RNA de **A)** *Pomc* e **B)** *Npy*, respectivamente por RT-qPCR no hipotálamo de camundongos *Swiss* tratados icv (0,5µg/uL) com PBS e/ou leptina (-icv lep) e submetidos à dieta hiperlipídica composta com óleo de palma natural (POHF, POHF-lep) e óleo de palma interesterificado (IPOHF, IPOHF-lep) por quatro semanas. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão da média. * $p \leq 0,05$. $n=3-5$ animais/grupo. *Two-Way* ANOVA.

A leptina atua sobre as duas populações neuronais, estimulando a produção de POMC, com atividade anorexígena, e inibindo NPY, que exerce função orexígena (PARK e AHIMA, 2014). De acordo com os dados apresentados, não foram observadas diferenças estatísticas. Mais experimentos são necessários para entendermos o papel da gordura interesterificada na homeostase energética e regulação da leptina.

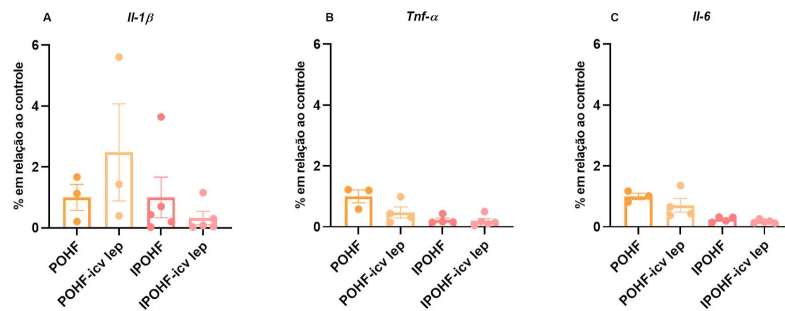


Figura 15. Conteúdo transcrito de RNA de citocinas após o tratamento icv com leptina em camundongos da linhagem *Swiss* submetidos à dieta hiperlipídica rica em óleo de palma natural e interesterificado. Expressão do conteúdo transcrito de RNA de A) *Il-1β*, B) *Tnf-α* e C) *Il-6*, respectivamente por RT-qPCR no hipotálamo de camundongos *Swiss* tratados icv (0,5μg/uL) com PBS e/ou leptina (-icv lep) e submetidos à dieta hiperlipídica composta com óleo de palma (POHF, POHF-lep) ou óleo de palma interesterificado (IPOHF, IPOHF-lep) por quatro semanas. Os valores são mostrados como média ± erro padrão da média. *p ≤ 0,05. n=3-5 animais/grupo. *Two-Way* ANOVA.

O número pequeno de animais por grupo dificultou a confirmação estatística dos dados. Mais experimentos são necessários para melhor compreensão do impacto da dieta rica em gordura interesterificada sobre a sinalização da leptina e consequentemente, ativação de vias inflamatórias e regulação da fome.

Dessa forma, tendo em vista todos os resultados já obtidos com os grupos hiperlipídicos, buscamos verificar possíveis alterações relacionadas ao consumo de dietas normolipídicas e normocalóricas compostas com óleo de palma (PO) e óleo de palma interesterificado (IPO), isolando assim o efeito qualitativo da gordura da dieta.

4.2 Protocolo experimental 2 - Avaliação de parâmetros metabólicos e moleculares de animais alimentados com dieta normolipídica composta com gordura interesterificada.

Os animais, ao completarem seis semanas, após três semanas de aclimação, foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais, submetidos às dietas normolipídicas compostas com óleo de palma natural (PO) e óleo de palma interesterificado (IPO), contendo 10% de lipídios na composição. O delineamento do protocolo experimental está descrito a seguir (**Figura 16**).

Os grupos receberam a dieta por uma semana. Os animais foram alocados em gaiolas individuais (n=10/grupo) com dieta e água *ad libitum* no decorrer do tempo experimental. A massa corporal e a ingestão de dieta foram avaliadas no início e final do período experimental (**Fig. 17 A e B**).

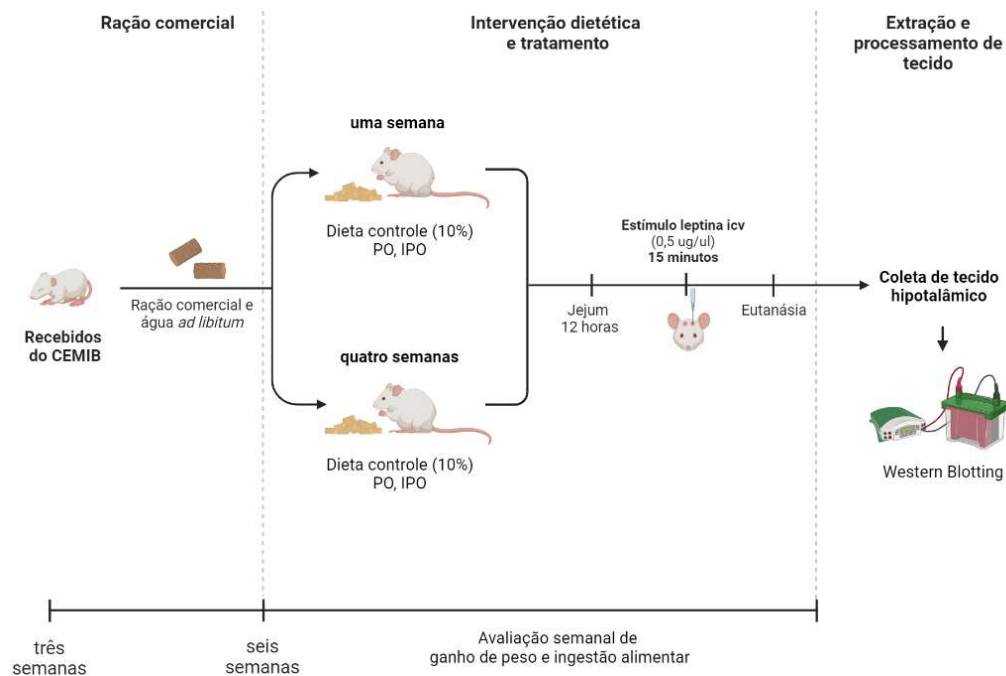


Figura 16. Delineamento referente ao protocolo experimental 2. Os animais foram separados, com três semanas de idade, em gaiolas individuais, passando a receber dieta controle comercial e água *ad libitum*, até que completassem seis semanas de vida. Ao atingir a idade, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: grupo alimentado com dieta normolipídica com óleo de palma natural (PO) e grupo alimentado com dieta normolipídica com óleo de palma interesterificado (IPO). Foram realizados dois períodos experimentais, sendo um deles de uma semana e o outro de quatro. Os animais, em ambos os grupos, ao completarem o período de intervenção dietética (uma ou quatro semanas) com as respectivas dietas (PO e/ou IPO), passaram por um jejum de 12 horas para posterior estímulo intracerebroventricular (icv) com leptina. Após a aplicação, esperou-se 15 minutos. Em seguida, os animais foram eutanasiados e os tecidos coletados para análises posteriores através da técnica de Western Blotting. Figura produzida no biorender.com.

Não foram observadas diferenças em relação à massa corporal dos animais (**Fig. 17 A**). No entanto, o tempo de exposição de uma semana à dieta foi suficiente para modular a ingestão alimentar. De acordo com a **Figura 17 B**, os animais que receberam a dieta IPO tiveram um consumo menor em relação ao seu controle.

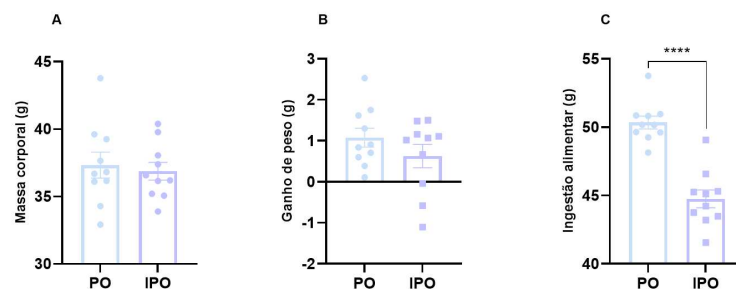


Figura 17. O efeito da dieta normolipídica rica em óleo de palma natural ou interesterificado em parâmetros metabólicos de camundongos da linhagem *Swiss* após uma semana. **A)** Massa corporal (g), **B)** Delta do ganho de peso (g), **C)** Delta da ingestão alimentar (g) ao final de uma semana de camundongos *Swiss* alimentados com dietas normolipídicas compostas por óleo de palma natural (PO) e óleo de palma interesterificado (IPO). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão. **** $p < 0,0001$. $n=10$ animais/grupo. Teste t de *student*.

Neste grupo investigamos a cascata de sinalização da leptina no hipotálamo mediante análise do conteúdo proteico de marcadores importantes dessa via. Para isso, após uma

semana de dieta, os animais foram submetidos à cirurgia de estereotaxia de microagulhamento para tratamento único com leptina na região do ventrículo lateral. Portanto, dividimos os dois grupos totais (n=10/grupo) em dois subgrupos cada (n=5/grupo) para comportá-los como controle (sem leptina) e tratamento (com leptina). Após a cirurgia e os respectivos estímulos (15 minutos), os animais foram eutanasiados e o tecido hipotalâmico foi coletado para posterior análises.

De acordo com as **figuras 18 D** a ingestão de dieta rica em óleo de palma interesterificado durante uma semana parece prejudicar a sinalização de proteínas *downstream* do receptor de leptina (ObRb) como JAK2 após estímulo com leptina, porém não foram observadas diferenças estatísticas.

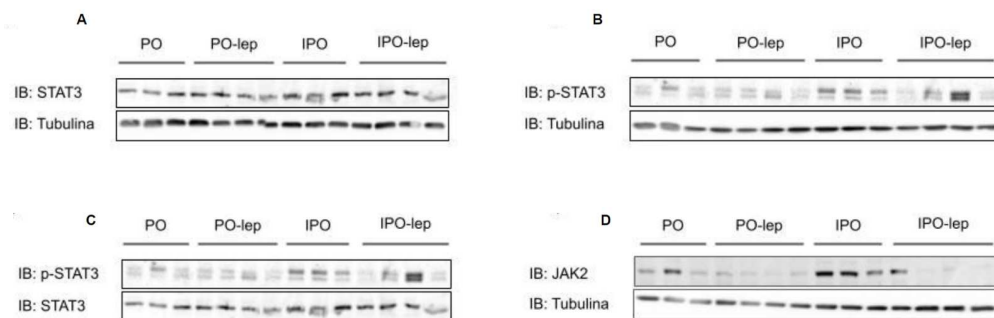


Figura 18. Expressão de proteínas em extrato protéico hipotalâmico obtido após o tratamento icv com leptina em camundongos da linhagem Swiss submetidos à dieta composta com óleo de palma natural ou interesterificado por uma semana. Análise por Western Blot da expressão de A) STAT3, B) p-STAT3, C) p-STAT3/STAT3 e D) JAK2, respectivamente em extrato protéico hipotalâmico obtido de camundongos alimentados por uma semana com dieta normolipídica composta com óleo de palma (PO), óleo de palma interesterificado (IPO) e/ou submetidos ao tratamento com icv com leptina (-lep). n=3-4 animais/grupo.

Nosso próximo objetivo foi avaliar a sinalização da via da leptina em animais alimentados com a dieta interesterificada por um período de quatro semanas. Para isso, os animais receberam o mesmo tratamento icv com leptina 15 minutos antes da eutanásia. Os resultados estão presentes na **Figura 19** e não foram observadas diferenças. No entanto, esses dados são ainda parciais e mais experimentos são necessários para confirmação dos resultados.

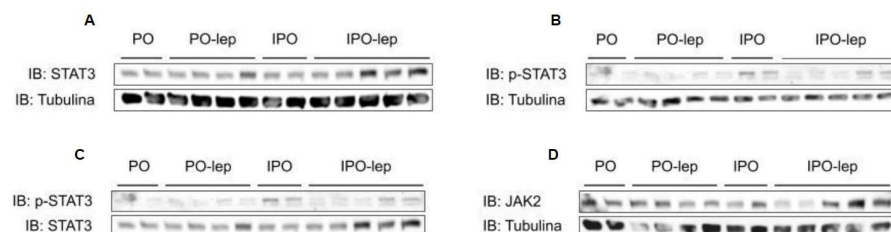


Figura 19. Expressão de proteínas em extrato protéico hipotalâmico obtido após o tratamento icv com leptina em camundongos da linhagem Swiss submetidos à dieta composta com óleo de palma natural ou interesterificado por quatro semanas. Análise por Western Blot da expressão de A) STAT3, B) p-STAT3, C) p-STAT3/STAT3 e D) JAK2, respectivamente em extrato protéico hipotalâmico obtido de camundongos alimentados por quatro semanas com dieta

normolipídica composta com óleo de palma (PO), óleo de palma interesterificado (IPO) e/ou submetidos ao tratamento com icv com leptina (-lep). n=3-5 animais/grupo.

