



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Aplicadas

TAMIRES DOS SANTOS

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE COCO
NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E METABOLISMO LIPÍDICO
EM FÍGADO DE CAMUNDONGOS**

**EFFECTS OF COCONUT OIL SUPPLEMENTATION
ON INFLAMMATORY RESPONSE AND LIPID METABOLISM IN
MOUSE LIVER**

LIMEIRA

2019

TAMIRES DOS SANTOS

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE COCO
NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E METABOLISMO LIPÍDICO EM
FÍGADO DE CAMUNDONGOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni

Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Souza Torsoni

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA TAMIRES DOS SANTOS E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCIO
ALBERTO TORSONI.**

LIMEIRA

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

Santos, Tamires dos, 1987-
Sa59e Efeitos da suplementação com óleo de coco na resposta inflamatória e metabolismo lipídico em fígado de camundongos / Tamires dos Santos. – Limeira, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Marcio Alberto Torsoni.
Coorientador: Adriana Souza Torsoni.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Inflamação. 2. Óleo de coco. 3. Fígado. I. Torsoni, Marcio Alberto, 1967-. II. Torsoni, Adriana Souza, 1973-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of coconut oil supplementation on inflammatory response and lipid metabolism in mouse liver

Palavras-chave em inglês:

Inflammation

Coconut oil

Liver

Área de concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

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

Banca examinadora:

Marcio Alberto Torsoni [Orientador]

Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fuzaro

Patricia Aline Boer

Karen Cristiane Martinez de Moraes

Patrícia Cristina Lisboa da Silva

Data de defesa: 13-11-2019

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

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

- ORCID do autor: 0000-0002-4489-4777

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2894018667756340>

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Tamires dos Santos

Título: Efeitos da suplementação com óleo de coco na resposta inflamatória e metabolismo lipídico em fígado de camundongos.

Área de Concentração: Metabolismo e Biologia Molecular.

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA/Unicamp.

Data da Defesa: Limeira-SP, 13 de Novembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni (orientador)
Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA/Unicamp

Profa. Dra. Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro (membro)
Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA/Unicamp

Profa. Dra. Patricia Aline Boer (membro externo)
Faculdade de Ciências Médicas – FCM/Unicamp

Profa. Dra. Karen Cristiane Martinez de Moraes (membro externo)
Universidade Estadual Paulista – UNESP/Rio Claro

Profa. Dra. Patrícia Cristina Lisboa da Silva (membro externo)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ/Rio de Janeiro

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós Graduação em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo da Faculdade de Ciências Aplicadas.

DEDICATÓRIA

Ao meu amado irmão

Fabio Alexandre Bacciotti Finotti (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni, pela paciência, incentivo, por acreditar em minha capacidade e pelos conselhos que contribuíram para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

À Profa. Dra. Adriana Souza Torsoni, por seus ensinamentos, ao longo da supervisão das minhas atividades.

À Profa. Dra. Marciane Milanski Ferreira pelo convívio e apoio.

À Profa. Dra. Letícia Martins Ignácio de Souza por sua colaboração nos cálculos nutricionais das suplementações usadas.

À Profa. Dra. Patrícia Aline Boer por compor a banca examinadora deste trabalho, que tanto contribuiu anteriormente com a minha dissertação de Mestrado.

À Profa. Dra. Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro, pela contribuição ao trabalho no Exame de Qualificação e por sua presença na banca de Defesa.

Às Professoras Dra. Karen Cristiane Martinez de Moraes e Dra. Patrícia Cristina Lisboa pela disponibilidade em compor essa banca avaliadora.

Às parceiras de trabalho e sobretudo amigas Camilla Mendes de Souza e Suleyma de Oliveira Costa que em muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Às doutorandas Thaís Camargo e Laís Simino pela colaboração com as análises de metabolismo lipídico.

À doutoranda Alana Carolina Costa Vêras, que dividiu comigo todo o período experimental com os animais.

À todos os alunos do Laboratório de Distúrbios do Metabolismo e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo.

Um agradecimento especial ao meu marido Luís Henrique Silva Martins Mendes, que me ajudou na resolução dos problemas que apareceram durante esses quatro anos com muita compreensão, paciência, companheirismo e amor.

Também agradeço à minha família, pelos ensinamentos de vida, como comprometimento, dedicação, disciplina e esforço, sem os quais eu não teria chegado até aqui.

Enfim, agradeço ao mundo por mudar as coisas, por nunca fazê-las serem da mesma forma, pois assim temos o que pesquisar, o que descobrir, o que fazer, e através disto consegui concluir a minha Tese e o meu Doutorado.

EPIÍGRAFE

“Tudo o que temos de decidir é o que fazer com o tempo que nos é dado!”

Gandalf – O Senhor dos Anéis (J.R.R. Tolkien)

RESUMO

Nos últimos anos houve aumento da prevalência de obesidade no mundo todo, no Brasil 19% da população é obesa e 54% apresenta sobrepeso. Atualmente na mídia destaca-se o consumo de óleo de coco como recurso no tratamento dessa doença. A gordura do óleo de coco consiste principalmente em ácidos graxos saturados, que no passado foram associados à risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, fato que levou ao aumento do consumo de óleos vegetais, como o óleo de soja. Camundongos Swiss machos (5 semanas de idade) foram divididos aleatoriamente em 5 grupos e receberam diariamente por via oral 100µL de água (Controle - CO) ou foram suplementados com 100µL e 300 µL de óleo de coco (OC100), (OC300), 100µL e 300µL de óleo de soja (OS100), (OS300) durante 8 semanas. A suplementação com todos os óleos levou ao aumento dos níveis séricos de colesterol total, triglicérides e da proteína TNF- α , mas não alterou o conteúdo proteico de GPR78 e LC3II no fígado. O consumo de óleo de coco em ambos os volumes elevou os seguintes parâmetros: peso corporal, adiposidade epididimal, níveis séricos de AST, colesterol total hepático, expressão gênica de CX3CL1 e TNF- α . O grupo OC300 apresentou aumento hepático de triglicérides, células F4/80 +, expressão gênica de GPAM, HMGCR, CXCL2 e níveis proteicos de pNFkB e pSTAT3. O grupo OC100 apresentou aumento da proteína TNF- α . Os animais do grupo OS100 demonstraram intolerância à glicose, enquanto os do grupo OC300 apresentaram maior sensibilidade à insulina, nenhum grupo teve alterações na glicemia de jejum. Ao tratar células Hepa-1c1c7 por 24 horas com o soro dos animais suplementados observamos aumento na expressão gênica de TNF- α e diminuição do gene da IL10 no grupo OC100. Nós fornecemos evidências de que a suplementação com óleo de coco, ao aumentar o peso e a adiposidade corporal e alterar o metabolismo lipídico, desencadeou um processo inflamatório no fígado, semelhante à inflamação de baixo grau causada pela obesidade.

Palavras-chave: Inflamação, óleo de coco, fígado.

ABSTRACT

In recent years, there has been an increase in the prevalence of obesity worldwide; in Brazil 19% of the population is obese and 54% overweight. Currently, the media shows the consumption of coconut oil as a resource in the treatment of this disease. Coconut oil fat consists mainly of saturated fatty acids, which in the past have been associated with the risk of developing cardiovascular disease, which has caused an increase in the consumption of vegetable oils such as soybean oil. Swiss mice (5 weeks of age) are randomly divided into 5 groups and receive daily 100 μ L of water (Control - CO) or supplemented with 100 μ L and 300 μ L of coconut oil (OC100), (OC300), 100 μ L and 300 μ L of soybean oil (OS100), (OS300) for 8 weeks. Supplementation with all oils leads to increased serum cholesterol, triglyceride and TNF- α protein levels, but does not alter the protein content of GPR78 and LC3II in the liver. Coconut oil consumption in both volumes increases the following parameters: body weight, epididymal adiposity, serum AST levels, total liver cholesterol, CX3CL1 and TNF- α gene expression. The OC300 group presented hepatic increase of triglycerides, F4/80 + cells, GPAM, HMGCR, CXCL2 gene expression and protein levels of pNFkB and pSTAT3. The OC100 group showed increased TNF- α protein. Animals from group OS100 showed glucose intolerance, while group OC300 had higher insulin sensitivity; neither group had alterations in fasting glucose. When treating cells Hepa-1c1c7 for 24 hours within serum from supplemented animals, we observed increase gene expression of TNF- α and decrease gene expression of IL10 in the group OC100. We provide evidence that supplementation with coconut oil, by increasing body weight and adiposity and change lipid metabolism has triggered an inflammatory process in the liver, similar to the low-grade inflammation caused by obesity.

Key words: Inflammation, coconut oil, liver.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Parâmetros zoométricos de camundongos suplementados por 8 semanas com óleo de coco ou óleo de soja. A e B. Ganho de peso. C. Adiposidade epididimal. D. Adiposidade retroperitoneal. E. Índice hepatossomático. F. Lipídios nas fezes. Valores representados como média $\pm$ erro padrão (SEM); *Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao CO. $n = 10$ animais por grupo (A, B e F), $n = 7$ animais por grupo (C,D,E).....44
- Figura 2.** Níveis hepáticos de triglicérides e colesterol total. A. triglicérides hepático. B. Colesterol hepático total. Valores representados como média $\pm$ erro padrão (SEM); *Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo CO; # Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos OC100 e OC300; & Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos OC100 e OS100; \$ Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos OC300 e OS300. $n = 4-6$ animais por grupo.....47
- Figura 3.** Efeitos da suplementação com óleo de coco ou óleo de soja na homeostase glicêmica. A. Glicemia em jejum após 4 e 8 semanas de suplementação. B. Teste de tolerância à glicose após 8 semanas de suplementação. C. Teste de tolerância à insulina após 8 semanas de suplementação. Valores representados como média $\pm$ erro padrão (SEM); *Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao CO. $n = 6$ animais por grupo.50
- Figura 4.** Efeitos da suplementação com óleo de coco (OC100 e OC300) ou óleo de soja (OS100 e OS300) na inflamação hepática. A. Imagens representativas de imunomarcagem para células F4/80⁺ (vermelho) e núcleos com DAPI (azul). B. Quantificação do número de células F4/80⁺. Valores representados como média $\pm$ erro padrão (SEM); *Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao CO; # Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos OC100 e OC300. $n = 3$ cortes por animal/3 animais por grupo.55
- Figura 5.** Efeitos da suplementação com óleo de coco ou óleo de soja na expressão gênica de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias no fígado. A. Níveis de RNAm de Cxcl2. B. Níveis de RNAm de Cx3cl1. C. Níveis de RNAm de TNF- α . D. Níveis de RNAm de IL1 β . Valores representados como média $\pm$ erro padrão (SEM); *Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao CO; \$ Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos OC300 e OS300 (B-C). $n = 4-6$ animais por grupo.56
- Figura 6.** Efeitos da suplementação com óleo de coco ou óleo de soja nos níveis hepáticos e séricos de IL1 β e TNF- α . A. Níveis hepáticos de IL1 β . B. Níveis séricos de IL1 β . C. Níveis hepáticos de TNF- α . D. Níveis séricos de TNF- α . Valores representados como média $\pm$ erro

padrão (SEM); *Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo CO. \$ Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao OC300. n = 4-7 animais por grupo.....57

Figura 7. Western blot representativo da expressão de proteínas de vias inflamatórias no fígado.

A. Conteúdo proteico de pNFkB. B. Conteúdo proteico de pSTAT3. C. Conteúdo proteico de pJNK. Valores representados como média $\pm$ erro padrão (SEM); *Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao CO; # Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos OC100 e OC300 (B); \$ Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos OC300 e OS300 (B). n = 5 animais por grupo.58

Figura 8. Efeitos do tratamento por 24 horas com soro de animais suplementados com óleo de

coco ou óleo de soja na expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias em células Hepa-

1c1c7. A. Níveis de RNAm de TNF- α . B. Níveis de RNAm de IL10. Valores representados

como média $\pm$ erro padrão (SEM); *Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao CO. n = 3-4..60

Figura 9. Western blot representativo da expressão de proteínas de estresse de retículo e

autofagia no fígado. A. Conteúdo proteico de GPR78. B. Conteúdo proteico de LC3II. Valores

representados como média $\pm$ erro padrão (SEM). n = 4-6 animais por grupo..61

Figura 10. Efeitos da suplementação com óleo de coco ou óleo de soja na expressão hepática

de genes do metabolismo lipídico. A. Níveis de RNAm de Cpt1a. B. Níveis de RNAm de Gpm.

C. Níveis de RNAm de Hmgcr. Valores representados como média $\pm$ erro padrão (SEM);

*Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao CO. n = 4-6 animais por grupo. .64

Figura 11. Resumo dos efeitos metabólicos das diferentes doses de óleo de coco e soja sobre a

composição corporal, plasma e tecido hepático.66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais categorias da função hepática (FOX, 2007; BARBOSA et al., 2010).....	18
Tabela 2. Composição dos ácidos graxos dos óleos de coco	40
Tabela 3. Níveis séricos de colesterol total, triglicérides, AST e ALT	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ABESO	Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica
AGCL	Ácidos graxos de cadeia longa
AGCM	Ácidos graxos de cadeia média
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
ATF4	Cyclic AMP-dependent transcription of factor 4
ATF6	Activating transcription factor 6
CAT	Catalase
CE	Células estreladas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHOP	C/EBP homologous protein
CX3CL1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
DCV	Doença cardiovascular
DHA	Ácido docosaheptaenóico
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eIF2 α	Eukariotic translation initiation fator 2
EPA	Ácidos eicosapentaenóico
ERAD	Degradação de proteína associado ao retículo endoplasmático
GPx	Glutathione peroxidase
GRP78	Glucose regulated proteins 78
HDL	High-density lipoprotein
IL10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de massa corporal
IRE1	Inositol-requiring

IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1
JNK	C-Jun N-terminal kinase
LDL	Low density lipoprotein
MDA	Malondialdeído
MEC	Matriz extracelular
MUFA	Ácidos graxos monoinsaturados
NFκB	Nuclear factor kappa B
NRF2	Factor erythoid 2-related factor 2
pAKT	Phospho-AKT
PCR	Proteína C-reativa
PDGF	Platelet-derived growth factor
PERK	Eukaryotic translation initiation factor 1 α-kinase 3
PFA	Paraformaldeído
Pjnk	Phospho- c-Jun N-terminal kinase
PMSF	Fluoreto fenilmetilsulfonil
pNFκB	Phospho-nuclear factor kappa b
PUFA	Ácidos graxos poliinsaturados
RE	Retículo endoplasmático
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SBEM	Sociedade Brasileira e Endocrinologia e Metabologia
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio
SFA	Ácidos graxos saturados
SOD	Superóxido dismutase
SREBP1c	Sterol regulatory element binding protein 1c
TCM	Triglicerídeos de cadeia média
TGF-β	Transforming growth factor beta
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UPR	Unfolded protein response
USDA	United States Department of Agriculture
VLDL	Very low density lipoprotein
LC3	<i>A/B-light chain 3</i>
XBP1	X-box-binding protein 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Obesidade.....	17
1.2 Obesidade e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA).....	18
Estresse de retículo e autofagia na DHGNA	20
1.3 Obesidade, inflamação e resistência à insulina.....	22
1.4 Óleo de soja	23
1.5 Óleo de coco	25
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 Composição em ácidos graxos dos óleos	34
4.2 Animais e Suplementação	35
4.3 Análise de peso corpóreo e índice hepatossomático	35
4.4 Teste de tolerância à insulina	35
4.5 Teste de tolerância à glicose	36
4.6 Extração de tecidos.....	36
4.7 Análise por Real Time PCR.....	36
4.8 Análises por Western Blot.....	37
4.9 Imunofluorescência.....	37
4.10 ELISA	38
4.11 Análises bioquímicas do soro	38
4.12 Extração de lipídios	38
4.13 Cultura e tratamento de células.....	39
4.14 Análises Estatísticas	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Parâmetros zométricos e perfil lipídico após a suplementação	41
5.2 Perfil glicêmico após a suplementação	48
5.3 Perfil inflamatório após suplementação.....	51
5.4 Estresse de retículo e autofagia após a suplementação com óleo de coco	59
5.5 Metabolismo lipídico hepático após a suplementação	61
6. CONCLUSÃO	67

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXOS	79

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

A obesidade, considerada em séculos passados como símbolo de fartura, saúde e beleza, é atualmente considerada uma doença crônica multifatorial caracterizada pelo excesso de gordura corporal decorrente da hiperplasia e/ou hipertrofia dos adipócitos (LEITE; ROCHA; BRANDÃO-NETO, 2009).

A maioria da população mundial vive em países onde o excesso de peso e a obesidade mata mais pessoas do que o baixo peso. Dados atuais da OMS, publicados em 2018 apontam que a obesidade mundial quase triplicou desde 1975 e que em 2016, 39% dos adultos com 18 anos ou mais estavam acima do peso e 13% eram obesos. O quadro não é diferente para crianças e adolescentes, 41 milhões de crianças menores de 5 anos e mais de 340 milhões de crianças e adolescentes com idade entre 5 e 19 anos estavam acima do peso ou obesas (WHO, 2019).

O estudo da VIGITEL, publicado em 2016 que compreendeu a Vigilância De Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, avaliou as capitais de 26 estados brasileiros e do Distrito Federal, e mostrou que 53,8% da população de adultos acima de 18 anos, apresentava excesso de peso e 18,9% obesidade (BRASIL, 2017).

Estes dados aparecem como um contrassenso em relação à cultura da magreza estabelecida em 1960, caracterizada por diversos marcos históricos como o Miss América e as publicações na revista Playboy que indicavam a tendência de um padrão de beleza mais fino. Associado a isso, houve um aumento significativo de artigos de dietas em revistas femininas (GARNER, 1980).

A disparidade entre a imagem corporal estabelecida pela cultura atual e o aumento do excesso peso em grande parte da população, leva os indivíduos à buscarem por alternativas não convencionais de perda de peso, que são denominadas “dietas da moda”. Os mais atingidos por essa prática são indivíduos em excesso de peso e obesidade (ARAÚJO et al., 2013).

Inúmeros fatores estão envolvidos na etiologia da obesidade, porém todos eles convergem para um único ponto: o desequilíbrio energético positivo. As calorias ingeridas diariamente ultrapassam aquelas gastas, sendo o excesso armazenado continuamente no tecido adiposo. No entanto, esse balanço energético sofre influência de fatores ambientais, comportamentais, psicológicos, fisiológicos e genéticos (SPIEGELMAN; FLIER, 2001).

De forma preocupante, a obesidade está associada ao surgimento de inúmeras comorbidades que prejudicam a qualidade de vida e agravam o prognóstico dos pacientes. Dentre elas, destacam-se diabetes tipo 2, câncer, doenças cardiovasculares e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (GUH et al, 2009).

1.2 Obesidade e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

O fígado possui uma variedade de funções, mais amplas que qualquer outro órgão do corpo (FOX, 2007). As principais categorias de funções hepáticas estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1. Principais categorias da função hepática (FOX, 2007; BARBOSA et al., 2010).

Categoria Funcional	Ações
Detoxificação do sangue	- Fagocitose pelas células de Kupffer. - Alteração química de moléculas biologicamente ativas (hormônios e drogas). - Produção de uréia, ácido úrico e outras moléculas que são menos tóxicas que os componentes que dão origem às mesmas. - Excreção de moléculas na bile.
Metabolismo dos carboidratos	- Conversão da glicose sanguínea em glicogênio e gordura. - Produção de glicose a partir do glicogênio hepático e de outras moléculas (aminoácidos, lactato) pela neoglicogênese. - Secreção de glicose na corrente sanguínea.
Metabolismo dos lipídios	- Síntese de triglicerídeos e colesterol. - Excreção do colesterol na bile. - Produção de corpos cetônicos a partir de ácidos graxos.
Metabolismo dos aminoácidos	- As enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) catalisam a transferência de um grupo amino de um aminoácido para um cetoácido.
Síntese proteica	- Produção de albumina. - Produção de proteínas de transporte plasmáticas.

	- Produção de fatores de coagulação (fibrinogênio, protrombina e outros).
Secreção de bile	- Síntese dos sais biliares. - Conjugação e excreção do pigmento biliar (bilirrubina).

Devido às suas várias funções, o fígado é composto por diferentes tipos celulares, entre os quais destacam-se:

Células de Kupffer: encontradas na superfície luminal das células endoteliais, suas principais funções são: metabolizar eritrócitos velhos, digerir hemoglobina, secretar proteínas relacionadas com processos imunológicos e destruir bactérias. As células de Kupffer constituem cerca de 15% da população celular no fígado. Muitas estão localizadas na região periférica do lóbulo hepático, onde são muito ativas na fagocitose (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). As células de Kupffer são consideradas fagócitos fixos, por serem imóveis (“fixas”), localizadas nas paredes dos capilares sinusóides. À medida que o sangue flui através desses amplos capilares, substâncias químicas estranhas, resíduos e patógenos são removidos através da fagocitose (FOX, 2007).

Células Estreladas: no espaço de Disse, células armazenadoras de lipídios, também denominadas células de Ito, contêm inclusões lipídicas ricas em vitamina A. No fígado saudável estas células desempenham várias funções, como captação, armazenamento e liberação de retinóides, síntese e secreção de várias proteínas da matriz extracelular e proteoglicanos, secreção de fatores de crescimento e citocinas e regulação do diâmetro do lúmen sinusoidal em resposta a diferentes fatores reguladores (FOX, 2007). As células estreladas (CE) desempenham importante papel nos mecanismos de injúria e regeneração hepática (RAMALHO et al., 2000). Vários estudos têm demonstrado que a célula-chave na produção da fibrose no fígado é a célula estrelada de Ito. Sob a ação de citocinas fibrogênicas, (TGF- β , TNF- α , PDGF e outras), essa célula se diferencia em miofibroblasto e fibroblasto (ANDRADE, 2005). As células estreladas apresentam dois fenótipos: quiescente e ativado. A ativação consiste em duas fases: iniciação e perpetuação. A iniciação, também chamada de estágio pré-inflamatório, refere-se a alterações iniciais na expressão gênica e no fenótipo, que tornarão as células aptas a responder à citocinas e outros estímulos. A segunda fase resulta dos efeitos desses estímulos sobre a manutenção do fenótipo ativado e a produção de fibrose. A fase de perpetuação compreende a proliferação, contratilidade, fibrogenese, perda de retinóides, infiltração de células inflamatórias e degradação de matriz extracelular (MEC) (BONA, 2010).

