

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - CAMPUS DE CASCAVEL  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E SAÚDE – MESTRADO

**BEATRIZ MACHADO DAUDT**

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO ADIPOSITO BRANCO DE ROEDORES  
OBESOS TRATADOS COM ÓLEO DE CASTANHA DO BRASIL**

CASCAVEL-PR

Abril/2022

**BEATRIZ MACHADO DAUDT**

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO DE ROEDORES  
OBESOS TRATADOS COM ÓLEO DE CASTANHA DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa De Pós-Graduação em Biociências e Saúde – Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

**Área de concentração: Biologia, processo  
saúde-doença e políticas de saúde**

**ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sabrina Grassioli**

CASCADEL-PR

Abril/2022

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Daudt, Beatriz Machado

ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO DE ROEDORES OBESOS TRATADOS COM ÓLEO DE CASTANHA DO BRASIL / Beatriz Machado Daudt; orientadora Sabrina Grassioli. -- Cascavel, 2022.

64 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em BioCiências e Saúde, 2022.

1. Obesidade. 2. Castanha do Brasil. 3. Adipócitos. 4. Histologia. I. Grassioli, Sabrina, orient. II. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### BEATRIZ MACHADO DAUDT

Análise histológica do tecido adiposo branco de roedores obesos tratados com óleo de castanha do Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biociências e Saúde, área de concentração Biologia, processo saúde-doença e políticas de saúde, linha de pesquisa Processo saúde-doença, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:



---

Orientador(a) - Sabrina Grassioli

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



---

Allan Cezar Faria Araújo

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



---

Henriette Rosa de Oliveira Emílio

Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Cascavel, 6 de abril de 2022

À minha avó Rosa...

*“O tempo é tudo que possuímos. E talvez um dia constatemos que possuímos menos do que julgávamos”.*

*Randy Pausch*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço e dedico esse trabalho à minha família, minha mãe Rosana e irmãs Caroline e Patricia. por serem as pessoas mais importantes na minha vida, sendo a base da minha existência. Sem vocês eu não seria nada, obrigada por todo apoio. Agradeço também ao Vito, quem mais me aguentou durante essa trajetória, que comemorou minhas vitórias, e também me deu suporte quando as coisas não iam tão bem. Eu amo muito vocês!

Às minhas amigas Keywa e Lorena, que mesmo de longe nós continuemos sempre nos apoiando e ajudando uma à outra a crescer ainda mais. Agradeço também as minhas amigas Amanda, Débora, Desirè e Naiara, as quais sempre compartilharam comigo suas vivências, e ajudaram nesse processo. A todas vocês, muito obrigada por todo carinho.

Além disso, agradeço também as minhas colegas de pesquisa, Zoé e Marianela: vocês foram essenciais nesse processo (e continuarão sendo), sem vocês eu não conseguiria chegar até aqui!

E por fim, à minha orientadora Sabrina Grassioli, saiba sempre que a admiro e sinto orgulho por ter sido sua aluna. Obrigada por toda luta pela ciência e por uma educação de qualidade, você é uma das minhas maiores inspirações!

Sei que nesse caminho existiram muitas pessoas que me ajudaram, a elas, toda minha gratidão!

## RESUMO

DAUDT, B. M. **Análise Histológica do Tecido Adiposo Branco de roedores obesos tratados com Óleo de Castanha do Brasil**. 64 páginas. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2022.

A hipertrofia de adipócitos está relacionada à piora do perfil metabólico no estado obeso. Compostos bioativos presentes em produtos naturais podem trazer benefícios à saúde, incluindo melhorar as comorbidades relacionadas à obesidade. Neste estudo foi avaliado o efeito da suplementação crônica com o óleo de Castanha do Brasil (Brazil nuts oil; Bno) na frequência de distribuição de adipócitos no tecido adiposo branco visceral e subcutâneo de ratos obesos. A obesidade hipotalâmica foi induzida em ratos machos (♂) e fêmeas (♀) - pela administração neonatal de glutamato monossódico (MSG) (4g/Kg). O controle (CTL; ♂ e ♀) recebeu solução salina equimolar. Dos 30 aos 90 dias de vida, metade dos grupos MSG e CTL receberam por gavagem via orogástrica o Bno na dose de 1mL/Kg. Os grupos não suplementados (NS) receberam o mesmo volume de solução salina (0,9%). Aos 92 dias de vida foram registrados o peso corporal (BW), comprimento naso-anal (NAL) e calculado o índice de Lee (LI). Depósitos de tecido adiposo branco das regiões inguinal (TAB-I) e perirrenal (TAB-P) foram retirados, pesados e submetidos a procedimentos histológicos. O tamanho dos adipócitos e a frequência de distribuição (pequeno, médio e grande) foram avaliados nos depósitos de TAB-I e TAB-P de obesos (MSG) e não-obesos (♂ e ♀). Roedores MSG ♂ e ♀ apresentaram aumento nos conteúdos adiposos e hipertrofia dos adipócitos dos depósitos de TAB-I e TAB-P, em relação aos animais não obesos (CTL). Além disso, observou-se alta frequência de adipócitos grandes e redução simultânea na frequência de adipócitos pequenos em depósitos de TAB-I e TAB-P de ♂ e ♀ tratados com MSG em comparação com os respectivos grupos de CTL. A suplementação de Bno reduziu significativamente a hipertrofia de adipócitos no TAB-P nos grupos obesos (MSG<sub>Bno</sub> ♂ e ♀) com simultânea elevação na frequência de adipócitos pequenos e médios em relação aos ratos MSG<sub>NS</sub> ♂ e ♀. Esses efeitos foram mais evidentes nas ♀ obesas. Neste grupo, a suplementação com Bno também melhorou o perfil de adipócitos do TAB-I. Assim, concluímos que a suplementação com Bno é eficaz na redução da hipertrofia de adipócitos no TAB-P de animais obesos hipotalâmicos, exercendo efeitos mais pronunciados em ♀ obesas.

**Palavras-Chaves:** Obesidade; adipócitos, dimorfismo sexual, histologia.

## ABSTRACT

DAUDT, B. M. **Histological Analysis of White Adipose Tissue of Obese rats treated with Brazil Nut Oil**. 64 pages. Dissertation (Master's). Postgraduate Program in Biosciences and Health, Center for Biological and Health Sciences, Cascavel Campus, Unioeste, 2022.

Adipocyte hypertrophy is related to worsen metabolic condition in obese state. Bioactive compounds present in natural products may have health benefits, including improving obesity-related comorbidities. In this study, it was evaluated the effect of chronic supplementation with Brazil nut oil (Bno) on the frequency of distribution of adipocytes in the visceral and subcutaneous white adipose tissue of obese rats. Hypothalamic obesity was induced in males (♂) and female (♀) rats by neonatal glutamate monosodium (MSG) administration (4g/Kg). Control (CTL; ♂ and ♀) received equimolar saline solution. From 30 – 90 days of life half MSG and CTL groups received by gavage via orogastric the Bno a dose of 1mL/Kg. Non-supplemented (NS) groups received same volume of saline (0.9%). At 92 days of life were registered body weight (BW), naso-anal length (NAL) and calculated Lee index. White adipose tissue depots from inguinal (WAT-I) and perirenal (WAT-P) regions were removed, weighed and submitted to histological procedures. Adipocyte size and distribution frequency (small, medium, and large) were evaluated in obese and non-obese WAT-I and WAT-P deposits, ♂ and ♀). MSG ♂ and ♀ rodents showed increased WAT-I and WAT-P content and adipocyte hypertrophy compared to non-obese animals (CTL). In addition, a high frequency of large adipocytes and a simultaneous reduction in the frequency of small adipocytes were observed in WAT-I and WAT-P deposits of MSG-treated ♂ and ♀ compared to the respective CTL groups. Bno supplementation significantly reduced adipocyte hypertrophy in WAT-P in obese groups (MSG<sub>bno</sub> ♂ and ♀) with a simultaneous increase in the frequency of small and medium adipocytes compared to MSG<sub>NS</sub> ♂ and ♀ rats. These effects were more evident in obese females. In this group, supplementation with Bno also improved the adipocyte profile of WAT-I. Thus, we conclude that chronic supplementation of Bno is effective in reducing adipocyte hypertrophy in WAT-P of hypothalamic obese animals, exerting more pronounced effects on the in obese females.

**Key words:** Obesity; adipocytes, sexual dimorphism, histology.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxogramas dos grupos experimentais de ratos machos (1A) e fêmeas (1B) .....	27
Figura 2 - Mensuração da área de adipócitos pelo software ImageJ 1.53a. ....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
DCNT	Doença Crônica Não Transmissível
TAB	Tecido Adiposo Branco
RI	Resistência à insulina
SM	Síndrome Metabólica
DM2	Diabete Mellitus tipo 2
DCV	Doenças Cardiovasculares
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral - Alfa
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
MSG	Glutamato Monossódico
ARQ	Núcleo Arqueado
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
Se	Selênio
Bn	Castanha-do-Brasil (Brazil Nuts)
Bno	Óleo de Castanha-do-Brasil (Brazil Nuts oil)
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
TABs	Tecido Adiposo Branco subcutâneo
TABv	Tecido Adiposo Branco visceral
IL-6	Interleucina 6
RE	Receptores de estrogênio
RA	Receptores de androgênio
AGMI	Ácidos Graxos monoinsaturados
AGPI	Ácidos Graxos poli-insaturados
Zn	Zinco
Mg	Magnésio
EPA	Ácido Graxo Eicosapentaenoico
DHA	Ácido Graxo Docosahexaenoico
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
TAB-I	Tecido Adiposo Branco Inguinal
TAB-P	Tecido Adiposo Branco Perirrenal

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>16</b>
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Obesidade .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2 Tecido adiposo branco .....</b>	<b>19</b>
<b>3.3 Óleo de Castanha-do-Brasil .....</b>	<b>22</b>
<b>3.4 Modelo de obesidade induzido por Glutamato Monossódico – MSG.....</b>	<b>24</b>
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Protocolo do estudo.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2 Indução da obesidade:.....</b>	<b>28</b>
<b>4.2 Suplementação com óleo de Castanha-do-brasil: .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3 Grupo Amostral .....</b>	<b>28</b>
<b>4.4 Avaliação da obesidade, eutanásia e coleta dos tecidos .....</b>	<b>29</b>
<b>4.5 Histologia e análise morfométrica .....</b>	<b>30</b>
<b>4.6 Análise Estatística.....</b>	<b>31</b>
<b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS GERAIS .....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>62</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma epidemia, a obesidade é uma das patologias que apresenta maior incidência no mundo todo, sendo categorizada como um fator de risco para as Doenças Crônicas Não Transmissíveis - DCNT (WHO, 2018). No Brasil, dados mais recentes obtidos pelo Ministério da Saúde na Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), mostram que a ocorrência da obesidade na população brasileira adulta em 2019, foi de 25,9%, sendo 21,8% homens, e 29,5% mulheres (BRASIL, 2020). Além disso, como apontam dados da OMS, em média, 22% da população brasileira adulta apresenta a obesidade como fator de risco para o desenvolvimento da DCNT, sendo 19% do sexo masculino e 26% do sexo feminino (WHO, 2016).

A obesidade é uma condição de acúmulo excessivo de Tecido Adiposo Branco (TAB) corporal, frequentemente decorrente de alterações na ingestão alimentar, e/ou gasto de energia, resultando em excesso de calorias que são depositadas na forma de gordura nas células do TAB. Deste modo, o sedentarismo, associado a maus hábitos alimentares são elementos centrais na epidemia de obesidade, sendo o grau de expansão do TAB e a gravidade das comorbidades instaladas no indivíduo obeso também influenciadas pelos fatores genéticos ou hormonais (WHO, 2000; BERNARDI; CICHELERO; VITOLO, 2005; MARIATH *et al.*, 2007). Está bem estabelecido na literatura que o acúmulo de TAB, particularmente aquele concentrado na região abdominal, é precursor para o desenvolvimento de patologias, tais como dislipidemias, hipertensão, Resistência à Insulina (RI), intolerância à glicose e esteatose hepática, anormalidades reunidas na Síndrome Metabólica (SM). Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares (DCV) e as neoplasias são mais frequentes em obesos com SM (CRISTÓVÃO; SATO; FUJIMORI, 2011; SCHMIDT *et al.*, 2011).