Etapa 2: Avaliação de parâmetros metabólicos e resistência à insulina em animais alimentados com dieta rica em gordura interesterificada ou suplementados com óleo de palma interesterificado.

4.3 Protocolo experimental 3 - Avaliação da homeostase glicêmica e expressão gênica hipotalâmica de animais alimentados com dieta composta com gordura interesterificada

Nosso próximo passo foi investigar os efeitos da interesterificação na homeostasia glicêmica e expressão gênica de citocinas e marcadores de inflamação no tecido hipotalâmico dos animais.

Para isso, camundongos *Swiss* machos adultos receberam a dieta normocalórica e normolipídica composta com óleo de palma natural (PO) e com óleo de palma interesterificado (IPO), contendo 10% de lipídios na composição e dieta hiperlipídica e hipercalórica composta com óleo de palma natural (POHF) e com óleo de palma interesterificado (IPOHF), contendo 45% de lipídios na composição. O delineamento do protocolo experimental está descrito a seguir (**Figura 20**).

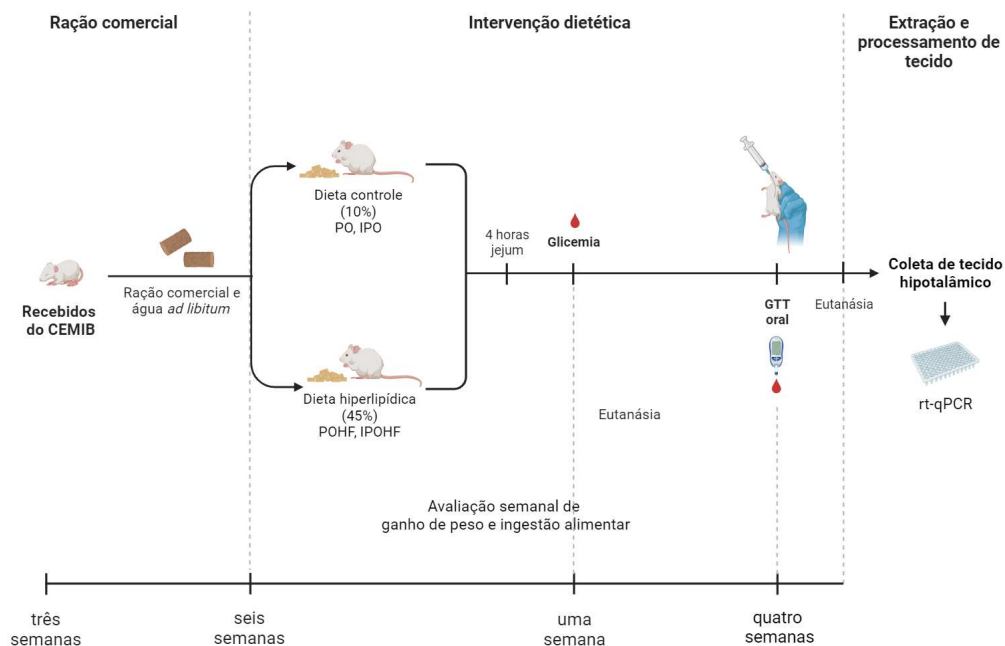


Figura 20. Delineamento do protocolo experimental 3. Os animais foram separados com três semanas de idade em gaiolas individuais, passando a receber dieta controle comercial e água *ad libitum*, até que completassem seis semanas de vida. Ao atingir a idade, os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: dieta controle com 10% do valor calórico proveniente de lipídios (óleo de palma refinado não modificado) (**PO**), dieta controle interesterificada com 10% do valor calórico proveniente de lipídios (óleo de palma refinado interesterificado) (**IPO**), dieta hiperlipídica com 45% do valor calórico proveniente de lipídios (óleo de palma refinado não modificado) (**POHF**) e dieta hiperlipídica interesterificada com 45% do valor calórico proveniente de lipídios (óleo de palma refinado interesterificado) (**IPOHF**). Os animais receberam as dietas por quatro semanas. Peso e ingestão foram avaliados semanalmente. Na última semana de dieta, os grupos foram submetidos ao GTT oral. Anteriormente à eutanásia, os animais foram submetidos a 12 horas de jejum. Ao final do período,

foi realizada a eutanásia para coleta do tecido hipotalâmico e posterior análise de expressão gênica pela técnica da RT-qPCR. Figura produzida no biorender.com.

Ao final dos primeiros sete dias de oferta das dietas, os animais foram deixados em jejum por quatro horas para avaliação da glicemia (Fig. 21).

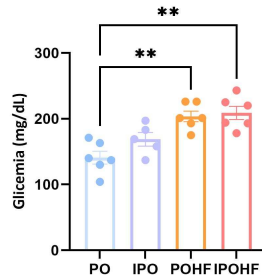


Figura 21. O efeito das dietas normolipídica e hiperlipídica ricas em óleo de palma natural ou interesterificado na glicemia em jejum de camundongos da linhagem *Swiss* após uma semana. Glicemia (mg/dL) após quatro horas de jejum ao final de uma semana da oferta de dietas. PO: Óleo de palma natural; IPO: Óleo de palma interesterificado; POHF: Dieta rica em óleo de palma natural; IPOHF: Dieta rica em óleo de palma interesterificado. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão da média. ** $p < 0,005$. $n = 5-6$ /grupo. *Two-Way* ANOVA seguido pelo pós-teste *Tukey* para múltiplas comparações.

De acordo com os dados mostrados acima, os animais do grupo PO apresentaram uma glicemia menor em comparação aos grupos hiperlipídicos (POHF, IPOHF). A fim de explorarmos um pouco mais o efeito da dieta na modulação de parâmetros metabólicos, o período experimental foi estendido para quatro semanas.

Ao analisarmos o peso dos animais (g), não observamos diferenças estatísticas ao comparar os grupos controle (PO *versus* IPO), nem os hiperlipídicos (POHF *versus* IPOHF). Conforme o esperado, os animais pertencentes ao grupo hiperlipídico apresentaram maior peso corporal durante o período estudado (Figura 22).

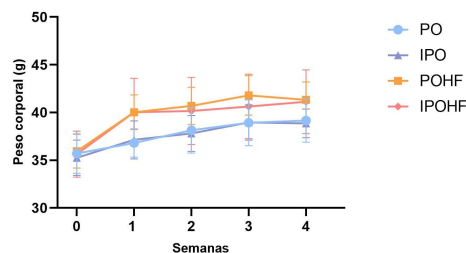


Figura 22. O efeito das dietas normolipídica e hiperlipídica ricas em óleo de palma natural ou interesterificado no ganho de massa corporal de camundongos da linhagem *Swiss* ao longo de quatro semanas. Variação da massa corporal (g) de camundongos da linhagem *Swiss* durante todo o período experimental. PO: Óleo de palma natural; IPO: Óleo de palma interesterificado; POHF: Dieta rica em óleo de palma natural; IPOHF: Dieta rica em óleo de palma interesterificado. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0,05$. $n = 6$ /grupo. *Two-Way* ANOVA.

Em relação à ingestão alimentar, os dados parecem indicar uma maior ingestão alimentar em calorias do grupo IPO em comparação aos demais grupos na primeira e segunda semana (Fig. 23 A).

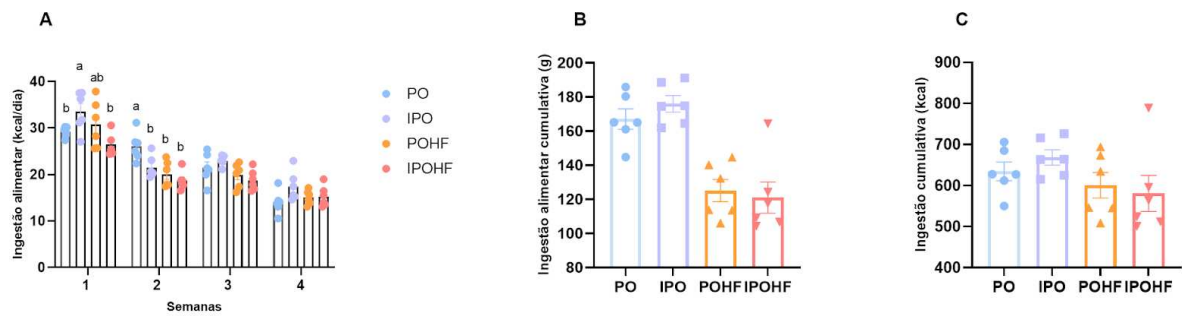


Figura 23. O efeito das dietas normolipídica e hiperlipídica ricas em óleo de palma natural ou interesterificado na ingestão alimentar de camundongos da linhagem *Swiss* ao longo de quatro semanas. **A)** Ingestão alimentar (kcal/dia) e **B)** Ingestão alimentar cumulativa (g), **C)** Ingestão cumulativa (kcal) de camundongos da linhagem *Swiss* ao final de quatro semanas. PO: Óleo de palma natural; IPO: Óleo de palma interesterificado; POHF: Dieta rica em óleo de palma natural; IPOHF: Dieta rica em óleo de palma interesterificado. Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0,05$. $n = 6/\text{grupo}$. **A)** *Two-Way* ANOVA seguido pelo pós-teste *Tukey* para múltiplas comparações, *letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos; **B, C)** Teste *t* de *Student* POxIPO, POHFxIPOHF.

No que diz respeito à homeostase glicêmica dos animais, não foram encontradas diferenças estatísticas na análise da área sob a curva do teste oral de tolerância à glicose ao final das quatro semanas (**Fig. 24**).

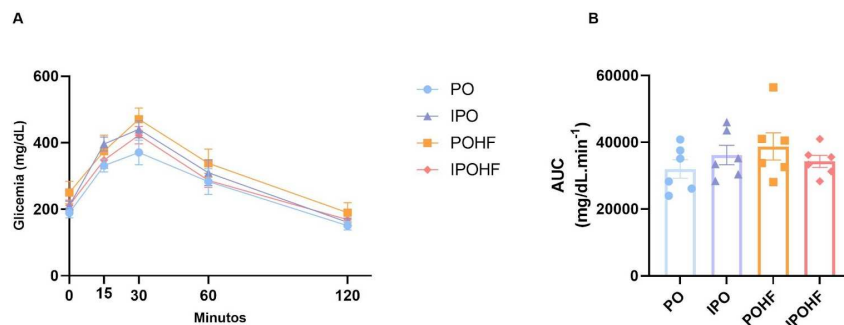


Figura 24. O efeito das dietas normolipídica e hiperlipídica ricas em óleo de palma natural ou interesterificado na homeostase glicêmica de camundongos da linhagem *Swiss* após quatro semanas. **A)** Curva da glicemia, **B)** Área sob a curva (AUC) do GTT oral. PO: Óleo de palma natural; IPO: Óleo de palma interesterificado; POHF: Dieta rica em óleo de palma natural; IPOHF: Dieta rica em óleo de palma interesterificado. Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0,05$. $n = 6/\text{grupo}$. *Two-Way* ANOVA.

Uma vez que não observamos diferenças em parâmetros metabólicos de animais submetidos aos quatro tipos de dietas durante o período experimental, passamos a investigar se ocorreu alguma modulação importante a nível molecular em relação à qualidade do lipídio. Para isso, analisamos o conteúdo transcrito de RNA do hipotálamo de animais submetidos à dieta normolipídica e normocalórica composta com óleos de palma natural (PO) ou interesterificado (IPO) ao final de quatro semanas (**Fig. 25**).