Estima-se que 60% da população celular do fígado de um homem adulto sejam hepatócitos, e são nessas células que ocorre acúmulo de lipídios na DHGNA, que varia de esteatose a esteato-hepatite, fibrose e cirrose (BROWNING, D.J, HORTON, J.D., 2004).

A DHGNA é uma importante complicação da obesidade, sendo reconhecida como a manifestação hepática da síndrome metabólica (BRUNT. E.M., 2010). Sua fisiopatogênese é bastante complexa e envolve muitos fatores, não estando completamente esclarecida. Atualmente, a maioria dos autores concorda com a teoria dos múltiplos “*hits*”. Acredita-se que o primeiro hit esteja relacionado com o estabelecimento de resistência à insulina no tecido adiposo e o suprimento excessivo de ácidos graxos livres no fígado, levando à esteatose (DONNELLY, K. L. et al. 2005; BASARANOGLU, M. et al. 2010; BASARANOGLU, M. et al. 2013).

O acúmulo hepático de lipídios induz as células hepáticas a produzirem citocinas inflamatórias. Essas citocinas podem desempenhar um papel ativo no desenvolvimento e progressão da DHGNA (segundo “*hit*”) através da estimulação da inflamação hepática, da necrose celular, apoptose e indução de fibrose (MARRA, F., BERTOLANI, C., 2009). Dentre as citocinas, vale destacar o TNF- α , por apresentar efeitos lipogênicos e fibrogênicos, mediado por mecanismo parácrino que envolve a ativação das células da Kupffer, com secreção de mediadores solúveis, que estimulam a transformação das células estreladas em miofibroblastos, que por sua vez, passam a sintetizar componentes da matriz extracelular, podendo ser usado no diagnóstico da DHGNA (ZAHARAN, W.E. et al, 2013).

Estresse de retículo e autofagia na DHGNA

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela envolvida na síntese de proteínas, controle do estoque de cálcio, detoxificação xenobiótica e biossíntese de lipídeos. Quando as proteínas são mal enoveladas é ativado o sistema de degradação de proteína associado ao RE (ERAD), este mecanismo é mediado pela translocação das proteínas para o citosol para degradação pelo sistema ubiquitina/proteassoma. Frente a um desequilíbrio entre a capacidade de maturação proteica e degradação das proteínas mal enoveladas, há um acúmulo destas no RE, ativando o estresse do RE que pode também ser denominado *unfolded protein response* (UPR) (RON; WALTER, 2017).

O sistema UPR tem o objetivo de restaurar a homeostase celular, para a diminuição do acúmulo de proteínas mal enoveladas. O sistema inibe a tradução e aumenta a expressão das proteínas envolvidas com o ERAD, essencialmente as chaperonas. A UPR é mediada principalmente por três proteínas, que ficam na porção transmembrana do RE ligadas

principalmente a chaperona *Glucose regulated proteins 78* (GRP78): *eukaryotic translation initiation factor 1 α -kinase 3* (PERK), *inositol-requiring* (IRE1) e *activating transcription factor 6* (ATF6). O acúmulo de proteínas mal enoveladas, sequestram a chaperona GRP78, desligando-a dos sensores, ativando a UPR (CNOP et al., 2012)

No contexto do excesso de gorduras no fígado, DHGNA, o sistema UPR está cronicamente ativo, o que contribui para o acúmulo de gorduras no tecido. O estresse de retículo é inicialmente ativado pelo acúmulo de lipídios no hepatócito, que induz modificações na composição da membrana do RE (FU et al., 2011; ARRUDA; HOTAMISLIGIL, 2015). Esse é o principal mecanismo da ativação de UPR no contexto da DHGNA, caracterizado pelo aumento na razão fosfatidilcolina/olfatidiletanolamina, diminuição da fluidez da membrana e da atividade de bombas iônicas como de Cálcio-ATPase e diminuição do conteúdo de cálcio no interior do retículo, que interfere negativamente na atividade das chaperonas, prejudicando o enovelamento de proteínas acarretando na ativação do estresse de retículo (FU et al., 2011).

O estresse de retículo é um mecanismo importante para a progressão da DHGNA, por induzir a lipogênese especialmente a “síntese de novo de lipídeos” de forma direta ou indireta por fatores que induzem a expressão gênica de genes envolvidos com a lipogênese (NING et al., 2011; WANG et al., 2015) e síntese de ácidos graxos (XU et al., 2013).

Outro mecanismo essencial para a função normal do fígado e prevenção do desenvolvimento de doenças hepáticas é a autofagia (CZAJA et al. 2013), que tem como função celular a degradação e reciclagem de componentes citoplasmáticos como organelas senescentes, proteínas agregadas ou mal enoveladas, microrganismos invasores e macromoléculas (MIZUSHIMA & KOMATSU, 2011). A autofagia ocorre em níveis basais na maioria dos tecidos de eucariontes de modo a contribuir para a viabilidade celular e possibilitar a adequada reciclagem dos componentes citoplasmáticos (AMEETA, 2005). Durante esse processo, a proteína LC3 é recrutada para a membrana do autofagossomo, em seguida, esse se funde ao lisossomo, formando o autolisossomo responsável pela degradação dos componentes citoplasmáticos capturados (KIMMELMAN; WHITE, 2017; WHITE; MEHNERT, J; CHAN, 2015).

A autofagia é um importante processo para a proteção hepatocelular da lipotoxicidade, ela está envolvida no metabolismo lipídico hepático, regulando os estoques de lipídeos intracelulares e eliminando triglicerídeos, o que previne o desenvolvimento de esteatose hepática (KE, 2019; SIGNH et al. 2009). A literatura demonstra que hepatócitos expostos a ácidos graxos saturados diminuem a autofagia e levam à apoptose, já a exposição à

ácidos graxos insaturados parecem estimular a atividade autofágica com pouca promoção de apoptose (MEI et al. 2011).

1.3 Obesidade, inflamação e resistência à insulina

Os efeitos da dieta sobre diferentes parâmetros fisiológicos têm sido estudados há cerca de 30 anos e, mais recentemente, os estudos têm procurado entender os efeitos de dietas hiperlipídicas e hipercalóricas sobre a homeostase energética e glicêmica. Neste sentido, estudos com dietas ricas em gordura têm mostrado a estreita relação entre o uso destas dietas, os níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF α e interleucina 1 beta (IL-1 β) e o desenvolvimento da obesidade e diabetes tipo II (GUIMARÃES, 2013).

A expressão, produção e liberação de citocinas – principalmente, TNF- α , IL-1 β , Interleucina 6 (IL-6), encontram-se aumentadas em indivíduos obesos. Essas citocinas secretadas por adipócitos e macrófagos residentes no tecido adiposo têm uma contribuição sistêmica relevante (BERG; SCHERER, 2005) e causam efeitos prejudiciais, no tecido adiposo, fígado e músculo (TZANAVARI et al., 2010). O principal efeito da liberação excessiva de citocinas pró inflamatórias está associado a ativação exacerbada das vias de sinalização de *nuclear factor kappa B* (NF κ B) e JNK (JIAO et al., 2009).

A migração e atividade das células inflamatórias é controlada por quimiocinas (famílias CC, CXC, CX3C e C) (ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O., 2000), produzidas não somente por células do sistema imune, mas também pelas células de Kupffer, estreladas, endoteliais e hepatócitos do fígado (HOLT, M. P. et al. 2008; WASMUTH, H. E. et al. 2010).

A inflamação hepática decorrente da obesidade é regulada pela produção de quimiocinas (ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O., 2000), que por sua vez é estimulada por diversas citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α (BENDALL, 2005; MANTOVANI, 1999).

Estudos demonstram que citocinas pró-inflamatórias e o aumento dos ácidos graxos intracelulares inibem a fosforilação da tirosina dos substratos dos receptores de insulina (IRS-1) em adipócitos e hepatócitos. Isso se dá porque essas substâncias fosforilam a porção serina do IRS-1, que, ao contrário da fosforilação da tirosina (que permite a transmissão do sinal da insulina), bloqueia a ação intracelular da insulina, impedindo a internalização da glicose nas células. Uma vez que a serina é fosforilada, os IRS-1 se tornam um pobre substrato para o receptor de insulina, dessa forma, a correta sinalização intracelular da insulina é impedida, propiciando o estado de resistência a esse hormônio (HOTAMISLIGIL, 2003).

Alguns trabalhos demonstraram que alterações na resistência à insulina são independentes da adiposidade, mas estão estreitamente relacionadas com a ingestão de gordura ou com o tipo de gordura ingerida (PAGLIASSOTTI, et al, 2000), em especial ao tamanho e número de insaturações (STEIN et al, 1997). A exposição prolongada de adipócitos a ácidos graxos saturados causou resistência à ação da insulina nestas células (HUNNICUTT et al, 1994).

Estudos mostram que dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados diminuem a síntese de citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, aumentam a sensibilidade à insulina (PICINATO et al., 1998). Segue uma discussão pontual do papel específico de cada ácido graxo essencial como mediador do processo inflamatório e da conseqüente melhoria da sensibilidade à insulina.

1.4 Óleo de soja

A soja *Glycine max* é uma leguminosa pertencente à família *Fabaceae*, e à sub-família das *Papilionoidea*. O cultivo de soja ocorre há mais de 5.000 anos, no entanto o óleo de soja tornou-se parte da dieta apenas nas últimas décadas (HYMOWITZ, 1970). A adesão a esse tipo de óleo, deve-se, em parte, a uma reação à estudos populacionais em larga escala nas décadas de 50 e 60, que mostraram que a dieta rica em gorduras saturadas, de produtos animais, estava associada a um risco aumentado de doença cardiovascular (KEYS et al., 1957; KANNEL et al., 1961).

O óleo de soja é composto de 60,8% de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), 24,5% de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e 15,1% de ácidos graxos saturados (SFA) (MEYDANI et al., 1991). Os ácidos graxos do óleo de soja são, na sua maioria, insaturados, cujo maior percentual corresponde ao ácido linoléico, seguido pelo oléico, palmítico, linolênico e esteárico, em ordem decrescente. O óleo de soja contém ainda alguns ácidos graxos em mínimas quantidades, como o araquidônico, o palmitoléico e o mirístico.

Os ácidos graxos linoléico (ômega-6) e linolênico (ômega-3) são considerados essenciais, porque os mamíferos, incluindo o homem, não podem sintetizá-los. Os demais ácidos poliinsaturados somente podem ser sintetizados a partir destes. Desta maneira, devem ser fornecidos pela dieta em quantidades adequadas.

A partir do ácido linoleico, é possível outros ácidos ômega-6, como o ácido araquidônico. Já o ácido linolênico é o precursor dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) (WHITNEY e HOLFES, 1999).

O teor elevado de ácidos graxos insaturados torna o óleo de soja muito suscetível às reações de oxidação. Por este motivo, o óleo geralmente é submetido ao processo de hidrogenação antes de ser usado como óleo para fritura ou como óleo para salada (GUNSTONE, 2005).

Importantes estudos surgiram para que o óleo de soja fosse considerado saudável e seu consumo fosse estimulado pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (SANTOS, 2013). Por exemplo, o estudo de Kromhout e colaboradores, que mostrou que indivíduos com angina pectoris estável (tipo de dor no peito causada pela redução do fluxo sanguíneo para o coração) que consumiram uma dieta rica em ácido linoleico, por 2 anos, tiveram o colesterol plasmático reduzidos (KROMHOUT et al., 1987).

Riemersma et al., (1986), reportaram relação inversa entre ácidos graxos essenciais no tecido adiposo, em particular ácido linoléico, e mortalidade por doença coronariana. Essa relação foi investigada em um estudo transversal, com amostras populacionais aleatórias de homens aparentemente saudáveis com idades entre 40-49 anos, de quatro regiões europeias com diferentes taxas de mortalidade por doença coronariana. A proporção de ácido linoléico no tecido adiposo foi menor em homens das regiões onde a taxa de mortalidade por doença coronariana era maior. O estudo infere que estas diferenças no conteúdo lipídico do tecido adiposo, poderiam refletir as diferenças na ingestão dietética (RIEMERSMA et al., 1986).

O estudo de Kuusi et al., (1985), mostrou que o aumento na relação dietética de ácidos graxos poliinsaturados em relação aos saturados, diminuiu o colesterol total, High-density lipoprotein (HDL) e low density lipoprotein (LDL) em uma população com colesterol alto, de uma região do condado da Finlândia que apresentava alta taxa de doença coronariana (KUUSI et al., 1985).

Em 1991 a revisão de Meydani e colaboradores apontou que a inclusão na dieta de óleos vegetais como óleo de soja, milho e girassol poderia produzir aumento no conteúdo de ácido linoleico em plaquetas e modesta diminuição do ácido araquidônico, associada a elevações de EPA e DHA. De acordo com o trabalho, estes óleos também poderiam produzir um efeito inibitório sobre as plaquetas em relação à formação de tromboxanos e agregações (MEYDANI et al., 1991).

Em um estudo mais recente com humanos, cross-over duplo-cego, os indivíduos consumiram três tipos de dietas, com 30% de calorias como gordura, das quais dois terços foram fornecidos como óleo de soja ou margarina à base de óleo de soja ou manteiga durante 32 dias. O estudo demonstrou que os níveis de citocinas eram maiores naqueles que consumiram

margarina ou manteiga. Apontando que o consumo do óleo de soja é mais saudável em detrimento das outras fontes lipídicas estudadas, hidrogenadas e saturadas (HAN et al., 2002).

Posteriormente, a literatura relacionou o consumo de ácidos graxos insaturados, essencialmente EPA e DHA com efeitos benéficos em diversos eventos relacionados com a saúde, como metabolismo lipídico, glicídico, pressão arterial, inflamação, função endotelial, aterosclerose, arritmia, eventos cardiovasculares e morte súbita. Sendo o óleo de soja considerado uma das fontes desses lípidos, com aproximadamente 5-7% de seu conteúdo. Neste sentido, a utilização deste óleo na rotina culinária foi estimulada, uma vez que apresenta estabilidade em temperatura de 25°C, mesmo após aberto, estabilidade em temperatura de cocção e proporção de ácidos graxos interessante para o contexto de saúde (SANTOS, 2013).

1.5 Óleo de coco

O óleo de coco é de origem vegetal, 100% natural, sendo extraído da espécie *Cocos nucifera*, da família *Arecaceae (Palmae)* e subfamília *Cocoideae*. Existem vários processos para extração do óleo de coco, obtendo o óleo de coco extra virgem, virgem, refinado ou hidrogenado:

Óleo de coco extra virgem: Prensado a frio, fica solidificado abaixo de 25°C. Não passa pelo processo de refinamento e desodorização, apenas é extraído a partir da polpa do coco fresco, passando pela trituração, prensagem e tripla filtração. Seu índice de acidez fica em no máximo 0,5% (SANTOS et al, 2009).

Óleo de coco virgem: segue o mesmo processamento do óleo de coco extra virgem, porém a película residual da polpa é mantida, o que diminui a pureza do óleo e a disponibilidade de ácido láurico.

Óleo de coco refinado: Neste processo, se prensa a copra (polpa seca) do coco a fim de obter o óleo que passará pelo processo de Refinamento, Branqueamento e Desodorização (RBD). Durante o processo de desodorização, a temperatura aumenta, podendo chegar a 245°C, o que altera sua composição.

Óleo de coco hidrogenado: ao passar pelo processo de hidrogenação, o óleo de coco diminui sua concentração de ácidos graxos insaturados.

Portanto, o modo de extração e armazenamento do óleo de coco utilizado nos estudos deve ser considerado, uma vez que a composição diferenciada pode interferir nos resultados obtidos (MARINA; CHE MAN; AMIN, 2009).

O óleo de coco possui mais de 90% de ácidos graxos saturados em sua composição (os átomos de carbono dessa molécula são unidos por ligações simples), são eles: capróico,

caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico e araquídico (ASSUNÇÃO et al, 2009). A maioria dos seus ácidos graxos saturados são triglicerídeos de cadeia média (TCM), formados por 3 ácidos graxos de cadeia média ligados a uma molécula de glicerol, com um comprimento de cadeia entre 6 a 12 carbonos (BONTEMPO, 2008). O ácido láurico (C12: 0) é o principal ácido graxo do óleo de coco, e estudos já demonstraram que ele é capaz de causar hipercolesterolemia (LIMA et al, 2000).

Como o óleo de coco possui uma maior quantidade de ácidos graxos de cadeia média (AGCM), seu comportamento metabólico é distinto das demais gorduras saturadas, em virtude de suas características estruturais. Os AGCM são rapidamente absorvidos no intestino, mesmo sem sofrer ação da enzima lipase pancreática. Os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), por outro lado, necessitam da lipase pancreática para a absorção e são transportados pela linfa para a circulação sistêmica na forma de quilomícrons, para depois atingir o fígado, onde eles passam por beta-oxidação, biossíntese de colesterol, ou são resintetizados como triglicérides. Já os AGCM são transportados pela veia porta para o fígado, onde são rapidamente oxidados, gerando energia (LIAU et al, 2011).

O óleo de coco também contém uma menor quantidade de ácidos graxos insaturados (ao menos uma dupla de átomos de carbono da cadeia está ligada através de ligação dupla), como oléico, palmitoléico e linolênico (ASSUNÇÃO et al, 2009).

Os produtos de coco, por milhares de anos, simbolizaram um componente importante da medicina popular indiana, em documentos em sânscrito referentes há 4 000 anos foram documentados o uso de coco para alimentos e suas aplicações na medicina ayurvédica. Atribuía-se aos produtos do coco diversas propriedades medicinais, como antiblenorrágica, antibronquite, combate e controle da febre e antigengivítico. Na medicina ayurvédica, o óleo, leite, creme e água do coco são usados para tratar alopecia, queimaduras e problemas cardíacos (DEBMANDAL & MANDAL, 2011).

Em maio de 2003, houve uma grande popularização do consumo de óleo de coco, após a publicação de um artigo na revista americana “Women's World” que atribuía ao óleo o título de “alimento milagroso” (MYPASSION4HEALTH, 2003). O artigo foi derivado do livro de Bruce Fife, que teve sua primeira edição publicada em 2000 e é intitulado “*The Healing Milacres of Coconut Oil*”, no qual é atribuído ao óleo os efeitos de promover a perda de peso, proteger contra doenças cardíacas, câncer, diabetes, doenças degenerativas e fortalecimento do sistema imunológico (FIFE, 2000). O livro continua muito popular e atualmente encontra-se na quinta edição e pode ser comprado em qualquer livraria (FIFE, 2013). O consumo de óleo de

coco mantém-se constante de 2003/2004 até a atualidade (2018) segundo dados da USDA (USDA, 2019).

A popularização do consumo de óleo de coco e a dieta da moda “Coconut Diet” foi tão eminente que também alcançou a população brasileira, em tal grau que a ABESO (Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica), em 2012, publicou um artigo discutindo sobre o consumo de óleo de coco. Em sua conclusão, o artigo alerta que apesar das diversas teorias sobre os benefícios do óleo de coco, os estudos ainda são escassos e controversos, adicionalmente o artigo reforça que o óleo de coco é rico em gordura saturada, por isso, deve ser consumido com restrição (ABESO, 2012).

A utilização de óleo de coco transcendeu a prática popular e alguns profissionais da saúde começaram a prescrever o óleo com a finalidade de perda de peso. Por isso, em setembro de 2015 a ABESO e SBEM (Sociedade Brasileira e Endocrinologia e Metabologia) emitiram um comunicado oficial, direcionado aos profissionais da saúde nutricionistas e médicos. O comunicado diz que não existe fundamentação científica suficiente que embase o uso de óleo de coco para fins de emagrecimento e deve ser considerado que o uso desse óleo pode ser deletério para os pacientes devido à sua elevada concentração de ácidos graxos saturados, como ácido láurico e mirístico. Nessa perspectiva, a SBEM e a ABESO posicionaram-se frontalmente contra a utilização terapêutica do óleo de coco com a finalidade de emagrecimento e contra a utilização do óleo de coco como óleo de cozinha (HOHL & CERCATO, 2015).

Em relação aos estudos que fundamentam o consumo de óleo de coco está o de Assunção et al. (2009) que avaliou os efeitos da suplementação dietética com óleo de coco nos perfis bioquímicos e antropométricos de mulheres obesas entre 20 e 40 anos. Os grupos receberam suplementos alimentares diários compreendendo 30 mL de óleo de soja ou óleo de coco durante um período de 12 semanas, associado à dieta hipocalórica e atividade física. Ambos os grupos apresentaram redução no índice de massa corporal (IMC), mas apenas o grupo suplementado com coco exibiu redução na circunferência abdominal. O trabalho conclui que a suplementação dietética parece promover uma redução na obesidade abdominal (ASSUNÇÃO et al., 2009).

O estudo de Liao e colaboradores (2011), com apenas 20 participantes, sendo 13 mulheres e 7 homens que consumiram 30mL por dia de óleo de coco extra virgem, durante 4 semanas, encontrou redução na circunferência da cintura em homens, sem alterações no perfil lipídico e concluiu que o óleo de coco é eficaz para a redução de circunferência da cintura e que seu consumo é seguro (LIAO et al., 2011).

Já Vijayakumar e colaboradores (2016) mostraram em um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, com duração de 2 anos, utilizando 200 participantes com doença arterial coronariana, que a utilização de óleo de coco, como óleo de cozinha, comparado ao uso do óleo de girassol não modificou o IMC, porcentagem de gordura corporal ou relação cintura-quadril (VIJAYAKUMAR et al., 2016);

As revisões que discutem o papel do óleo de coco sobre a perda de peso, utilizam em sua discussão artigos que relacionam o consumo de TCM e a melhora no metabolismo energético e redução de peso, e não apenas artigos que avaliaram o consumo do óleo de coco propriamente dito, já que são escassos (CLEGG, 2017; WALLACE, 2018). No entanto, uma recente revisão publicada pelo grupo Nature em 2017, discute que o óleo de coco é diferente do óleo de TCM em relação à sua composição, já que o ácido láurico, que compõe 47,7% do óleo do coco não está presente no óleo de TCM. Além disso, o metabolismo do ácido láurico é diferente, sendo apenas 20-30% metabolizado diretamente como fonte de energia, como os TCM's. Ou seja, apenas 23,16% da gordura o óleo de coco é metabolizada como o óleo puro de TCM (CLEGG, 2017). Nesse sentido, não é adequado a transposição dos efeitos observados em estudos usando TCM, como sendo efeitos esperados perante o consumo de óleo de coco.