O TAB é um tecido com diversas funções, dentre as quais destaca-se a intensa capacidade de síntese e armazenamento de lipídios associados à reconhecida função endócrina, sendo ambos eventos ligados a saúde do indivíduo. Deste modo, a expansão excessiva de TAB promove crescimento do número (hiperplasia) e área (hipertrofia) dos seus adipócitos, e resulta em desregulação da função endócrina, provocando estresse oxidativo e inflamação sistêmica (VERBOVEN *et al.*, 2018). Assim o TAB de obesos, apresenta maior produção de

adipocinas pró-inflamatórias, como o Fator de Necrose Tumoral – Alfa (TNF- $\alpha$ ), Interleucina 1-beta (IL-1 $\beta$ ) e a resistina, as quais também promovem localmente um recrutamento de células imunes, estabelecendo um ciclo-vicioso que mantém a condição de inflamação de baixo grau, contribuindo para RI e consequente instalação da hiperglicemia e hipertrigliceridemia (FERRANTE, 2007; BAI; SUN, 2015).

Além do caráter funcional do TAB, é importante reconhecer o perfil de sua distribuição e forma de expansão. Assim, a predominante expansão do TAB visceral em relação a outros depósitos, tais como o TAB subcutâneo pode implicar em piores aspectos inflamatórios e metabólicos (FERRANTE, 2007; VERBOVEN *et al.*, 2018); um evento também notado quando o crescimento do TAB se dá preferencialmente por hipertrofia. Interessantemente, o TAB visceral cresce principalmente de maneira hipertrófica (COELHO *et al.*, 2013).

A complexidade da obesidade e funcionalidade do TAB é ainda influenciada pelo sexo, sobretudo pela ação metabólica dos hormônios sexuais masculinos e femininos (PALMER; CLEGG, 2015). Neste sentido, enquanto as mulheres tem um padrão de deposição de gordura preferencialmente no TAB subcutâneo, os homens tem armazenamento de gordura sobretudo nos territórios de TAB visceral (COELHO *et al.*, 2013; PALMER; CLEGG, 2015; CHANG *et al.*, 2018). Este perfil de distribuição do TAB se reflete no grau inflamatório e na gravidade das patologias, de tal maneira, que homens tendem a apresentar maior grau de dislipidemia, maior incidência de DCV e hipertensão em relação às mulheres (PALMER; CLEGG, 2015; CHANG *et al.*, 2018). Portanto, do ponto de vista funcional, é importante entender o TAB nos aspectos histológicos, endócrinos e o caráter de dimorfismo sexual, para assim estabelecer condições de tratamento mais apropriadas e prevenção da obesidade.

Neste sentido, modelos roedores que reproduzem a fisiopatologia da obesidade humana são importantes para desvendar os mecanismos da relação entre aumento de TAB e adoecimento. Lesões cerebrais, sobretudo aquelas localizadas no hipotálamo, importante centro regulador do apetite e balanço energético, são modelos muito utilizados para indução de obesidade em roedores (OLNEY, 1969; SCALLET; OLNEY, 1986; DOLNIKOFF *et al.*, 2001). As injeções subcutâneas de elevadas doses de Glutamato Monossódico (MSG), um aminoácido neuroexcitatório, é um método farmacológico, de lesão hipotalâmica, utilizada desde

a década de 60 para indução de obesidade em ratos e camundongos (OLNEY, 1969). A administração do MSG no período neonatal promove a degeneração de neurônios de áreas hipotalâmicas, principalmente no Núcleo Arqueado (ARQ) e leva a uma desregulação do eixo hipotálamo-hipófise e alteração do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) (TORREZAN *et al.*, 2019). Como consequência, roedores tratados com MSG, apresentam na vida adulta intensa adiposidade com acúmulo de TAB nas regiões viscerais e subcutâneas (GUARESCHI *et al.*, 2019), acompanhado de RI, intolerância à glicose, dislipidemia e complicações cardiovasculares, reproduzindo as principais características da SM vista em humanos obesos (SCALLET; OLNEY, 1986). No TAB de ratos MSG observa-se elevada lipogênese e baixo efeito lipolítico das catecolaminas (MARTINS *et al.*, 2004), além de hipertrofia e aumento da expressão do RNAm para adipocinas pró-inflamatórias no TAB destes animais (MARTINS *et al.*, 2004; ROMAN-RAMOS *et al.*, 2011; SVIDNICKI *et al.*, 2015). Importante destacar que esta obesidade ocorre sem hiperfagia e que há diferenças na resposta à lesão central em machos e fêmeas, o que pode indicar alterações nas adiposidades decorrentes do efeito sexual (DOLNIKOFF *et al.*, 2001; SAGAE *et al.*, 2011; QUINES *et al.*, 2019). Apesar do grau de obesidade e da extensão da lesão hipotalâmica, roedores MSG são capazes de reduzir a massa adiposa frente a estímulos, tais como, exercício, dieta ou suplementação com diferentes tipos de nutrientes (MARTINS *et al.*, 2004; ROMAN-RAMOS *et al.*, 2011; SVIDNICKI *et al.*, 2015; GUARESCHI *et al.*, 2019).

Ao longo dos anos, diferentes estratégias de combate à obesidade têm sido desenvolvidas, incluído técnicas cirúrgicas, restrição alimentar, exercício físico e medicamentos; todavia a manutenção do peso a longo prazo e os graves efeitos colaterais tem tornado o tratamento e a prevenção desta patologia pouco efetiva. Neste sentido, a busca por princípios bioativos em componentes naturais, como vitaminas e óleos, que possam melhorar o controle do peso corporal tornou-se muito frequente. Preocupantemente, muitos agentes naturais são utilizados sem a adequada dose ou conhecimento de efeitos colaterais sobre o organismo (COSTA; JORGE, 2011).

Alguns compostos bioativos, sobretudo aqueles extraídos da bioflora brasileira são amplamente indicados como benéficos à saúde, incluindo para o enfrentamento da obesidade (ROS, 2009; MARANHÃO *et al.*, 2011). Neste contexto, destaca-se o óleo obtido da Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*; Brazil Nuts

(Bn), uma substância rica em ácidos graxos, tais como os ômega 3 e 6, e minerais como o selênio (Se), ambos componentes conhecidos por suas ações antioxidantes e anti-inflamatórias (MARANHÃO *et al.*, 2011; SANTOS, 2012). Por estas propriedades, o consumo do óleo de Castanha-do-Brasil (Bno) vem sendo indicado para auxiliar no combate as comorbidades atreladas a obesidade e a SM. Estudos em roedores e humanos tem demonstrado efeitos positivos do consumo do Bno na melhora na função do adipócito, redução do processo inflamatório e no controle glicêmico (NASCIMENTO *et al.*, 2020; FRAUSTO-GONZÁLEZ *et al.*, 2021). Interessantemente, a suplementação com extrato de Bn melhorou os parâmetros reprodutivos em ratos machos diabéticos (NASCIMENTO *et al.*, 2020). Em machos obesos por dieta rica em calorias o extrato de Bn foi efetivo em reduzir conteúdo e área do adipócito do TAB perigonadal (FRAUSTO-GONZÁLEZ *et al.*, 2021). Em mulheres obesas com SM o consumo de Bn aumentou a expressão de microRNAs envolvidos com ação da vitamina D e cálcio, mas não afetou o peso e o metabolismo de lipídios (REIS *et al.*, 2019). Estes achados iniciais indicam diferenças na ação da Bn entre os sexos.

Diante disso, questiona-se se a partir da suplementação com Bno seria possível uma redução na massa adiposa? Seriam os efeitos sobre a adiposidade influenciados pelo sexo?

Portanto, nossa hipótese é de que a suplementação com Bno reduza o acúmulo de TAB, tendo efeito mais acentuado na massa visceral e sobre os machos obesos MSG.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da suplementação com o óleo de Castanha do Brasil na quantidade, tamanho e frequência de distribuição de adipócitos no tecido adiposo branco visceral e subcutâneo de ratos obesos MSG (machos e fêmeas).

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Comparar os efeitos da suplementação com Bno no ganho de peso corporal e no conteúdo de TAB visceral e subcutâneo de roedores obesos MSG;
- Analisar as modificações induzidas pela suplementação crônica com Bno na área de adipócitos no TAB visceral e subcutâneo de roedores obesos MSG;
- Caracterizar o padrão de distribuição dos adipócitos (pequenos, médios e grandes) no TAB visceral e subcutâneo de roedores obesos MSG.



### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Obesidade

O excesso de peso ou obesidade é uma condição patológica crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo corporal, o qual causa danos à saúde e ao bem-estar do indivíduo (WHO, 2000). A elevada incidência global de obesidade em diferentes populações estabelece o caráter epidêmico da doença, tendo como elementos centrais, o sedentarismo e a ingestão de alimentos ricos em carboidratos e gorduras, principalmente as saturadas (MARIATH *et al.*, 2007). Para além dos processos comportamentais, a magnitude dos efeitos deletérios da obesidade sobre a saúde também é influenciada pelos fatores hormonais, genéticos, psicológicos, metabólicos, ambientais, bem como, pelo sexo do indivíduo (BERNARDI; CICHELERO; VITOLLO, 2005; WANDERLEY; FERREIRA, 2010).

Segundo dados publicados pela OMS em 2018, no ano de 2016 a prevalência da obesidade em uma escala global foi de 13%, o que indica que há aproximadamente 650 milhões de adultos (>18 anos) obesos, além de 1,9 bilhões de pessoas com sobrepeso (WHO, 2018). Este fenômeno de rápido avanço da obesidade é evidente na América Latina, o continente com um dos maiores índices mundiais de obesidade e sobrepeso (FAO; OPAS, 2017). No Brasil, dados do Ministério da Saúde (2020) mostram que 20,3% dos adultos estão obesos, sendo que esta incidência é levemente menor nos homens, 19,5%, em relação as mulheres, 21%. Importante lembrar que no Brasil há diferenças socioeconômicas marcantes entre as diferentes regiões do país de tal forma, que a incidência de sobrepeso e obesidade, bem como as comorbidades, variam de acordo com a região estudada (BRASIL, 2020).

Como mencionado inicialmente, a obesidade é uma doença na qual há expansão do tecido adiposo, em particular os depósitos de Tecido Adiposo Branco (TAB). Logo, compreender a função, crescimento e distribuição deste tecido é essencial para melhor tratamento e acompanhamento do indivíduo obeso. Neste sentido, a expansão da massa adiposa pode ocorrer de duas maneiras, por hipertrofia, caracterizada pelo aumento no tamanho das células adiposas ou por hiperplasia que consiste na elevação no número de adipócitos, ambos os processos frequentemente ocorrem na progressão da doença (VERBOVEN *et al.*, 2018).

Assim, em condições normais, há maior porcentagem de TAB distribuído na região subcutânea (abaixo da pele) em relação a massa de TAB visceral (entre os órgãos) (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2007 *apud* COELHO *et al.*, 2013). Na obesidade pode haver a expansão do TAB subcutâneo e visceral, porém fatores genéticos, hormonais ou sexuais, podem determinar o crescimento preferencial de um dos setores, o que é relevante para diagnóstico e tratamento da obesidade (HEINONEN *et al.*, 2014; PALMER; CLEGG, 2015; KERSHAW; FLIER, 2004 *apud* RECINELLA *et al.*, 2020). Assim, estudos mostram que, em condições em que o crescimento do TAB, resulta sobretudo, de hipertrofia, com acúmulo visceral, parece haver maior grau de rompimento das funções fisiológicas dos adipócitos e consequente alterações metabólicas e instalação de DCNT (COELHO *et al.*, 2013; HEINONEN *et al.*, 2014; VERBOVEN *et al.*, 2018). O rompimento da homeostase glicêmica e lipídica, com dislipidemia, hiperglicemia, RI, levando a esteatose hepática e hipertensão, são, portanto, fatores comuns no indivíduo obeso, estabelecendo a presença da SM. A SM e obesidade estão relacionadas à maior incidência de neoplasias, doenças respiratórias crônicas e, principalmente, DM2, causando assim efeitos deletérios severos à saúde do indivíduo (WANDERLEY; FERREIRA, 2010; CRISTÓVÃO; SATO; FUJIMORI, 2011; SCHMIDT *et al.*, 2011).