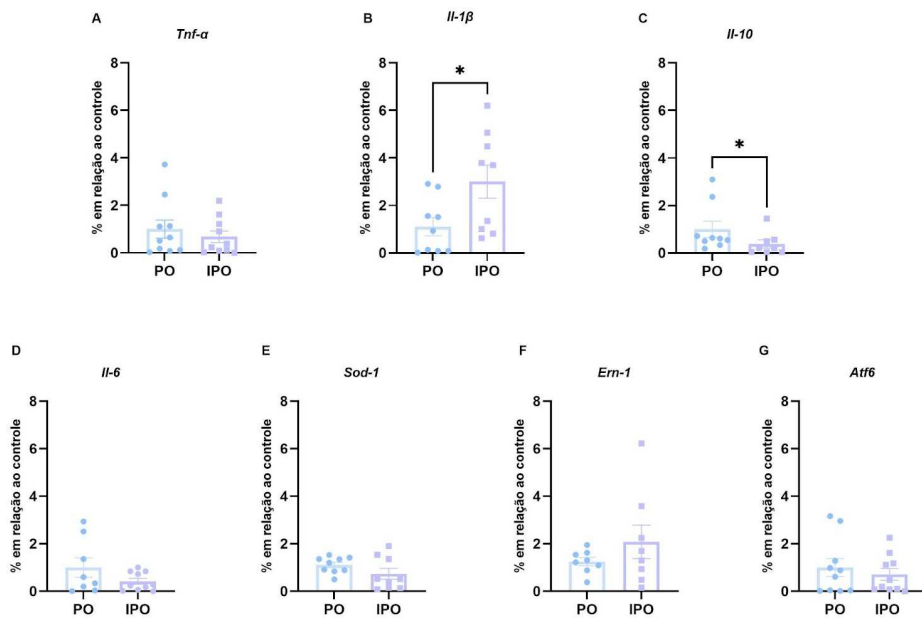


Figura 25. Conteúdo transcrito de RNA de citocinas e do estresse de retículo endoplasmático do hipotálamo de camundongos da linhagem *Swiss* submetidos à dieta com óleo de palma natural e interesterificado por quatro semanas. Expressão do conteúdo transcrito de RNA de A) *Tnf-α*, B) *Il-1β*, C) *Il-10*, D) *Il-6*, E) *Sod-1*, F) *Ern-1*, G) *Atf6*, respectivamente por RT-qPCR no hipotálamo de camundongos submetidos à dieta composta com óleo de palma natural (PO) e óleo de palma interesterificado (IPO) por quatro semanas. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão. * $p \leq 0,05$. $n=8-10$ animais/grupo. Teste *t* de *student*.

De acordo com os nossos resultados, o grupo IPO apresentou um aumento da expressão de *Il-1β*, indicando uma possível resposta inflamatória a nível central e, em contraposição, redução da expressão gênica de *Il-10*, um mediador antiinflamatório.

4.4 Protocolo experimental 4 - Avaliação da homeostase glicêmica e expressão gênica hipotalâmica de animais submetidos ao tratamento intracerebroventricular com 2-palmitoilglicerol

As sutis alterações encontradas na homeostasia hipotalâmica dos animais submetidos à dieta rica em gordura interesterificada, nos fez questionar quais seriam os efeitos isolados do lipídio interesterificado no sistema nervoso central. Para este propósito, foram utilizados camundongos C57BL/6 machos adultos. Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para injeção hipotalâmica intracerebroventricular (icv) única de ácidos graxos (180 uM, 2 uL/cada).

Os camundongos foram divididos em três grupos experimentais: Controle (CT) - estimulado icv com veículo BSA, Palmitato (PA) ou Palmitoilglicerol (PG), um monoacilglicerol, metabólito da gordura interesterificada, contendo um palmitato na posição central do glicerol (sn-2), o 2-palmitoilglicerol. O delineamento do protocolo experimental está descrito a seguir (**Figura 26**).

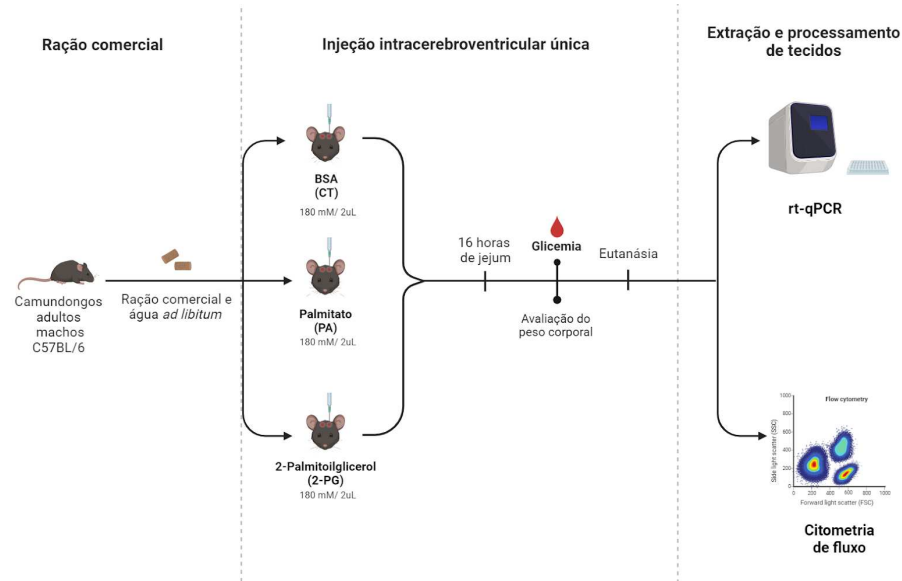


Figura 26. Delineamento referente ao protocolo experimental 4. Camundongos C57BL/6 machos adultos foram fornecidos pelo *AECOM Institutional Animal Care and Use Committee* com dois meses de vida. Os animais foram separados em gaiolas individuais, passando a receber dieta controle comercial e água *ad libitum*, até o final do protocolo experimental. Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para injeção hipotalâmica intracerebroventricular (icv) única de ácidos graxos (180 uM, 2 uL/cada). Os camundongos foram divididos em três grupos experimentais: Controle (CT) estimulado icv com veículo BSA; Palmitato (PA) - ácido graxo palmitato; Palmitoilglicerol (PG) - 2-palmitoilglicerol, um monoacilglicerol, metabólito da gordura interesterificada, contendo um palmitato na posição central do glicerol (sn-2), o 2-palmitoilglicerol. Após o estímulo agudo, foi realizado um jejum de 16 horas. Em seguida, o peso corporal e a glicemia foram medidos. Posteriormente, tecidos biológicos foram coletados e analisados através da técnica de rt-qPCR ou citometria de fluxo. Figura produzida no biorender.com.

Após o estímulo agudo, foi realizado jejum de 16 horas e em seguida os tecidos biológicos foram coletados e analisados. A massa corporal e a glicemia foram medidos. Não foram encontradas diferenças estatísticas nos parâmetros analisados (**Figura 27 A e B**).

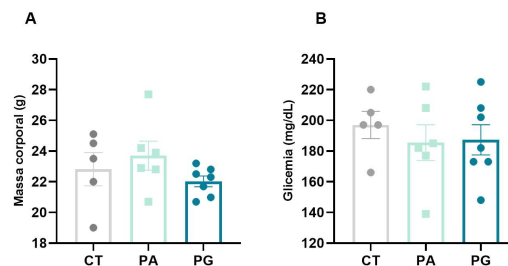


Figura 27. Massa corporal e glicemia de jejum de camundongos da linhagem C57BL/6 após tratamento intracerebroventricular com BSA, palmitato ou palmitoilglicerol. A) Massa corporal (g), B) Glicemia (mg/dL) m jejum de camundongos da linhagem C57BL/6 após tratamento intracerebroventricular (icv) único (2 uL) com BSA (CT), palmitato (PA) e palmitoilglicerol (PG). Os valores são apresentados como média ± erro padrão. $p < 0,05$. $n = 5-7$ animais/grupo. Teste *One-Way ANOVA*.

Nesta primeira etapa foram realizados dois experimentos independentes para aumentar o tamanho da amostra e confirmação dos dados. Porém, detectamos um problema com as amostras controles e elas foram excluídas, conforme mostrado nos resultados a seguir (**Figura 28 - 31**).

Aqui pretendemos investigar se alguma modulação significativa após a injeção de ácidos graxos interesterificados ocorreu a nível hipotalâmico em camundongos. Os animais

foram estimulados icv com PA ou PG (2 μ L) e, após 16 horas de jejum, período que antecedeu a eutanásia, o tecido foi coletado para análise do conteúdo de transcritos de neuropeptídeos, citocinas inflamatórias e genes relacionados ao processo autofágico.

De acordo com nossos dados, após estímulo único de icv com PG e jejum, os camundongos apresentaram aumento de *Cart* (**Figura 28 D**), sugerindo que os ácidos graxos interesterificados no SNC podem prejudicar a homeostase energética, uma vez que os neurônios produtores de *Pomc*/*Cart* responsáveis pela atividade anorexígena, com níveis aumentados após a alimentação, e neurônios *Npy*/*AgRP* responsáveis pela atividade orexígena, mais expressa durante o jejum (Millington, 2007).

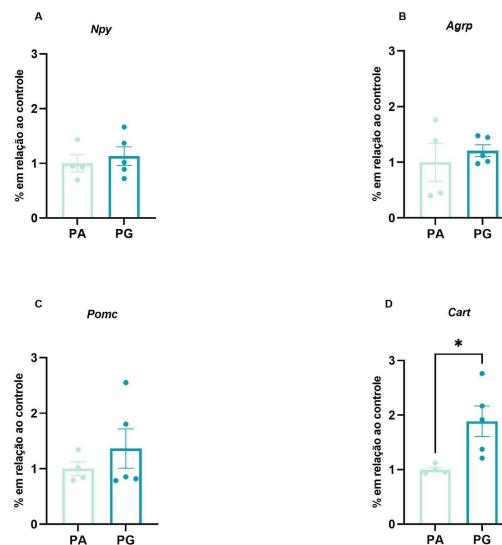


Figura 28. Conteúdo transcrito de RNA de neuropeptídeos após tratamento icv com palmitato ou palmitoilglicerol em camundongos da linhagem C57BL/6. Expressão do conteúdo transcrito de RNA A) *Npy*, B) *AgRP*, C) *Pomc* e D) *Cart*, respectivamente por RT-qPCR no hipotálamo de camundongos da linhagem C57BL/6 após tratamento icv único (2 μ L) com palmitato (PA) ou palmitoilglicerol (PG). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão da média. * $p \leq 0,05$. $n=4-5$ animais/grupo. Teste t de *student*.

Avaliamos expressão gênica de fatores pró-inflamatórios no hipotálamo de camundongos. A **Figura 29 D** mostra que a injeção aguda de PG foi suficiente para aumentar os níveis de *F4/80* em comparação com PA, indicando a possibilidade de aumento da ativação da microglia, células imunes residentes do cérebro. Mais experimentos são necessários para confirmar os dados obtidos.

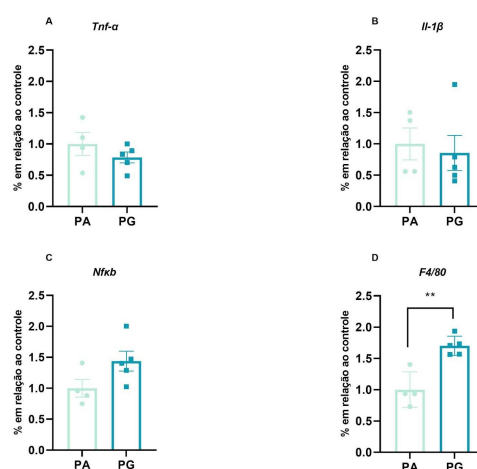


Figura 29. Conteúdo transcrito de RNA de genes pró-inflamatórios após tratamento icv com palmitato ou palmitoilglicerol em camundongos da linhagem C57BL/6. Expressão do conteúdo transcrito de RNA de A) *Tnf-α*, B) *Il-1β*, C) *Nfkb* e D) *F4/80* respectivamente por RT-qPCR no hipotálamo de camundongos da linhagem C57BL/6 após tratamento icv único (2 μ L) com palmitato (PA) ou palmitoilglicerol (PG). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão da média. * $p \leq 0,05$. $n=4-5$ animais/grupo. Teste t de *student*.

A autofagia é um processo de degradação lisossomal que contribui para a homeostase celular. Dentre os tipos desse processo, encontra-se a macroautofagia, que depende da formação de uma estrutura denominada autofagossomo, capaz de capturar material para degradação lisossomal (Valdor e Macian, 2012). Nosso objetivo aqui foi investigar se o estímulo agudo central com 2-palmitoilglicerol está relacionado ao desencadeamento da autofagia hipotalâmica.