É notório a necessidade de produção científica sobre o assunto para que os efeitos do consumo do óleo de coco sobre a saúde sejam esclarecidos. Uma vez que, mesmo com a ambiguidade e escassez na literatura sobre o assunto, o consumo ainda é estimulado pela mídia e a população que está constantemente exposta a essas informações, pode expor sua saúde à riscos, visando a busca de resultados que não possuem comprovação científica estabelecida, já que a mídia exerce um fator fundamental na formação de hábitos alimentares (MARTINS et al., 2011). Os sites relacionados à saúde nacionais e internacionais estimulam a substituição do óleo de cozinha pelo óleo de coco, ou o consumo de 1-3 colheres de sopa ao dia (HEALTHLINE, 2019; TUASAÚDE, 2019).

Além disso, o aumento do consumo de gorduras na dieta está relacionado com diversos desfechos metabólicos, essencialmente com alterações no perfil lipídico e risco de doenças cardiovasculares (SANTOS, 2013), principalmente o consumo de gordura saturada, rica em ácidos graxos como láurico e mirístico (HOUSTON, 2018), os quais o óleo de coco possui em sua composição (ASSUNÇÃO et al, 2009).

Alguns estudos relacionam o consumo do óleo de coco com alterações no perfil lipídico. O estudo de Cox e colaboradores avaliou os efeitos do consumo de 54g por dia, durante 4 semanas, de óleo de milho comparado com óleo de coco sobre lipídios circulantes, em um estudo randomizado, utilizando amostra de homens e mulheres com sobrepeso e dislipidemia.

O óleo de coco aumentou 4,6% do colesterol LDL, 5,8% do colesterol não-HDL, 7,1% do colesterol total, 6,5% do HDL e 6,0% de triacilgliceróis. Enquanto o consumo do óleo de milho, foi relacionado com a redução de todos esses lípides circulantes, exceto HDL. Ou seja, o consumo de óleo de coco modifica de forma desfavorável o perfil lipídico (COX et al., 1995)

Em um ensaio maior, Cox e colaboradores realizaram um experimento sequencial randomizado com 41 indivíduos saudáveis do Pacífico, com o objetivo de avaliar os efeitos sobre o perfil lipídico do consumo de óleo de coco, cártamo e manteiga. Os participantes consumiram cada um dos 3 tipos de gordura por 6 semanas, sendo que a gordura foi consumida como 36% de energia total, com gorduras de teste fornecendo 46% de ingestão de gordura na dieta. O consumo do óleo de coco aumentou os níveis de colesterol, em níveis menores que a manteiga, mas maiores que o óleo de cártamo, assim como aumentou os níveis de LDL, HDL comparado ao óleo de cártamo (COX et al., 1998). Resultados similares aos observados no estudo anterior (COX et al., 1995).

O estudo de Voon e colaboradores (2011) investigou os efeitos de dietas preparadas com oleína de palma, óleo de coco ou azeite de oliva virgem sobre marcadores de doença cardiovascular, em 45 adultos saudáveis. A intervenção foi cruzada e randomizada com 3 sequências dietéticas de 5 semanas. As 3 gorduras de teste, foram incorporadas em dois terços de 30% do total das calorias de gordura. Não foram observadas diferenças significativas nos efeitos das três dietas na homocisteína total plasmática, e nos marcadores inflamatórios TNF- α , IL-1 β , IL-6 e Interleucina 8 (IL-8), proteína C-reativa (PCR) de alta sensibilidade e interferon- γ . No entanto a dieta com óleo de coco apresentou índice lipídicos maiores comparados aos outros tipos de dieta (VOON et al., 2011).

No estudo de Assunção et al. (2009) mulheres obesas entre 20 e 40 anos receberam suplementos alimentares diários compreendendo 30 mL de óleo de soja ou óleo de coco durante um período de 12 semanas, associado a dieta hipocalórica e atividade física. Nessa situação, a suplementação dietética com óleo de coco não causou dislipidemia (ASSUNÇÃO et al., 2009).

Algumas atribuições das propriedades cardioprotetoras do óleo de coco estão baseadas no conteúdo de ácidos graxos de cadeia média, que seriam rapidamente absorvidos pelo intestino, não participando do transporte de colesterol, assim como os compostos fenólicos presentes no óleo, que contribuiriam com a cardioproteção (BABU, 2014; DEBMANDAL, 2011). No entanto, os estudos que avaliam o consumo do óleo propriamente dito mostram efeitos diferentes (VOON et al., 2011; COX et al., 1998; COX et al., 1995).

O estudo recente de Eyres e colaboradores, analisou 21 artigos que avaliaram o efeito do óleo de coco ou produtos de coco nos perfis lipídicos séricos. De forma geral o artigo

encontrou que o óleo de coco geralmente elevou o colesterol total e o LDL comparado aos óleos vegetais insaturados, mas em menor grau do que a manteiga e conclui que os estudos de intervenção até o momento sugerem a substituição do óleo de coco por gorduras insaturadas, já que o consumo do óleo de coco relacionou-se com alterações deletérias no perfil lipídico (EYRES et al., 2016).

Percebe-se grande variedade entre os estudos nas doses utilizadas de óleo de coco, tempo de exposição e nas populações investigadas, o que dificulta o entendimento dos efeitos do consumo de óleo de coco em relação a redução no peso, perfil lipídico e riscos para outras doenças.

Segundo a Sociedade Brasileira de Hepatologia a dislipidemia é um fator de risco primário para o desenvolvimento de DHGNA (COTRIM, 2019) e existem poucos estudos que avaliam a condição hepática frente a utilização do óleo de coco. Recentemente um estudo utilizando como modelo ratos saudáveis avaliou os efeitos da suplementação de óleo de coco de 10% e 15% em dietas suplementadas, durante 5 semanas. O perfil lipídico dos animais suplementados mostrou redução significativa nos níveis de colesterol total, triglicerídeos, LDL e aumento dos níveis de HDL. O nível de malondialdeído (MDA), um marcador de peroxidação lipídica, reduziu notavelmente e as atividades das enzimas antioxidantes hepáticas, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), aumentaram nos ratos suplementados. Ainda, a dieta suplementada modulou significativamente creatinina, sódio, potássio, cloreto, ALT, AST e fosfatase alcalina (ALP) em comparação ao controle. Os resultados sugerem um efeito benéfico do óleo de coco no perfil lipídico, estado renal, sistema de defesa antioxidante hepático e nos índices de risco cardiovascular em ratos (FAMUREWA et al., 2018).

No entanto, Wall-Medrano et al. (2017), avaliaram os efeitos da ingestão dietética de dietas com 10% de óleo de semente de uva ou milho ou coco durante 28 dias em ratos albinos saudáveis. O grupo óleo de coco apresentou aumento nos níveis de triacilgliceróis séricos e hepáticos e colesterol total, concomitante com redução nos níveis de colesterol HDL sérico, comparado aos óleos de uva e milho. A deposição hepática de fitoesteróis foi menor no grupo óleo de coco comparado aos outros óleos (WALL-MEDRANO et al., 2017).

Interessantemente, dois estudos com modelos parecidos encontraram efeitos totalmente distintos do consumo de óleo de coco em relação aos impactos no perfil lipídico e saúde hepática. Sendo um indicativo da importância de mais estudos que avaliem os efeitos metabólicos do consumo deste óleo.

2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, a população mundial apresentou grandes mudanças no seu padrão alimentar. Em relação aos óleos vegetais, seu consumo tem aumentado no mundo todo, substituindo parte do consumo de gorduras animais (BLASBALG, T.L. et al, 2011). De acordo com o *United States Department of Agriculture* (USDA), no Brasil, o óleo de soja é o mais consumido.

Essa mudança no consumo alimentar ocorreu pois nas últimas décadas foram divulgadas recomendações médicas e nutricionais para diminuição do consumo de ácidos graxos saturados de origem animal, por sua relação com o aumento do risco de desenvolvimento de doença cardiovascular (ZELMAN, K., 2011).

O aumento da obesidade também está relacionado com as transformações no consumo alimentar, dados do Ministério da Saúde (2018) mostram que 19% dos brasileiros são obesos e 54% da população apresenta sobrepeso.

Diariamente, podemos acompanhar nas mídias diversos produtos como recursos no tratamento de obesidade. No contexto dos produtos naturais, destaca-se o óleo de coco, considerado um alimento funcional reconhecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como alimento próprio para suplementação, com base em dados de segurança e eficácia (BRASIL, 2017).

Como a gordura do óleo de coco consiste principalmente em ácidos graxos saturados, a recomendação é evitar seu consumo, porém, estudos recentes mostram que a maior parte de seus ácidos graxos são triglicerídeos de cadeia média, que por serem rapidamente metabolizados, não causam prejuízos ao organismo (CHANDRASHEKAR, P., LOKESH, B. R.; GOPALA KRISHNA, A. G., 2010).

O fígado é o principal órgão metabólico do corpo humano e desempenha papel importante na regulação do metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas. A integridade das funções hepáticas pode ser afetada pelo acúmulo de gordura no tecido, sendo que a composição de macronutrientes da dieta pode influenciar no acúmulo de gordura hepática (PARRY & HODSON, 2017). Estudos que avaliam a integridade das funções hepáticas frente ao consumo de óleo de coco são escassos e controversos, evidenciando a importância da produção científica nesta área.

Existem poucas informações relacionadas aos efeitos do consumo dos óleos de coco no desenvolvimento da obesidade, inflamação e alterações no metabolismo lipídico hepático. Diante disso, nós hipotetizamos que o consumo de óleo de coco e soja pode:

- Afetar o ganho de peso e adiposidade.

- Modificar o metabolismo hepático de ácidos graxos.
- Afetar a resposta inflamatória no fígado.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do óleo de coco no metabolismo de lipídios e a resposta inflamatória no fígado de camundongos com 5 semanas.

3.2 Objetivos específicos

Caracterização metabólica

Determinar a glicemia de jejum, tolerância à glicose e à insulina, peso corporal (g) e adiposidade (g) em camundongos machos, com 5 semanas de vida após suplementação com óleo de coco e óleo de soja, durante o período de 8 semanas.

Resposta inflamatória e dano hepático

Avaliar os níveis proteicos das citocinas IL1 β e TNF- α no soro e no fígado.

Avaliar a expressão das proteínas pNF κ B, pJNK, pSTAT3 no fígado.

Avaliar a expressão gênica das citocinas IL1 β , TNF- α e quimiocinas CXCL2 e CX3CL1 no fígado.

Avaliar a expressão gênica das citocinas TNF- α e IL10 em células Hepa-1c1c7 tratadas com o soro dos animais suplementados.

Avaliar a marcação de macrófagos no fígado.

Avaliar os níveis séricos das enzimas hepáticas AST e ALT.

Metabolismo lipídico

Avaliar o acúmulo de lipídios hepáticos.

Avaliar os níveis séricos de triglicérides e colesterol.

Avaliar a excreção de lipídios nas fezes.

Avaliar a expressão dos genes CPT1a, GPAM e HMGRC no fígado.

Estresse de retículo e autofagia

Avaliar a expressão das proteínas GPR78 e LC3II no fígado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Composição em ácidos graxos dos óleos

Foram utilizados óleos comerciais: soja (Soya, Lote 1216A) e coco (Copra Extra virgem, Lote 91113217).

A análise da composição em ácidos graxos foi realizada na Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp (FEA/UNICAMP) utilizando cromatógrafo em fase gasosa com coluna capilar – CGC Agilent 6850 Series GC System, após esterificação utilizando o método de Hartman e Lago (1973). 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.

4.2 Animais e Suplementação

Os procedimentos experimentais envolvendo animais foram realizados de acordo com a Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (5129-1) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Cinquenta camundongos Swiss machos (5 semanas de idade) foram obtidos do CEMIB/UNICAMP. Eles foram divididos aleatoriamente em 5 grupos de 10 animais cada e receberam diariamente por via oral 100µL de água (Controle - CO) ou foram suplementados com 100µL de óleo de coco (OC100), 300µL de óleo de Coco (OC300), 100µL de óleo de soja (OS100) e 300µL de óleo de soja (OS300). A dose de 100µL foi determinada por não ultrapassar os limites diários de ingestão de ácidos graxos saturados, já a dose de 300µL ultrapassa esse limite fisiológico e é o volume máximo que os camundongos podiam receber por via oral no início da suplementação. Os animais foram mantidos em microisoladores individuais com água e ração padrão ad libitum (Nuvilab® CR-1, Nuvital, PR - Brasil), em uma sala com temperatura controlada (22-24°C) e ciclo claro/escuro (12 horas) durante as 8 semanas de tratamento.

4.3 Análise de peso corpóreo e índice hepatossomático

O peso corporal (g) de todos os animais dos cinco grupos (CO, OC100, OC300, OS100, OS300) foi avaliado semanalmente durante o período de suplementação. O índice hepatossomático se dá pelo peso do fígado relativo ao peso corporal.

4.4 Teste de tolerância à insulina

O teste foi realizado ao final do período experimental dos protocolos descritos. Seis animais por grupo foram deixados em jejum durante 12 horas (*overnight*), realimentados por 2 horas e um segundo jejum de 4 horas foi executado. Por meio de corte na extremidade da cauda do animal foi efetuada a primeira coleta de sangue que equivaleu ao tempo 0 do teste. Após essa coleta, a insulina (1,5 UI/Kg de peso corporal) foi injetada intraperitonealmente e amostras de sangue foram coletadas pela cauda nos tempos 0, 5, 10, 15 e 20 minutos para a determinação da glicose sérica.

4.5 Teste de tolerância à glicose

O teste foi realizado ao final do período experimental dos protocolos descritos. Seis animais por grupo foram deixados em jejum durante 12 horas (*overnight*), realimentados por 2 horas e um segundo jejum de 4 horas foi executado antes do desafio com glicose. Por meio de corte na extremidade da cauda do animal foi efetuada uma primeira coleta de sangue para a dosagem de glicemia, o que equivale ao tempo zero (t0) do teste. Em seguida, foi realizada a injeção de uma solução glicosada a 25% (1 g/Kg de peso corporal), administrada intraperitonealmente, com posteriores coletas de amostras sanguíneas nos tempos 15, 30, 60, 120 minutos, para as dosagens de glicose.

4.6 Extração de tecidos

Sete animais de todos os grupos foram anestesiados (ketamina 200mg/kg de peso corporal e diazepam 5mg/kg de peso corporal, i.p) e eutanasiados para coleta do fígado e sangue. Além disso, os tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal foram coletados e pesados para avaliar o peso relativo (%).

4.7 Análise por Real Time PCR

O RNA total do fígado foi extraído usando o reagente Trizol® (Invitrogen Corporation, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA total foi quantificado em um Nanodrop ND-2000 (Thermo Electron, WI, EUA), após a quantificação foram mantidas de 4 a 6 amostras por grupo para as etapas seguintes. A transcrição reversa foi realizada com 3 µg de RNA total e um kit de alta capacidade para transcrição reversa- cDNA (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA). A expressão relativa foi determinada utilizando o sistema de detecção Taqman e primers para os genes-alvo: Mm00443258_m1 para Tnf-α; IL10, Mm00436450_m1 para Cxcl2, Mm00436454_m1 para Cx3cl, Mm 01231183_m1 para Cpt1a, Mm 00833328_m1 para Gpam, Hmgcr e ACTB foi utilizado como controle endógeno (4351315, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). Cada PCR continha 20ng de cDNA. A expressão gênica foi quantificada por PCR em tempo real, realizada na plataforma ABI Prism 7500 Fast. Os dados foram analisados utilizando Sequence Detection System 2.0.5 (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) e expressos com valores relativos

determinados pelo ciclo de limiar comparativo (Ct) método ($2^{-\Delta \Delta Ct}$) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.8 Análises por Western Blot

Cinco amostras do fígado (por grupo) foram homogeneizadas em tampão gelado previamente preparado (10mM EDTA; 100mM Tris, pH 7.4; 100mM pirofosfato de sódio; 10mM fluoreto de sódio; 10mM ortovanadato de sódio; 2mM PMSF; 0.01mg/mL aprotinina; 1% (v/v) Triton X-100). O material insolúvel foi removido por centrifugação (11.500 rpm) durante 30 min a 4°C. A concentração de proteína do sobrenadante foi determinada pelo método de Biureto (Gornall; Bardawill; David, 1949). O sobrenadante foi diluído em tampão Laemmli e fervido por 5 minutos antes da separação por SDS-PAGE usando um mini aparato para gel (Bio Rad, Richmond, CA, USA). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada durante 90 minutos a 120V (constante). As membranas de nitrocelulose foram incubadas com anticorpos específicos. Os anticorpos primários utilizados foram; pNF- κ B (#3033S, Cell Signaling Technology); pSTAT3 (#9145S, Cell Signaling Technology); pJNK (#4255S, Cell Signaling Technology); LC3 (ab48394, ABCAM), GPR78, o controle endógeno foi: β -actin (#4967S). Após o período de incubação com os anticorpos específicos, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado HRP-conjugated secondary antibodies (KPL, Gaithersburg, MD, USA). As proteínas reconhecidas pelo anticorpo secundário foram detectadas por SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) e visualizadas pela exposição das membranas em fotodocumentador. As intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria óptica utilizando Scion Image Software (ScionCorp, MD, USA). As intensidades das bandas foram normalizadas por ACTB (Benatti et al., 2014; Melo et al., 2014).

4.9 Imunofluorescência

Três animais de todos os grupos foram anestesiados, em seguida procedeu-se perfusão cardíaca com 4% de paraformaldeído – PFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os fígados foram extraídos e fixados em PFA 4%. Em seguida, os tecidos foram incorporados em Tissue-Tek (Sakura, Torrance, CA, USA), congelados e seccionados em cortes de 15 μ m. Os cortes foram incubados com solução de bloqueio (1% BSA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 90 min. Em seguida, eles foram incubados com anticorpos específicos durante 12h. O anticorpo primário utilizado foi: F4/80 1:200 (ab-6640, Abcam, Cambridge, MA, USA). Como anticorpo

secundário foi utilizado Goat to rat - Cy3 1:1000 (ab-6953, Abcam, Cambridge, MA, USA). DAPI 1:2000 (D9542, Sigma) foi utilizado como marcador nuclear. As imagens foram obtidas em microscópio óptico de fluorescência ampliadas em 200x. O *software* Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) foi utilizado para contagem automática de células, sendo utilizados imagens de três cortes em diferentes profundidades por animal.

4.10 ELISA

Quatro amostras de fígado por grupo foram homogeneizadas em PBS + inibidor de protease e centrifugados a 2.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. A produção de IL-1 β e TNF- α foi avaliada através do método de ELISA utilizando Kits Duo Set (R&D System, Mineapolis, MN, USA), conforme instruções do fabricante. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm. Para as análises estatísticas, os dados foram normalizados com a concentração de proteína tecidual, quantificada pelo método de Biureto (Gornall; Bardawill; David, 1949). O conteúdo sérico de 6 animais por grupo de IL-1 β e TNF- α foi determinado diretamente pelo método de ELISA.

4.11 Análises bioquímicas do soro

O colesterol total e triglicérides no soro de 4 a 6 animais por grupo foram determinados utilizando os kits enzimáticos Colesterol (1770080, Labor Lab) e Triglicérides (1770290, Labor Lab), respectivamente. Para determinar as transaminases AST e ALT no soro foram utilizados os kits enzimáticos Transaminase AST (TGO) Cinética (K048, Bioclin) e Transaminase ALT (TPG) Cinética (K049, Bioclin). As análises foram feitas conforme instruções do fabricante.

4.12 Extração de lipídios

A extração de lipídios das fezes de todos os animais e do fígado de 4 a 6 animais por grupo foi realizada de acordo com a metodologia de Folch, Lees e Sloane-Stanley (1957). Os lipídios totais nas fezes foram quantificados pela diferença de peso entre o tubo contendo os lipídios e o mesmo tubo vazio, previamente pesado. Os lipídios totais hepáticos foram ressuspensos em álcool isopropílico e o colesterol total e triglicérides hepáticos foram determinados utilizando os kits enzimáticos Colesterol (1770080, Labor Lab) e Triglicérides

(1770290, Labor Lab), respectivamente. As análises foram feitas conforme instruções do fabricante.

4.13 Cultura e tratamento de células

Foi utilizada a linhagem celular hepática de camundongos (Hepa-1c1c7 ATCC CRL-2026).

As células foram cultivadas em meio de cultura α MEM (Alpha Modified Eagle's Medium; Invitrogen) com 1% de penicilina (100 U/mL)/estreptomicina (100 μ g/mL) (Invitrogen) e mantidas em estufa incubadora à 37°C de temperatura, 5% de CO₂ e 80% de umidade até o ponto de confluência.

As células foram colocadas em placas de 6 poços e expostas à 5% do soro de 3 a 4 animais dos grupos controle ou suplementados com óleo de coco ou soja por 24 horas. As células foram extraídas para posterior análise por Real Time PCR.

4.14 Análises Estatísticas

Os resultados são apresentados como a média $\pm$ erro padrão da média (S.E.M). Os dados foram analisados usando a análise unidirecional de variância (ANOVA) seguida de múltiplas comparações entre grupos usando o teste post-hoc de Bonferroni ou comparação entre dois grupos usando o teste t de Student. A significância estatística para todas as análises foi estabelecida em $p < 0,05$. Todas as comparações estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism 6.01 (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 2. Composição dos ácidos graxos dos óleos de coco

COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

Ácido graxo	Óleo de coco	Óleo de soja
C 6:0 capróico (% m/m)	0,570	-----
C 8:0 caprílico (% m/m)	7,590	-----
C10:0 cáprico (% m/m)	6,210	-----
C12:0 láurico (% m/m)	48,360	0,180
C14:0 mirístico (% m/m)	18,850	0,190
C15:0 pentadecanóico (% m/m)	0,010	0,020
C16:0 palmítico (% m/m)	8,710	10,960
C16:1 palmitoléico (% m/m)	0,000	0,090
C17:0 margárico (% m/m)	0,020	0,100
C17:1 cis-10-heptadecenóico (% m/m)	0,000	0,060
C18:0 esteárico (% m/m)	3,310	3,400
C18:1 oléico (% m/m)	5,300	25,520
C18:2 trans t-linoléico (% m/m)	-----	0,110
C18:2 linoléico (% m/m)	0,790	52,070
C18:3 trans t-linolênico (% m/m)	-----	0,140
C18:3 linolênico (% m/m)	0,050	5,880
C20:0 araquídico (% m/m)	0,100	0,380
C20:1 eicosenóico (% m/m)	0,030	0,230
C22:0 behênico (% m/m)	0,020	0,510
C24:0 lignocérico (% m/m)	0,040	0,190
TOTAL (%)	100	100
AG SAT	93,790	15,930
AG MONO	5,330	25,840
AG POLI	0,840	57,950
TOTAL (%)	100	100
Relação $\omega 6:\omega 3$	16:1	9:1

5.1 Parâmetros zoométricos e perfil lipídico após a suplementação

Avaliou-se os parâmetros zoométricos dos animais submetidos a suplementação de óleo de coco em diferentes doses (OC100, OC300) ou soja em diferentes doses (OS100, OS300) comparados aos animais que receberam água (CO). Os parâmetros avaliados foram peso durante o tratamento (Figura 1A), ganho de peso (Figura 1.B), adiposidade epididimal e retroperitoneal (Figura 1.C e D), índice hepatossomático (Figura 1.E) que representa a massa do fígado relativizada pelo peso corpóreo e total de lipídios nas fezes (Figura 1F).