Grande parte da relação adiposidade e doenças é decorrente de um processo inflamatório crônico sistêmico e vascular, cuja origem está na ação endócrina dos adipócitos. Como já bem estabelecido na literatura, as células do TAB liberam diferentes tipos de substâncias de ação endócrina, com destaque para as citocinas pró-inflamatórias, tais como as IL-1 e 6 e a TNF- $\alpha$ , além dos hormônios como a leptina e resistina (FERRANTE, 2007; HEREDIA *et al.*, 2012; BAI; SUN, 2015; BALLAK *et al.*, 2015), as quais tem impacto direto no desenvolvimento da RI, e em decorrência do rompimento do metabolismo de carboidratos e lipídios. Importante lembrar que o grau de inflamação gerada pelo TAB está relacionado à magnitude da hipertrofia do adipócito, bem como, ao perfil de localização da gordura (SETHI *et al.*, 2007; BJØRNDAL *et al.*, 2011). Por estes elementos, o entendimento da fisiopatologia do TAB é ponto central para melhor compreensão da obesidade e seu impacto sobre a saúde.

### 3.2 Tecido adiposo branco

O TAB, comumente conhecido como depósito de gordura, é um órgão que possui diversas funções no corpo, tais como auxiliar no balanço energético, promover isolamento térmico, proteger órgãos contra choques mecânicos, além de seu papel na secreção de diferentes substâncias. O TAB pode apresentar diferenças funcionais, estruturais, de tamanho celular e metabólicas conforme a sua localização (SETHI *et al.*, 2007; BJØRNDAL *et al.*, 2011), todas diretamente ligadas à sua capacidade de sintetizar e liberar uma variedade de compostos protéicos, denominadas adipocinas, as quais regulam a homeostase energética e determinam o peso corporal (COELHO *et al.*, 2013).

Em geral, o TAB é composto por diferentes elementos celulares como fibroblastos, células de origem hematopoiética e células imunes, como macrófagos (MARTINEZ-SANTIBAÑEZ *et al.*, 2014) e por um tipo celular principal, os adipócitos, os quais são provenientes de uma diferenciação dos pré-adipócitos (SETHI *et al.*, 2007; COELHO *et al.*, 2013; LUDWIG, 2018). O TAB é um tecido muito versátil, e portanto, a sua diferenciação e crescimento ocorrem ao longo da vida, iniciando a partir de uma complexa cascata transcricional na adipogênese, a qual, segundo Sethi *et al.* (2007), não é apenas uma resposta passiva à elevada ingestão calórica, mas que esse processo demanda energia para ocorrer.

Assim, em condições de excesso de substratos energéticos, o TAB modifica seu número de adipócitos (hiperplasia), bem como, o tamanho de suas células (hipertrofia). Estas modificações em resposta ao balanço de energia, são orquestradas por meio dos processos bioquímicos envolvidos na captação de lipídios, esterificação, lipólise e diferenciação de pré-adipócitos (COELHO *et al.*, 2013). A expansão em celularidade (adipogênese) e área dos adipócitos é regulada neural e hormonalmente, para garantir equilíbrio entre lipogênese e lipólise e evitar o rompimento da homeostase energética (ZHU *et al.*, 2019).

O TAB apresenta ampla distribuição pelo corpo, estando presente em regiões subcutâneas e viscerais, principalmente a abdominal (COELHO *et al.*, 2013). Os adipócitos do TAB são células arredondadas, das quais no seu interior há uma única gotícula de lipídio que ocupa o centro do citoplasma celular, caracterizando o perfil unilocular de deposição de gordura (MARTINEZ-SANTIBAÑEZ *et al.*, 2014; LUDWIG, 2018). O núcleo e organelas do adipócito estão presentes na periferia

citoplasmática empurrados pela gotícula de lipídio e envoltos por uma camada lipídica fina (MARTINEZ-SANTIBAÑEZ *et al.*, 2014). Em termos metabólicos, a principal função de TAB é atuar na homeostase energética, armazenando substratos energéticos na forma de triglicerídeos durante períodos de excesso de ingestão calórica, e liberando ácidos graxos livres, em períodos de déficit calórico, como jejum ou exercício físico (NISHIMOTO; TAMORI, 2017; LUDWIG, 2018; ZWICK *et al.*, 2019). Entretanto, hoje é reconhecido que esta atividade é intimamente ligada à sua ação endócrina secretora.

O TAB, como mencionado anteriormente, sintetiza e libera as denominadas adipocinas, peptídeos bioativos que atuam alterando o metabolismo sistêmico, exercendo ações pró-inflamatórias e anti-inflamatórias que regulam a homeostase energética, através de fatores como estado nutricional, sexo, idade entre outros (MANCUSO, 2016; RECINELLA *et al.*, 2020). Entre as diferentes adipocinas secretadas pelos adipócitos, aquelas com ação pró-inflamatória sistêmica tem recebido maior atenção, em especial por sua ligação com a instalação da SM e DCNT (RECINELLA *et al.*, 2020). As principais adipocinas pró-inflamatórias são o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , a resistina e o hormônio leptina, as quais modulam a diferenciação dos adipócitos, a lipólise e a redução da sensibilidade à insulina promovendo hiperglicemia e dislipidemia (FERRANTE, 2007; BAI; SUN, 2015; VERBOVEN *et al.*, 2018; RECINELLA *et al.*, 2020). Adicionalmente, há importante interação entre os adipócitos do TAB e o sistema imunológico, de tal forma, que na obesidade é frequente a migração e a infiltração de macrófagos, linfócitos e outros tipos celulares imunes entre os adipócitos, os quais também sustentam a hipersecreção das substâncias pró-inflamatórias, e garantem o caráter inflamatório sistêmico típico da obesidade (CHAWLA *et al.*, 2011 *apud* ESSER *et al.*, 2014). Na obesidade, os processos de hipertrofia e hiperplasia se tornam alterados em resposta à alta de ingestão calórica, fazendo com que haja um excesso de triglicerídeos acumulados no organismo, conseqüentemente ocasionando o aumento das adipocinas pró-inflamatórias no TAB. Além disso, o crescimento exagerado do TAB provoca a redução de proteínas com ação anti-inflamatórias, como adiponectina e IL-10. Essa desregulação facilita a infiltração de células imunes, elevando a quantidade de macrófagos ativos no tecido, que secretam mais moléculas pró-inflamatórias através da comunicação parácrina e autócrina, dessa forma, atingem outros sistemas como muscular, cardiovascular e hepático que também sofrem impactos pela quantidade

de ácidos graxos livres e proteínas inflamatórias secretadas pelo TAB hipertrofiado (FERRANTE, 2007; COELHO *et al.*, 2013).

É importante salientar que os níveis da expressão das proteínas pró-inflamatórias podem ocorrer de formas distintas nos diferentes depósitos de TAB. Nos depósitos de TAB subcutâneo (TABs) foi demonstrado que os níveis do leptina são mais expressos do que os de TNF- $\alpha$  e que a infiltração por macrófagos também é menor, sugerindo que o perfil inflamatório da obesidade seja menor no TABs do que no TAB visceral (TABv). Estudos demonstram que TABv é metabolicamente mais ativo, apresentando uma concentração maior de IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e células imunes, tornando-o mais propenso a ser o maior responsável pela inflamação na obesidade do que TABs (FERRANTE, 2007; COELHO *et al.*, 2013; MANCUSO, 2016; VERBOVEN *et al.*, 2018).

Interessantemente, a distribuição do TAB e os níveis de proteínas pró e anti-inflamatórias também podem ser influenciados pelo sexo. Deste modo, no sexo feminino observa-se principalmente a predominância de TABs, enquanto nos homens a deposição é preferencialmente no TABv. O acúmulo de gordura no TABv tem sido correlacionado com o aumento das complicações metabólicas, enquanto o acúmulo adiposo em TABs exerce risco reduzido em relação a obesidade e suas complicações (PALMER; CLEGG, 2015; CHANG *et al.*, 2018). Isso acontece devido a menor taxa de lipólise em TABs quando comparado a TABv e, por tanto, menor e maior taxa de expressão das adipocinas pró-inflamatórias nos respectivos tecidos (SHULMAN, 2014 *apud*. PALMER; CLEGG, 2015).

O dimorfismo morfológico e funcional do TAB parece estar ligado a ação dos hormônios sexuais. Adipócitos do TABv e TABs possuem receptores para os hormônios estrogênio e androgênio, os quais atuam na adipogênese (PALMER; CLEGG, 2015; CHANG *et al.*, 2018). O TABs possui mais receptores de estrogênio (RE) que TABv, enquanto TABv é rico em receptores de androgênio (RA) essa diferença pode elucidar como ocorre o acúmulo do tecido adiposo entre os sexos (CHANG *et al.*, 2018). Além disso, a maior expressão de RE no TABs resultando em níveis mais elevados de leptina inibe RA, o que explica a maior concentração de leptina circulante em mulheres do que em homens (COELHO *et al.*, 2013). Em ratas foi observado que a ação estrogênica sobre a proliferação do TAB é afetada pelo ciclo estral. O estradiol aplicado diretamente no cérebro de roedores fêmeas ovariectomizadas e falso operadas levou a um aumento na sensibilidade à leptina e

uma redução na sensibilidade à insulina. Além disso, ocorreram mudanças na distribuição da gordura corporal subcutânea dessas ratas favorecendo-as em relação à gordura visceral, tornando a distribuição parecida com a de ratas em condições normais (CLEGG *et al.*, 2006).

Por outro lado, em homens, o androgênio parece diminuir a expressão da adiponectina no TAB, resultando na baixa sensibilidade à insulina e níveis de glicose mais elevados, relacionando-se com o aumento da lipólise pelas catecolaminas (GROSSMANN, 2011). O dimorfismo sexual, determina, portanto, o aspecto morfológico, a distribuição e o caráter funcional do TAB e tem consequentemente repercussões sobre o estado de saúde, que podem ser diferentes para homens e mulheres.

Apesar da vasta literatura sobre o TAB e da ampliação de seus conceitos e funções, vivemos nas últimas décadas um período de rápido avanço da obesidade, sem que estratégias efetivas pudessem amenizar ou impedir o adoecimento dos indivíduos. Assim, a suplementação com diferentes agentes naturais tem sido um mecanismo frequente buscando por pacientes obesos para o enfretamento da doença, sobretudo por que alguns agentes naturais têm apresentado potencial de reduzir inflamação e teor de TAB.

### **3.3 Óleo de Castanha-do-Brasil**

A Bn (*Bertholletia excelsa*) é uma semente oleaginosa, nativa da Amazônia, a qual possui componentes bioativos que são capazes de atuar no metabolismo e fisiologia humana (COSTA; JORGE, 2011; CARDOSO *et al.*, 2017). Tanto na sua forma *in natura* quanto a partir da extração do Bno são encontrados diferentes tipos de substâncias com efeitos benéficos sobre a saúde, dentre as quais destacam-se, os macronutrientes, como os Ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e poli-insaturados (AGPI), os micronutrientes, como zinco (Zn), Magnésio (Mg) e Selênio (Se) e compostos fenólicos e tocoferóis como o  $\alpha$ -tocoferol (MARANHÃO *et al.*, 2011; SANTOS, 2012; CARDOSO *et al.*, 2017). Todos estes elementos, conferem ao Bno propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias com importantes efeitos sobre o metabolismo de carboidratos e lipídios e, portanto, com potenciais efeitos positivos sobre a obesidade, SM e DM2 (BAHADORAN *et al.*, 2013; COSTA; JORGE, 2011; CARDOSO *et al.*, 2017).

O Bno é rico em ácidos graxos essenciais, sendo composto por aproximadamente 75% de AGPI e AGMI, destacando-se o ômega 6, o ácido oleico (ômega 9) e em menor quantidade o ômega 3 (CARDOSO *et al.*, 2017). Endogenamente AGPI e AGMI dão origem a outros ácidos graxos como eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) que são biologicamente ativos podendo ser sintetizados no TAB, diminuindo os níveis de triglicerídeos e lipoproteínas de baixa densidade (LDL, *Low-density Lipoproteins*) circulantes (COSTA; JORGE, 2011). Similarmente foi demonstrado que a suplementação com ácido linoleico conjugado (ômega 6) nas concentrações de 2% reduziu a gordura corporal dos roedores (BOTELHO *et al.*, 2005), enquanto a suplementação com ômega 3 em camundongos reduziu a glicose circulante e aumentou a sinalização da insulina (LUZ *et al.*, 2012). Sendo assim, estima-se que por possuir uma alta quantidade de AGPI, o Bno pode atuar no organismo reduzindo o TAB, alterando a concentração de marcadores inflamatórios e causando impacto na homeostase energética, além de diminuir o peso corporal (BOTELHO *et al.*, 2005; LUZ *et al.*, 2012).