Conforme visto na **Figura 30 A**, o PG aumentou a expressão de *Beclin*, que está relacionada ao início do processo autofágico, importante para localização de proteínas autofágicas em uma estrutura pré-autofágica. Experimentos adicionais são necessários para confirmar os resultados obtidos.

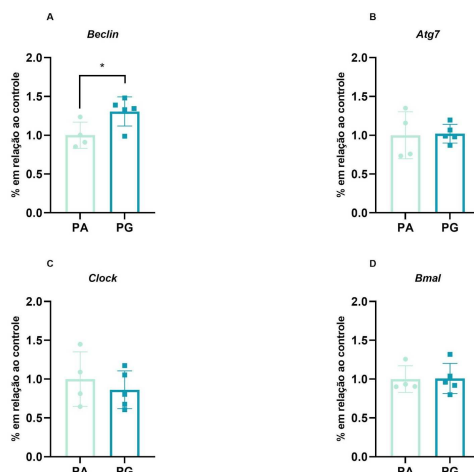


Figura 30. Conteúdo transcrito de RNA de genes relacionados à autofagia e ao ciclo circadiano após tratamento icv com palmitato ou palmitoilglicerol em camundongos da linhagem C57BL/6. Expressão do conteúdo transcrito de RNA de A) *Beclin*, B) *Atg7*, C) *Clock*, D) *Bmal1* respectivamente por RT-qPCR no hipotálamo de camundongos da linhagem C57BL/6 após tratamento icv único (2 μ L) com palmitato (PA) ou palmitoilglicerol (PG). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão. * $p \leq 0,05$. $n=4-5$ animais/grupo. Teste t de *student*.

Figura 31. Estratégia de *gating* aplicada à análise geral de citometria de fluxo. Estratégia de *gating* aplicada à análise geral de citometria de fluxo da fração vascular estromal isolada de tecido adiposo inguinal após tratamento icv com palmitato ou palmitoilglicerol em camundongos C57BL/6.

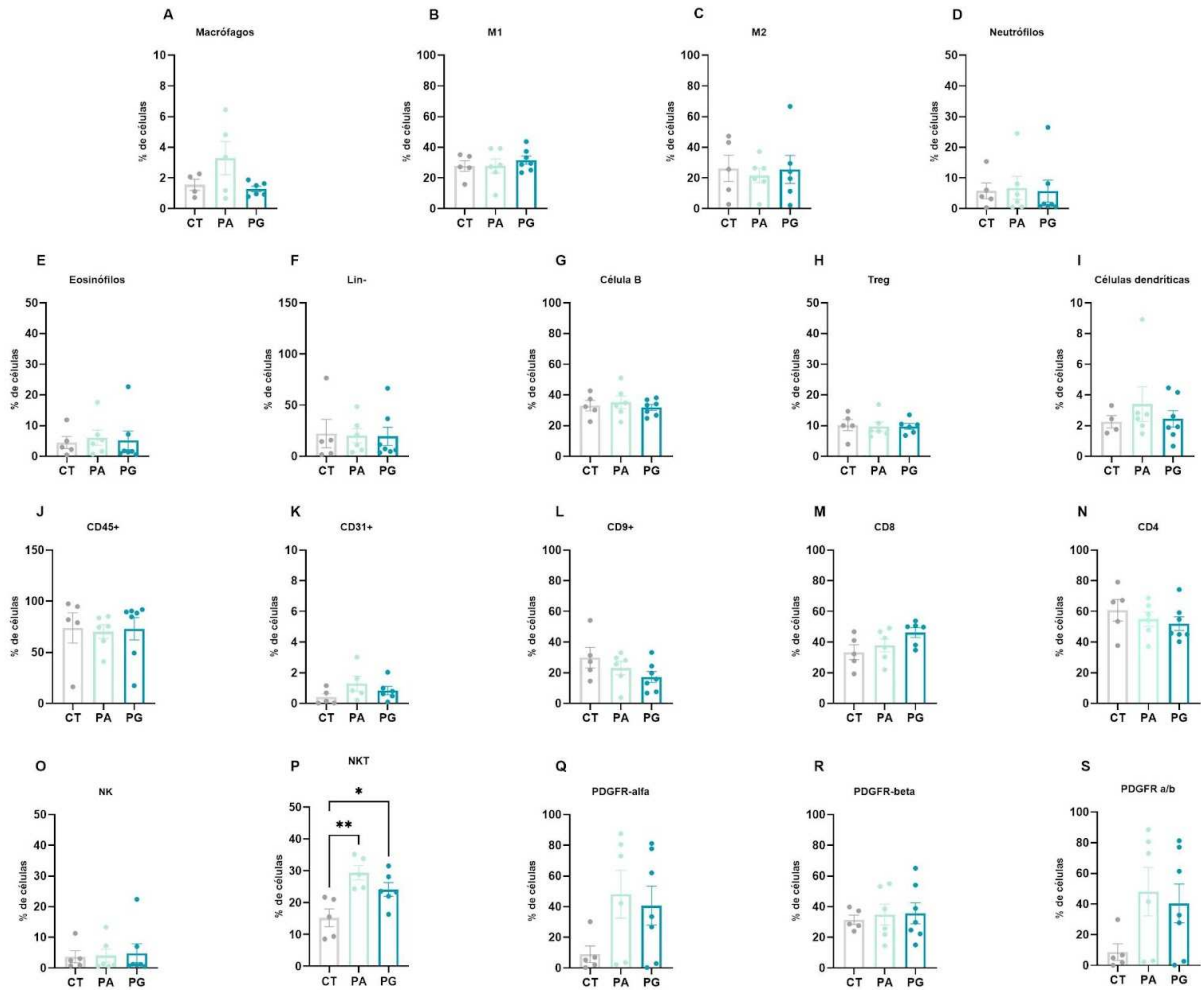


Figura 32. Análise de citometria de fluxo da fração vascular estromal isolada de tecido adiposo inguinal após tratamento icv com palmitato ou palmitoilglicerol em camundongos da linhagem C57BL/6. Porcentagem (%) de **A)** Macrófagos, **B)** M1, **C)** M2, **D)** Neutrófilos, **E)** Eosinófilos, **F)** Lin-, **G)** Células B, **H)** Treg, **I)** Células dendríticas, **J)** CD45+, **K)** CD31, **L)** CD9, **M)** CD8, **N)** CD4, **O)** NK, **P)** NKT, **Q)** PDGFR-alfa, **R)** PDGFR-beta, **S)** PDGFRa/b da fração vascular estromal (FVS) do tecido adiposo inguinal (iWAT) de camundongos da linhagem C57BL/6 após tratamento icv único (2µL) com BSA (CT), palmitato (PA) ou palmitoilglicerol (PG). Os valores são mostrados como média ± erro padrão. *p < 0,05, **p < 0,005. *One-Way* ANOVA seguido pelo pós-teste *Tukey* para múltiplas comparações.

De acordo com os dados obtidos, uma única injeção icv com PA e/ou PG foi suficiente para aumentar a expressão de células T natural killer (**Fig. 32 P**), que são ativadas durante uma variedade de infecções e condições inflamatórias.

Como a administração central de palmitoilglicerol, um metabólito da gordura interesterificada, pareceu modular os parâmetros metabólicos e moleculares analisados, nos perguntamos quais poderiam ser os efeitos agudos sistêmicos da gordura interesterificada. Portanto, realizamos a administração oral de óleos por gavagem durante um período de uma semana.

4.5 Protocolo experimental 5 - Avaliação da composição corporal, disponibilidade bioenergética e contagem de células de camundongos suplementados com óleo de palma natural ou interesterificado

Camundongos C57BL/6 machos adultos foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais, submetidos à gavagem oral com óleo de palma natural (PO) e óleo de palma interesterificado (IPO), duas vezes ao dia durante sete dias. Os animais tiveram acesso a ração e água *ad libitum* durante todo o período experimental. O delineamento do protocolo experimental está descrito a seguir (**Fig. 33**).

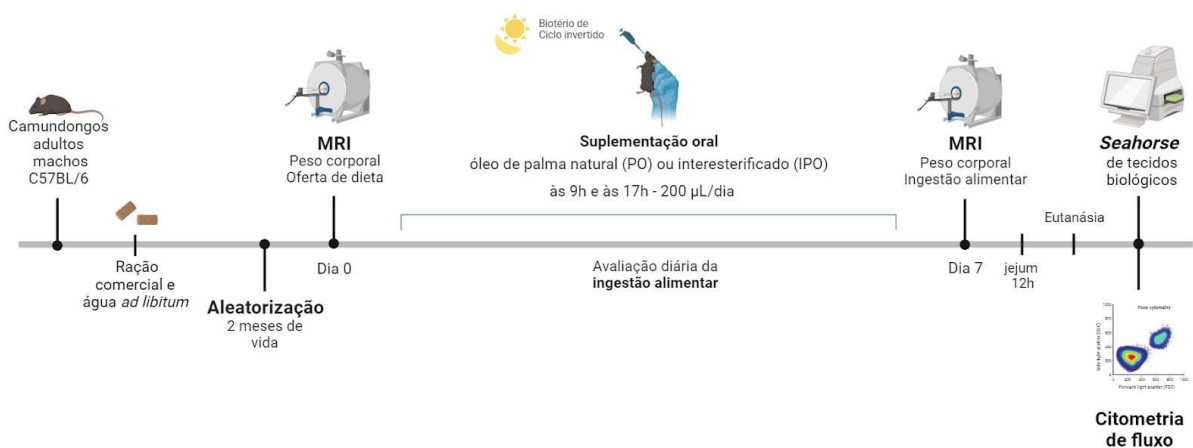


Figura 33. Delineamento referente ao protocolo experimental 5. Camundongos C57BL/6 machos adultos foram fornecidos pelo AECOM Institutional Animal Care and Use Committee com dois meses de vida. Os animais foram separados em gaiolas individuais, passando a receber dieta controle comercial e água *ad libitum*, até o final do protocolo experimental. No dia zero, foi realizada a pesagem dos animais, da dieta a ser ofertada e o MRI (*Magnetic Resonance Imaging*), para análise da composição corporal. Em seguida, os camundongos foram divididos em dois grupos: suplementação oral com óleo de palma natural (PO) e suplementação com óleo de palma interesterificado (IPO). A suplementação aconteceu duas vezes ao dia, ao longo de uma semana, nos mesmos horários: 9h e 17h (100 µL de óleo PO ou IPO/horário). A ingestão alimentar foi avaliada diariamente. Ao final do protocolo experimental (sétimo dia), os grupos foram pesados e novamente submetidos ao MRI. Os animais foram deixados em jejum por 12 horas e, em seguida, foram eutanasiados e os tecidos coletados para análises posteriores através da técnica de *Seahorse* ou citometria de fluxo. Figura produzida no biorender.com.

Antes do início do experimento (dia 0), a composição corporal dos animais foi analisada por ressonância magnética (MRI) bem como a quantidade de dieta fornecida. Os animais receberam a suplementação com óleos PO ou IPO por gavagem oral duas vezes ao dia (100µl/hora, 200 µl/dia), sempre no mesmo horário (9h e 17h). A massa corporal e a ingestão de dieta foram medidos diariamente. Os dados de ingestão de dieta são mostrados abaixo na **Figura 34**.

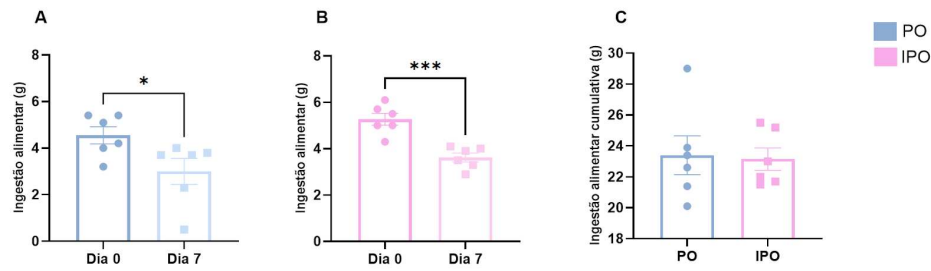


Figura 34. O efeito do óleo de palma natural e interesterificado na ingestão alimentar de camundongos da linhagem C57BL/6 após uma semana de suplementação com óleo de palma natural ou interesterificado. Ingestão alimentar (g) dos grupos A) PO, B) IPO antes e após intervenção com óleos por gavagem oral, C) Ingestão alimentar cumulativa (g) de camundongos C57BL/6 após intervenção por gavagem oral com óleo de palma natural (PO) ou interesterificado (IPO) duas vezes ao dia (200µl/dia) durante uma semana. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$. $n=6$ animais/grupo. Teste t de *student*.