Os animais dos grupos suplementados com óleo de coco apresentaram maior ganho de peso a partir da segunda semana até o final do tratamento (Figura 1.A e B). A adiposidade epididimal também se mostrou aumentada nos grupos OC100 e OC300 (Figura 1.C). O grupo OC300 foi o único a apresentar maior adiposidade retroperitoneal em relação ao grupo CO (Figura 1.D). Como pode ser visualizado na figura (Figura 1.E), não foi observada nenhuma diferença na massa do fígado entre os grupos.

O estudo de Manio et al., (2018) avaliou o consumo de óleo de coco inserido na dieta de camundongos C57BL/6N, durante 30 dias. Os camundongos foram divididos em grupos que receberam baixo teor de gordura (10% kcal de óleo de soja), óleo de coco (10% kcal de óleo de soja, 20% kcal de óleo de coco) ou óleo de soja (30% kcal de óleo de soja). O estudo não encontrou diferenças entre os grupos em relação ao ganho de peso, mas a ingestão alimentar dos grupos com 30% de gordura na dieta estava diminuída, tornando essa ingestão isocalórica entre os grupos (MANIO et al., 2018).

Um estudo com humanos, avaliou o efeito do consumo diário de óleo de coco virgem (VCO) nos níveis de lipoproteínas plasmáticas e eventos adversos. A população do estudo era de 35 voluntários tailandeses saudáveis, com idades entre 18 e 25 anos. Os participantes receberam por 8 semanas 15 mL de óleo de coco ou 15 mL de solução de carboximetilcelulose, duas vezes ao dia. O estudo não observou alterações no peso entre os grupos e verificou aumento de HDL no plasma do grupo suplementado com óleo de coco. No entanto a ingestão alimentar não foi mensurada e no grupo de óleo de coco 71,9% dos participantes relataram eventos diarreicos (CHINWONG et al., 2017).

Ratos saudáveis suplementados com 10% de óleo de coco de 10% em suas dietas, apresentaram diminuição do peso em relação a dieta controle após oito semanas, no entanto o grupo suplementado com 15% de óleo de coco na dieta não apresentou alteração no peso. No estudo não foi avaliada a ingestão alimentar dos ratos (FAMUREWA et al., 2018).

Muthuramu et al., (2017) avaliaram em camundongos C57BL/6 os efeitos da suplementação dietética de 10% óleo de coco e 0,2% de colesterol sobre cardiomiopatia induzida por constrição aórtica transversal (TAC). Os animais foram expostos a dieta durante 5 semanas e o grupo Sham que recebeu óleo de coco não apresentou diferenças em relação ao peso corpóreo e peso do fígado comparado ao grupo controle Sham. No entanto, o estudo encontra que mesmo na ausência de obesidade, resistência à insulina ou esteatose cardíaca a dieta com óleo de coco aumentou o estresse oxidativo e agravou a cardiomiopatia induzida por sobrecarga de pressão (MUTHURAMU et al., 2017)

A ingestão dietética de dietas 10% de óleo de semente de uva, milho ou coco durante 28 dias por ratos albinos saudáveis não resultou em modificações no peso corpóreo e no peso do fígado, no entanto o fígado dos animais expostos à dieta com óleo de coco apresentou aumento na porcentagem de gordura (WALL-MEDRANO et al., 2017).

No trabalho de Quitete et al., 2019 ratos Wistar fêmeas foram suplementadas com óleo de soja ou óleo de coco (0.5g/kg de peso) durante o período de lactação, e os parâmetros zoométricos da prole adulta (180 dias) suplementada com a mesma dose de óleo de coco ou não foram avaliados. O leite das mães que receberam óleo de coco apresentou maiores níveis de colesterol, triglicérides e diminuição dos níveis de leptina, além de ser mais calórico, quando comparado ao leite das mães suplementadas com óleo de soja. As mães e a prole durante o período de lactação não apresentaram diferenças na ingestão alimentar, ganho de peso e gordura visceral. Ao final dos 180 dias a prole de mães que receberam óleo de coco durante a lactação não suplementadas pós desmame apresentaram maior ganho de peso, aumento da ingestão alimentar, maior acúmulo de gordura visceral e diminuição de massa magra, quando comparadas à prole de mães suplementadas com óleo de soja. Interessantemente, a prole suplementada com óleo de coco pós desmame teve menor ingestão alimentar quando comparada à prole que somente as mães foram suplementadas com óleo de soja ou de coco, com ganho de peso semelhante à prole que não recebeu óleo de coco, porém com menor gordura visceral quando comparada a esse grupo. Esses dados demonstram que a suplementação com óleo de coco durante a lactação leva à desordens metabólicas na prole (QUITETE et al., 2019).

Nota-se que são raros os estudos que avaliam a suplementação dietética de óleo de coco como aplicada neste trabalho, a maioria dos estudos avaliam a inclusão do óleo na dieta ou a suplementação materna. Como discutido acima Manio et al., 2018 não encontrou diferenças entre o ganho de peso nos grupos óleo de coco, no entanto a ingestão alimentar estava diminuída nos grupos com maior porcentagem de gordura na dieta. O estudo de Chinwong et al., 2017 que avaliou a suplementação de óleo de coco em humanos, não encontrou alterações

no peso, no entanto demonstrou que o grupo suplementado relatou diarreia o que pode ter interferido na absorção de nutrientes dos participantes. Famurewa et al., 2018, Muthuramu et al., 2017 e Wall-Medrano et al., 2017 não avaliaram a ingestão alimentar e a composição das fezes dos animais.

A inclusão de gordura na dieta pode interferir na ingestão alimentar ou induzir diarreia, podendo relacionar-se com a ausência de alterações em alguns estudos que aumentam a porcentagem de gordura na dieta. No presente trabalho, as doses de suplementação utilizadas de óleo de coco não modificaram a ingestão alimentar dos animais mas diminuíram o gasto energético e a atividade locomotora nos ciclos claro e escuro dos grupos OC100 e OC300 (dados do grupo ainda não publicados), adicionalmente, a suplementação com os diferentes óleos não alterou a excreção lipídica nas fezes (Figura 1.F). Visto que os camundongos suplementados com óleo de coco não apresentaram alterações na ingestão alimentar e excreção lipídica nas fezes, mas prejuízos na taxa metabólica e locomoção, justifica-se os resultados de aumento de peso e adiposidade, diferentemente dos dados encontrados na literatura, que mostraram influências de alterações na ingestão e perda de nutrientes nas fezes, como discutido anteriormente. Nesse sentido, a suplementação de óleo de coco frente ao consumo alimentar inalterado resultou no aumento do depósito de tecido adiposo (Figura 1 A-D).

O índice hepatossomático é um indicador de alterações no tamanho do fígado (RAHARDJO et al., 2013), não foram observadas alterações neste índice (Figura 1.E) e outros trabalhos como os de Wall-Medrano et al., (2017) e Muthuramu et al., (2017) que avaliam os efeitos da ingestão do óleo de coco, também não encontraram alterações morfológicas no órgão.

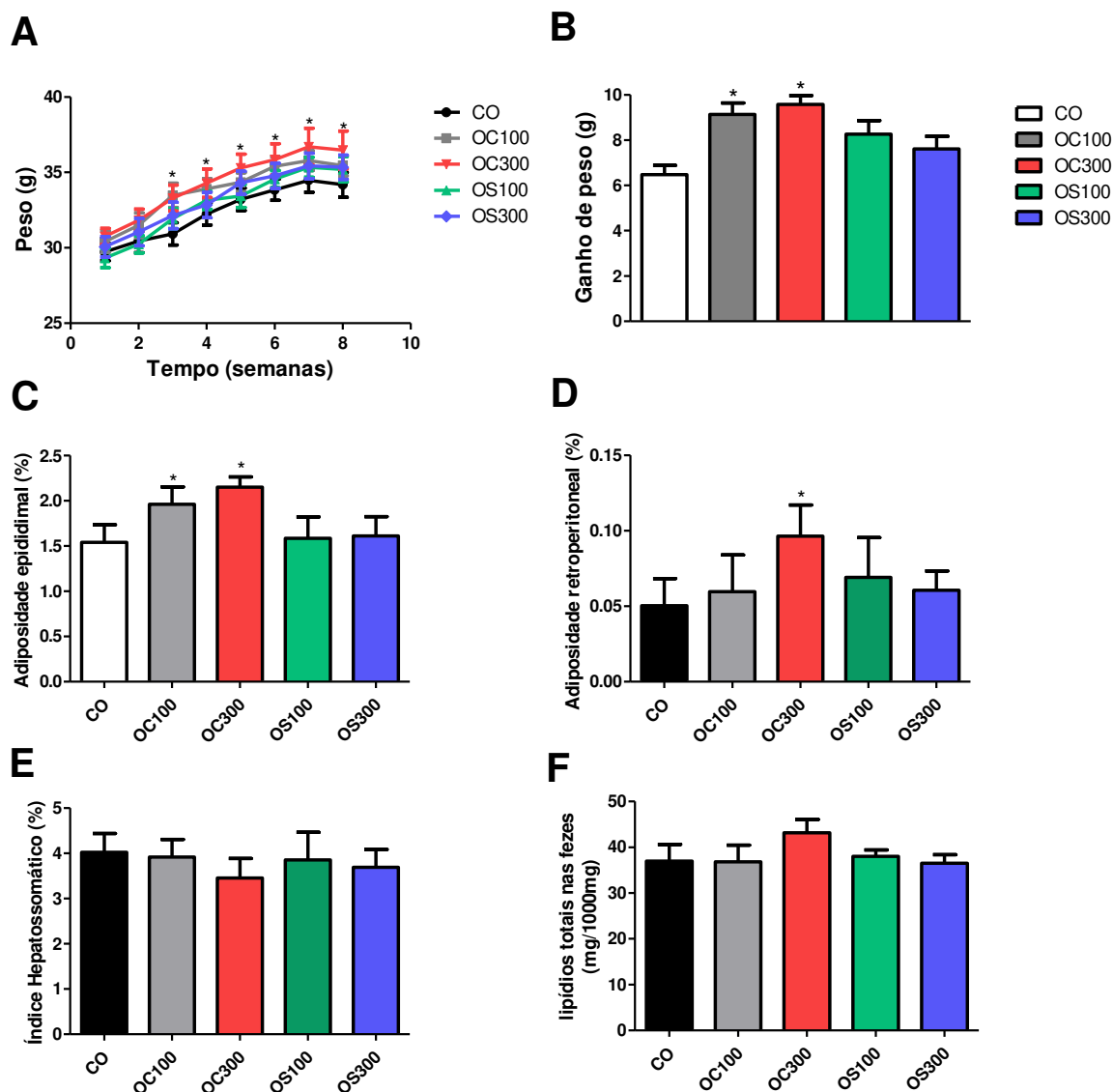


Figura 1. Parâmetros zoométricos de camundongos suplementados por 8 semanas com óleo de coco ou óleo de soja. A e B. Ganho de peso. C. Adiposidade epididimal. D. Adiposidade retroperitoneal. E. Índice hepatossomático. F. Lipídios totais nas fezes. Valores representados como média $\pm$ erro padrão (SEM); *Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao CO. $n = 10$ animais por grupo (A, B, F), $n = 7$ animais por grupo (C,D,E).

O perfil lipídico dos camundongos também foi avaliado, todos os grupos suplementados com os óleos apresentaram aumento do conteúdo de colesterol total e triglicérides no soro (Tabela 3).

No entanto, somente os animais suplementados com óleo de coco (OC100 e OC300) apresentaram maiores níveis séricos de AST. Níveis elevados de ALT e AST indicam dano hepatocelular e a elevação destes parâmetros podem ser indicativos de esteato-hepatite

(LALA; MINTER, 2019). No estudo de El-Fattah e Barakat, 2013, não foram observadas alterações nos níveis séricos de AST entre ratos Sprague Dawley machos alimentados com dietas contendo azeite de oliva ou óleo de coco virgem por 4 semanas. Imafidon e Okunrobo, 2012 investigaram o efeito da suplementação dietética com 10% de óleo de palma, coco ou amendoim por 6 semanas em parâmetros bioquímicos de função hepática, sendo o grupo suplementado com óleo de coco capaz de aumentar os níveis séricos de AST.

Com base nos achados de lipídios séricos, o conteúdo lipídico hepático foi investigado e observou-se maior acúmulo de triglicerídeos no fígado dos animais OC300, comparados aos controles e aos OC100 (Figura 2.A). Em relação ao colesterol hepático observou-se maior acúmulo nos grupos que receberam óleo de coco comparados ao controle (Figura 2.B).

Um estudo brasileiro, de Resende et al., (2015) encontrou resultados semelhantes aos do presente trabalho. O estudo verificou os efeitos da suplementação com óleo de coco na composição corporal e perfil lipídico de ratos Wistar submetidos à exercício físico. A suplementação com óleo de coco foi de 3 mL/Kg de massa corporal e o meio de administração foi gavagem, durante 28 dias. Tanto o grupo sedentário quanto o exercitado suplementados apresentaram maiores níveis plasmáticos de triglicérides, VLDL, LDL, HDL e menor razão LDL/HDL, sendo que o grupo exercitado suplementado apresentou pior perfil lipídico que o exercitado não suplementado (RESENDE et al., 2015).

Oliveros e colaboradores investigaram os efeitos de uma dieta rica em gordura saturada proveniente do óleo de coco no metabolismo lipídico, oxidativo e na renovação do ácido araquidônico em macrófagos peritoneais residentes em camundongos. O estudo utilizou camundongos C57BL / 6 fêmeas. A dieta experimental foi introduzida após o desmame, contendo óleo de coco ou óleo de soja como fonte de gordura (15% do valor energético total da dieta), por 6 semanas. A concentração de lipídios totais, triglicerídeos, colesterol (LDL + VLDL), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutathiona reduzida aumentaram no plasma de camundongos alimentados com a dieta que continha óleo de coco (OLIVEROS et al., 2004)

Wall-Medrano et al. (2017), avaliaram os efeitos da ingestão de dietas com 10% de óleo de semente de uva, milho ou coco durante 28 dias em ratos albinos saudáveis. O grupo óleo de coco apresentou aumento nos níveis de triacilgliceróis séricos e hepáticos e colesterol total, concomitante com redução nos níveis de colesterol HDL comparados aos óleos de uva e milho (WALL-MEDRANO et al., 2017).

O aumento da ingestão dietética de gordura é um fator que resulta em dislipidemia (SHANMUGASUNDARAM et al., 1986) e em todos os grupos suplementados no nosso trabalho observamos alterações no perfil lipídico. No entanto, o que a literatura e o presente estudo mostram é que a resposta metabólica é mais afetada nos animais que recebem como fonte de gordura o óleo de coco. O estudo de Oliveros et al., (2004) que compara diferentes dietas hiperlipídicas mostra perfis lipídicos ruins no grupo suplementado com óleo de coco e Wall-Medrano et al. (2017) que avalia os efeitos metabólicos de diferentes óleos em condições normolipídicas também encontra dislipidemia e aumento da deposição de gorduras no fígado dos animais submetidos a ingestão da dieta com óleo de coco.

No entanto, vale ressaltar, que existem estudos que encontram efeitos metabólicos contrários, nos quais, o óleo de coco melhora o perfil lipídico dos animais como o de Famurewa et al., (2018), que mostrou que ratos saudáveis com dietas suplementadas com 10% e 15% de óleo de coco durante 5 semanas apresentaram redução significativa nos níveis de colesterol total, triglicerídeos, LDL e aumento dos níveis de HDL (FAMUREWA et al., 2018).

O óleo de coco é majoritariamente constituído de ácidos graxos saturados de cadeia média e estudos apontam que os AGCM podem melhorar o perfil lipídico e reduzir a deposição de gordura no fígado. Como o de Huizi et al., (2018), que estudou camundongos com hipercolesterolemia alimentados com dieta rica em AGCM por 16 semanas. Ao final do experimento os animais da dieta rica em AGCM apresentaram melhor perfil metabólico e lipídico. O estudo de Ronis et al., (2013) mostrou que a substituição do óleo de milho pelo óleo de TCM foi benéfico para diminuição da gravidade da doença hepática gordurosa em ratos (RONIS et al., 2013). No entanto o óleo utilizado nestes estudos é constituído de 54% de caprílico (C8:0) e 41% de cáprico (C:10), composição totalmente diferente do óleo de coco extra virgem, que possui 6 e 7% destes ácidos graxos respectivamente e é majoritariamente composto de ácido laurico (48,3%).

Denke e Grundy, 1992 avaliaram os efeitos do ácido láurico nos lipídios e lipoproteínas plasmáticos comparados com os efeitos do ácido palmítico e ácido oleico em homens, por 3 semanas. A dieta com alto teor de láurico resultou em maiores concentrações de colesterol total e colesterol LDL no plasma, quando comparada à dieta com alto teor de ácido oleico (DENKE; GRUNDY, 1992). Themme et al., (1996) também investigaram o efeito nos lipídios séricos e lipoproteínas de dietas ricas em ácidos láurico, palmítico ou oleico. Homens e mulheres consumiram as dietas experimentais, cada uma por 6 semanas. Com a dieta com ácido láurico, a concentração sérica de colesterol total e HDL dos indivíduos apresentou-se aumentada em comparação com a dieta com ácido palmítico ou ácido oleico (THEMME et al., 1996).

O estudo de Woollett e colaboradores, 1992 investigou a participação de cada ácido graxo saturado no aumento de colesterol LDL. Hamsters foram alimentados com dietas adicionadas de colesterol (0,14%) e triacilgliceróis em várias concentrações, durante 30 dias. Apenas os ácidos graxos 12:0, 14:0 e 16:0 (láurico, mirístico e palmítico), mas não os compostos 6:0, 8:0, 10:0 e 18:0 (capróico, caprílico, cáprico e esteárico) aumentaram a fração lipídica no fígado e colesterol LDL circulante (WOOLLETT et al., 1992). Ou seja, o ácido láurico, presente no óleo de coco pode ter contribuído para o aumento de depósito de lipídeos no fígado dos animais suplementados com esse óleo, o que não foi observado no grupo suplementado com óleo de soja. Os óleos ricos em PUFA's estão associados com a prevenção de DHGNA (HERNÁNDEZ et al., 2016) e o óleo de soja contém 57,9% de PUFA's.

Tabela 3. Níveis séricos de colesterol total, triglicérides, AST e ALT.

	CO	OC100	OC300	OS100	OS300
Colesterol total (mg/dL)	53,86±11,94	76,91±7,29*	76,91±7,29*	74,22±7,19*	82,78±20,30*
Triglicérides (mg/dL)	191,70±1,61	208±2,743*	208,70±1,77*	209,80±0,88*	208,50±2,14*
AST (U/L)	241,53±15,3	340,47±16,2*	444,65±58,4*	239,45±10,8	323,01±71,4
ALT (U/L)	123,67±23,7	170,72±16,9	148,41±11,8	133,86±29,1	80,32±10,9

Valores representados como média ± erro padrão (SEM); Letras diferentes significam diferença estatística $p < 0.05$; n = 4-7 animais por grupo.

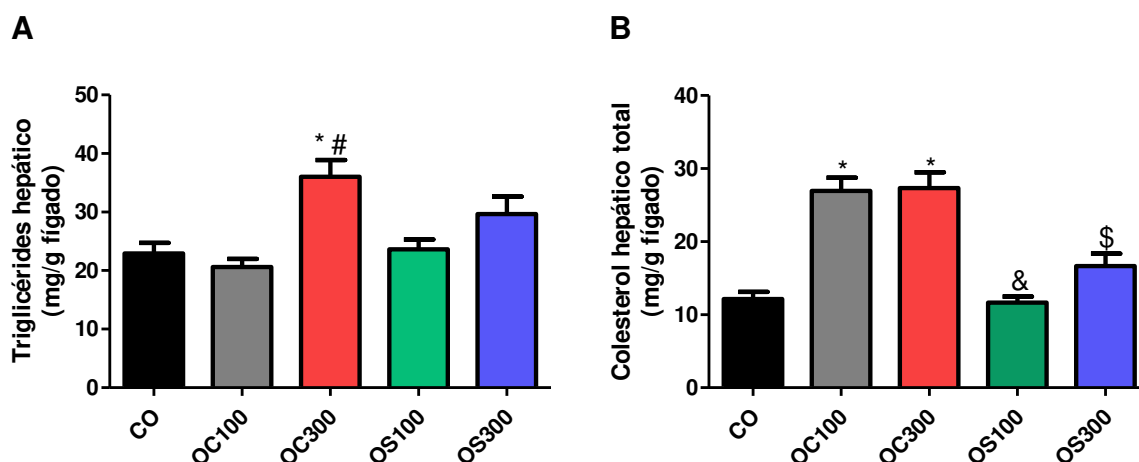


Figura 2. Níveis hepáticos de triglicérides e colesterol total. A. triglicérides hepático. B. Colesterol hepático total. Valores representados como média ± erro padrão (SEM); *Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo CO; # Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os

grupos OC100 e OC300; & Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos OC100 e OS100; \$ Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos OC300 e OS300. $n = 4-6$ animais por grupo.

5.2 Perfil glicêmico após a suplementação

A glicemia dos camundongos foi avaliada em jejum de 12 horas ao final da quarta e da oitava semanas de suplementação. A glicemia em jejum não variou em função da suplementação (Figura 3.A). Para investigar mais profundamente a homeostase glicêmica os animais foram submetidos aos testes de tolerância à glicose e à insulina.