O Se é frequentemente relatado como um importante composto que participa como sítio ativo de enzimas como a tioredoxina redutase e a glutathione peroxidase, as quais agem no organismo exercendo funções antioxidantes e regulando o sistema imune, atuando na redução e prevenção de doenças cardiovasculares, câncer, doenças no fígado e redução do perfil lipídico em pessoas obesas (YANG, 2009; MARANHÃO *et al.*, 2011; COLPO *et al.*, 2014). Uma investigação realizada com BN\* *in natura* demonstrou a diminuição de marcadores pró-inflamatórios em indivíduos saudáveis após um longo período de consumo de Bn, atribuindo os resultados a grande quantidade de Se presente na dieta (COLPO *et al.*, 2014). Confirmando os efeitos positivos de Bn, Maranhão *et al.* (2011) demonstrou que as substâncias bioativas presentes em Bn ajudaram positivamente a melhorar o perfil lipídico e a reatividade microvascular nutritiva em adolescentes obesas.

Pesquisas recentes demonstram que os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes de Bn agem nos parâmetros reprodutivos (NASCIMENTO *et al.*, 2020), o que indica que esses efeitos também podem ser diferentes entre os sexos. Nesse sentido, Nascimento *et al.* (2020) demonstrou que ao administrar extrato de Bn em ratos diabéticos houve melhora no perfil glicêmico, na esteroidogênese e na

produção de espermatozoides, entretanto, os animais que receberam o extrato apresentaram ganho de peso.

Do mesmo modo, foi observado que após o tratamento com extrato de Bn na dose de 30 e 300mg/Kg em roedores machos obesos que receberam dieta hipercalórica houve redução de peso corporal, diminuição no conteúdo lipídico testicular, no peso do TAB perigonadal e na área de adipócitos, acredita-se que esses resultados foram promovidos devido a grande quantidade de ácidos graxos presentes em Bn (FRAUSTO-GONZÁLEZ *et al.*, 2021).

Adicionalmente, em uma pesquisa realizada em mulheres obesas com SM que consumiram diariamente uma semente de Bn durante dois meses observou-se que houve aumento nos níveis de expressão de dois microRNAs circulantes relacionados com a via de ativação de receptores da Vitamina D, os quais foram correlacionados com o Se presente na Bn. O aumento desses microRNAs podem apresentar efeitos nas funções imunes, na ação do cálcio e na regulação do crescimento. Apesar dos achados, o peso e o metabolismo de lipídios não sofreram efeitos do consumo de Bn (REIS *et al.*, 2019).

Embora existam publicações demonstrando os benefícios fisiológicos e metabólicos do consumo de Bn *in natura* nos marcadores pró-inflamatórios, na homeostase glicêmica e na obesidade, a literatura mostra-se escassa sobre os benefícios da suplementação com Bno na obesidade, principalmente no TAB. A partir disso, acredita-se que os componentes da castanha *in natura* possam atuar de forma similar através do consumo do Bno, reduzindo o perfil inflamatório, e a hipertrofia do TAB.

### **3.4 Modelo de obesidade induzido por Glutamato Monossódico – MSG**

O MSG é um sal sódico do ácido glutâmico amplamente utilizado em alimentos industrializados como um realçador de sabor, com o objetivo de trazer o gosto *umami* aos alimentos (BAUTISTA *et al.*, 2019; HAJHASANI *et al.*, 2020). O glutamato age como um neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central, sendo biossintetizado na mitocôndria, participando de diversas funções cerebrais (BAUTISTA *et al.*, 2019).

Esse composto tem sido muito utilizado na literatura em modelos de obesidade hipotalâmica com ratos e camundongos. A administração de superdoses



de MSG via injeções subcutâneas em ratos neonatos geram distúrbios metabólicos e induzem ao estresse oxidativo em diferentes órgãos devido sua capacidade do MSG em atravessar a barreira hematoencefálica em roedores neonatos, causando a degeneração de neurônios hipotalâmicos, principalmente em ARQ (OLNEY, 1969). Essas lesões hipotalâmicas levam a disfunção do eixo hipotálamo-hipófise promovendo diversas complicações fisiológicas e metabólicas no animal adulto, como, por exemplo, retardo no crescimento prejudicando o tamanho corporal, biossíntese defeituosa de catecolaminas e obesidade apresentada pelo acúmulo exacerbado de TABv e TABs, RI, intolerância à glicose e dislipidemia (MARTINS *et al.*, 2004; SVIDNICKI *et al.*, 2015; GUARESCHI *et al.*, 2019; TORREZAN *et al.*, 2019). Além disso, o tratamento com MSG pode ativar a atividade lipogênica resultando acúmulo adiposo por hipertrofia de TAB e influenciar no tecido aumentando a quantidade de marcadores inflamatórios, contribuindo para o desenvolvimento da inflamação de baixo grau da obesidade (MARTINS *et al.*, 2004; ROMAN-RAMOS *et al.* 2011). Apesar do MSG promover obesidade esta condição não está associada a hiperfagia (DOLNIKOFF *et al.*, 2001).

As respostas promovidas pela lesão central do tratamento com MSG podem se diferenciar entre os sexos dos roedores. Quines *et al.* (2019) demonstrou que a obesidade hipotalâmica por MSG induziu um aumento de lipídios no fígado e músculo esquelético de roedores machos, enquanto em roedores fêmeas houve lipotoxicidade apenas no músculo esquelético. Além disso, roedores machos e fêmeas MSG obesos demonstram atividade colinérgica cortical aumentada, entretanto, após serem expostos ao exercício físico, essa atividade foi atenuada em ratas MSG obesas, diferentemente dos ratos MSG nos quais a atividade colinérgica talâmica aumentou após o exercício (SAGAE *et al.*, 2011). Essas diferenças entre roedores MSG machos e fêmeas podem ser decorrentes do efeito sexual, que pode impactar em alterações na adiposidade desses animais.

Na busca de melhorar e prevenir as severas alterações fisiológicas e metabólicas causadas pela obesidade, o modelo MSG aliado a suplementação com produtos naturais tem se destacado. Dessa maneira, Ratas MSG obesas obtiveram redução dos depósitos de gordura corporal após receberem dieta rica em AGPI, apresentando recuperação da tolerância à glicose e na secreção de insulina induzida pela glicose (MARTIN *et al.*, 2016). Ainda, Ratos MSG obesos suplementados oralmente com vitamina D tiveram redução de hiperinsulinemia e a

hipertrigliceridemia, além da sensibilidade à insulina restaurada (GUARESCHI *et al.*, 2019). Similarmente, um estudo por Sanches *et al.* (2016) demonstrou que roedores MSG-obesos que receberam o extrato hidroalcolico das folhas de Jambolão (*Syzygi cumumini*) tiveram a obesidade reduzida, bem como a hiperinsulinemia, além da ação lipolítica, tolerância à glicose e sensibilidade à insulina restauradas.

Apesar de existirem efeitos de suplementação com compostos naturais em ratos tratados com MSG, até o momento não há na literatura pesquisas relacionando os efeitos do Bno sobre a redução e/ou melhora do TAB em roedores MSG obesos.

## 4. METODOLOGIA

O presente estudo se caracteriza como uma pesquisa experimental básica, de caráter quantitativo desenvolvida no Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo (LAFEM), da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *Campus* de Cascavel/PR. Os procedimentos do projeto foram realizados de acordo com as normas internacionais de ética em experimentação aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE, no dia 13 de abril de 2020 (anexo A).

Este estudo é um recorte de projeto maior intitulado “Efeitos da suplementação crônica com os óleos de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) e copaíba (*Copaifera langsdorfii*) sobre adiposidade e homeostase glicêmica de roedores obesos-MSG machos e fêmeas”, coordenado pela professora Sabrina Grassioli. Portanto, neste trabalho foram utilizados roedores machos e fêmeas da linhagem *Wistar*, nos quais foram analisados o conteúdo e histologia dos depósitos de TAB inguinal (subcutâneo) e o TAB Perirrenal (visceral).

### 4.1 Protocolo do estudo

#### Amostra

Foram utilizadas ratas *Wistar* grávidas (n=10) provenientes do Biotério Central da UNIOESTE/Cascavel, as quais foram transferidas para o biotério setorial anexo ao LAFEM e alojadas em gaiolas de polipropileno com restrição de um animal por gaiola e receberam água e ração à vontade. Após o nascimento dos roedores, as proles foram padronizadas para 6-8 animais por rata durante o período lactacional (21 dias), sendo metade machos (♂) e metade fêmeas (♀) (MATTARAIA; MOURA, 2012).

Após o desmame, os animais foram mantidos em gaiolas forradas com maravalha e receberam à vontade ração própria para roedores (BIOBASE, Brasil) e água potável proveniente da torneira. No biotério a luminosidade foi regulada através de um temporizador programável, mantendo o biotério 12 horas claro – 12 horas escuro. A ventilação foi mantida através de exaustores e a temperatura regulada entre 23°C ± 2°C, assegurando condições de luminosidade, temperatura e higienização adequado ao bem estar dos animais.

#### **4.2 Indução da obesidade:**

A partir do segundo dia de vida foi realizada a indução da obesidade, sendo que metade dos animais ( $n \cong 10$  ♂ e  $n \cong 10$  ♀) receberam durante 5 dias consecutivos injeções subcutâneas de glutamato monossódico (MSG) na região dorsal com concentração de 4g/Kg por peso corporal dos animais. Ao mesmo tempo, os animais do grupo controle (CTL;  $n \cong 10$  ♂ e  $n \cong 10$  ♀) receberam solução salina equimolar (1,25g/Kg) na mesma frequência e proporção, para simular o estresse. A indução da obesidade por doses de MSG foi descrita pela primeira vez por OLNEY (1969), entretanto, nesse estudo as doses utilizadas foram adaptadas através de estudos anteriores realizados com ratos *Wistar* (LUBACZEUSKI *et al.*, 2015).

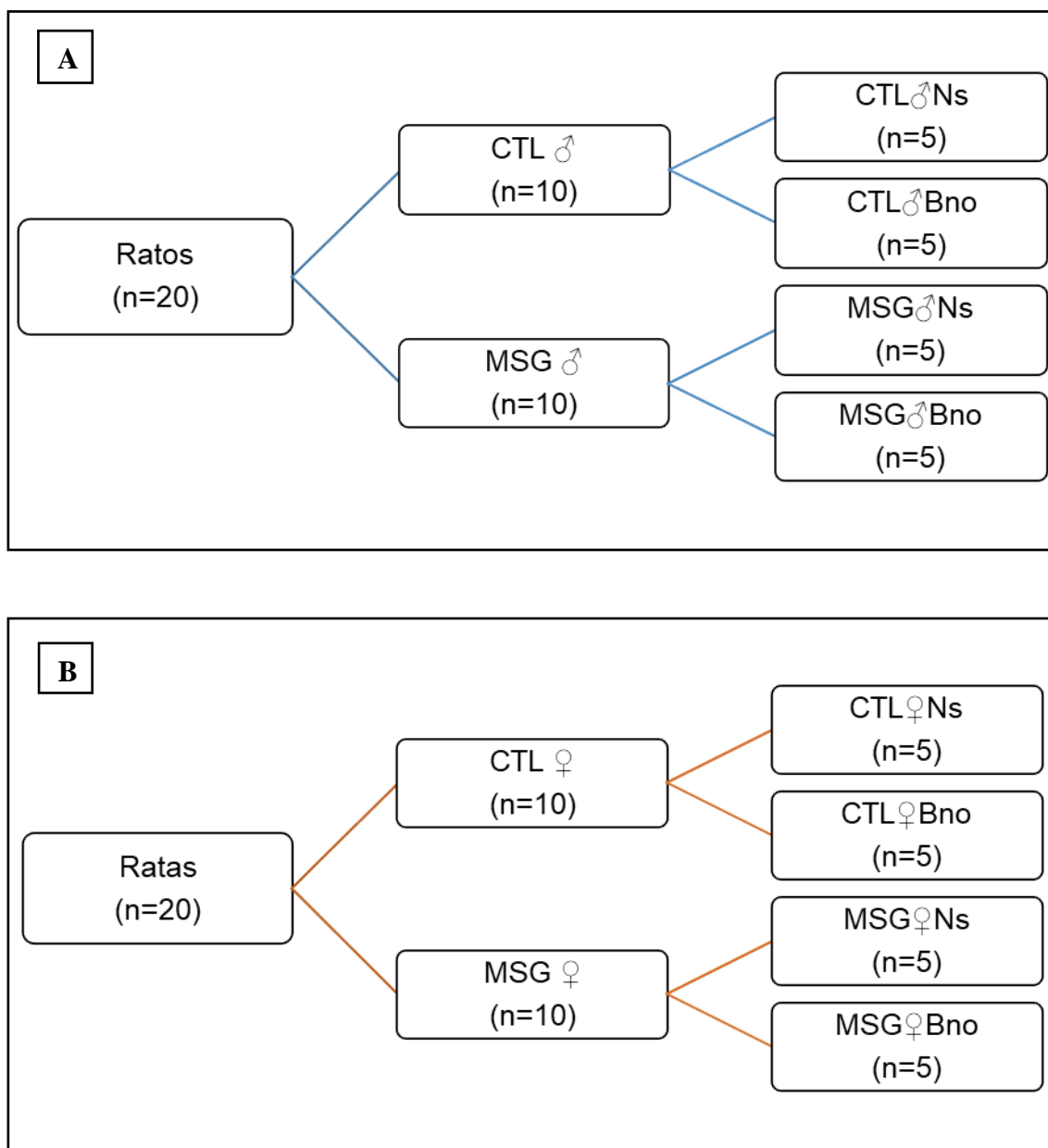
#### **4.2 Suplementação com óleo de Castanha-do-brasil:**