De acordo com os resultados, o grupo PO (Fig. 34 A) e o grupo IPO (Fig. 34 B) apresentaram redução da ingestão alimentar ao final do período experimental. Este resultado era esperado, uma vez que os lipídios aumentam a saciedade. Porém, quando comparamos os dois grupos ao final do período experimental, não encontramos diferenças (Fig. 34 C).

Ao final dos sete dias de administração do óleo por gavagem, os animais ficaram em jejum de 12 horas para mensuração da glicemia (Figura 35). Em seguida, foi realizada a eutanásia e os tecidos biológicos foram coletados. O tecido adiposo inguinal (iWAT), o tecido adiposo epididimal (eWAT) e o tecido adiposo marrom (BAT) foram pesados. Os valores foram corrigidos de acordo com a massa corporal dos animais. Os dados são mostrados na figura 36.

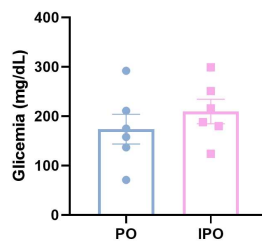


Figura 35. O efeito do óleo de palma natural e interesterificado na glicemia em jejum de camundongos da linhagem C57BL/6 após uma semana de suplementação com óleo de palma natural ou interesterificado. Glicemia (mg/dL) ao final de 12 horas de jejum após intervenção com suplementação oral com óleo de palma natural (PO) e interesterificado (IPO) duas vezes ao dia (200µl/ dia) durante uma semana. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$. $n=6$ animais/grupo. Teste t de *student*.

Não foi encontrada diferença estatística nos níveis de glicemia entre os grupos (Figura 35). Curiosamente, estes dados estão alinhados com resultados anteriores obtidos no nosso grupo. Os animais alimentados durante oito semanas com dieta rica em gordura interesterificada tornaram-se hiperinsulinêmicos, sinalizando um estado de pré-diabetes (dos Santos et al., 2024). Também não foi encontrada diferença estatística em relação ao peso dos tecidos adiposos dos animais ao final do período experimental (Figura 36).

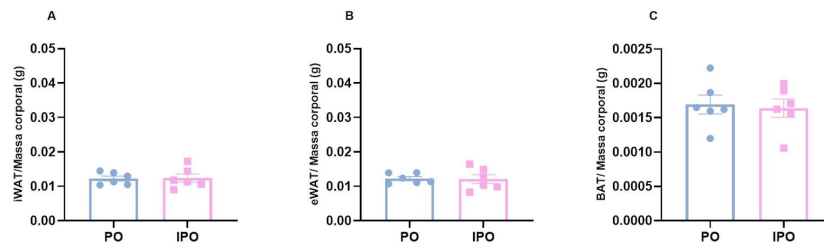


Figura 36. Relação peso do tecido adiposo/massa corporal corporal de camundongos da linhagem C57BL/6 após uma semana de suplementação com óleo de palma natural ou interesterificado. A) Tecido adiposo inguinal (iWAT) (g)/massa corporal (g), B) tecido adiposo epididimal (eWAT) (g)/massa corporal (g), C) tecido adiposo marrom (BAT) (g)/massa corporal (g) de camundongos da linhagem C57BL/6 após intervenção com suplementação oral com óleo de palma natural (PO) e interesterificado (IPO) duas vezes ao dia (200µl/dia) durante uma semana. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$. $n=6$ animais/grupo. Teste t de *student*.

A seguir, investigamos a disponibilidade bioenergética dos tecidos coletados através da atividade mitocondrial, por meio da taxa de consumo de oxigênio (OCR) (**Figura 37**).

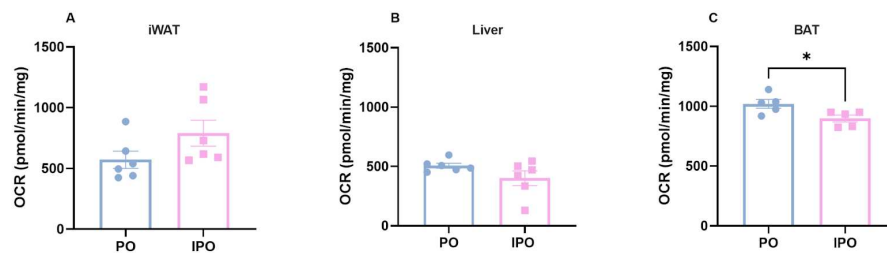


Figura 37. Medições de OCR de tecidos de camundongos da linhagem C57BL/6 após uma semana de suplementação com óleo de palma natural ou interesterificado. Quantificação do consumo de oxigênio (OCR, pmol/min/mg) do A) tecido adiposo inguinal (iWAT), B) fígado, C) tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos da linhagem C57BL/6 após intervenção com suplementação oral com óleo de palma natural (PO) e interesterificado (IPO) duas vezes ao dia (200µl/dia) durante uma semana. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$. $n=6$ animais/grupo. Teste t de *student*.

Conforme mostrado na **Figura 37 C**, verificamos que a capacidade respiratória do tecido adiposo marrom no grupo IPO é menor. Este resultado indica que a capacidade termogênica do BAT no grupo IPO existe em um estado bioenergético relativamente baixo quando comparado com o grupo PO. Para confirmar os dados, este experimento será repetido com novos grupos de animais.

Também investigamos as características químicas de uma população de células da fração vascular estromal do tecido adiposo inguinal de animais que receberam administração oral de óleo interesterificado por gavagem (**Figura 38**). De acordo com os resultados obtidos, o grupo IPO apresentou maior expressão de neutrófilos (**Fig. 38 D**). Seu papel no tecido adiposo está relacionado à inflamação tecidual, associada à obesidade e à resistência à insulina e pode preceder a infiltração de macrófagos (Watanabe et al, 2019; Elgazar-Carmon et al, 2008).

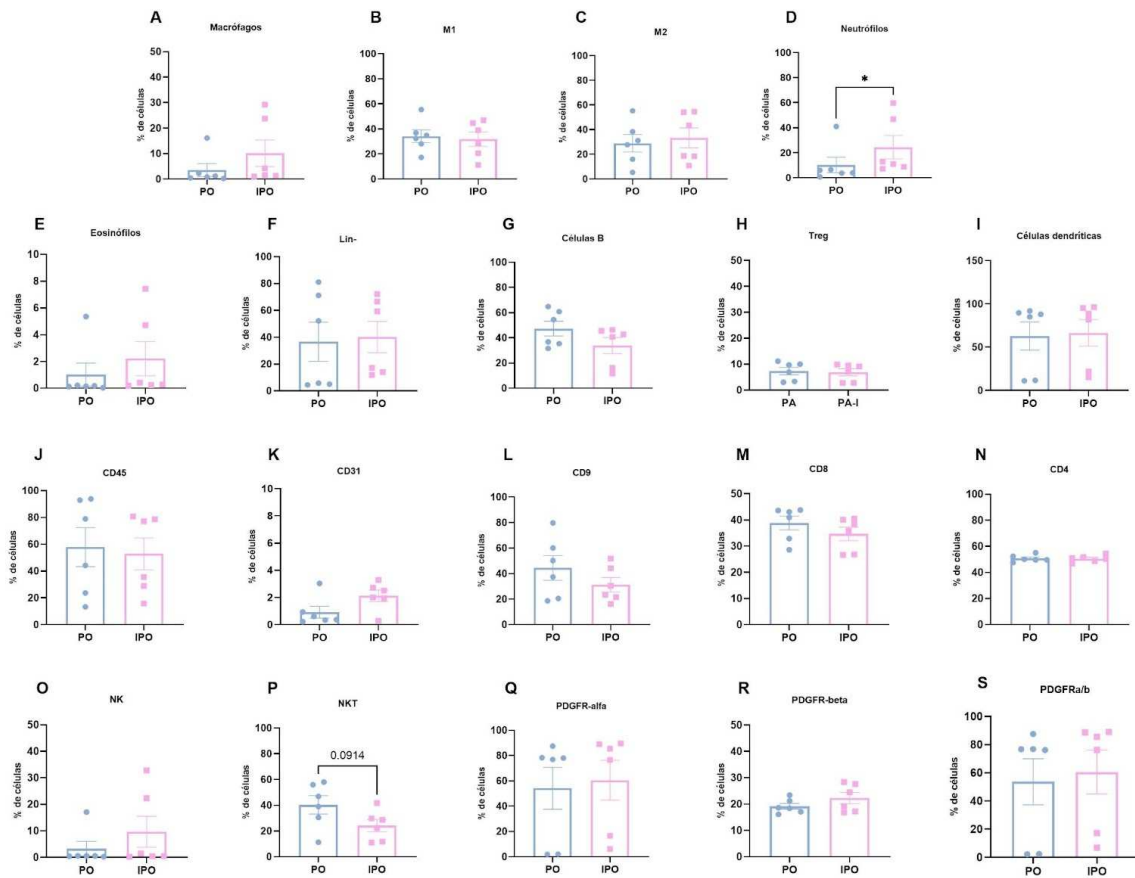


Figura 38. Análise por citometria de fluxo da fração vascular estromal isolada de tecido adiposo inguinal de camundongos da linhagem C57BL/6 após uma semana de suplementação com óleo de palma natural ou interesterificado. Porcentagem (%) de **A)** Macrófagos, **B)** M1, **C)** M2, **D)** Neutrófilos, **E)** Eosinófilos, **F)** Lin-, **G)** Células B, **H)** Treg, **I)** Células dendríticas, **J)** CD45, **K)** CD31, **L)** CD9, **M)** CD8, **N)** CD4, **O)** NK, **P)** NKT, **Q)** PDGFR-alfa, **R)** PDGFR-beta, **S)** PDGFRa/b isoladas da fração vascular estromal (FVS) do tecido adiposo inguinal de camundongos da linhagem C57BL/6 (iWAT) após intervenção com suplementação oral com óleo de palma natural (PO) e interesterificado (IPO) duas vezes ao dia (200µl/dia) durante uma semana. Os valores são mostrados como média ± erro padrão da média. *p < 0,05. n=6 animais/grupo. Teste t de *student*.

Também foi analisada a composição corporal por Ressonância Magnética (RM) dos animais. Os dados foram coletados antes da intervenção com óleos PO e IPO por gavagem oral (dia 0) e ao final do período experimental (dia 7). Os resultados são mostrados abaixo (**Figura 39**).

O grupo IPO apresentou redução de massa magra, fluidos corporais e água em comparação ao grupo PO (**Fig. 39 C, D, E**). Curiosamente, a redução da massa magra observada na **Figura 39 C** está associada aos dados do nosso grupo com animais que receberam dieta composta com gordura interesterificada durante oito semanas, nos quais observamos aumento da massa gorda (dos Santos et al., 2024).

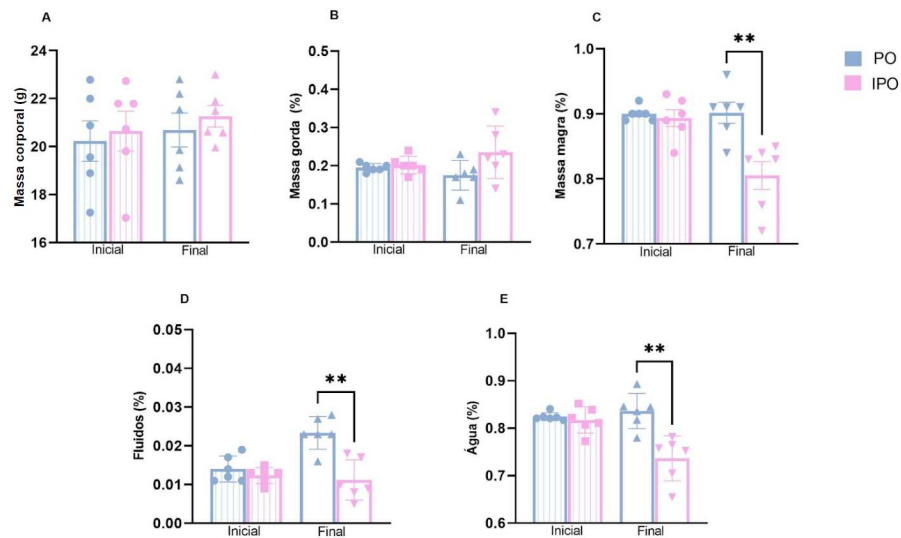


Figura 39. Composição corporal por ressonância magnética de camundongos da linhagem C56BL/6 de camundongos após uma semana de suplementação com óleo de palma natural ou interesterificado. **A)** Massa corporal (g), **B)** Massa gorda (%), **C)** Massa magra (%), **D)** Fluidos (%), **E)** Água (%) de camundongos C57BL/6 por ressonância magnética (MRI) após intervenção por gavagem oral com óleo de palma natural (PO) e interesterificado (IPO) duas vezes ao dia (200µl/dia) durante uma semana. Os valores são mostrados como média ± erro padrão da média. *p < 0,05, **p < 0,005. n=6 animais/grupo. Teste t de *student*.