Comparando-se o grupo OS100 com o grupo CO, observa-se que os animais do grupo OS100 possuem intolerância à glicose, pois apresentaram uma curva glicêmica alterada temporariamente que retornou ao normal duas horas após a sobrecarga de glicose (Figura 3.B). O grupo OC300, quando comparado com o grupo controle, apresentou maior sensibilidade à insulina (Figura 3.C).

Após suplementação com o menor volume de óleo de soja, nossos animais demonstraram intolerância à glicose. Esse achado é corroborado por Ikemoto e colaboradores (1996), que alimentou camundongos C57/BL6 com uma dieta hiperlipídica com 60% de gorduras provenientes do óleo de soja durante 18 semanas e observou níveis elevados de glicose sanguínea durante o teste de tolerância à glicose. O óleo de soja é rico em ácidos graxos poli-insaturados, como o ômega-6, que apresenta correlação positiva com resistência à insulina (PIMENTEL et al, 2010). Porém, vale ressaltar que no teste de tolerância à insulina os grupos suplementados com soja apresentaram taxas de glicemia normais.

Os animais suplementados com 300 μ L de óleo de coco apresentaram maior sensibilidade à insulina (Figura 3.C). Na literatura, não foram encontradas diferenças na sensibilidade à insulina em camundongos C57/BL6 que receberam dieta hiperlipídica com óleo de coco por 35 semanas, no entanto os animais que receberam dieta hiperlipídica com óleo de soja apresentaram intolerância à glicose (DOEL et al, 2015).

O estudo de Narayanankutty et al., (2016), investigou a capacidade do óleo de coco em prevenir os efeitos metabólicos de dieta rica em frutose. Ratos Wistar alimentados com dietas ricas em frutose com diferentes fontes lipídicas, óleo de coco virgem ou óleo de coco refinado foram comparados com dieta de referência com carboidratos complexos e óleo de amendoim, nas mesmas proporções das dietas de intervenção. Os animais alimentados com dietas com óleo de coco refinado apresentaram prejuízos no controle glicêmico e maior resistência à insulina. No entanto, os animais alimentados com dieta com óleo de coco virgem apresentaram tolerância a glicose semelhante à dieta de referência, apontando que o óleo de coco virgem

preveniu o descontrole glicêmico promovido pela dieta rica em frutose, sendo esse efeito atribuído aos compostos fenólicos presentes no óleo de coco virgem como ácido cafeico, ácido ferúlico e catequina, que são perdidos após o processo de refino do óleo (NARAYANANKUTTY et al., 2016).

Em outro estudo, camundongos machos BALB /c foram divididos em dois grupos e alimentados com dieta controle ou rica em carboidratos refinados (HC) para induzir obesidade por oito semanas. Na nona semana, os ratos alimentados com dieta HC foram aleatoriamente reagrupados em quatro grupos suplementados com diferentes doses de óleo de coco virgem de 1000-9000 mg /kg. Independentemente da dose utilizada, a suplementação com VCO promoveu menor adiposidade e também melhora na tolerância à glicose, menores níveis séricos de glicose e lipídios e diminuição da esteatose hepática (ZICKER et al., 2019).

O estudo de Vijayakumar et al., (2016), com humanos, foi conduzido para investigar o impacto do óleo de cozinha (óleo de coco ou óleo de girassol) no perfil lipídico, mecanismo antioxidante e função endotelial em pacientes com doença cardiovascular (DCV). Em um estudo randomizado em um único centro na Índia, pacientes com DCV estável em atendimento médico padrão foram designados para utilizar óleo de coco ou óleo de girassol como meio de cozimento por 2 anos. Não houveram alterações no perfil glicêmico dos participantes de ambos os grupos (VIJAYAKUMAR et al., 2016).

Nota-se que os estudos apontam que o óleo de coco não altera ou pode melhorar o perfil glicêmico em condições de exposição a dieta de indução de obesidade, rica em carboidratos refinados, em animais. No entanto, não encontramos estudos que avaliem os efeitos do óleo de coco sobre a glicemia de animais ou humanos em uma dieta equilibrada, o estudo de Vijayakumar et al., 2016 que avaliou o consumo de óleo de coco a longo prazo em humanos, não encontrou alterações no perfil glicêmico. Nos presentes achados, a maior dose de óleo de coco determinou aumento na sensibilidade à insulina, no entanto a glicemia de jejum não foi alterada, sendo necessário outros experimentos que avaliam o impacto da suplementação do óleo de coco sob a homeostase glicêmica, para que os padrões de resposta sejam identificados e conclusões consistentes possam ser geradas.

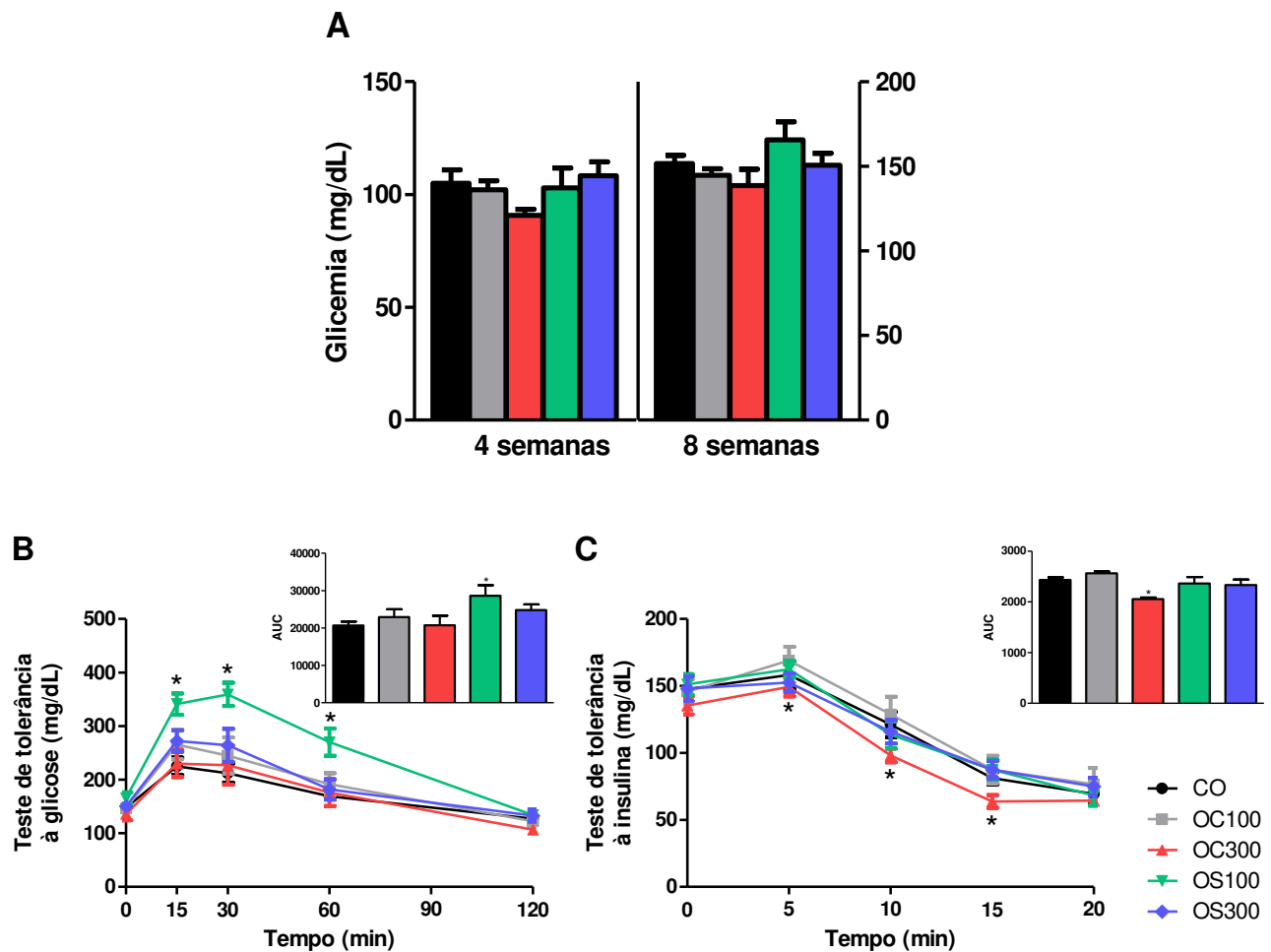


Figura 3. Efeitos da suplementação com óleo de coco ou óleo de soja na homeostase glicêmica. A. Glicemia em jejum após 4 e 8 semanas de suplementação. B. Teste de tolerância à glicose após 8 semanas de suplementação. C. Teste de tolerância à insulina após 8 semanas de suplementação. Valores representados como média $\pm$ erro padrão (SEM); *Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao CO. $n = 6$ animais por grupo.

5.3 Perfil inflamatório após suplementação

Para investigar alterações no perfil inflamatório no fígado de animais suplementados com óleo de coco foram realizadas diversas técnicas com marcadores inflamatórios, como imunofluorescência, análise de RNAm (no tecido hepático e em células Hepa-1c1c7) e de conteúdo proteico por técnicas de ELISA no soro e no fígado e Western Blot no fígado.

Em relação ao perfil inflamatório, o grupo OC300 foi o que apresentou maior quantidade de alterações. A suplementação com 300µL de óleo de coco levou a aumento de células F4/80 + (Figura 4.A-B), de RNAm de Cxcl2, Cx3cl1 e TNF- α quando comparado ao grupo CO (Figura 5.A-C). O grupo OC300 também apresentou aumento do conteúdo proteico de pNFkB e pSTAT3 e nenhuma diferença foi observada entre os grupos com relação à proteína pJNK (Figura 7.A-C).

A suplementação de 100 µL de óleo de coco também aumentou o perfil inflamatório hepático dos animais. Observou-se aumento nos níveis hepáticos de RNAm de Cx3cl1 (Figura 5.B) e RNAm e proteína da citocina TNF- α no grupo OC100 (Figura 5.C e 6.C). Nas células Hepa-1c1c7 tratadas por 24 horas com o soro dos animais do grupo OC100 observamos aumento da expressão gênica de TNF- α e diminuição do gene da IL10, citocina com perfil anti-inflamatório (Figura 8). Não houve diferença entre os grupos na expressão gênica e no conteúdo proteico de IL1 β no fígado (Figura 5.D e 6.A).

Os níveis séricos de IL1 β no ensaio de ELISA não se mostraram alterados em relação ao controle, mas estão diminuídos no grupo OS300 quando comparado ao grupo OC300 (Figura 6.B). Por outro lado, os níveis de TNF- α no soro estão aumentados em todos os grupos suplementados (Figura 6.D).

Os achados apontam que a suplementação com os óleos aumentou o nível sérico de inflamação. No entanto, somente a suplementação com óleo de coco aumentou o perfil inflamatório hepático. A inflamação hepática é um gatilho para doenças hepáticas e o principal fator que dirige o dano hepatocelular, desencadeando a progressão da DHGNA para fibrogênese grave e carcinoma hepatocelular (CAMPO et al., 2018). O ácido láurico, que está presente em torno de 48% no óleo utilizado, está relacionado com a ativação de TLR4 em células imunes, podendo ativar a resposta pró-inflamatória (LEE et al., 2003).

Foram observados níveis gênicos elevados da quimiocina atrativa de células inflamatórias Cx3cl1 em ambos os grupos suplementados com óleo de coco e Cxcl2 no grupo OC300. Camundongos que receberam dieta deficiente em colina com 10% de óleo de coco por 21 dias também apresentaram aumento na expressão de Cxcl2 (LEE et al, 2007). Os sítios de ligação para transcrição de Cxcl2 em humanos são STAT3 e NFkB, sendo sua expressão induzida por TNF- α (SINGHA, GATLA; VANCUROVA, 2015).

A síntese e expressão local de Cx3cl1 é regulada por vários fatores, como citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) (WOJDASIEWICZ et al, 2014). O aumento da atividade nuclear de NFkB induz a expressão de Cxcl2 (Dong et al 2013), e Cx3cl1 (CHANDRASEKAR et al, 2003), como observado em nossos resultados. Interessantemente, Liu e colaboradores (2018) sugerem que Cx3cl1 também contribuiu para a ativação da via do NFkB, ou seja, Cx3cl1 tem uma função auto reguladora que interage com o receptor de TNF- α para ativar NFkB (WOJDASIEWICZ et al, 2014).

Citocinas como IL6 e TNF- α são capazes de ativar a via de sinalização JAK2/STAT3 (LIU et al, 2015). A translocação de pSTAT3 para o núcleo resultará na produção de mediadores inflamatórios. Na fisiologia normal, o fator nuclear-kB (NFkB) é sequestrado no citoplasma pelo inibidor de NFkB α (IkB α). Quando as IKB quinases (IKKs) são ativadas por vários patógenos e /ou citocinas pró-inflamatórias, o IkB α é fosforilado e degradado, permitindo a translocação nuclear de NFkB. A STAT3, que também é ativada por vias intrínseca e extrínseca, tem a capacidade de inibir a IKK e, assim, contribui para a ativação persistente do NFkB durante a inflamação (YU; PARDOLL; JOVE, 2009). No nosso modelo experimental, o grupo OC300 apresentou maiores níveis proteicos de STAT3 fosforilada, ou seja, na sua forma ativa, bem como de pNFkB e maior expressão de TNF- α , confirmando a relação entre esses eventos inflamatórios.

Poucos estudos avaliam a resposta inflamatória em diferentes tecidos após o consumo de óleo de coco em animais. O estudo recente de Dias e colaboradores, que avaliou a substituição do óleo de coco na dieta em diferentes concentrações, em uma dieta normocalórica e normolipídica em ratos, observou aumento de IL1 β e IL12 no tecido adiposo e discute que o aumento na resposta inflamatória destes animais é preocupante, pois pode ser relacionada com resistência à insulina e diabetes tipo II (DIAS et al., 2018).

O estudo de Díaz-Villaseñor et al., (2013) avaliou o efeito da interação do tipo de óleo (óleo de coco ou de soja) em dietas com 5% ou 10% de gordura na funcionalidade do tecido adiposo branco de ratos Zucker. Os grupos experimentais que consumiram óleo de coco virgem apresentaram maior incorporação de ácidos graxos capricos e mirísticos (C10: 0 e C14: 0,

respectivamente) no tecido adiposo. Além disso, verificou-se que o consumo de óleo de coco resultou em maior acúmulo de tecido adiposo e no total de AGS. O trabalho discute que o perfil de ácidos graxos no tecido adiposo é fortemente influenciado pela dieta consumida e que várias anormalidades metabólicas desenvolvidas durante a obesidade estão associadas à tecido adiposo disfuncional (DÍAZ-VILLASEÑOR et al., 2013). Nosso grupo investigou o perfil inflamatório no tecido adiposo branco (dados não publicados), verificando aumento na expressão gênica das citocinas TNF- α e IL6 em todos os grupos suplementados e IL1 β somente no grupo OC300, além de aumento na fosforilação de JNK e NF κ B nesse mesmo grupo, indicando que o maior consumo de óleo de coco exacerba a inflamação nesse tecido.

Por outro lado, o estudo de Zicker e colaboradores que avaliaram em camundongos obesos machos BALB /c alimentados com dieta rica em carboidratos refinados e posteriormente suplementados com diferentes doses de óleo de coco virgem observaram diminuição do número de leucócitos e das concentrações de TNF- α e IL-6 no tecido adiposo, bem como a redução da contagem de leucócitos totais, células circulantes mononucleares e polimorfonucleares (ZICKER et al., 2019).

Os animais que receberam 300 μ L de óleo de soja apresentaram menores níveis hepáticos de Cxcl2, Cx3cl1, TNF- α e pNF κ B e séricos de IL1 β quando comparados ao grupo suplementado com o mesmo volume de óleo de coco, porém, sem diferenças em relação ao controle. Henkel e colaboradores (2017) também não encontraram alterações no seu grupo experimental que ingeria óleo de soja na dieta em relação ao grupo controle na expressão gênica de Cxcl2, IL1 β e TNF- α no fígado, reforçando nossa ideia de que os ácidos graxos presentes no óleo de soja não causam inflamação nesse órgão.

Ácidos graxos saturados, particularmente ácido láurico e ácido palmítico, são capazes de estimular a resposta inflamatória através da via de sinalização TLR4. Lee e colaboradores publicaram o primeiro estudo que demonstrou o efeito de diferentes ácidos graxos na via de sinalização do TLR4. Nesse estudo, verificou-se que os ácidos láurico, palmítico e esteárico poderiam induzir a expressão de COX-2 através de mecanismos dependentes de NF κ B em uma linhagem celular de macrófagos. Entre os ácidos graxos saturados que foram testados, o ácido láurico (C12: 0) teve a maior capacidade de ativação através do TLR4. Diferentemente dos AGS, ácidos monoinsaturados e poli-insaturados não levaram à ativação do sinal TLR4 (LEE et al. 2003a). Como todos os grupos suplementados tiveram aumento nos níveis sérios de TNF- α tratamos células de hepatoma Hepa-1c1c7 com o soro dos animais, e observamos aumento de mRNA de TNF- α no grupo OC100 e diminuição da expressão gênica da citocina anti-inflamatória IL10, como o ácido láurico é o principal componente do óleo de coco e sabendo

que esse ácido graxo saturado de cadeia média é capaz de desencadear resposta inflamatória através de TLR4 (Lee et al. 2003b) acreditamos que um maior conteúdo de C12:0 no soro dos animais OC100 foi o responsável por ativar essa via inflamatória e aumentar a expressão TNF- α nessa linhagem celular. Vale ressaltar que atualmente discute-se sobre a ativação de TLR4 mediada por AGS, um trabalho importante da *Cell Metabolism* de 2018 aponta que TLR4 não é um receptor para AGS, no entanto medeia a inflamação por AGS de forma indireta, reprogramando o metabolismo de macrófagos (LANCASTER et al., 2018).

No trabalho de Sveia e colaboradores (2017), apenas a fração polifenólica do óleo de coco foi utilizada, e houve diminuição na expressão de TNF- α e na atividade de NFkB nuclear em cultura primária de células sanguíneas mononucleares humanas. Esses dados mostram, mais uma vez, que provavelmente é a porção de ácidos graxos saturados presentes no óleo de coco a responsável por desencadear a cascata inflamatória, por serem reconhecidos pelo receptor TLR4, que sinaliza a translocação de pNFkB para o núcleo, levando à produção de TNF- α (MILANSKI et al, 2009).

Com os presentes achados, sugerimos que o ácido láurico presente no óleo de coco pode ativar vias relacionadas com a inflamação, como a do TLR4, em células do tecido hepático (LEE et al., 2003), o que estaria associado com aumento na produção de citocinas como TNF- α e fosforilação de NFkB e STAT3, potencializando a inflamação no tecido hepático, causando dano hepatocelular. No entanto, é importante enfatizar que estes resultados devem ser estritamente relacionados com a suplementação de óleo de coco em camundongos com dietas padrão. Como discutido acima em condições de obesidade induzida por dietas ricas em carboidratos simples os resultados no perfil inflamatório são diferentemente descritos na literatura.

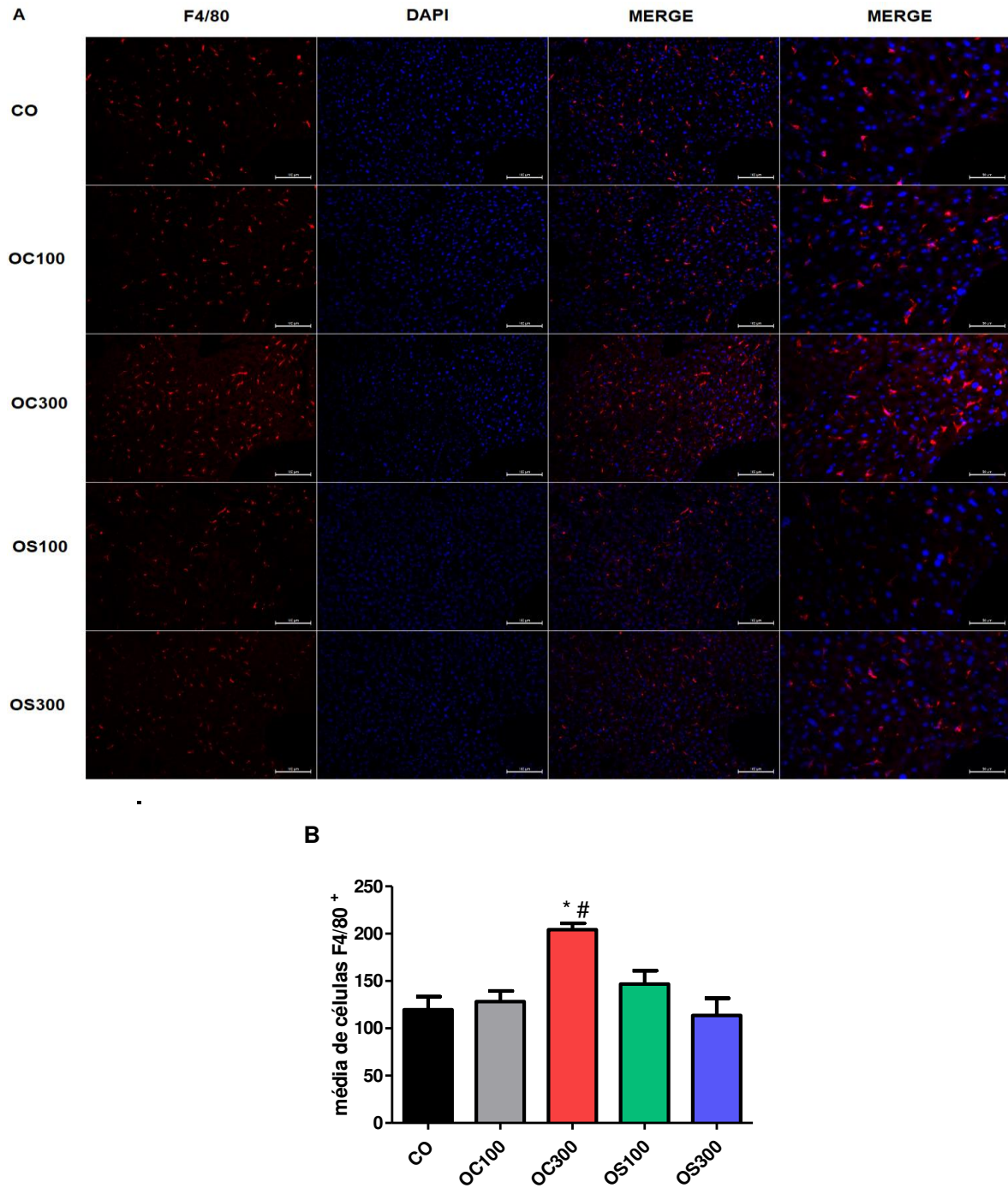


Figura 4. Efeitos da suplementação com óleo de coco (OC100 e OC300) ou óleo de soja (OS100 e OS300) na inflamação hepática. A. Imagens representativas de imunomarcagem para células F4/80+ (vermelho) e núcleos com DAPI (azul). B. Quantificação do número de células F4/80+. Valores representados como média $\pm$ erro padrão (SEM); *Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao CO; # Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos OC100 e OC300. $n = 3$ cortes por animal/3 animais por grupo.