A partir do desmame (21 dias), os grupos CTL e MSG foram distribuídos randomicamente por sexo em subgrupos, conforme protocolo de suplementação descrito a seguir : foram alojados em caixas contendo 3-4 ratos por caixa. Aos 30 dias de vida, teve início a suplementação com Bno. Para tal, os animais suplementados receberam Bno (AmazonOil, Brasil) na dose de 1 mL/Kg administrada via sonda orogástrica na frequência de três vezes por semana dos 30 aos 90 dias de vida. Animais Não Suplementados (NS) receberam pela mesma via, dose igual, o mesmo volume de salina 0,9%, administrado na mesma frequência e duração. A escolha da dose de Bno foi adaptada para uso em roedores através de estudos anteriores disponíveis na literatura (VIEIRA, 2011) e conforme as doses sugeridas para consumo humano presentes na embalagem do fabricante (AmazonOil, Brasil) com a finalidade de assegurar a não toxicidade dos animais.

A caracterização físico-química do Bno foi disponibilizada no site da empresa (AmazonOil, Brasil; ANEXO B).

#### **4.3 Grupo Amostral**

De acordo com suplementação de Bno, o tratamento com MSG e o sexo formaram-se oito grupos experimentais, conforme a figura 1 a e b, respectivamente:



**Figura 1 - Fluxogramas dos grupos experimentais de ratos machos (1A) e fêmeas (1B)**  
 Autoria Própria (2022). **Figura A:** CTL♂Ns (controle não-suplementado macho, n=5); CTL♂Bno (controle com suplementação de óleo de Castanha macho, n=5); MSG♂Ns (MSG não-suplementado macho, n=5); MSG♂Bno (MSG com suplementação de óleo de castanha macho, n=5). **Figura B –**  
 Autoria Própria (2022). Legenda: CTL♀Ns (controle não-suplementado fêmea, n=5); CTL♀Bno (controle com suplementação de óleo de Castanha fêmea, n=5); MSG♀Ns (MSG não-suplementado fêmea, n=5); MSG♀Bno (MSG com suplementação de óleo de castanha fêmea, n=5);

#### 4.4 Avaliação da obesidade, eutanásia e coleta dos tecidos

Aos 92 dias de vida, após 48h da última gavagem e 12h de jejum os animais foram pesados, e após a eutanásia tiveram o Comprimento Naso-Anal (CNA) medidos (n=8). A obesidade então foi avaliada a partir do cálculo do Índice de Lee

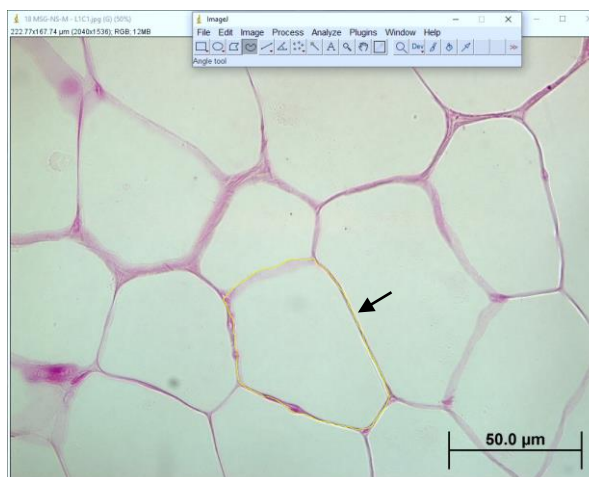
(IL) obtido através da raiz cúbica do peso corporal (g) dividido pelo CNA (cm) (BERNARDIS; PATTERSON, 1968). Após eutanásia, a cavidade abdominal foi laparotomizada, a partir de então foram localizados, retirados e pesados os TAB inguinal (TAB-I) e perirrenal (TAB-P) para análise do conteúdo de TAB. Imediatamente, o TAB foi transferido para solução de fixação. As técnicas de processamento destas amostras serão apresentadas a seguir.

#### **4.5 Histologia e análise morfométrica**

Após os tecidos serem coletados, pesados e limpos, os exemplares foram imersos em solução fixadora de tecidos - ALFAC (85% de álcool etílico 70%, 10% de formaldeído 37-40% e 5% ácido acético glacial) por 24h, sendo posteriormente transferidos e armazenados em álcool 70% até processamento histológico. Para preparo dos tecidos, os exemplares foram submetidos à desidratação em série crescente de álcool (80, 90, 95 e 100%), seguida pela diafanização gradual pelos xilóis e por fim emblocados em parafina histológica (ACS Científica, Sumaré-SP, Brasil). Os blocos foram submetidos a secções semi-seriadas com espessura de 7 $\mu$ m com o auxílio do micrótomo (OLYMPUS CUT4055). Foram confeccionadas três lâminas por animal (n=5 animais/grupo), contendo de 1 corte/lâmina. Posteriormente, foi realizada a técnica de coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E) (RIBEIRO; LIMA, 2000).

As lâminas histológicas foram fotografadas com auxílio do microscópio de luz (OLYMPUS BX60) acoplado a câmera de captura (OLYMPUS DP71), sendo realizada 5 fotomicrografias por corte no aumento de 40X. Para a caracterização do tamanho e frequência dos adipócitos foi utilizado o software ImageJ (Versão 1.53a, USA; Figura 2).

Para as frequências de tamanho dos adipócitos, foram realizados o 1º e 3º quartil para definição de adipócitos pequenos e médios respectivamente, sendo utilizados como valores limites, valores acima do 3º quartil, foram considerados para adipócitos grandes. Após, obtivemos as porcentagens através das estatísticas descritivas.



**Figura 2 - Mensuração da área de adipócitos pelo software ImageJ.**  
Autoria Própria (2022). Seta mostra linha amarela indicativa da área de um adipócito.

#### 4.6 Análise Estatística

Foi realizada uma análise descritiva dos resultados a partir da análise Shapiro-Wilk. O teste utilizado foi o de Análise de Variâncias *two-way* (ANOVA) com pós-teste Tukey. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism® (versão 8.0 para Windows) e os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), com p-valor  $<0,05$ .

## ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado: **“Chronic Brazil nuts oil supplementation reduce adipocyte hypertrophy on visceral white adipose tissue depot of lean and hypothalamic obese male and female rodents”**, foi formatado de acordo com as normas para submissão da revista British Food Journal ([Manuscript requirements](#); ANEXO C).



**Chronic Brazil nuts oil supplementation reduce adipocyte hypertrophy on visceral white adipose tissue depot of lean and hypothalamic obese male and female rodents**

Beatriz Machado Daudt\*<sup>1</sup>; Marianela Andrea Díaz Urrutia<sup>1</sup>; Zoé Maria Guareschi<sup>1</sup>; Gustavo Tsuyoshi Okada Kamiji<sup>1</sup>; Isabella Hikari Kinoshita Nishiyama<sup>1</sup>; Julia Mayumi Ueda<sup>1</sup>; Sabrina Grassioli<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratory of Endocrine and Metabolic Physiology, Biosciences and Health PostGraduate. University of West Parana, Cascavel - PR, Brazil.

Corresponding author\*: Beatriz Machado Daudt. E-mail: [bia.daudt@hotmail.com](mailto:bia.daudt@hotmail.com).  
Adress: Rua Universitária, 2069 - Jardim Universitário - Bloco de Ciências - Sala 95 - CEP: 85819-110 - Cascavel – PR.

## Abstract

**Purpose:** Herein we evaluated the effect of chronic Brazil nuts oil supplementation on frequency of adipocytes distribution on white adipose tissue of lean and hypothalamic obese animals.

**Design/methodology/approach:** Hypothalamic obesity was induced in males and female rats by neonatal glutamate monosodium (MSG) administration (4g/Kg). Control (CTL) received equimolar saline solution. From 21 – 90 days of life half MSG and CTL groups received via oral Brazil nuts oil (Bno; 1mL/Kg). Non-supplemented (NS) groups received same volume of saline (0.9%). At 92 days of life were registered adiposity and biometric variables. White adipose tissue (WAT) from inguinal (I) and perirenal (P) depots were excised, weighed and submitted at histological procedures to analysis the size of adipocytes and frequency of distribution.

**Findings:** MSG-treated male and female groups showed high adiposity, accompanied of adipocytes hypertrophy and reduction in frequency of small adipocytes in WAT-I and WAT-P depots in comparison to respective CTL groups. Bno supplementation reduced adipocyte hypertrophy in WAT-P adipocytes, increasing the frequency of small and medium adipocytes in MSG male and female groups in relation to NS animals. In MSG female group these effects also were observed in WAT-I depot. Thus, we concluded that Bno chronic supplementation is effective in reduces adipocytes hypertrophy in visceral WAT depot from hypothalamic obese animals, exerting more pronounced effects in MSG-obese female.

**Originality:** For first time, we explored effects of Bno supplementation in adiposity, indicating benefits effects this nutritional strategy to reduce adipocyte hypertrophy in hypothalamic obesity, in especial in obese female.

**Key words:** obesity, male, female, adipocytes, histology.

## Introduction

Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) is a native species from the Amazon being a seed rich in bioactive compounds such as phytosterols tocopherols and phenolics agents, vitamins, fibers, mono and poli unsaturated fat acids (MUFA and PUFA) beside be considered the main food source of selenium (Ros, 2009) These elements found in Brazil nuts present anti-inflammatory and anti-adiposity proprieties and protective effect to oxidative stress (Kume *et al.*, 2021; Maranhão *et al.*, 2011). Thus, Brazil nuts consumption have been related at positive effects on cardiovascular and metabolic state, in special those related with obesity, such as metabolic syndrome (MS) (Silva *et al.*, 2020).

Brazil nuts intake improved the lipid profile and microvascular function in obese adolescents without modifies body mass index (BMI) (Maranhão *et al.*, 2011). In hypertensive and dyslipidemic individuals, ingestion of Brazil nuts partially defatted reduced oxidative stress, oxidized-LDL-c and blood pressure, and increased antioxidant status (Huguenin *et al.*, 2015). Cominetti *et al.* (2011) showed that the consumption of one unit of Brazil nuts daily to morbidly obese women is able in improve anti-oxidative response (Cominetti *et al.* 2011). The consumption of Brazil and cashew nuts to an energy-restricted diet improved body composition, selenium status, and endothelial inflammation in cardiometabolic risk women (Caldas *et al.* 2022). Brazil nut intake modulated circulating miRNAs in obese women, without affect parameters related to body composition, lipid profile, and glucose homeostasis (Reis *et al.* 2019). However, not all studies have showed positive effects of Brazil nuts consumption on obesity state (Costa *et al.* 2021) and, important points, such as quantity, frequency and time of consume need be established priori to recommend this element as a nutritional benefit.