4.6 Protocolo experimental 6 - Avaliação da sinalização da insulina em explantes hipotalâmicos de camundongos suplementados com óleo de palma natural ou interesterificado

Uma vez que suplementação com óleo de palma interesterificado aconteceu com animais da linhagem C57BL/6 em um biotério de ciclo invertido, buscamos repetir o mesmo protocolo com camundongos *Swiss*, sem inversão de ciclo.

Para isso, novamente realizamos o protocolo de suplementação oral com óleo de palma natural e/ou interesterificado por um período de sete dias, agora em camundongos *Swiss* machos. O delineamento do protocolo experimental está descrito a seguir (**Figura 40**).

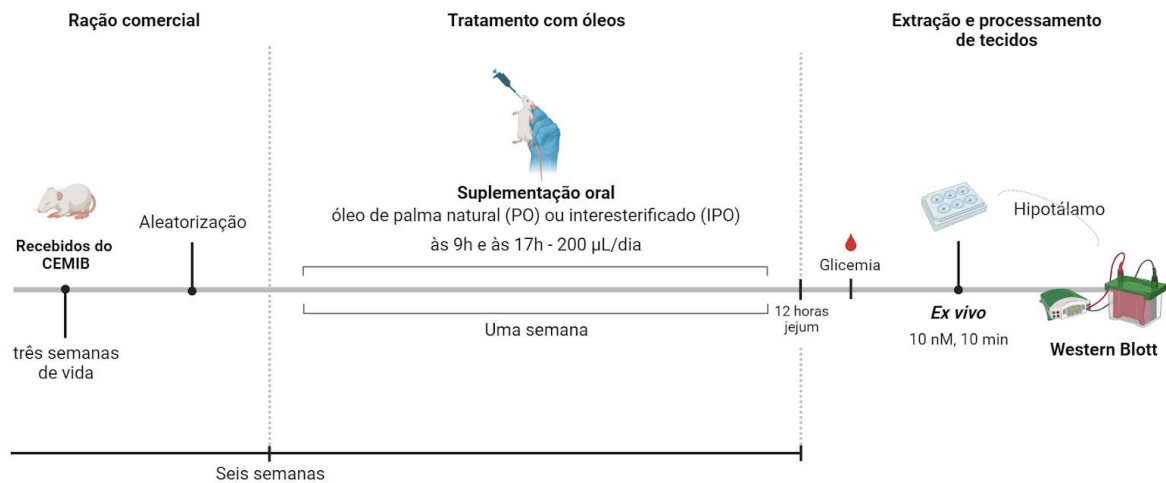


Figura 40. Delineamento referente ao protocolo experimental 6. Os animais foram separados com três semanas de idade em gaiolas individuais, passando a receber dieta controle comercial e água *ad libitum*, até que completassem seis semanas de vida. Ao atingir a idade, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: Suplementação com óleo de palma natural (PO) e suplementação com óleo de palma refinado interesterificado (IPO). A suplementação aconteceu durante uma semana e, os grupos foram mantidos com ração comercial *ad libitum* durante todo o período experimental. A massa corporal foi avaliada no início e no final deste período e a ingestão alimentar foi avaliada diariamente. No sétimo dia, os grupos foram deixados em jejum por 12 horas. Os camundongos ficaram em jejum *overnight* (12h) e foram submetidos ao tratamento *ex vivo* com insulina. O tecido foi tratado por 10 min com insulina (10nM) ou *CO2 independent medium* (veículo). Após o tratamento, o tecido foi armazenado em nitrogênio para posterior análise da expressão proteica da via da insulina. Figura produzida no biorender.com.

Para isso, os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* durante todo o período experimental e divididos aleatoriamente em dois grupos: PO - suplementados com óleo de palma natural e, IPO - suplementados com óleo de palma interesterificado. Os óleos foram administrados duas vezes ao dia (100 µL/vez). Os dados de massa corporal foram coletados antes e ao final do período experimental e os dados de ingestão alimentar foram coletados diariamente (Fig. 41 A, B).

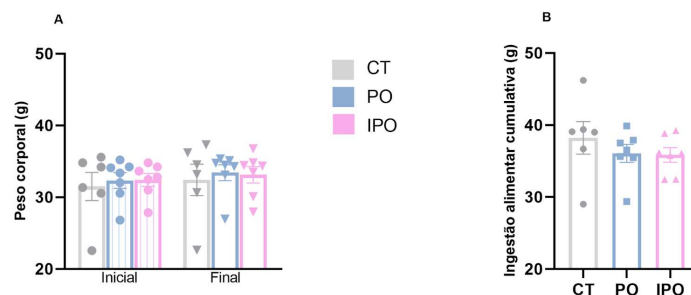


Figura 41. O efeito da suplementação com óleo de palma natural e interesterificado no ganho de massa corporal e ingestão alimentar de camundongos da linhagem Swiss ao final de sete dias. A) Massa corporal (g) e B) Ingestão alimentar cumulativa (g) de camundongos da linhagem Swiss ao final de uma semana de suplementação oral com óleo de palma natural ou interesterificado. CT: Água; PO: Óleo de palma natural; IPO: Óleo de palma interesterificado. Dados apresentados em média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0,05$. $n = 10$ / grupo. *One-Way* ANOVA.

Para determinarmos se o estado metabólico é influenciado pela suplementação do óleo de palma interesterificado, os animais ficaram em jejum por um período de 12 horas e a

glicemia foi analisada. De acordo com o resultado mostrado na **Fig. 42**, não houve diferença na glicemia em jejum entre os grupos.

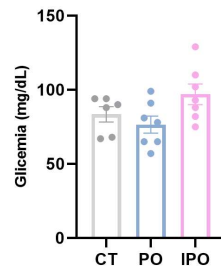


Figura 42. O efeito da suplementação do óleo de palma natural e interesterificado na glicemia em jejum de camundongos da linhagem *Swiss* ao final de sete dias de suplementação com óleo de palma interesterificado. Glicemia (mg/dL) após 12 horas em jejum de camundongos da linhagem *Swiss* ao final de sete dias de suplementação com óleos. CT: Água; PO: Óleo de palma natural; IPO: Óleo de palma interesterificado. Os valores são mostrados como média ± erro padrão da média. n= 6-7 animais/grupo. *One-Way* ANOVA.

Em relação aos tecidos adiposos, não foram encontradas diferenças estatísticas em relação aos pesos (**Fig. 43 A-C**) e a adiposidade (**Figura 43 D**).

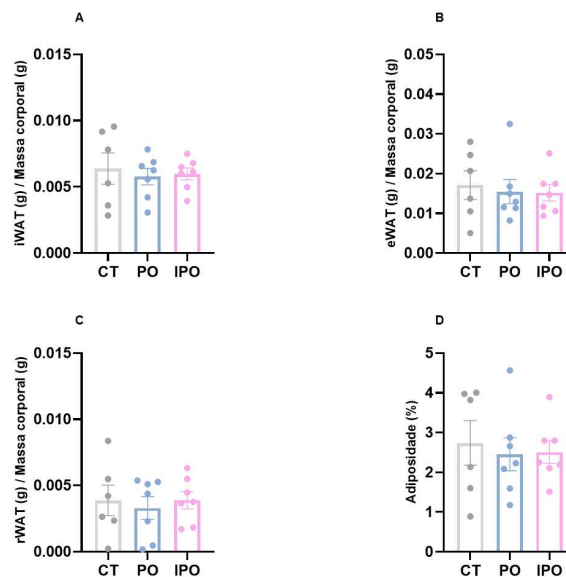


Figura 43. Relação peso do tecido adiposo/massa corporal de camundongos da linhagem *Swiss* ao final de sete dias de suplementação com óleo de palma natural ou interesterificado. **A)** Tecido adiposo inguinal (g) (iWAT)/massa corporal (g), **B)** tecido adiposo epididimal (eWAT) (g)/massa corporal (g), **C)** tecido adiposo retroperitoneal (g) (rWAT)/massa corporal (g), **D)** adiposidade total (%) de camundongos da linhagem *Swiss* após suplementação oral com óleo de palma natural ou interesterificado duas vezes ao dia (200µl/dia) durante uma semana. CT: Água; PO: Óleo de palma natural; IPO: Óleo de palma interesterificado. Os valores são mostrados como média ± erro padrão da média. $p < 0,05$. n=6-7 animais/grupo. *One-Way* ANOVA.

Adicionalmente, buscamos analisar o efeito da interesterificação sobre a sinalização hipotalâmica de insulina através da técnica de *ex vivo*.

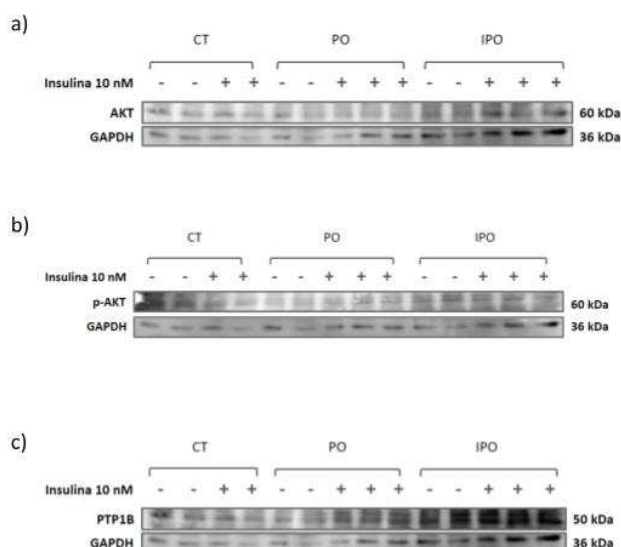


Figura 44. Expressão de proteínas em extrato protéico hipotalâmico obtido após tratamento ex vivo com insulina em camundongos da linhagem *Swiss*. Análise qualitativa por Western Blot da expressão de **A) AKT**, **B) p-AKT** e **C) PTP1B** em extrato protéico hipotalâmico obtido de camundongos da linhagem *Swiss* após suplementação oral com óleo de palma natural ou interesterificado duas vezes ao dia (200µl/dia) durante uma semana. CT: Água; PO: Óleo de palma natural; IPO: Óleo de palma interesterificado. n=2-3 animais/grupo.

De acordo com a **figura 44 C**, os dados qualitativos indicam que o estímulo com insulina em explantes hipotalâmicos no grupo IPO pareceu aumentar a expressão de PTP1B, um regulador negativo da sinalização de insulina.

Em resumo, os resultados significativamente estatísticos obtidos neste trabalho estão presentes na tabela abaixo:

Tabela 4. Resumo dos resultados obtidos em diferentes protocolos experimentais

Protocolo experimental	Tratamento único	1 semana	4 semanas
Dieta		↑ glicemia em jejum em grupos POHF vs IPOHF	IPO vs PO
		↓ ingestão IPO vs PO	Conteúdo transcrito hipotalâmico: ↑ <i>Il-1β</i> ↓ <i>Il-10</i>
Suplementação		↓ JAK2 no IPO-lep icv vs IPO	
		↑ PTP1B no IPO-ins vs IPO ex vivo	
		↓ ingestão alimentar	
		↓ Taxa de consumo de O ₂ do BAT	
		Citometria de fluxo - Fração Vascular Estromal: ↑ Neutrófilos	
ICV		↓ massa magra (%)	
		↓ água (%)	
		↓ fluidos corporais (%)	
	Conteúdo transcrito hipotalâmico: ↑ <i>Cart</i> ↑ <i>F4/80</i> ↑ <i>Beclin</i>	-	
	Citometria de fluxo - Fração Vascular Estromal: (iWAT) ↑ NKT		

5. DISCUSSÃO

A gordura interesterificada tem sido utilizada como uma alternativa a gordura parcialmente hidrogenada (*trans*). No entanto, ainda há uma lacuna importante entre os estudos a respeito dos efeitos da interesterificação de gorduras sobre o metabolismo energético.