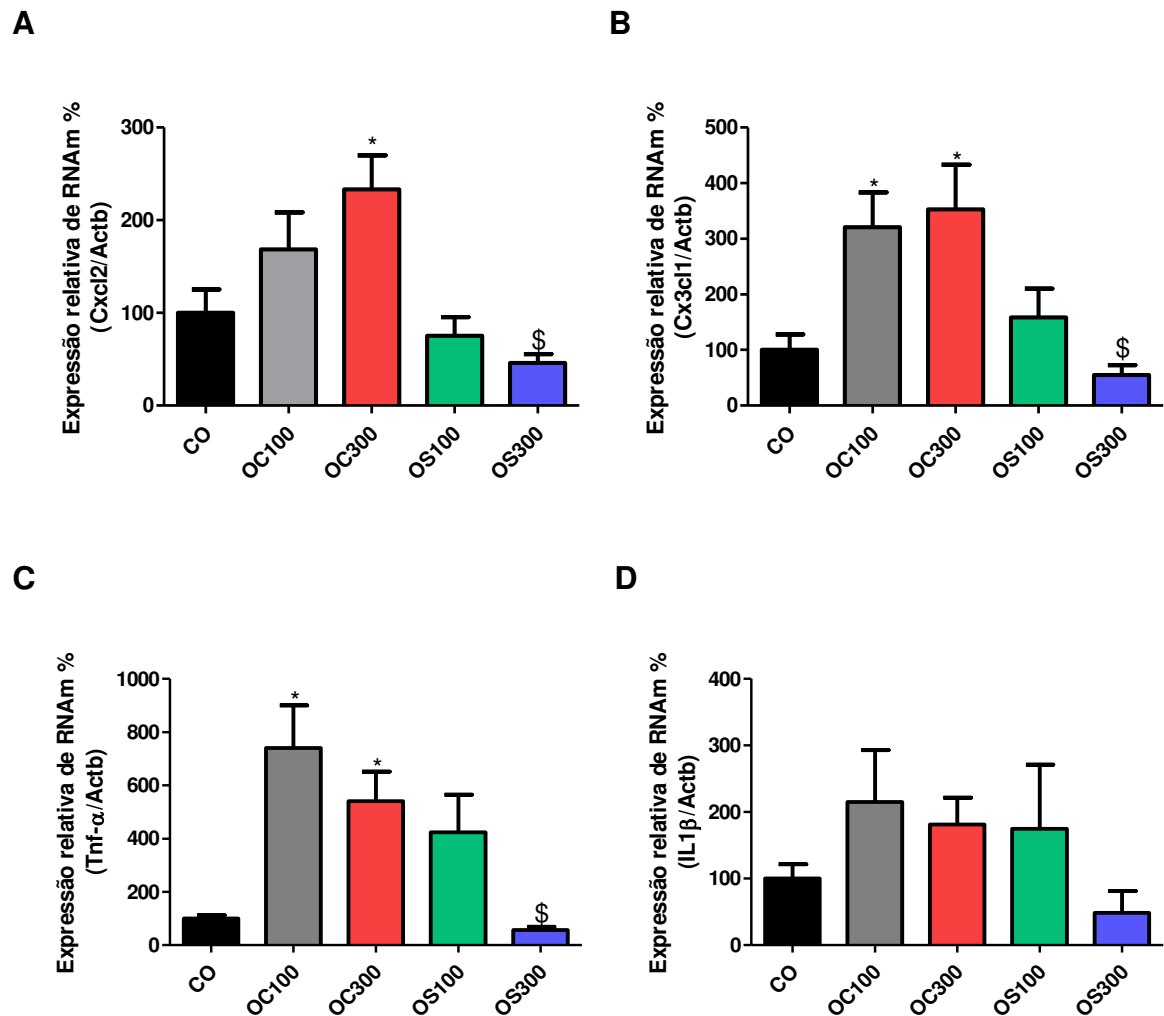


Figura 5. Efeitos da suplementação com óleo de coco ou óleo de soja na expressão gênica de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias no fígado. A. Níveis de RNAm de Cxcl2. B. Níveis de RNAm de Cx3cl1. C. Níveis de RNAm de TNF- α . D. Níveis de RNAm de IL1 β . Valores representados como média $\pm$ erro padrão (SEM); *Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao CO; \$ Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos OC300 e OS300 (B-C). $n = 4-6$ animais por grupo.

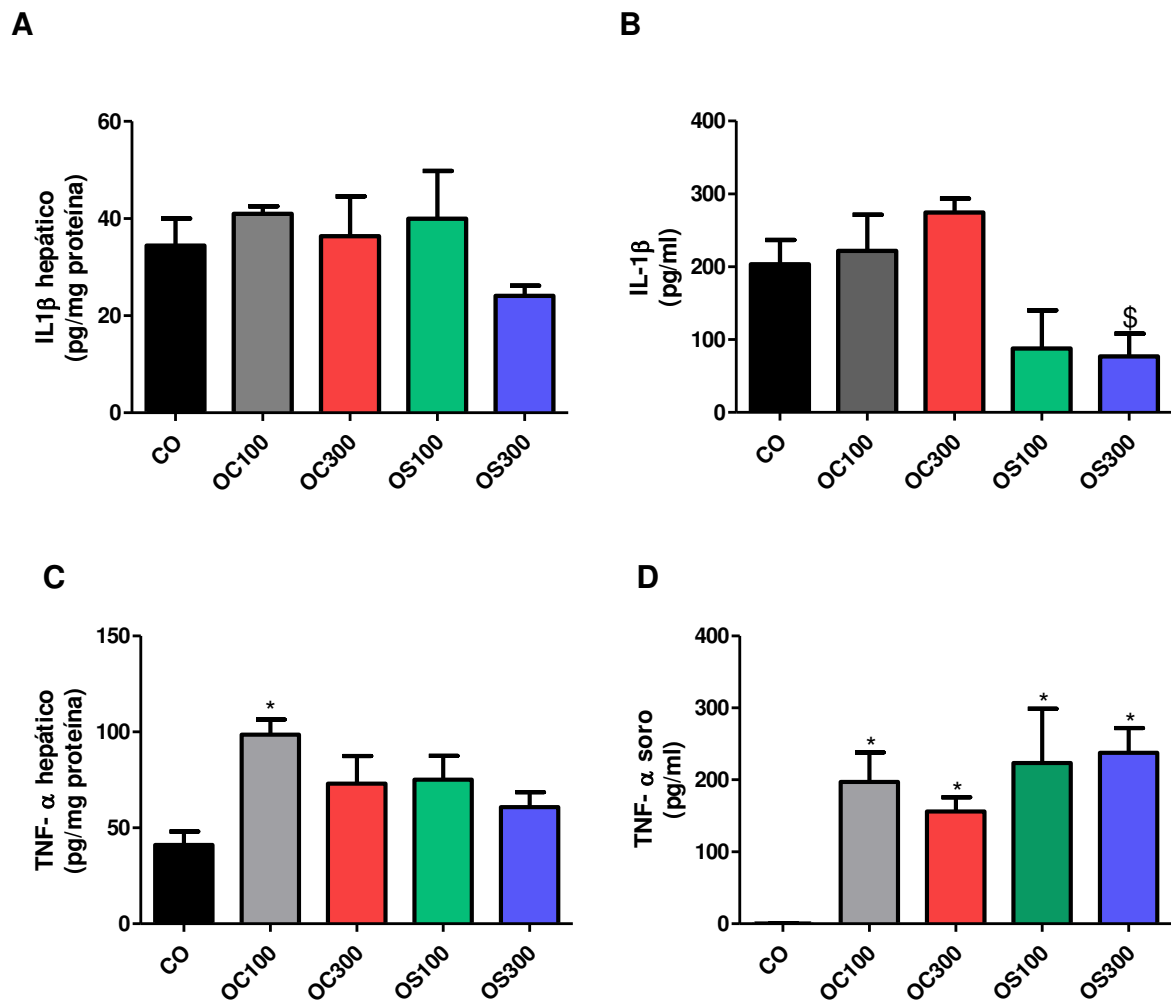


Figura 6. Efeitos da suplementação com óleo de coco ou óleo de soja nos níveis hepáticos e séricos de IL1 β e TNF- α . A. Níveis hepáticos de IL1 β . B. Níveis séricos de IL1 β . C. Níveis hepáticos de TNF- α . D. Níveis séricos de TNF- α . Valores representados como média $\pm$ erro padrão (SEM); *Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo CO. \$ Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo OC300. $n = 4-7$ animais por grupo.

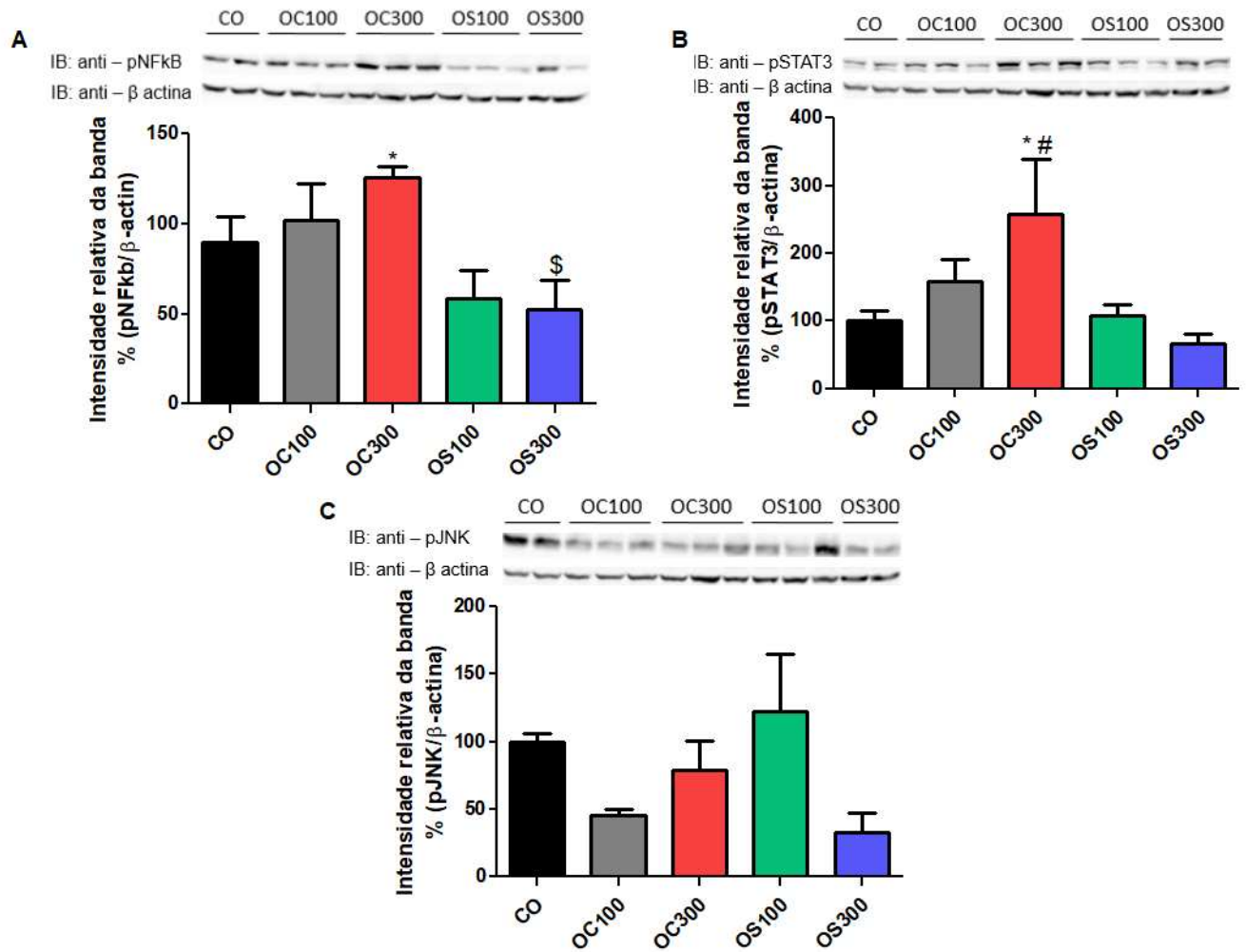


Figura 7. Western blot representativo da expressão de proteínas de vias inflamatórias no fígado. A. Conteúdo proteico de pNFkB. B. Conteúdo proteico de pSTAT3. C. Conteúdo proteico de pJNK. Valores representados como média $\pm$ erro padrão (SEM); *Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao CO; # Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos OC100 e OC300 (B); \$ Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos OC300 e OS300 (B). $n = 5$ animais por grupo.

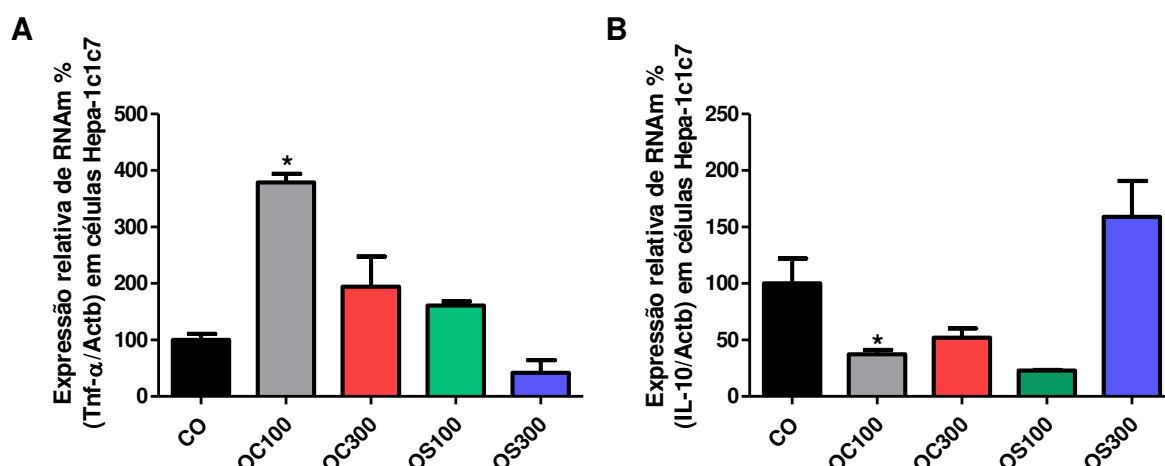


Figura 8. Efeitos do tratamento por 24 horas com soro de animais suplementados com óleo de coco ou óleo de soja na expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias em células Hepa-1c1c7. A. Níveis de RNAm de TNF- α . B. Níveis de RNAm de IL10. Valores representados como média $\pm$ erro padrão (SEM); *Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao CO. $n = 3-4$.

5.4 Estresse de retículo e autofagia após a suplementação com óleo de coco

As múltiplas implicações do estresse no RE na saúde e na doença destacam a importância de identificar a participação deste processo em vários contextos experimentais ou fisiológicos. Glucose regulated protein (GRP78) é uma chaperona residente do RE e pode ser estimulada por diversas condições ambientais e fisiológicas de estresse que perturbam o RE. GRP78 é considerado um importante regulador de sinalização de estresse de RE, assim como do processo apoptótico já que em células não estressadas, os transdutores de estresse de RE ATF6, IRE1 e PERK são mantidos em um estado inativo através da interação com GPR78. Após o estresse do RE e a formação de proteínas mal enoveladas nessa organela, GRP78 é liberado desses sensores que são ativados, acionando o UPR. O GRP78 se complexa com procaspases como a caspase-7 e a caspase-12 que se associam à membrana do RE, através dessas interações, o GRP78 regula o equilíbrio entre sobrevivência celular e apoptose em células sob o estresse de RE (LEE, 2005).

O fígado é suscetível ao estresse do RE. Numerosos estudos em tecido hepático humano e modelos de doenças animais indicaram um papel crucial do estresse do RE e das vias de sinalização UPR na patogênese de doenças hepáticas, incluindo DHGNA e doença hepática alcoólica. O RE desempenha um papel importante na síntese de ácidos graxos e no metabolismo do colesterol. A relação entre estresse de RE e fígado gorduroso é bilateral, a literatura

demonstra que a esteatose promove o estresse no RE e por outro lado, a resposta ao estresse do RE leva à esteatose (DARA et al., 2011).

Visto que os animais suplementados com óleo de coco apresentaram aumento no conteúdo de triglicérides e colesterol no fígado (Figura 1.A,B), o presente trabalho avaliou o conteúdo proteico da chaperona GPR78 no fígado dos animais suplementados, que não mostrou-se alterado (Figura 9.A).

O estudo de Díaz-Villaseñor et al., (2013) avaliou o efeito da interação do tipo de óleo (óleo de coco ou de soja) em dietas com 5% ou 10% de gordura na funcionalidade do tecido adiposo branco de ratos Zucker. Os grupos experimentais que consumiram óleo de coco virgem apresentaram aumento na expressão gênica do componente central da UPR, GRP78, comparado aos animais controle, indicando ativação de estresse de RE (DÍAZ-VILLASEÑOR et al., 2013).

Outro importante mecanismo associado à acúmulo de gordura e inflamação hepática é a autofagia, um processo catabólico pelo qual as células eucarióticas eliminam os materiais citosólicos através do sequestro mediado por vacúolos e subsequente entrega aos lisossomos para degradação, mantendo assim a homeostase celular e a integridade das organelas. Após a indução da autofagia, a proteína *A/B-light chain 3* (LC3) é clivada, causando a liberação de uma glicina C-terminal necessária para a conjugação de fosfolipídios. Esse processo é importante para a formação do autofagossomo, uma estrutura de membrana dupla que entrega proteínas ao lisossomo durante o processo. Portanto, o uso de anticorpos LC3 na investigação de autofagia é extremamente eficiente (TANIDA et al., 2008).

A ativação de autofagia no fígado é relacionada como um mecanismo importante para o combate do acúmulo de gordura no tecido. No entanto a literatura aponta que na DHGNA, existe prejuízo no fluxo autofágico, o qual está associado a um estresse elevado no RE e à apoptose celular. Assim, a esteatose hepática pode interferir no processo autofágico para promover a progressão da doença em pacientes com doenças hepáticas gordurosas (KE, 2019).

Como observamos acúmulo de gorduras no fígado dos camundongos suplementados com óleo de coco (Figura 2.A,B), fomos investigar a autofagia. Nesse sentido, o conteúdo proteico de LC3 no tecido hepático foi investigado, com o objetivo de determinar alterações no processo de autofagia após a suplementação com óleos, no entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Figura 9.B).

Um estudo com linhagem celular HepG2, que possui algumas características metabólicas que se assemelham ao tecido hepático humano em um modelo de indução de lipotoxicidade induzida por ácidos graxos, observou que um aumento nos níveis de ácidos graxos

de cadeia média no meio de cultura melhorava o fluxo autofágico, protegendo as células contra a lipotoxicidade (WANG et al., 2017). No entanto, não observamos esse efeito no nosso modelo.

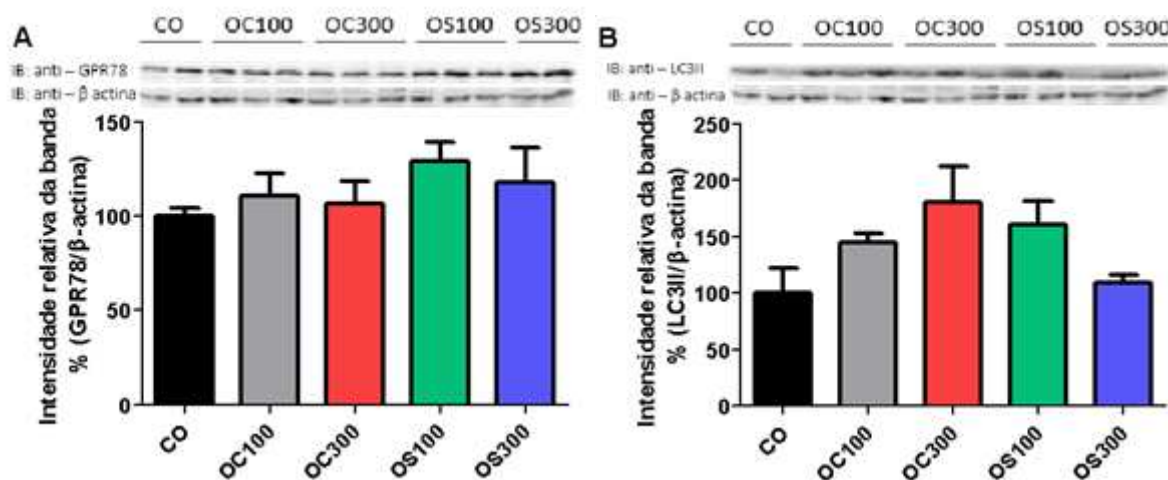


Figura 9. Western blot representativo da expressão de proteínas de estresse de retículo e autofagia no fígado. A. Conteúdo proteico de GPR78. B. Conteúdo proteico de LC3II. Valores representados como média $\pm$ erro padrão (SEM). n = 4-6 animais por grupo.

5.5 Metabolismo lipídico hepático após a suplementação

A suplementação com óleo de coco, de 300μL, aumentou a expressão de enzimas relacionadas ao metabolismo de lipídeos no fígado dos camundongos (Figura 10.B,C). Enquanto a suplementação com 100μL de óleo de coco e as diferentes doses de óleo de soja não causaram diferenças em relação ao controle na expressão de enzimas hepáticas (Figura 10.A,C).