In this sense, a systematic review and meta-analysis showed that nuts consumption increased daily energy intake in overweight and obese individuals but not in individuals with normal weight (Akhlaghi *et al.* 2020), suggesting that the effect of nuts on satiety on obesity condition is reduced in relation to lean. Obese subjects showed altered glucose and lipid homeostasis besides chronic pro-inflammatory state and imbalance in several hormones and minerals, including insulin and selenium (Maranhão *et al.*, 2011). Moreover, fat mass distribution and its consequence in health are strong influenced by sex (Palmer and Clegg, 2015; Song

*et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2018). In this sense, most studies evaluating Brazil nuts consumption have been developed in humans (Costa *et al.* 2021; Silva *et al.*, 2020; Reis *et al.*, 2019; Huguenin *et al.*, 2015; Cominetti *et al.* 2011; Maranhão *et al.*, 2011), in special woman (Reis *et al.*, 2019; Cominetti *et al.* 2011; Maranhão *et al.*, 2011) and not has explored white adipose tissue (WAT) responses, the primary cause of obesity.

Obesity is defined as excessive WAT accumulation which is characterized by evident changes in adipocyte morphology and function. In this sense, to accommodate excessive endogen calories is necessary WAT expansion, a phenomenon driven by adipogenesis (hyperplasia) and growth of adipocytes size (hypertrophy). WAT visceral depot accumulation associated with major degree of adipocytes hypertrophy are events linked at worsen metabolic and cardiovascular conditions (Ferrante, 2007). In this, sex influences WAT distribution, having female preferential WAT deposition on subcutaneous sites, while in male WAT is concentrated at visceral region (von Eyben *et al.*, 2003; Macotela *et al.*, 2009). In consequence, male more frequently develop dyslipidemia, cardiovascular disfunctions and diabetes (Palmer and Clegg, 2015; Chang *et al.*, 2018).

Sex – related changes in triglycerides storage in liver and muscle cells, as well as, changes in fat utilization during exercise have been observed by several studies as recently detached by (Devries and Jakobi, 2021). In rodents, males showed more predisposition to develop early changes in glucose metabolism (Kuhl *et al.*, 2005; Sarafian *et al.* 2016). Moreover, male offspring responds to the maternal obesity more than the female offspring (Ornellas *et al.*, 2013). In male *Wistar* rats supplemented with the Brazil nuts was observed reduction in body gain and body fat mass, together with lower serum glucose levels. Interesting, male *Wistar* rats daily consuming Brazil nuts (natura and flour) at different doses presented rises in mass of retroperitoneal WAT but reduced lipid content (Kume *et al.* 2021), suggesting changes in WAT composition and function. These authors also noted difference of response in Brazil nut nature and flour, in special to liver. Moreover, Brazil nuts concentration and time can be important to benefits effects this nutrient (Cardoso *et al.*, 2017). Taken together, these finding indicates the importance of conveying sex-dependent differences in response to nutrition interventions.

Of our knowledge no study has explored the impact of chronic Brazil nuts oil supplementation in WAT morphology. Thus, at present work we evaluated the

influences of sex on WAT mass and adipocytes sizes in hypothalamic obese and non-obese (lean) rats.

## **Experimental Methods**

### **Ethical Aspects**

In the present study were used *Wistar* male and female rats, neonatally treated with monosodium-L-glutamate (MSG) and received at long of life supplementation with Brazil-nuts oil. From weaning at 90 days of life the animals were maintained at controlled luminosity (7:00 – 19:00 dark-light cycle) and temperature ( $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), allocated at 3 – 4 rats by cages and receiving chow rodents (BIOBASE, Brazil) and water *ad libitum*. The project was previously approved by Ethics Committee on Animals Use (CEUA/November, 13/2020) of the Western Parana State University (UNIOESTE). All procedures respected the guidelines of the National Council for Control of Animal Experiments (CONCEA) and The Arrive Guidelines.

### **Hypothalamic obese and non-obese animals**

Ten pregnant rats were acquired from Central and Creation Vivarium of Unioeste and transferred to rodent facility at Endocrine Physiology and Metabolism Laboratory being maintained at individual cages and receiving rodent chow and water *ad libitum*. At birth, the size of offspring was adjusted 6 – 8 pups by dams [3 - 4 females (♀); 3 – 4 males (♂)]. Hypothalamic lesions were induced by subcutaneous administration of MSG (4g//Kg) applied from 2<sup>nd</sup> to 6<sup>th</sup> pos-natal days as protocol of Olney (1969) with adapted from previous studies with *Wistar* rats (Lubaczeuski et al., 2015). Non-obese or Control (CTL) rats received in same time saline equimolar solution. MSG (n=10 ♀ and 10 ♂) and CTL (n=10 ♀ and 10 ♂) were weaned at 21 days of life and randomly distributed at subgroups according supplementation scheme presented below.

### **Brazil-nut Oil Supplementation**

From 30 to 90 days of life supplemented groups received via oral, a dose of 1 mL/Kg of Brazil-nuts oil (Bno) adapted from the study by Vieira (2011) and administered

three times/week. Non-supplemented groups (Ns) received in same time, via and volume saline solution (NaCl, 0.9%). Thus, considering sex, obese and supplementation were originated 8 experimental groups (n= 5 rats/group): CTL♀Ns; CTL♀Bno; CTL♂Ns; CTL♂Bno; MSG♀Ns; MSG♀Bno; MSG♂Ns; MSG♂Bno. All groups were housed in groups of 3 – 4 rats per cage with free access to chow rodents and water and were maintained at controlled luminosity and temperature according describe above.

### **Euthanasia and Adiposity Evaluation**

At 92 days of life the body weight gain (BW gain) was calculated and naso-anal length (NAL; cm) registered to Lee Index (LI) calculus (Bernardis and Patterson, 1968), according formulae  $LI = \sqrt[3]{BW(g)/NAL (cm)}$ . In next, the rats were decapitated after brief CO<sub>2</sub> desensitization. The WAT inguinal (WAT-I) and perirenal (WAT-P) depots were excised, weighted and transferred to fixation histological solution (Alfac: alcohol 70%; formalin 37-40% and glacial acetic acid).

### **White Adipose Tissue Histology**

The WAT from inguinal and perirenal depots were submitted to dehydration process in growing alcohol solution, after were diaphanized by xylol and embedded in paraffin (ACS Científica, Brazil). The tissue samples were cut (7µM) at microtome (OLYMPUS CUT4055) and at least 1 cut by exemplar were transferred to slides and stained by hematoxylin and eosin (H&E) technique. The slides were photographed in Olympus BX60 microscope with Olympus DP71 camera attached. 5 photomicrographs were performed per cut at 40X magnification. The ImageJ software (Version 1.53a, USA) was used to characterize the area and size frequency of adipocytes.

### **Statistical Analysis**

Data were showed as mean ± standard error mean (SEM). Normality and homoscedasticity were tested by Shapiro-wilk test. Factor (F) influences to MSG Treatment (M), Bno supplementation (Bno) and Interaction (I) were calculated by

Anova two-way followed by Tukey post-hoc ( $p < 0.05$ ). These analyses were separately done in male and female obese and non-obese rats.

## Results

**Effects of Bno supplementation in body weight gain, growth and Lee index in female and male rats obese and non-obese:** The MSG-treatment was effective and modify BW gain (male:  $F = 37.65$ ;  $p < 0.0001$  and female:  $F = 38.10$ ;  $p < 0.0001$ ), NAL (male:  $F = 113.3$ ;  $p < 0.0001$  and female:  $F = 36.21$ ;  $p < 0.0001$ ) and LI (male:  $F = 76.24$ ;  $p < 0.0001$  and female:  $F = 15.56$ ;  $p = 0.0012$ ) as showed in Table I and II respectively. Thus,  $MSG_{NS\text{♂}}$  and  $\text{♀}$  rats showed reduced BW gain (male:  $p = 0.0005$  and female:  $p = 0.0007$ ); NAL (male:  $p < 0.0001$  and female:  $p = 0.0004$ ) and higher LI (male:  $p < 0.0001$  and female:  $p = 0.0107$ ) value in relation to respective  $CTL_{NS\text{♂}}$  and  $\text{♀}$  groups. In none these variables were observed significant effects on Bno supplementation or interaction effects (Table I and II).

**Responses to MSG-treatment and Bno supplementation in subcutaneous and visceral WAT depots in male rats:** The WAT-I and WAT-P content, adipocytes size and histology analysis in male obese and non-obese rats the are showed Figure 1 (a-l). MSG-treatment influenced WAT weight (WAT-I:  $F = 41.38$ ;  $p < 0.0001$  and WAT-P:  $F = 14.24$ ;  $p = 0.0017$ ) and adipocyte size (WAT-I:  $F = 65.29$ ;  $p < 0.0001$  and WAT-P:  $F = 6.278$ ;  $p = 0.0234$ ). Thus,  $MSG_{NS\text{♂}}$  rats showed higher WAT-I (Fig. 1a;  $p = 0.0027$ ) and WAT-P (Fig. 1g;  $p = 0.0097$ ) weight accompanied by adipocyte hypertrophy (Fig. 1b;  $p = 0.0002$  and Fig. 1h;  $p = 0.0213$ ) in relation to same parameters in the  $CTL_{NS\text{♂}}$  groups. Adipocyte hypertrophy found in MSG-treated male rats can be observed in representative photomicrographs of WAT-I (Fig. 1c *versus* Fig. 1e) and WAT-P (Fig. 1l *versus* 1k). In WAT-I depot from male rats no were noted significant influences of Bno supplementation or interaction effects neither weight nor to size of adipocytes. However, interaction ( $F = 4.647$ ;  $p = 0.0467$ ) influenced adipocyte size in WAT-P depot from male rats. Thus,  $MSG_{Bno}$  male animals presented reduction in adipocyte size in relation to  $MSG_{NS}$  group ( $p = 0.0425$ ; Fig. 1h). This effect can be noted in histological data showed in Fig. 1l *versus* Fig. 1k.

**Responses to MSG-treatment and Bno supplementation in subcutaneous and visceral WAT depots in female rats:**

The WAT-I and WAT-P content, adipocytes size and histology analysis in female rats are showed in the Fig. 2 (a – l). MSG-treatment effect was observed in WAT weight (WAT-I:  $F=14.24$ ;  $p=0.0017$  and WAT-P:  $F=14.23$ ;  $p=0.0017$ ) and adipocyte size (WAT-I:  $F=160.8$ ;  $p<0.0001$  and WAT-P:  $F=44.41$ ;  $p<0.0001$ ). Thus,  $MSG_{NS}\text{♀}$  rats showed higher WAT-I ( $p:0.0358$ ; Fig. 2a) weight accompanied by adipocyte hypertrophy (Fig. 2b;  $p<0.0001$ ) in relation to respective depots in  $CTL_{NS}\text{♀}$  animals. In WAT-P was noted single hypertrophy (Fig. 2h;  $p<0.0001$ ) compared to same depot in  $CTL_{NS}\text{♀}$  animals. Adipocyte hypertrophy found in MSG-treated female can be observed in representative photomicrographs (WAT-I: Fig. 2e *versus* 2c; WAT-P: Fig.2i *versus* 2k).

Interaction effects were noted in size of adipocytes of WAT-I ( $F=6.259$ ;  $p=0.0236$ ) and WAT-P ( $F=33.40$ ;  $p<0.0001$ ) from female groups. Moreover, Bno effects also were noted in adipocytes size of WAT-P depot ( $F=21.48$ ;  $p=0.0003$ ). Thus,  $MSG_{Bno}\text{♀}$  rats showed significant reduction in adipocyte size in relation to  $MSG_{NS}\text{♀}$  animals ( $p<0.0001$ ). The effect of Bno supplementation in adipocytes size in the WAT-P depot can be observed in representative photomicrography (Fig. 2k *versus* 2l).

**Influences of MSG-treatment and Bno supplementation on frequency of adipocytes distribution in visceral and subcutaneous WAT depots:**

The frequency of distribution of adipocytes (small, medium and larger) is showed in Table III and IV respectively, to male and female groups. In male groups we noted that MSG-treatment influenced adipocytes frequency in WAT-I depot (Small:  $F=17.71$ ;  $p=0.0007$ ; medium:  $F=100.4$ ;  $p<0.0001$ ; larger:  $F=129.8$ ;  $p<0.0001$ ). Thus,  $MSG_{NS}\text{♂}$  and  $MSG_{Bno}\text{♂}$  rats showed significant reduction in frequency of small and medium adipocytes in WAT-I depot in relation to  $CTL_{NS}\text{♂}$  and  $CTL_{Bno}\text{♂}$  animals. Moreover,  $MSG_{NS}\text{♂}$  and  $MSG_{Bno}\text{♂}$  groups showed high frequency of larger adipocytes in WAT-I depot in relation to  $CTL_{NS}\text{♂}$  and  $CTL_{Bno}\text{♂}$  (Table III). No was observed significant effect in adipocytes frequency to Bno supplementation in WAT-I depot from male rats. In WAT-P depot no were observed effects of MSG-treatment ( $F=0.02346$ ;  $p=0.8802$ ) or Bno supplementation ( $F=1.483$ ;  $p=0.2409$ ) in frequency of small adipocytes. However, MSG-treatment influences frequency of medium ( $F=21.13$ ;  $p=0.0003$ ) and larger ( $F=5.942$ ;  $p=0.0268$ ) adipocytes in WAT-P depot.