Dados prévios do nosso grupo mostram que o consumo por 16 semanas de dieta normocalórica e normolipídica com 10% do VET em lipídios provenientes do óleo de soja interesterificado quando comparado ao consumo do óleo de soja não modificado, promoveu ganho de peso, prejuízo da homeostasia de glicose e aumento significativo na expressão de marcadores de estresse de retículo endoplasmático e citocinas pró-inflamatórias no fígado de ratos *Wistar* (Miyamoto et al., 2018).

Em camundongo *Swiss*, o consumo do óleo de palma interesterificado por oito semanas promoveu alterações na homeostasia glicêmica, aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias no tecido hepático (Miyamoto et al. 2020), no intestino, além do aumento da permeabilidade intestinal (Menta et al., 2022) e aumento da secreção de insulina pelas células β -pancreáticas (dos Santos et al., 2024).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo principal verificar em que momento da exposição à dieta rica em gordura interesterificada as alterações metabólicas e moleculares são desencadeadas. Para responder a esta pergunta foram utilizados vários modelos experimentais e protocolos.

Inicialmente, em animais experimentais em exposição à dieta hiperlipídica, rica em óleo de palma natural (POHF) ou interesterificado (IPOHF) por uma semana, observamos aumento na glicemia de jejum nos dois grupos quando comparados ao período inicial (dia 0). Esse resultado corrobora outros trabalhos publicados que mostram que uma exposição a curto prazo à dieta rica em gordura é capaz de levar ao ganho de massa corporal e alterações metabólicas importantes (Thaler et al., 2012; Valdearcos et al., 2014).

Por outro lado, nos animais expostos à dieta normocalórica e normolipídica, composta com óleo de palma interesterificada (IPO) por uma semana, foi observado redução na ingestão de dieta comparado ao óleo de palma natural (PO), porém não foi observada diferença na massa corporal. A redução na ingestão pode ser atribuída à menor palatabilidade e/ou ao tempo de exposição a uma dieta com consistência e composição diferentes da dieta comercial que estavam expostos previamente. Porém, essa última hipótese é menos provável uma vez que as modificações aconteceram para os dois grupos experimentais. Além disso, neste

mesmo grupo experimental, quando estimulado com leptina via icv (vs IPO não estimulado), foi observado diminuição no conteúdo da JAK2, mostrando comprometimento precoce neste marcador da via de sinalização de leptina. Porém, não foi observada diferença significativa na ingestão de dieta dos animais estimulados com leptina (ip ou icv) em nenhum dos tempos avaliados. Desta maneira, passamos a estudar os efeitos da interesterificação na via de sinalização da insulina, uma vez que leptina e insulina são hormônios com funções complementares no controle central da ingestão alimentar (Thon, Hosoi, Ozawa, 2016). Os dados serão discutidos mais adiante nesta seção.

Ao estendermos o protocolo experimental de exposição às dietas por quatro semanas, observamos aumento no conteúdo transcrito hipotalâmico de *Il-1 β* , uma citocina pró-inflamatória e redução de *Il-10*, anti-inflamatória no grupo IPO comparado ao PO. O aumento de marcadores inflamatórios também foi observado com exposição a gordura de palma interesterificada por 8 semanas em outros tecidos como fígado, intestino e pâncreas de camundongos (Miyamoto et al., 2020; Menta et al., 2022, Dos Santos et al., 2024). Esses resultados mostram que a ativação de vias inflamatórias em resposta a IPO, mesmo em uma dieta normocalórica, pode acontecer mais precocemente em tecidos com funções metabólicas importantes.

Após a exposição às dietas, optamos por estudar o efeito metabólico das gorduras isoladamente, por meio da suplementação de animais com óleo de palma natural ou interesterificado por uma semana. Similar ao observado em resposta à exposição à dieta, a suplementação com óleo de palma interesterificado (IPO) levou a redução da ingestão alimentar em comparação aos animais suplementados com óleo de palma natural (PO). Embora a massa corporal seja similar entre os grupos, observamos no grupo IPO, comparado ao PO, redução da porcentagem de massa magra, água, fluidos corporais e da taxa de consumo de oxigênio do tecido adiposo marrom, responsável pela termogênese corporal. Ainda, ao analisarmos o fenótipo das células da fração vascular estromal do tecido adiposo inguinal deste grupo, encontramos um aumento da expressão de neutrófilos, células responsáveis por orquestrar o primeiro estágio de uma inflamação aguda.

Ainda, optamos pela utilização deste protocolo de suplementação para os experimentos com estímulo com insulina *ex vivo*, onde o tecido é extraído e imediatamente transferido para uma placa que mimetiza o ambiente fisiológico e então recebe o estímulo com insulina. Nossos resultados parciais mostram que no grupo IPO (comparado ao PO) houve aumento no conteúdo proteico de PTP1B, uma fosfatase importante na regulação negativa da sinalização de insulina (Teimouri et al., 2022).

Previamente demonstramos a análise química das fontes de lipídios dietéticos utilizadas neste estudo (Miyamoto 2020; Dos Santos, 2024) e, após o processo de interesterificação química a composição do perfil de ácidos graxos do óleo de palma (PO) e do óleo de palma interesterificado (IPO) é mantida, porém ocorre alteração da estrutura do molécula de TAGs, com aumento do teor de ácidos graxos saturados na posição sn-2 na fração interesterificada (IPO), comparado com o óleo natural (PO). Normalmente as gorduras alimentares derivadas de plantas (como os óleos) possuem menor quantidade de SFA na posição sn-2, e essa modificação estereoespecífica resulta em alterações nas características físico-químicas do produto final. Assim, nós testamos o efeito do 2-palmitoilglicerol (PG), um monoacilglicerol metabólito da gordura interesterificada, contendo um palmitato na posição central do glicerol (sn-2), na sinalização hipotalâmica por meio da injeção intracerebroventricular desta molécula.

Nossos dados mostram que, após 16 horas de jejum, o tratamento icv com PG foi capaz de aumentar a expressão do conteúdo transcrito de *Cart*, *F4/80* e *Beclin* no hipotálamo. Além disso, o tratamento hipotalâmico icv com 2-palmitoilglicerol refletiu em mudanças discretas, porém significativas, no fenótipo do tecido adiposo inguinal (iWAT), medidas por citometria de fluxo. Animais do grupo PG apresentaram um aumento da expressão de células NKT, conhecidas por serem ativadas durante uma variedade de infecções e condições inflamatórias.

Esses resultados são ainda parciais, porém são evidências importantes sobre a ação central de um metabólito da gordura interesterificada (PG) em curto prazo, com ativação de marcadores de dano celular no tecido hipotalâmico e modulando o fenótipo de células de defesa do tecido adiposo branco dos animais.

Assim, a ingestão a curto e médio prazos da gordura interesterificada ou suplementação com PO ou IPO parecem não ser suficientes para causar grandes impactos no metabolismo energético e glicêmico dos animais. Porém, nossos dados parciais sugerem que a gordura interesterificada pode levar a alterações moleculares que podem estar relacionadas ao prejuízo da homeostase energética e com os danos observados posteriormente, em exposições mais crônicas a dietas normolipídicas e normocalóricas ricas em gordura interesterificada. Dados do nosso grupo mostram que os efeitos sobre o perfil metabólico de roedores são evidentes a partir de oito semanas de dieta com gordura interesterificada (Miyamoto et al, 2018, 2020; Menta et al, 2022; Dos Santos et al, 2024).

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a ingestão a curto e médio prazo de gordura interesterificada ou suplementação com óleos parecem não ser suficientes para causar grandes impactos no metabolismo energético e glicêmico dos animais. Porém, mesmo que os efeitos observados tenham sido discretos, nossos dados parciais sugerem que a gordura interesterificada pode levar a alterações moleculares que podem estar relacionadas ao prejuízo da homeostase energética e com os danos observados posteriormente, em exposições mais crônicas a dietas normolipídicas e normocalóricas ricas em gordura interesterificada.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE K. T. et al. Intake of trans fatty acid–rich hydrogenated fat during pregnancy and lactation inhibits the hypophagic effect of central insulin in the adult offspring. **Nutrition**, v. 22, n. 7–8, p. 820-829, 2006.
- ANDER, B. P. et al. Polyunsaturated fatty acids and their effects on cardiovascular disease. **Experimental and clinical cardiology**, v. 8, n. 4, p. 164-72, 2003.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 332, de 23 de dezembro de 2019. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-332-de-23-de-dezembro-de-2019-235332281>>.
- BISPO, K. P. et al. Trans and interesterified fat and palm oil during the pregnancy and lactation period inhibit the central anorexigenic action of insulin in adult male rat offspring. **J Physiol Sci.**, v. 65, p. 131–138, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. Vigitel Brasil 2020: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2021. 1a edição, 124 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Vigitel Brasil 2010: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2011. 152 p.
- BRAY, G. A. et al. The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation. **J Nutr.**, v. 132, n. 9, p. 2488-91, 2002.
- CHEN, W., BALLAND, E., COWLEY, M. A. Hypothalamic Insulin Resistance in Obesity: Effects on Glucose Homeostasis. **Neuroendocrinology**, v. 104, n. 4, p. 364-381, 2017.
- D'AVILA, L. F. et al. Toxicological aspects of interesterified fat: Brain damages in rats. **Toxicology Letters**, v. 276, p. 122–128, 2017.
- DE SOUZA C. T. et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**. v. 146, n. 10, p. 4192-9, 2005.
- DE SOUZA, R. J. et al. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. **BMJ**, v. 351:h3978, 2015.
- dos SANTOS, R. M. et al. Interesterified palm oil promotes insulin resistance and altered insulin secretion and signaling in Swiss mice. **Food Research International**, v. 177, n. 113850, 2024.
- EL-HASCHIMI, K. et al. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. **J. Clin. Invest**, v. 105, p. 1827–1832, 2000.
- GARCIA-GALIANO, D. et al. PI3K α inactivation in leptin receptor cells increases leptin sensitivity but disrupts growth and reproduction. **JCI Insight**, v. 2, n. 23, p. 96728, 2017.
- GIT, K. C. G., ADAN, R. A. H. Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation. **Obes Rev**, v.16, p. 207–224, 2015.

GRUNDY, S. M. Lipids: Cholesterol, Factors Determining Levels in Blood. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, 2002.

HRUBY, A.; HU, F. B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. **Farmacoeconomia**, v. 33, n. 7, p. 673-689, 2015.

HU, F.; VAN DAM, R.; LIU, S. Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. **Diabetologia**, v. 44, p. 805-817, 2001.

IQBAL, M. P. Trans fatty acids - A risk factor for cardiovascular disease. **Pak J Med Sci**, v. 30, n. 1, p. 194-7, 2014.

JI, Y. et al. Activation of Natural Killer T Cells Promotes M2 Macrophage Polarization in Adipose Tissue and Improves Systemic Glucose Tolerance via Interleukin-4 (IL-4)/STAT6 Protein Signaling Axis in Obesity. **Metabolism**, v. 287, n. 17, p. 13561-13571, 2012.

JIAO, J. et al. Dietary fats and mortality among patients with type 2 diabetes: Analysis in two population based cohort studies. **BMJ**, v. 366, p. 8-11, 2019.

KENNEDY, A. et al. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. **J Nutr.**, v. 139, n. 1, p. 1-4, 2009.

KIEN, C. L., BUNN, J. Y., UGRASBUL, F. Increasing dietary palmitic acid decreases fat oxidation and daily energy expenditure. **Am J Clin Nutr.** v. 82, n. 2, p. 320-6, 2005.

KÖNNER, A. C., KLÖCKENER, T., BRÜNING, J. C. Control of energy homeostasis by insulin and leptin: targeting the arcuate nucleus and beyond. **Physiol Behav.**, v. 97, n. 5, p. 632-8, 2009.

KOOPMAN, R. J. et al. Obesity and metabolic disease. **Prim Care**, v. 36, n. 2, p. 257-70, 2009.