O acúmulo hepático de gordura é um estágio inicial de progressão para DHGNA (VANNI et al., 2010). O acúmulo de lipídios no fígado pode resultar de diferentes alterações no metabolismo lipídico como o aumento da lipólise adiposa, aumento da lipogênese hepática, síntese ou secreção prejudicada de colesterol VLDL, disfunção de esterificação do triacilglicerol ou prejuízos na β -oxidação mitocondrial (KAWANO et al., 2013).

A beta oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias é um processo que converte os ácidos graxos em acetil-CoA, que posteriormente pode ser convertido em corpos cetônicos (hidroxibutirato beta ou acetoacetato) ou ainda ser incorporado no Ciclo de Krebs, para a oxidação total. Os acil-CoAs provenientes de ácidos graxos são transportados através das membranas mitocondriais pela atividade de enzimas CPTs. Os acil-CoAs são convertidos em acil-carnitina pela enzima carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1) na membrana externa

mitocondrial para a translocação para o espaço intermembrana (KOO, 2013). A regulação da oxidação de ácidos graxos é extremamente complexa e finamente coordenada, sendo o transporte dos ácidos graxos para o interior da mitocôndria, que é mediado por CPT1 um ponto crítico de regulação do metabolismo de lipídios no fígado (YAMASHITA et al., 2008).

Gavito et al., (2016) observou que camundongos alimentados por 16 semanas com dieta hiperlipídica apresentaram alterações na expressão hepática de CPT1, relacionando esta alteração com o acúmulo de gordura no fígado (GAVITO et al., 2016). Em relação ao presente trabalho, a expressão gênica hepática de CPT1 não foi alterada nas diferentes doses e óleos suplementados (Figura 9.A), o que indica que os óleos de coco e soja parecem não interferir na oxidação de lipídios hepáticos.

O primeiro passo na síntese de triglicérides, pela via do glicerol fosfato, é a acilação do glicerol 3-fosfato pelas enzimas glicerol-3-fosfato aciltransferase, que residem no retículo endoplasmático (GPAT) e nas mitocôndrias (GPAM) (TAKEUCHI & REUE, 2009). A glicerol-3-fosfato aciltransferase é a enzima reguladora da atividade de síntese de triacilgliceróis, desempenhando papel central na regulação da síntese de triglicerídeos e fosfolipídios. A literatura relaciona alterações na expressão da glicerol-3-fosfato aciltransferase como um fator crítico no desenvolvimento da obesidade, esteatose hepática e resistência à insulina (YU et al., 2018). Os camundongos do grupo OC300 apresentaram aumento na expressão gênica hepática de GPAM, sugerindo aumento na lipogênese hepática (Figura 9.B), este resultado está ao encontro do aumento do conteúdo total hepático de triglicérides observado no grupo OC300 (Figura 2.A).

A coenzima A-3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMGC) corresponde a enzima de controle de taxa de biossíntese de colesterol (BROWN et al., 2018). O acúmulo hepático de triglicérides e colesterol estão associados com aumento na expressão de HMGC, na DHGNA (SIGLER et al., 2018). No presente trabalho, os animais do grupo OC300 apresentaram aumento significativo na expressão gênica de HMGC hepática (Figura 10.C), indicando aumento na biossíntese de colesterol no tecido, o que pode ser correlacionado com o aumento de colesterol total hepático que o grupo demonstrou (Figura 2.B).

O estudo de Sanders et al., (2018) investigou os triacilgliceróis associados à esteatose hepática e a associação deles com o consumo dietético. O estudo foi realizado em voluntários esteatóticos de Fenland Study, no Reino Unido. Os triglicérides contendo ácidos graxos saturados e monoinsaturados foram associados à esteatose hepática, além disso, o estudo mostrou que o aumento nos níveis de triglicérides apresentaram-se associados a um maior consumo de carboidratos e gorduras saturadas, relacionando o excesso no consumo de

carboidratos e gorduras saturadas como um fator de risco para o acúmulo de gorduras no fígado (SANDERS et al., 2018). Nesse sentido, o elevado consumo de gordura saturada, proveniente do óleo de coco, pode relacionar-se com aumento nos níveis de triglicérides plasmáticos associado com alterações no metabolismo lipídico hepático que favorecem o acúmulo de gorduras no fígado no grupo OC300.

O estudo de Schumacher et al., (2016) avaliou os efeitos do óleo de soja e óleo de coco extravirgem em dietas normolipídicas e hiperlipídicas, sobre o metabolismo lipídico de ratos Wistar. Os parâmetros hepáticos de colesterol total e triacilgliceróis aumentaram com a substituição do óleo de soja por óleo de coco em dieta normolipídica e diminuíram na dieta hiperlipídica (SCHUMACHER et al., 2016).

O consumo de óleo de coco inserido na dieta de camundongos C57BL/6N na proporção de óleo de coco (10% kcal de óleo de soja, 20% kcal de óleo de coco) ou óleo de soja (30% kcal de soja dieta) não alterou o metabolismo lipídico hepático em camundongos não treinados. Nos camundongos treinados a dieta com óleo de coco aumentou a expressão de enzimas relacionadas à beta-oxidação (MANIO et al., 2018).

Arunima e Rajamohan avaliaram os efeitos do óleo de coco virgem, em comparação com o óleo de copra, azeite e óleo de girassol na síntese e oxidação de ácidos graxos e na regulação molecular do metabolismo de ácidos graxos em ratos Sprague – Dawley machos. Os óleos foram adicionados na dieta na proporção de 8% do valor calórico e os animais foram expostos à dieta por 45 dias. O consumo de dieta normolipídica com óleo de coco virgem diminuiu os níveis de lipídios nos tecidos e reduziu a atividade das enzimas envolvidas na lipogênese: Acil coA carboxilase, ácido graxo sintase (FAS), HMG CoA redutase, glicose 6 fosfato desidrogenase, isocitrato desidrogenase e enzima málica e aumentou significativamente a taxa de catabolismo lipídico, com aumento da atividade de: lipase lipoproteica, lecitina colesterol e aumento na expressão de PPAR α . Neste sentido o óleo de coco teve efeitos benéficos nos parâmetros lipídicos, reduzindo a lipogênese e aumentando a taxa de catabolismo de ácidos graxos (ARUNIMA E RAJAMOHAN, 2012; ARUNIMA E RAJAMOHAN, 2014).

Camundongos alimentados com dieta com 45% de gordura (HFD) tratados via gavagem com 337,6 μ L óleo de coco por 12 semanas, apresentaram supressão dos genes relacionados à lipogênese SREBM, FAS, acetil-coA carboxilase (LEE et al., 2018).

Os estudos que encontram melhoras no metabolismo dos animais alimentados com óleo de coco relacionam os efeitos aos ácidos graxos cáprico e caprílico. No entanto, um recente estudo que avaliou o efeito da suplementação de TCM (essencialmente de ácidos graxos cáprico e caprílico), em camundongos C57BL/6, alimentados com dieta rica em frutose, por 3 meses,

encontrou que o TCM agravou o dano hepático dos camundongos com aumento da esteatose hepática, aumento da lipogênese e inflamação (GUIMARÃES et al., 2019).

Como a literatura aborda diferentes métodos de introdução do óleo de coco nas dietas e muitos estudos que encontraram alterações em lipídios circulantes não avaliaram o metabolismo lipídico hepático (OLIVEROS et al., 2004; RESENDE et al., 2015; SCHUMACHER et al., 2016; WALL-MEDRANO et al., 2017) é um desafio determinar os efeitos desse óleo sobre a saúde hepática. O presente trabalho, que mimetiza a suplementação utilizada por humanos em altas doses (300µL de óleo de coco, semelhante a 3 colheres de sopa ao dia para humanos), encontra evidências de que o metabolismo hepático está prejudicado, com aumento no conteúdo de gorduras, aumento no perfil inflamatório e alterações enzimáticas, alterações que favorecem o acúmulo de lipídios no fígado, que é um fator importante para o desenvolvimento de DHGNA.

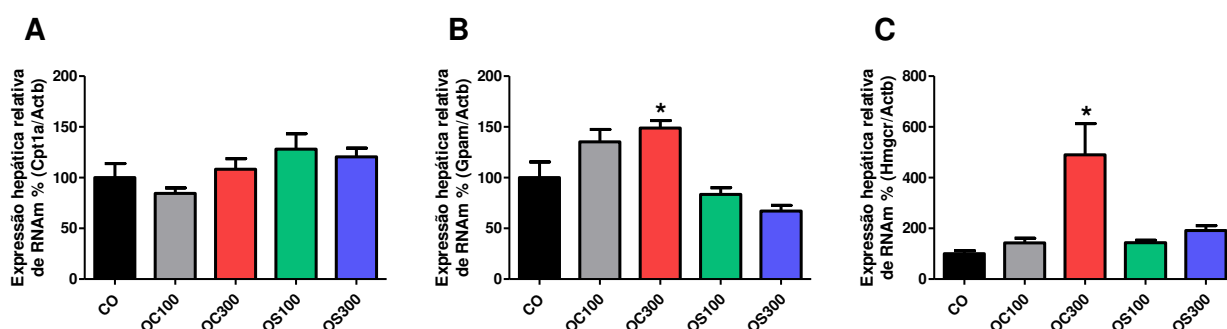


Figura 10. Efeitos da suplementação com óleo de coco ou óleo de soja na expressão hepática de genes do metabolismo lipídico. A. Níveis de RNAm de Cpt1a. B. Níveis de RNAm de Gpam. C. Níveis de RNAm de Hmgcr. Valores representados como média $\pm$ erro padrão (SEM); *Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao CO. $n = 4-6$ animais por grupo.

Em resumo, no presente trabalho, a suplementação com óleo de coco impactou de forma deletéria em diversos parâmetros metabólicos, como peso e adiposidade, além de dar indícios de danos hepáticos associados à inflamação desse órgão. Adicionalmente, a suplementação com óleo de coco resultou em aumento no conteúdo lipídico hepático, sendo que a suplementação com 300µL de óleo de coco impactou ainda mais no metabolismo lipídico do fígado. Observa-se que a maior dose de óleo de coco prejudicou o metabolismo lipídico hepático, exacerbou o acúmulo de gordura no fígado e aumentou a inflamação desse tecido (Figura 11).

São escassos os estudos que avaliam o impacto do uso do óleo de coco sobre o metabolismo lipídico hepático, e os poucos disponíveis são controversos. Famurewa e colaboradores usaram como modelo experimental ratos saudáveis, com dietas suplementadas

de óleo de coco em 10% e 15%, durante 5 semanas. Os resultados sugerem um efeito benéfico do óleo de coco no perfil lipídico, estado renal, sistema de defesa antioxidante hepático e índices de risco cardiovascular em ratos (FAMUREWA et al., 2018). Já Wall-Medrano et al. (2017), avaliaram os efeitos da ingestão dietética de dietas com 10% de óleo de semente de uva, milho ou coco durante 28 dias em ratos albinos saudáveis. Nesse estudo, houve maior acúmulo de gordura hepática nos animais suplementados com óleo de coco (WALL-MEDRANO et al., 2017).

A dificuldade do estabelecimento dos efeitos metabólicos do óleo de coco se dá pelas diferentes doses utilizadas, forma de inserção do óleo na dieta e modelo experimental utilizados nos estudos. O presente trabalho visou mimetizar o modelo de suplementação do óleo de coco na dieta habitual, nas doses usuais da população.

Sabe-se que o fígado é o principal órgão metabólico do corpo humano e a integridade das funções hepáticas podem ser afetadas pelo acúmulo de gordura no tecido. A composição de macronutrientes da dieta pode influenciar no acúmulo de gordura hepática (PARRY & HODSON, 2017).

Os efeitos observados no modelo experimental de maior dose de óleo de coco são efeitos também relacionados com o consumo excessivo de gorduras saturadas. De maneira geral, a gordura saturada (C12:0, C14:0 e C16:0) é a que mais eleva a concentração plasmática de colesterol e o ácido graxo láurico (C12:0) é o que mais aumenta o LDL (SANTOS, 2013).

O ácido láurico é capaz de ativar vias inflamatórias de TLR4 (LEE et al., 2003a), e o acúmulo hepático de lipídios induz as células hepáticas a produzirem citocinas inflamatórias. Essas citocinas podem desempenhar um papel ativo no desenvolvimento e progressão da DHGNA através da estimulação da inflamação hepática, da necrose celular, apoptose e indução de fibrose. Dentre as citocinas, vale destacar o TNF- α , por apresentar efeitos lipogênicos e fibrogênicos, mediado por mecanismo parácrino que envolve a ativação das células da Kupffer (MARRA, F., BERTOLANI, C., 2009). Ou seja, o consumo excessivo de gordura saturada proveniente do óleo de coco, possivelmente ativou a resposta inflamatória no fígado, contribuindo para o acúmulo de gordura hepática, exacerbando a resposta inflamatória, que pode causar dano hepático.

O consumo excessivo de gorduras saturadas é considerado um fator de risco para o acúmulo de gorduras no fígado (SANDERS et al., 2018). Uma vez que o consumo deste tipo de ácido graxo aumenta os níveis de triglicérides hepáticos, modulando vias de síntese e degradação de lipídios (LUKKONEN et al., 2018). No nosso trabalho, observamos alterações no metabolismo lipídico hepático que contribuem para o acúmulo de gordura nesse tecido.

Por mais que a literatura apoie que os ácidos graxos capríco, caprílico e cáprico são benéficos ao metabolismo (WOOLLETT et al., 1992; RONIS et al., 2013), acreditamos que os efeitos do ácido graxo láurico, que é o mais abundante no óleo de coco, sobressaiam e acarrete aos desfechos metabólicos adversos observados.

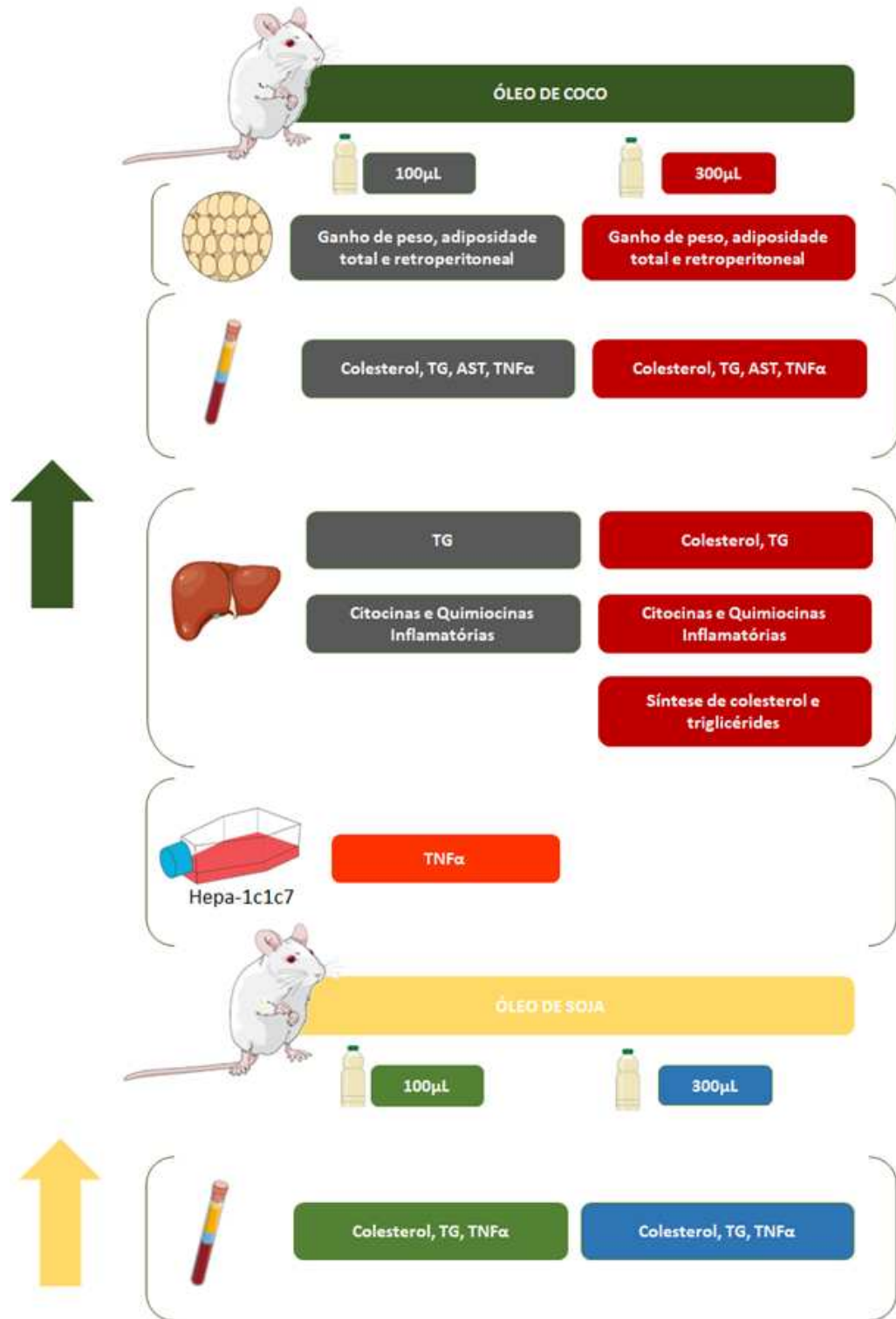


Figura 11. Resumo dos efeitos metabólicos das diferentes doses de óleo de coco e soja sobre a composição corporal, plasma e tecido hepático.

6. CONCLUSÃO

A suplementação com óleo de coco extra virgem demonstrou ter efeitos sobre o metabolismo dos camundongos, em relação à aumento do peso corporal e maior acúmulo de gordura. Esse óleo foi capaz de aumentar a sensibilidade à insulina no maior volume administrado, porém, desencadeou acúmulo de gordura, resposta inflamatória e alterações no metabolismo lipídico no fígado.

Em virtude da escassez e controvérsia de estudos com óleo de coco, é importante ressaltar que a gordura saturada desse óleo, mesmo que com melhor composição de ácidos graxos saturados, deve ser consumida de forma equilibrada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMEETA K. Autophagy. **New York Academy of Sciences**. n.1066, p .259–271, 2005.
- ANDRADE, Z. A. Regressão da fibrose hepática. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, n. 6, p. 514-520, 2005.
- ARAÚJO, M.P.L., FORTES, C.R., FAZZIO, G.M.D. Analysis of the use of fad diets for overweight people. **Journal Health Science Instute**, v. 31, n. 4, p. 388-391, 2013.
- ARRUDA, A. P.; HOTAMISLIGIL, G. S. Calcium Homeostasis and Organelle Function in the Pathogenesis of Obesity and Diabetes. **Cell metabolism**, v. 22, n. 3, p. 381–97, 2015.
- ARUNIMA, S.; RAJAMOHAN, T. Virgin coconut oil improves hepatic lipid metabolism in rats--compared with copra oil, olive oil and sunflower oil. **Indian journal of experimental biology**, v. 50, n. 11, p. 802–9, 2012.
- ASSUNÇÃO M.L. et al. Effects of Dietary Coconut Oil on the Biochemical and Anthropometric Profiles of Women Presenting Abdominal Obesity. AOCS-American Oil Chemists' Society. **Lipids** 44: 593-601, 2009.
- ASSUNÇÃO, M. L. et al. Effects of dietary coconut oil on the biochemical and anthropometric profiles of women presenting abdominal obesity. **Lipids**, v. 44, n. 7, p. 593–601, 2009.
- BABU, A. S. et al. Virgin coconut oil and its potential cardioprotective effects. **Postgraduate medicine**, v. 126, n. 7, p. 76–83, 2014.
- BARBOSA, A. A. et al. Perfil da aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase e biometria do fígado de codornas japonesas. **R. Bras. Zootec.** v. 39, n.2, p. 308-312, 2010.
- BASARANOGLU, M., et al. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. **World J Gastroenterol** 19(8): 1166-1172, 2013.
- BASARANOGLU, M., et al. Understanding mechanisms of the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol** 16(18): 2223-2226, 2010.
- BENATTI, R. O. et al. Maternal high-fat diet consumption modulates hepatic lipid metabolism and microRNA-122 (miR-122) and microRNA-370 (miR-370) expression in offspring. **British Journal of Nutrition** v. 111, n. 12, p. 2112–2122, 2014.
- BENDALL, L. Chemokines and their receptors in disease. **Histology and Histopathology**, v. 20, p. 907-926, 2005.
- BERG A.H.; SCHERER, P.E. Adipose Tissue, Inflammation, and Cardiovascular Disease. **Circ Res.** 96: 939-949, 2005.