Thus, MSGNS♂ rats presented lesser frequency of medium adipocytes ( $p=0.0299$ ) in comparison with CTLNS♂ animals and high ( $p=0.0396$ ) frequency of larger adipocytes depot in comparison with CTLBno♂ animals in WAT-P. These effects disappeared in MSGBno♂ group.

In female group the MSG-treatment influenced frequency of adipocytes distribution in WAT-I depot (Small:  $F=5.961$ ;  $p=0.0266$ ; medium:  $F=15.21$ ;  $p=0.0013$ ; larger:  $F=376.4$ ;  $p<0.0001$ ). Thus, were noted reduction on frequency of small ( $p=0.0156$ ) adipocytes in WAT-I depot from MSGNS♀ group in comparison to same depot in CTLNS♀ animals. In contrast, larger adipocytes were noted in WAT-I of MSGNS♀ groups in relation to CTLNS♀ rats ( $p<0.0001$ , Table IV). Bno- supplementation and interaction effects were observed in small adipocytes frequency (Bno:  $F=5.961$ ;  $p=0.0266$  and I:  $F=5.961$ ;  $p=0.0266$ ) in WAT-I depot from female groups. Thus, CTLBno♀ and MSGBno♀ groups had reduced frequency of small adipocytes in WAT-I depot in relation to respective NS female rats. Moreover, CTLBno♀ animals showed a significant rise in the frequency of medium adipocytes in comparison to other groups.

The frequency of small adipocytes in WAT-P depot of female group no was affect by MSG-treatment ( $F=2.918$ ;  $p=0.1069$ ), but showed interaction effect ( $F=4.663$ ;  $p=0.0463$ ). Thus, the frequency of small adipocytes was higher in WAT-P from MSGNS♀ rats in relation to CTLNS♀ animals. This effect disappeared in MSGBno♀ rats. In female groups, the frequency of medium adipocytes in WAT-P depot was affected by M ( $F=22.71$ ;  $p=0.0002$ ); Bno supplementation ( $F=22.25$ ;  $p=0.0002$ ) and interaction ( $F=8.942$ ;  $p=0.0087$ ). Similarly, the frequency of larger adipocytes in WAT-P depot was influenced by M ( $F=27.45$ ;  $p<0.0001$ ); Bno supplementation ( $F=12.13$ ;  $p=0.0031$ ) and interaction ( $F=19.73$ ;  $p=0.0004$ ). Thus, MSGNS♀ group showed reduced frequency ( $p=0.0003$ ) of medium adipocytes in comparison with CTLNS♀ rats; an effect that disappeared in WAT-P depot of MSGBno♀ animals. Similarly, MSGNS♀ rats presented high frequency ( $p<0.0001$ ) of larger adipocytes in WAT-P depot in relation to CTLNS♀ rats; an effect absent in adipocytes of MSGBno♀ animals (Table IV).

## Discussion

In the present study we confirmed the MSG efficacy to induced obesity, as previously demonstrated by us (Grassioli *et al.*, 2010; Sagae *et al.*, 2011; Guareschi *et al.*, 2019) and others (Olney,1969; Martins *et al.*, 2004). Moreover, MSG-treated male and female rats showed smaller growth and BW gain in relation to respective non-obese groups. As shown by Liang *et al.* (2021), Its well recognized that hypothalamic lesion induced by MSG-neonatal treatment damage arcuated nucleus (Arc) leading to reduction in growth hormone releasing hormone (GHRH) production and consequent absence of growth hormone (GH) circulating levels.

Obesity elevates WAT content resulting in pro-inflammatory state and metabolism dysfunctions with higher incidence of chronic diseases, such as diabetes and cardiovascular dysfunctions (Ferrante, 2007; Heredia *et al.*, 2012). Natural products have been used as nutritional strategy to address obesity and its associated comorbidities (Maranhão *et al.*, 2011; Sanches *et al.* 2016; Silva *et al.*, 2020). In this sense, the Bno is a product with elevated presence of mono and poli-unsaturated fatty acids (MUFA and PUFA, respectively) besides elevated presence of minerals as selenium, magnesium and vitamins as E and C (Chunhieng *et al.*, 2008; Ros, 2009). Several studies have demonstrated that Brazil nut consumption as oil or in nature improve glucose and lipids metabolism, reduce adiposity and mitigated pro-inflammatory state (Maranhão *et al.*, 2011; Reis *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2019, Nascimento *et al.*, 2020; Kume *et al.*, 2021). However, there is not study evaluating the effect of Bno in WAT mass and histology composition, as pointed in this present work.

Thus, for the first time we demonstrated that chronic Bno supplementation reduced adipocyte hypertrophy in MSG-treated rats, in special to visceral WAT depot; an effect observed in male and female obese rats. Hypertrophy of adipocytes in visceral WAT depot have been indicated as primary causes of metabolic diseases in obese state (Verboven *et al.*, 2018). High pro-inflammatory cytokines and elevated lipolytic flux at visceral WAT depots are factors directly linked to worsen metabolic state in obese subjects (Ferrante, 2007). Corroborating with our data, recently study with Bno flour supplementation to rats, demonstrated that lipid content was reduced in retroperitoneal and epididymal adipose tissues (Kume *et al.*, 2021). Bno supplementation to individual with metabolic syndrome for 30 days decreased lipid peroxidation, contributing to oxidative stress reduction (Silva *et al.*, 2020).

WAT mass distribution and function are modulated by sex in human and rodents (Ornellas *et al.*, 2013; Palmer and Clegg, 2015). In this regard, female frequently show high subcutaneous WAT content while male have higher visceral WAT. Moreover, dyslipidemia and glucose intolerance appear more frequent in male obese in relation to female obese (Palmer and Clegg, 2015; Chang *et al.*, 2018). Thus, male obese present high risk of diabetes and cardiac dysfunction in relation to female (Song *et al.*, 2014). Herein, we noted that Bno supplementation presented more accentuated effect in adipocytes from visceral WAT of MSG-obese females in relation to MSG-obese male rats. Moreover, in MSG-obese female we observed reduction in adipocytes hypertrophy also in subcutaneous WAT depot; an effect not found in MSG-obese male animals. Reis *et al.* (2019) demonstrated that Brazil nuts ingestion (1 seed/day) was sufficiently to elevate circulating miR-375 a biomarker of pancreatic  $\beta$ -cell that regulates insulin secretion in obese woman with metabolic syndrome. Brazil nuts consumption is also related to improve in insulin responsiveness (Reis *et al.* 2019). Consumption of one Brazil nut was effective in increasing the selenium status and the glutathione peroxidase activity in obese women regardless of the polymorphism-related genotype Pro198Leu (Cominetti *et al.*, 2011). Thus, it's probable that Bno supplementation had exert more benefit to insulin action in obese female. Important, insulin is a principal lipogenic hormone (Blair *et al.*, 1993).

In present work we also explored as Bno chronic supplementation can modifies the profile of distribution of adipocytes in visceral and subcutaneous WAT. In this sense, Bno chronic supplementation, in particular in visceral WAT depot from MSG-obese female group we noted an augmented presence of small and medium adipocytes and parallel reduction in larger adipocytes, approximating this group the adipocytes frequency found in non-obese state. As aforementioned selenium and MUFA and PUFA are principal elements in Bno (Chunhieng *et al.*, 2008; Ros, 2009). Zhong *et al.* (2018) showed that serum levels of selenium in woman and men were inversely associated with increased body mass index (BMI). Selenium can influence WAT adipogenesis (Tinkoy *et al.*, 2020). Sodium selenate in the supraphysiological dose of 0.72 mg/kg/day (8 weeks) significantly reduced adiposity in HFD-fed mice through down-regulation of PPAR $\gamma$  as well as improved of insulin sensitivity (Kim *et al.*, 2015). It therefore appears that diets providing PUFA improve insulin action in

adipocytes by enhancing glucose transport and inhibiting lipolysis (Ghafoorunissa *et al.*, 2005).

Subcutaneous and visceral WAT depot show significant different metabolism and organization (Hwang and Kim, 2019) presenting several responsiveness to lipogenic and lipolytic hormones. Insulin is important adipogenic hormone, thus it is possible that Bno supplementation improved insulin sensitivity at visceral WAT depot favoring adipogenesis to small and medium adipocytes and reducing larger adipocytes at this site. Moreover, Bno, like other nuts, are rich in lipids which are able to stimulate incretins, such as GLP-1 (Pasman *et al.* 2008), this incretin improved insulin sensitivity at WAT.

The MSG-obese female has hypogonadism and reduced levels of sexual hormones, estrogen and progesterone (Elefteriou *et al.*, 2003). However, the greater impact of Bno supplementation on adipocytes frequency was noted in this group, indicating sex-dependent response. Fatima *et al.*, (2019) demonstrated that estradiol is able to stimulate adipogenesis and improved glycemic control. Further studies are necessary to evaluate if Bno supplementation would modulate estrogen receptor in visceral WAT.

These data indicate that Bno chronic supplementation is able to reduce visceral WAT hypertrophy in MSG-obese male and female rats having more pronounced effects in female. These findings are important to clarify specific effects of Bno on adiposity and establish sexual dimorphism influences in its actions.

## References

Akhlaghi, M., Ghobadi, S., Zare, M. and Foshati, S. (2020), "Effect of nuts on energy intake, hunger, and fullness, a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 60, pp. 84–93. doi: 10.1080/10408398.2018.1514486

Bernardis, L.L. and Patterson, B. D. (1968), "Correlation between "Lee index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions". *Journal of Endocrinology*, Vol. 40 No. 4, pp. 527-528. doi: 10.1677/joe.0.0400527.

Blair, S.C., Caterson, I.D., Cooney, G.J. (1993), "Insulin Response to an Intravenous Glucose Load During Development of Obesity in Gold Thioglucose-Injected mice". *Diabetes*, Vol.42 No.8, pp. 1153–1158. Doi:10.2337/diab.42.8.1153

Caldas, A.P.S., Rocha, D.M.U.P., Dionísio, A.P., Hermsdorff, H.H.M., and Bressan J. (2022), "Brazil and cashew nuts intake improve body composition and endothelial health in women at cardiometabolic risk (Brazilian Nuts Study): a randomized controlled trial". *British Journal of Nutrition*, Vol. 23. pp.1-38. doi: 10.1017/S000711452100475X.

Cardoso, B.R., Duarte, G.B S., Reis, B.Z. and Cozzolino, S.M.F. (2017), "Brazil nuts: Nutritional composition, health benefits and safety aspects". *Food Research International*, Vol. 100 No. 2, pp. 9-18. doi: 10.1016/j.foodres.2017.08.036

Chang, E., Varghese, M. and Singer, K. (2018), "Gender and Sex Differences in Adipose Tissue". *Current Diabetes Reports*, Vol. 18, No. 9, pp. 1-17. doi: 10.1007/s11892-018-1031-3.

Chunhieng, T., Hafidi, A., Pioch, D., Brochier, J. and Didier, M. (2008), "Detailed study of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) oil micro-compounds: phospholipids, tocopherols and sterols". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Vol. 19, No. 7, pp. 1374-1380. doi: 10.1590/S0103-50532008000700021

Cominetti, C., de Bortoli, M.C., Purgatto, E., Ong, T.P., Moreno, F.S., Garrido, A.B., and Cozzolino, S.M.F. (2011), "Associations between glutathione peroxidase-1 Pro198Leu polymorphism, selenium status, and DNA damage levels in obese women after consumption of Brazil nuts" *Nutrition*, Vol. 27 No. 9, pp. 891–896. Doi: 10.1016/j.nut.2010.09.003

Costa, M.A.C., Hermsdorff, H.H.M., Caldas, A.P.S., Rocha, D.M.U.P., da Silva, A., de Oliveira, L.L. and Bressan, J. (2021), "Acute consumption of a shake containing cashew and Brazil nuts did not affect appetite in overweight subjects: a randomized, cross-over study". *European Journal of Nutrition*. Vol.60 No. 8, pp.4321-4330. doi: 10.1007/s00394-021-02560-w.