KOPPE, S. W. et al. Trans fat feeding results in higher serum alanine aminotransferase and increased insulin resistance compared with a standard murine high-fat diet. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** v. 297, n. 2, p. 378-84, 2009.

KWON, O., KIM, K. W., KIM, M. Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 73, p. 1457-1477, 2016.

MAGRI, T. P. R. et al. Interesterified fat or palm oil as substitutes for partially hydrogenated fat in maternal diet can predispose obesity in adult male offspring. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 5, p. 904-910, 2015.

MARCHAND, V. Trans fats: What physicians should know. **Paediatr Child Health**, v. 15, p. 373-378, 2010.

MENDIS, S.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; RATNAYAKE, W. M. N. Fatty acid profile of Canadian dairy products with special attention to the trans-octadecenoic acid and conjugated linoleic acid isomers. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 4, p. 811-819, 2008.

MENSINK, R. P. Effects of saturated fatty acids on serum lipids and lipoproteins: a systematic review and regression analysis. Geneva: **World Health Organization**; 2016.

MENTA, P. L. R. et al. Interesterified palm oil increases intestinal permeability, promotes bacterial translocation, alters inflammatory parameters and tight-junction protein gene expression in Swiss mice. **Food Research International**, v. 151, 2022.

- MILLS, C. E.; HALL, W. L.; BERRY, S. What are interesterified fats and should we be worried about them in our diet?. **Nutr Bull**, v. 42, n. 2, p. 153-158, 2017.
- MIYAMOTO, J. E. et al. Interesterified palm oil impairs glucose homeostasis and induces deleterious effects in liver of Swiss mice. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v. 112, p. 154350, 2020.
- MIYAMOTO, J. E. et al. Interesterified soybean oil promotes weight gain, impaired glucose tolerance and increased liver cellular stress markers. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 59, p. 153-159, 2018.
- MONTEIRO, C. A. et al. The un Decade of Nutrition, the NOVA food classification and the trouble with ultra-processing. **Public Health. Nutr.**; v. 21, n.1, p.5-17. 2018.
- MORRISON, C. D. Leptin resistance and the response to positive energy balance. **Physiol Behav.**, v. 94, n. 5, p. 660-3, 2008.
- MOZAFFARIAN, D., ARO, A.; WILLETT, W. Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence. **Eur J Clin Nutr**, v. 63, p. 5-21, 2009.
- PARK, H. K., AHIMA, R. S. Leptin signaling. **F1000 Prime Rep**, v. 6, n. 73, 2014.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 6. ed. Sydney: **Academic Press**, 2007. 456 p.
- PÉREZ-PÉREZ, A. et al. Role of Leptin in Inflammation and Vice Versa. **Int J Mol Sci.**, v. 21, n. 16, 2020.
- PIERS, L. S. et al. Substitution of saturated with monounsaturated fat in a 4-week diet affects body weight and composition of overweight and obese men. **British Journal of Nutrition.**, v. 90, n.3, p.717-727, 2003.
- PIMENTEL, G. D, et al. Intake of trans fatty acids during gestation and lactation leads to hypothalamic inflammation via TLR4/NFκBp65 signaling in adult offspring. **J Nutr Biochem.**, v. 23, n. 3, p. 265-71, 2012.
- PRENTICE, A. M. Overeating: the health risks. **Obes Res.**, v. 9, n. 4, p. 234-238, 2001.
- REENA, M. B.; GOWDA, L. R.; LOKESH, B. R. Enhanced hypocholesterolemic effects of interesterified oils are mediated by upregulating LDL receptor and cholesterol 7- α -hydroxylase gene expression in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 1, p. 24-30, 2011.
- SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, 414(6865): 799-806, 2001.
- SANTOS, R. D. et al. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 100, n. 1, n.3, p. 1-40, 2013.
- SCHERER, T., SAKAMOTO, K., BUETTNER, C. Brain insulin signalling in metabolic homeostasis and disease. **Nat Rev Endocrinol.**, v. 17, n. 8, p. 468-483, 2021.
- SOUZA, A. C. P. et al. Short-Term High-Fat Diet Consumption Reduces Hypothalamic Expression of the Nicotinic Acetylcholine Receptor $\alpha 7$ Subunit ($\alpha 7$ nAChR) and Affects the Anti-inflammatory Response in a Mouse Model of Sepsis. **Front Immunol.**, v. 10, p. 565, 2019.
- SUNDRAM, K.; KARUPAIAH, T.; HAYES, K. C. Stearic acid-rich interesterified fat and trans-rich fat raise the LDL/HDL ratio and plasma glucose relative to palm olein in humans. **Nutr Metab (Lond)**, v. 4, p. 3, 2007.

- TEIMOURI, M. et al. The role of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus and its complications. **J Physiol Biochem**, p. 307–322, 2022.
- THALER, J. P. et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 122, n. 1, p. 153-162, 3 jan. 2012.
- THON M., HOSOI T., OZAWA K. Possible Integrative Actions of Leptin and Insulin Signaling in the Hypothalamus Targeting Energy Homeostasis. **Front Endocrinol (Lausanne)**.7:138, 2016.
- TIMPER, K., BRÜNING, J. C. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. **Dis Model Mech.**, v. 10, n. 6, p. 679-689, 2017.
- TOKARZ, V. L.; MACDONALD, P. E.; KLIP, A. The cell biology of systemic insulin function. **Journal of Cell Biology**, v. 217, n. 7, p. 1–17, 2018.
- VALDEARCOS et al., Microglia Dictate the Impact of Saturated Fat Consumption on Hypothalamic Inflammation and Neuronal Function. **Cell Reports**, p. 2124–2138, 2014.
- VALDEARCOS, M. et al. Microglial Inflammatory Signaling Orchestrates the Hypothalamic Immune Response to Dietary Excess and Mediates Obesity Susceptibility. **Cell Metab.** v. 26, n. 1, p.185-197, 2017.
- VALDEARCOS, M., XU, A. W., KOLIWAD, S. K. Hypothalamic Inflammation in the Control of Metabolic Function. **Annual Review of Physiology**, v. 77, p. 131-160, 2015.
- VAN DE SANDE-LEE, S.; VELLOSO, L. A. Disfunção hipotalâmica na obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 56, n. 6, p. 341-350, 2012.
- VELLOSO, L. A. Controle hipotalâmico da fome e da termogênese: implicações no desenvolvimento da obesidade. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 50, n. 2, 2006.
- WANDERS, A. J.; ZOCK, P. L.; BROUWER, I. A. Trans Fat Intake and Its Dietary Sources in General Populations Worldwide: A Systematic Review. **Nutrients**, v. 9, n. 8, p. 840, 2017.
- WANG, D. D. et al. Association of specific dietary fats with total and cause-specific mortality. **JAMA Intern. Med.**, v. 176, p. 1134–1145, 2016.
- WATERSON M. J., HORVATH, T. L. Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. **Cell Metab.**, v. 22, n. 6, p. 962-70, 2015.
- SOUZA, A. C. P. et al. Short-Term High-Fat Diet Consumption Reduces Hypothalamic Expression of the Nicotinic Acetylcholine Receptor $\alpha 7$ Subunit ($\alpha 7nAChR$) and Affects the Anti-inflammatory Response in a Mouse Model of Sepsis. **Front Immunol.**, v. 10, p. 565, 2019.
- SUNDRAM, K.; KARUPAIAH, T.; HAYES, K. C. Stearic acid-rich interesterified fat and trans-rich fat raise the LDL/HDL ratio and plasma glucose relative to palm olein in humans. **Nutr Metab (Lond)**, v. 4, p. 3, 2007.
- TEIMOURI, M. et al. The role of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus and its complications. **J Physiol Biochem**, p. 307–322, 2022.
- THON M., HOSOI T., OZAWA K. Possible Integrative Actions of Leptin and Insulin Signaling in the Hypothalamus Targeting Energy Homeostasis. **Front Endocrinol (Lausanne)**.7:138, 2016.

TIMPER, K., BRÜNING, J. C. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. **Dis Model Mech.**, v. 10, n. 6, p. 679-689, 2017.

TOKARZ, V. L.; MACDONALD, P. E.; KLIP, A. The cell biology of systemic insulin function. **Journal of Cell Biology**, v. 217, n. 7, p. 1–17, 2018.

WHITE, P. A. S. et al. Model of high-fat diet-induced obesity associated to insulin resistance and glucose intolerance. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, 57/5, 2013.

WOODS, S. C. et al. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. **J Nutr** 133, 1081–1087, 2003.

ANEXOS

Anexo I

CERTIFICADO CEUA nº 130/2021



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação dos efeitos da gordura interesterificada em mecanismos moleculares envolvidos no controle central da homeostasia energética**, registrada com o nº **5763-1/2021**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Marciane Milanski e Beatriz Piatezzi Siqueira**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **20/05/2021**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/09/2021 a 28/10/2023
Vigência da autorização para manipulação animal:	20/05/2021 a 28/10/2023
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	24
Idade/Peso:	3.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	24 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	24
Idade/Peso:	3.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	24 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	24
Idade/Peso:	3.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	24 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	10
Idade/Peso:	3.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	10
Idade/Peso:	3.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Machos

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
 Informar código 6FE2605E CA054443 ACBF9937 CD716DC0

CERTIFICADO CEUA nº 130/2021

Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério do Laboratório de Distúrbios do Metabolismo, LabDmE/FCA/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 23 de junho de 2021.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Rosangela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, COORDENADOR CEUA/UNICAMP**, em 23/06/2021, às 19:06 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**, em 24/06/2021, às 09:59 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
6FE2605E CA054443 ACBF9937 CD716DC0



Anexo II



Montefiore

Animal Purchase Request Form

Submit directly to IAS Office, Van Etten, Rm. 460 or by Fax: (718) 862-1886 / (718) 862-1887*

*call (718) 839-7133 if problems with FAX

NOTE: Incomplete and incorrect information, e.g. invalid Protocol or Charge Numbers, will delay your order and animals may not arrive by time requested. Although the IAS will make a reasonable effort to contact you, provision of correct information is the responsibility of the requestor (person placing the order).

Date Requested: 08/02/2021		Time Requested: 12pm		Date Animals Needed by: ASAP	
Faculty Principal Investigator (Person who will own and use these animals):			Rajat Singh		
PI's Animal Use Protocol No. (Protocol under which animals will be used):			00001051		
Person / Account Paying for Animal Purchases and Housing (Please fill in ALL information below)					
PURCHASE:	P.I. Name: Rajat Singh	Charge/Index #: 311701	Phone: 7184303254		
HOUSING:	P.I. Name: Rajat Singh	Charge/Index #: 311701	Phone: 7184303254		
Requestor* Information (Please fill in all information below)					
*NOTE: Only individuals who are listed on the APPROVED ANIMAL USE PROTOCOL (above) may place orders for animals					
Name of Requestor: Rajat Singh			Phone: 7184303254		
E-mail address: rajat.singh@einsteinmed.org			Cell # (in case of an emergency): 7183001486		

	# of animals?	Animal type (mouse, rat.)	Strain or Stock	Gender	Weight range, age, other specifications	Vendor
1	100	mouse	000664 Black 6	male	3-4 months	Jackson Lab.
2						
3						
4						
5						

Housing Location (Into what location should these animals be unpacked):

Building:	☐ Ullmann	☒ Chanin	☐ Kennedy	☐ Price Center
Room #:	Room #:	Room #: 611	Room #:	Room #:
Room Type:	☒ Barrier	☐ Conventional "dirty room"	☐ Does not matter	

Special Handling on Arrival:

☒	PI staff will unpack into animal room (special feed, water or caging to be provided by PI staff on arrival). Please call: Name: Rajat Singh Phone # (call upon arrival): 7184303254
☐	"DO NOT UNPACK" (DNU)* order. Phone # (call upon arrival):
*Animals from "DNU" orders must be used terminally on the day of arrival.	

Hazards in Animals? Will any of these animals be exposed to any of the following:

Biological Hazards (infectious agents, tumors, human tissue)	☒ NO	☐ YES
Chemical Hazards (carcinogens, chemotherapy, toxins)	☒ NO	☐ YES
Physical Hazards (radioisotopes, radiation, laser)	☒ NO	☐ YES
Other Hazard (please identify)	☒ NO	☐ YES

FOR OFFICE USE ONLY (TO BE COMPLETED BY IAS)

Date ordered:	Date expected:	Order status:
Spoke to:	Order #:	