- BLASBALG, T.J. et al. Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. **Am J Clin Nutr.** v. 93, n.5, p. 950–962, 2011.
- BONA, S. **Proteção Antioxidante da Quercetina em fígado de ratos cirróticos.** Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.
- BONTEMPO, M. **O poder medicinal do coco e óleo de coco extra virgem.** São Paulo: Alaúde Editorial, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Suplementos alimentares:** Documento de base para discussão regulatória. Brasília-DF, 2017.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico : estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2016 / **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde.** – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
- BROWN, M. S.; RADHAKRISHNAN, A.; GOLDSTEIN, J. L. Retrospective on Cholesterol Homeostasis: The Central Role of Scap. **Annual Review of Biochemistry**, v. 87, n. 1, p. 783–807, 2018.
- BROWNING, D.J, HORTON, J.D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **J Clin Invest.** 114(2):147-52, 2004.
- BRUNT, E.M. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.** 13:195-203, 2010.
- CAMPO, J. A.; GALLEGGO, P.; GRANDE, L. Role of inflammatory response in liver diseases: Therapeutic strategies. **World Journal of Hepatology Baishideng Publishing Group Co**, v. 10, n. 1, p. 1-7, 2018.
- CHANDRASEKAR, B. et al. Fractalkine (CX3CL1) stimulated by nuclear factor κ B (NF- κ B)-dependent inflammatory signals induces aortic smooth muscle cell proliferation through an autocrine pathway. **Biochem. J.** 373, p. 547-558, 2003.
- CHANDRASHEKAR, P., LOKESH, B. R.; GOPALA KRISHNA, A. G. Hypolipidemic effect of blends of coconut oil with soybean oil or sunflower oil in experimental rats. **Food Chemistry**, 123(3), 728–733, 2010.
- CHINWONG, S.; CHINWONG, D.; MANGKLABRUKS, A. Daily Consumption of Virgin Coconut Oil Increases High-Density Lipoprotein Cholesterol Levels in Healthy Volunteers: A

- Randomized Crossover Trial. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1-7, 2017.
- CZAJA, M.J. et al. Functions of autophagy in normal and diseased liver. **Autophagy**, 9(8):1131-58, 2013.
- CLEGG, M. E. They say coconut oil can aid weight loss, but can it really? **European journal of clinical nutrition**, v. 71, n. 10, p. 1139–1143, 2017.
- CNOP, M.; FOUFELLE, F.; VELLOSO, L. A. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. **Trends in molecular medicine**, v. 18, n. 1, p. 59–68, 2012.
- COTRIM H. P. **Esteatose Hepática**. Disponível em: <<https://sbhepatologia.org.br/imprensa/esteatose-hepatica/>> Acesso em 23 de agosto de 2019.
- COX, A. J.; WEST, N. P.; CRIPPS, A. W. Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *The lancet*. **Diabetes & endocrinology**, v. 3, n. 3, p. 207–15, 2015.
- COX, C. et al. Effects of coconut oil, butter, and safflower oil on lipids and lipoproteins in persons with moderately elevated cholesterol levels. **Journal of lipid research**, v. 36, n. 8, p. 1787–95, 1995.
- COX, C. et al. Effects of dietary coconut oil, butter and safflower oil on plasma lipids, lipoproteins and lathosterol levels. **European journal of clinical nutrition**, v. 52, n. 9, p. 650–4, 1998.
- DARA, L.; JI, C.; KAPLOWITZ, N. The contribution of endoplasmic reticulum stress to liver diseases. **Hepatology**, v. 53, n. 5, p. 1752–1763, 2011.
- DE MOURA E DIAS, M. et al. Consumption of virgin coconut oil in Wistar rats increases saturated fatty acids in the liver and adipose tissue, as well as adipose tissue inflammation. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p. 472–480, 2018.
- DENKE, M. A.; GRUNDY, S. M. Comparison of effects of lauric acid and palmitic acid on plasma lipids and lipoproteins. **The American journal of clinical nutrition**, v. 56, n. 5, p. 895–8, 1992.
- DEOL, P. et al. Soybean Oil Is More Obesogenic and Diabetogenic than Coconut Oil and Fructose in Mouse: Potential Role for the Liver. **PLoS ONE** 10(7), 2015.
- DONG, W.; WEI, Y.; PAGLIASSOTTI, M.J. Saturated Fatty Acids Promote Endoplasmic Reticulum Stress and Liver Injury in Rats with Hepatic Steatosis. **Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 943–951, 2006.
- DONG, Y.L. et al. CXCR2-Driven Ovarian Cancer Progression Involves Upregulation of Proinflammatory Chemokines by Potentiating NF-kB Activation via EGFR-Transactivated Akt Signaling. **PLoS ONE** v. 8, n. 12, 2012.

- DONNELLY, K. L., et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **J Clin Invest** 115(5): 1343-1351, 2005.
- EL-FATTAH, H.M.A.; BARAKAT, L.A.A. Hepatoprotective effect of olive and coconut oils against oxidative stress-induced by 2,4 dichlorophenoxyacetic acid. **Indian Journal of Applied Research**, v. 3, n. 12, 2013.
- EYRES, L. et al. Coconut oil consumption and cardiovascular risk factors in humans. **Nutrition Reviews**, v. 74, n. 4, p. 267–280, 2016.
- FAMUREWA, A. C. et al. Dietary Supplementation with Virgin Coconut Oil Improves Lipid Profile and Hepatic Antioxidant Status and Has Potential Benefits on Cardiovascular Risk Indices in Normal Rats. **Journal of dietary supplements**, v. 15, n. 3, p. 330–342, 2018.
- FIFE, B. The coconut oil miracle. 5th ed. **Avery Publishing Group**, 2013.
- FIFE, B. The healing miracles of coconut oil. 1 th ed. Colorado: **Piccadilly Books**, 2000.
- FOLCH, J.; LEES, M., SLOANE-STANLEY, G.H. “A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues,” **J Biol Chem**, 226, 497-509, 1957.
- FONTAINE, K.R.; BAROFSKY, I. Obesity and health-related quality of life. **Obes Rev.** 2(3):173-82, 2001.
- FOX, S. I. **Fisiologia Humana**. 7 ed. Barueri: Manole, 2007.
- FU S, YANG L, LI P, HOFMANN O, DICKER L, HIDE W, LIN X, WATKINS SM, IVANOV AR, HOTAMISLIGIL GS. FU, S. et al. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. **Nature**, v. 473, n. 7348, p. 528–531, 2011.
- GARNER DM, GARFINKEL PE, SCHWARTZ D, THOMPSON M. Cultural expectations of thinness in women. **Psychological reports**, v. 47, n. 2, p. 483–491, 1980.
- GAVITO, A.L. et al. Chronic IL-6 administration desensitizes IL-6 response in liver, causes hyperleptinemia and aggravates steatosis in diet-induced-obese mice. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, 2016.
- GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of sérum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.** 177:751-66, 1949.
- GUH D.P. et al. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: A systematic review and metaanalysis. **BMC Public Health**. 9(88): 1-20, 2009.
- GUIMARÃES, N.C. **Homeostase glicêmica na prole de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica: o papel da sinalização da insulina**. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) - UNICAMP. 2013. Campinas, SP.

GUNSTONE, F. D. **Vegetable oils**. In: Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 6. ed. John Wiley & Sons, Inc, 2005.

HAN SN, LEKA LS, LICHTENSTEIN AH, AUSMAN LM, SCHAEFER EJ, MEYDANI SN. Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsaturated, fat on immune and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. **Journal of lipid research**, v. 43, n. 3, p. 445–52, 2002.

HENKEL, J. et al. Induction of Steatohepatitis (NASH) with Insulin Resistance in Wild-type B6 Mice by a Western-type Diet Containing Soybean Oil and Cholesterol. **Molecular Medicine** v. 23, n. 1, 2017.

HOHL, A.; CERCATO, C. Posicionamento oficial da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) e da Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO) sobre o uso do óleo de coco para perda de peso. 2015.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87–91, 1993.

HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammatory pathways and insulin action. **International Journal of Obesity**. 27: 53-55, 2003.

HOUSTON, M. The relationship of saturated fats and coronary heart disease: fact or fiction? A commentary Therapeutic. **Advances in Cardiovascular Disease Publications Ltd**, v. 12, n.2, p.32-37 2018.

HUNNICUTT, J.W. et al. Saturated fatty acid-induced insulin resistance in rat adipocytes. **Diabetes** 43:540-5, 1994.

HYMOWITZ, T. On the domestication of the soybean. **Economic Botany**, v. 24, n. 4, p. 408–421, 1970.

IKEMOTO, S. et al. High-Fat Diet-Induced Hyperglycemia and Obesity in Mice: Differential Effects of Dietary Oils. **Metabolism**. v.45, n. 12, p. 1539-1546, 1996.

IMAFIDON, K.E.; OKUNROBO, L.O. Study on biochemical indices of liver function testes of albino rats supplemented with three sources of vegetable oils. **NJBAS**, v. 19, n. 2, p. 105-110, 2012.

JIAO, P. et al. Obesity-related upregulation of monocyte chemotactic factors in adipocytes: Involvement of nuclear factor- κ B and c-Jun NH 2-terminal kinase pathways. **Diabetes** v. 58, n. 1, p. 104–115, 2009.

JUÁREZ-HERNÁNDEZ, E. et al. Role of bioactive fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease. **Nutrition Journal BioMed Central Ltd**. v. 15, n.72, p.1-10, 2016.

- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008.
- KANNEL, W. B. et al. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. **Annals of internal medicine**, v. 55, p. 33–50, 1961.
- KAWANO, Y.; COHEN, D. E. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Gastroenterology**, v. 48, n.4, p.434-441, 2013.
- KE, P. Y. Diverse functions of autophagy in liver physiology and liver diseases. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 20, n.300, p.1-102, 2019.
- KEYS, A.; GRANDE, F. Role of dietary fat in human nutrition. III. Diet and the epidemiology of coronary heart disease. **American journal of public health and the nation's health**, v. 4, n. 12, p. 1520–30, 1957.
- KIMMELMAN, A. C; WHITE, E. Autophagy and Tumor Metabolism. **Cell Metab**. v. 02; 25(5), p. 1037–1043, 2017.
- KOO, S. H. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. **Clinical and molecular hepatology**, n. 19, p. 210-215, 2013.
- KUUSI T., et al. Concentration and composition of serum lipoproteins during a low-fat diet at two levels of polyunsaturated fat. **Journal of lipid research**, v. 26, n. 3, p. 360–7, 1985.
- LALA, V.; MINTER, D. A. Liver Function Tests. **Treasure Island (FL): StatPearls Publishing**. 2019.
- LEE, A. S. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. **Methods**, v. 35, n. 4, p. 373–381, 2005.
- LEE, E.J. Lipid-Lowering Effects of Medium-Chain Triglyceride-Enriched Coconut Oil in Combination with Licorice Extracts in Experimental Hyperlipidemic Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 40, p. 10447–10457, 2018.
- LEE, G.S. et al. Polyunsaturated fat in the methionine-choline-deficient diet influences hepatic inflammation but not hepatocellular injury. **Journal of Lipid Research** v. 48, 2007.
- LEE, J.Y. et al. Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Lipid Research*, v. 44, 2003.
- LEE, J.Y. et al. Reciprocal modulation of toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by saturated and polyunsaturated fatty acids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 39, p. 37041-37051, 2003.
- LEITE, D.L., ROCHA, E.D.M., BRANDÃO-NETO J. Obesidade: uma doença inflamatória. **Revista Ciência & Saúde**. 2: 85-95, 2009.

- LI, H. et al. Medium-chain fatty acids decrease serum cholesterol via reduction of intestinal bile acid reabsorption in C57BL/6J mice. **Nutrition & metabolism**, v. 15, p. 37, 2018.
- LIAU, K.M. et al. AN open-label pilot study to assess the efficacy and safety of virgin coconut oil in reducing visceral adiposity. **Pharmacology**. 949686, 1-7, 2011.
- LIMA F.E.L. et al. Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão. **Revista de Nutrição** 13(2): 73-80, 2000.
- LIU, Z. et al. SOCS3 promotes inflammation and apoptosis via inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway in 3T3-L1 adipocyte. **Immunobiology** 220, p. 947-953, 2015.
- LIU, C. et al. NF- κ B mediated CX3CL1 activation in the dorsal root ganglion contributes to the maintenance of neuropathic pain induced in adult male Sprague Dawley rats. **Acta Cir. Bras.** v.33, n.7, 2018.
- MANIO, M. C.; MATSUMURA, S.; INOUE, K. Low-fat diet, and medium-fat diets containing coconut oil and soybean oil exert different metabolic effects in untrained and treadmill-trained mice. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 15, n. 1, 18 jun. 2018.
- MANTOVANI, A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. **Immunology today**, v. 20, n. 6, p. 254-257, 1999.
- MARINA, A. M.; CHE MAN, Y. B.; AMIN, I. Virgin coconut oil: emerging functional food oil. **Trends Food Scienci and Technology**, v. 20, p. 481- 487, 2009.
- MARINS, B. R.; DE ARAÚJO, I. S.; DO COUTO JACOB, S. A propaganda de food advertising: Advice or merely stimulation of consumption? **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 16, n. 9, p. 3873–3882, set. 2011.
- MARRA, F., BERTOLANI, C. Adipokines in liver diseases. **Hepatology**. 50(3):957-69, 2009.
- MEI, S. et al. Differential roles of unsaturated and saturated fatty acids on autophagy and apoptosis in hepatocytes. **J Pharmacol Exp Ther**. 339(2):487-98, 2011.
- MELO, A. M. et al. Hypothalamic endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in offspring of mice dams fed high-fat diet during pregnancy and lactation. **Metabolism: Clinical and Experimental** v. 63, n. 5, p. 682–692, 2014.
- MESINK, R.P.; KATAN, M,B. Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. **N Engl J Med**. 323(7):439-45, 1990.
- MEYDANI, S.N. et al. Food use and health effects of soybean and sunflower oils. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 10, n. 5, p. 406–28, 1991.
- MILANSKI, M. et al. Saturated Fatty Acids Produce an Inflammatory Response Predominantly through the Activation of TLR4 Signaling in Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Obesity. **Journal of Neuroscience** (2) 359-370, 2009.

- MIZUSHIMA N & KOMATSU M. Autophagy: renovation of cells and tissues. **Cell** 147(4): 728-41, 2011.
- MUTHURAMU I, AMIN R, POSTNOV A, MISHRA M, JACOBS F, GHEYSENS O, VAN VELDHOFEN PP, DE GEEST B. Coconut oil aggravates pressure overload-induced cardiomyopathy without inducing obesity, systemic insulin resistance, or cardiac steatosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, 2017.
- MYPASSION4HEALTH. The Finest Coconut Oil In The World Extra Virgin, Raw, Unprocessed Coconut Oil Promotes Healthy Brain & Body Metabolism*. p. 1–4, 2003.
- NING J, HONG T, WARD A, PI J, LIU Z, LIU HY, CAO W. Constitutive role for IRE1 α -XBP1 signaling pathway in the insulin-mediated hepatic lipogenic program. **Endocrinology**, v. 152, n. 6, p. 2247–55, 2011.
- OLIVEROS, L. B.; VIDELA, A. M.; GIMÉNEZ, M. S. Effect of dietary fat saturation on lipid metabolism, arachidonic acid turnover and peritoneal macrophage oxidative stress in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 311–320, 2004.
- PAGLIASSOTTI, M.J. et al. Developmental stage modifies diet-induced peripheral insulin resistance in rats. **Am J Physiol** 278:66-73, 2000.
- PARRY, S. A.; HODSON, L. Influence of dietary macronutrients on liver fat accumulation and metabolism. *Journal of investigative medicine: the official publication of the American Federation for Clinical Research*, v. 65, n. 8, p. 1102–1115, 2017.
- PICINATO, M. C. et al. Soybean- and olive-oils-enriched diets increase insulin secretion to glucose stimulus in isolated pancreatic rat islets. **Physiology & Behavior**, v. 65, n. 2, p. 289-294, 1998.
- PIMENTEL, G.D. et al. High-fat diets rich in soy or fish oil distinctly alter hypothalamic insulin signaling in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry** 23, p. 822–828, 2012.
- QUITETE, F.T. et al. Differential effects in male adult rats of lifelong coconut oil exposure versus during early-life only. **Journal of Functional Foods**, v. 55, p. 17-27, 2019.
- RAMALHO, F. S. et al. Efeito de agentes anti-hipertensivos sobre as células estreladas durante a regeneração hepática em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 15, 2000.
- RESENDE, N.M. et al. The effects of coconut oil supplementation on the body composition and lipid profile of rats submitted to physical exercise. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 2, p. 933-940, 2016.
- RIEMERSMA, R.A. et al. Linoleic acid content in adipose tissue and coronary heart disease. **British Medical Journal**. v. 292, n. 6533, p. 1423-1427, 1986.

- RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n.7 p. 519-529, 2007.
- RONIS, M.J. et al.. Medium chain triglycerides dose-dependently prevent liver pathology in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease. *Experimental Biology and Medicine*, v. 238, n. 2, p. 151–162, 2013.
- SANDERS, F.W.B. et al. Hepatic steatosis risk is partly driven by increased de novo lipogenesis following carbohydrate consumption. **Genome biology**, v. 19, n. 1, p. 79, 2018.
- SANTOS, R.D. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. **Arq Bras Cardiol**. 100:1-40, 2013.
- SANTOS, E.L. et al. Níveis de farelo de coco em rações para alevinos de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal** 10(2): 390-97, 2009.
- SCHUMACHER, B. et al. Coconut oil on biochemical and morphological parameters in rats submitted to normolipidic and hyperlipidic diets. **Ciência Rural**, v. 46, n. 10, p. 1818–1823, 2016.
- SHANMUGASUNDARAM, K.R., et al. Effect of high-fat diet on cholesterol distribution in plasma lipoproteins, cholesterol esterifying activity in leucocytes, and erythrocyte membrane components studied: importance of body weight. **The American journal of clinical nutrition**, v. 44, n. 6, p. 805–15, 1986.
- SIGLER, M. A.; CONGDON, L.; EDWARDS, K. L. An Evidence-Based Review of Statin Use in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease *Clinical Medicine Insights: Gastroenterology*. **SAGE Publications Ltd**. v.11, p.1-9, 2018.
- SINGH, R. et al. Autophagy regulates lipid metabolism. **Nature**. 458:1131–5, 2009.
- SINGHA, B.; GATLA, H.R.; VANCUROVA, I. Transcriptional Regulation of Chemokine Expression in Ovarian Cancer. **Biomolecules** v. 5, p. 223-243, 2015.
- SPIEGELMAN B.M., FLIER, J.S. Obesity and the regulation of energy balance. **Cell**. 104: 531-43, 2001.
- STEIN, D.T. et al. The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. **J Clin Invest** 100:398-403, 1997.
- SVENIA, P.J. et al. Polyphenolic fraction of virgin coconut oil inhibits the inflammatory response in oxidized LDL activated human peripheral blood mononuclear cells by modulating TLR/NF-B signaling pathways. **European Journal of Integrative Medicine**. v. 10, p. 59-65, 2017.

- TAKEUCHI, K.; REUE, K. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**. V.296 n.6 p. 1195-1209, 2009.
- TANIDA I., UENO T., KOMINAMI E. LC3 and Autophagy. In: Deretic V. (eds) Autophagosome and Phagosome. **Methods in Molecular Biology™**, vol 445. Humana Press. 2008.
- TEMME, E. H.; MENSINK, R. P.; HORNSTRA, G. Comparison of the effects of diets enriched in lauric, palmitic, or oleic acids on serum lipids and lipoproteins in healthy women and men. **The American journal of clinical nutrition**, v. 63, n. 6, p. 897–903, 1996.
- TZANAVARI, T; GIANNOGONAS, P; KARALIS, K. P. TNF-alpha and obesity. **Current directions in autoimmunity**. [S.l: s.n.], 2010.
- VIJAYAKUMAR, M, et al. A randomized study of coconut oil versus sunflower oil on cardiovascular risk factors in patients with stable coronary heart disease. **Indian heart journal**, v. 68, n. 4, p. 498–506, 2016.
- VOON, P.T. et al. Diets high in palmitic acid (16:0), lauric and myristic acids (12:0 + 14:0), or oleic acid (18:1) do not alter postprandial or fasting plasma homocysteine and inflammatory markers in healthy Malaysian adults. **The American journal of clinical nutrition**, v. 94, n. 6, p. 1451–7, 2011.
- WALLACE, T. C. Health Effects of Coconut Oil-A Narrative Review of Current Evidence. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 38, n. 2, p. 97–107, 2019.
- WALL-MEDRANO, A. et al. Lipidomic and Antioxidant Response to Grape Seed, Corn and Coconut Oils in Healthy Wistar Rats. **Nutrients**, v. 9, n. 1, 2017.
- WANG, M.E. et al. Increasing Dietary Medium-Chain Fatty Acid Ratio Mitigates High-fat Diet-Induced Non-Alcoholic Steatohepatitis by Regulating Autophagy. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 2017.
- WANG, Y. et al. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 11, p. 678–89, 2015.
- WASMUTH, H. E., et al. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. **Semin Liver Dis** 30(3): 215-225, 2010.
- WHITE, E; MEHNERT, J, M; CHAN, C. S. Autophagy, Metabolism, and Cancer. **Clin Cancer Res**. v. 15; 21(22), p. 5037–5046, 2015.
- WHITNEY, E.N., ROLFES, S.R. **Understanding Nutrition**. 8. ed. Belmont, CA: Wadsworth, 647p., 1999.

WHO. **Obesity and overweight**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 14 mar. 2019.

WOJDASIEWICZ, P. et al. The Chemokine CX3CL1 (Fractalkine) and its Receptor CX3CR1: Occurrence and Potential Role in Osteoarthritis. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis** v. 62, n.5, p. 395-403, 2014.

WOOLLETT; L.A.; SPADY, D.K.; DIETSCHY, J.M. Saturated and unsaturated fatty acids independently regulate low density lipoprotein receptor activity and production rate. **J. Lipid. Res.**, v. 33, n. 1, p. 77-88, 1992.

XU, X. et al. Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP. **Seminars in liver disease**, v. 33, n. 4, p. 301–11, 2013.

YAMASHITA, A.S. et al. Influence of aerobic physical training in the mitochondrial transport of long chain fatty acids in the skeletal muscle: Role of the carnitine palmitoil transferase. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte Redprint Editora Ltda.** v.4, n. 12, p. 150-4 , 2008.

YU, H.; PARDOLL, D.; JOVE, R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. **Nature Reviews** v. 9, 2009.

ZAHARAN, W.E. et al. Efficacy of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-10 Analysis in the Follow-up of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Progression. **Indian J Clin Biochem.** 28(2):141-6, 2013.

ZELMAN K. The great fat debate: a closer look at the controversy-questioning the validity of age-old dietary guidance. **J Am Diet Assoc.** 111(5):655-8, 2011.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity** 12(2): 121-127, 2000.

ANEXOS



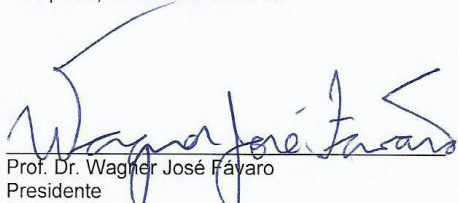
CERTIFICADO

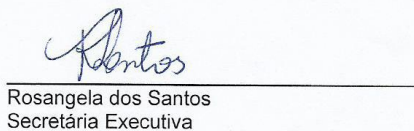
Certificamos que a proposta intitulada **Efeitos metabólicos do consumo de Óleo de Coco**, registrada com o nº **5124-1/2019**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni**, **Alana Carolina Costa Veras** e **Tamires dos Santos**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de 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 **14 de março de 2019**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/04/2019 - 01/04/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	01/04/2019 - 01/04/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib: SW(Swiss)
No. de animais:	220
Idade/Peso:	05 semanas / 30 g
Sexo:	Machos
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 junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 01 de abril de 2019.


 Prof. Dr. Wagner José Fávoro
 Presidente


 Rosângela 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.