Devries, M.C. and Jakobi, J.M. (2021), "Importance of considering sex and gender in exercise and nutrition research". *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. Vol. 46, No.6 pp. iii-vii. doi: 10.1139/apnm-2021-0298

Elefteriou, F., Takeda, S., Liu, X., Armstrong, D. and Karsenty, G. (2003), "Monosodium glutamate-sensitive hypothalamic neurons contribute to the control of bone mass". *Endocrinology*. Vol.144 No.9, pp.:3842-3847.

Fatima, L.A., Campello, R.S., Barreto-Andrade, J.N., Passarelli, M., Santos, R.S., Clegg, D.J. and Machado, U.F. (2019), "Estradiol stimulates adipogenesis and Slc2a4/GLUT4 expression via ESR1-mediated activation of CEBPA" *Mol Cell Endocrinol*. Vol. 498 No. 110447, pp.1-10 doi: 10.1016/j.mce.2019.05.006.

Ferrante, A. W. (2007), "Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation". *Journal Of Internal Medicine*, Vol. 262 No. 4, pp. 408-414, doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01852.x.

Ghafoorunissa, Ibrahim, A. and Natarajan, S. (2005), "Substituting dietary linoleic acid with  $\alpha$ -linolenic acid improves insulin sensitivity in sucrose fed rats", *Biochimica*

*et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, Vol. 1733 No. 1, pp. 67-75. doi: 10.1016/j.bbali.2004.12.003.

Grassioli, S., Scomparin, D.X., Torrezan, R., Balbo, S.L., Gravena, C., de Oliveira, J.C., and Mathias, P.C.F. (2010), "Glycemic control is adjusted by increased insulin secretion during growth of lean and MSG-obese rats". *MEFRED (Metabolic and Functional Research on Diabetes)*, Vol.3, pp. 32–39.

Guareschi, Z.M., Valcanaia, A., Ceglarek, V., Hotz, P., Amaral, B., de Souza, D. W., de Souza, T. A., Nardelli, T., Ferreira, T. R., Leite, N. C., Lubackzeuski, C., de O. Emilio, H. R. and Grassioli, S. (2019), "The effect of chronic oral vitamin D supplementation on adiposity and insulin secretion in hypothalamic obese rats". *British Journal Of Nutrition*, Vol. 121 No. 12, pp. 1334-1344. doi: 10.1017/s0007114519000667.

Heredia, F. P., Gómez-Martínez, S. and Marcos, A. (2012), "Obesity, inflammation and the immune system". *Proceedings Of The Nutrition Society*, Vol. 71 No. 2, pp. 332-338. doi: 10.1017/s0029665112000092

Huguenin G.V., Oliveira G.M., Moreira A.S., Saint’Pierre T.D., Gonçalves R.A., Pinheiro-Mulder A.R., Teodoro A.J., Luiz R.R. and Rosa G. (2015), "Improvement of Antioxidant Status after Brazil Nut Intake in Hypertensive and Dyslipidemic Subjects" *Nutrition Journal*. Vol.14 No 54. doi: 10.1186/s12937-015-0043-y.

Hwang, I., and Kim, J.B., (2019), "Two Faces of White Adipose Tissue with Heterogeneous Adipogenic Progenitors". *Diabetes Metab J*. Vol.43 No.6, pp.752-762. doi: 10.4093/dmj.2019.0174.

Kim, C.Y., Zhu, Y., Buhman, K.K. and Kim, K.H. (2015), "Dietary selenate attenuates adiposity and improves insulin sensitivity in high-fat diet-induced obese mice". *Journal of Functional Foods*, Vol. 17, pp.33–42. doi: 10.1016/j.jff.2015.05.008

Kuhl, J., Hilding, A., Östenson, C.G., Grill, V., Efendic, S. and Båvenholm P. (2005), "Characterisation of subjects with early abnormalities of glucose tolerance in the Stockholm Diabetes Prevention Programme: the impact of sex and type 2 diabetes heredity". *Diabetologia*, Vol.48, pp. 35–40. doi:10.1007/s00125-004-1614-1

Kume, W.T., Porto, E.P. J., Spada, E.C.L., Lisboa, D.R., Stachack, F.F.F., Terezo, A.J., Hernandez, T., Takeuchi, K.P., Elias, M.P.S., Gai, B.M., Kawashita, N.H. and Lemes, S.A.F. (2021), "Acute supplementation of growing rats with Brazil nut flour increases hepatic lipid content but prevents oxidative damage in the liver". *Journal of Food Biochemistry*. Vol. 45 No. 8. doi: 10.1111/jfbc.13834.

Liang, J., Jia, Y., Yan, H., Shen, Q., Bian, W., Zhao, D., Xu, Y., Jin, Y. and Yang, M. (2021), "Prdm16-Mediated Browning is Involved in Resistance to Diet-Induced and Monosodium Glutamate-Induced Obesity". *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, Vol.14, pp. 4351-4360. doi: 10.2147/DMSO.S335526.

Lubaczeuski, C., Balbo, S.L., Ribeiro, R.A., Vettorazzi, J.F., Santos-Silva, J.C., Carneiro, E.M. and Bonfleur, M.L. (2015), "Vagotomy ameliorates islet

morphofunction and body metabolic homeostasis in MSG-obese rats". *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*, Vol. 48 No. 5, pp. 447-457. Doi: 10.1590/1414-431x20144340.

Macotela, Y., Boucher, J., Tran, T.T. and Kahn, C.R. (2009), "Sex and depot differences in adipocyte insulin sensitivity and glucose metabolism". *Diabetes*. Vol. 58 No. 4, pp.:803-812. doi: 10.2337/db08-1054.

Maranhão, P.A., Kraemer-Aguiar, L.G., de Oliveira, C.L., Kuschnir, M.C.C. Vieira, Y.R. Souza, M.G.C., Koury, J.C. and Bouskela E. (2011), "Brazil nuts intake improves lipid profile, oxidative stress and microvascular function in obese adolescents: a randomized controlled trial" *Nutrition & Metabolism*, Vol. 8 No. 32, pp 1-8. doi: 10.1186/1743-7075-8-32

Martins, A. C. P., Souza, K.L., Shio, M.T., Mathias, P.C., Lelkes, P.I. and Garcia, R.M. (2004), "Adrenal medullary function and expression of catecholamine-synthesizing enzymes in mice with hypothalamic obesity". *Life Sciences*, Vol. 74 No. 26, pp. 3211-3222. doi: 10.1016/j.lfs.2003.10.034.

Nascimento, L.P.S., Pires, V.C., Ribeiro, D.A., Gollücke, A.P.B., Yamamura, H. and Junior, O.A. (2020), "Benefits of the consumption of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) extract in male reproductive parameters of streptozotocin-induced diabetic rats". *J Diabetes Metab Disord*, Vol. 19, pp.187–196. doi: 10.1007/s40200-020-00490-8

Olney, J.W. (1969), "Brain Lesions, Obesity, and Other Disturbances in Mice Treated with Monosodium Glutamate". *Science*, Vol. 164 No. 3880, pp. 719-721 doi: 10.1126/science.164.3880.719.

Ornellas, F., Mello, V.S., Mandarim-de-Lacerda, C.A. and Aguila, M.B. (2013), "Sexual dimorphism in fat distribution and metabolic profile in mice offspring from diet-induced obese mothers". *Life Sciences*, Vol. 93 No.12-14, pp.454-463. doi: 10.1016/j.lfs.2013.08.005.

Palmer, B. and F.; Clegg, D. J. (2015), "The sexual dimorphism of obesity". *Molecular And Cellular Endocrinology*, vol. 402, pp. 113-119. doi: 10.1016/j.mce.2014.11.029.

Pasman, W.J., Heimerikx, J., Rubingh, C.M., van den Berg, R., O'Shea, M., Gambelli, L., Hendriks, H.F., Einerhand, A.W., Scott, C., Keizer, H.G. and Mennen, L.I. (2008), "The effect of Korean pine nut oil on in vitro CCK release, on appetite sensations and on gut hormones in post-menopausal overweight women". *Lipids Health Dis*, Vol. 7 No.10. doi:10.1186/1476-511X-7-10

Reis, B.Z., Duarte, G.B.S., Vargas-Mendez, E., Ferreira, L.R.P., Barbosa, F. Jr., Cercato, C., Rogero, M.M. and Cozzolino, S.M.F. (2019), "Brazil nut intake increases circulating miR-454-3p and miR-584-5p in obese women". *Nutrition Research*, Vol. 67, pp.40-52. doi: 10.1016/j.nutres.2019.05.004.

Ros, E. (2009), "Nuts and novel biomarkers of cardiovascular disease". *The American Journal Of Clinical Nutrition*, v. 89, n. 5, pp. 1649S-1656S. doi: 10.3945/ajcn.2009.26736r.

Sagae, S.C., Grassioli, S., Raineiki, C., Balbo, S.L. and Silva, A.C. M. (2011), "Sex differences in brain cholinergic activity in MSG-obese rats submitted to exercise". *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, Vol. 89, No. 11, pp. 845-853. doi: 10.1139/y11-082.

Sanches, J. R., França, L.M., Chagas, V.T, Gaspar, R.S., Dos Santos, K.A., Gonçalves, L.M., Sloboda, D.M., Holloway, A.C., Dutra, R.P., Carneiro, E.M., Cappelli, A.P. and Paes, A.M. (2016), "Polyphenol-Rich Extract of Syzygium cumini Leaf Dually Improves Peripheral Insulin Sensitivity and Pancreatic Islet Function in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Rats". *Frontiers In Pharmacology*, Vol. 7, pp. 1-16. doi: 10.3389/fphar.2016.00048.

Sarafian, D., Schutz, Y., Montani, J.P., Dulloo, A.G., and Miles-Chan, J.L. (2016), "Sex difference in substrate oxidation during low-intensity isometric exercise in young adults". *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. Vol.41 No. 9, pp.977-984. doi: 10.1139/apnm-2016-0127

Scomparin, D.X., Gomes, R.M., Grassioli, S. Rinaldi, W., Martins, A.G., Oliveira, J.C., Gravena, C. and Mathias, P.C.F. (2009), "Autonomic activity and glycemic homeostasis are maintained by precocious and low intensity training exercises in MSG-programmed obese mice". *Endocrine*, Vol. 36, pp. 510–517 (2009). doi: 10.1007/s12020-009-9263-2

Silva, L.M.C., Melo, M.L.P., Reis, F.V. F., Monteiro, M.C., dos Santos, S.M., Gomes, B.A Q. and Silva, L.H. M. (2020), "Comparison of the Effects of Brazil Nut Oil and Soybean Oil on the Cardiometabolic Parameters of Patients with Metabolic Syndrome: A Randomized Trial". *Nutrients*, Vol.12, p.46. doi: 10.3390/nu12010046

Song, X., Tabak, A.G., Zethelius, B., Yudkin, J.S., Soderberg, S., Laatikainen, T., Stehouwer, C.D., Dankner, R., Jousilahti, P., Onat, A., Nilsson, P.M., Satman, I., Vaccaro, O., Tuomilehto, J., Qiao, Q. (2014), "Obesity attenuates gender differences in cardiovascular mortality". *Cardiovascular Diabetology*, Vol.13 No. 144, pp. 1-10. doi: 10.1186/s12933-014-0144-5.

Souza, A. C., Gallo, C. B. M., Passos, M. C. F., Croccia, C., Miranda, G. L., Sampaio, F.J. B. and Gregório, B. M. (2018) "Effect of a high-fat diet on the rat bladder wall and bioactive action of Brazil nut oil". *International braz j urol*, Vol. 45 No. 1, pp. 161-168. doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2018.0547.

Tinkov, A.A., Ajsuvakova, O.P., Filippini, T., Zhou, J.C., Lei, X.G., Gatiatulina, E.R., Michalke, B., Skalnaya, M.G., Vinceti, M., Aschner, M. and Skalny, A.V. (2020), "Selenium and Selenoproteins in Adipose Tissue Physiology and Obesity". *Biomolecules*, Vol.10 No. 4 p. 658. doi: 10.3390/biom10040658.

Verboven, K., Wouters, K., Gaens, K., Hansen, D., Bijnen, M., Wetzels, S., Stehouwer, C. D., Goossens, G. H., Schalkwijk, C. G., Blaak, E. E. and Jocken, J. W. (2018), "Abdominal subcutaneous and visceral adipocyte size, lipolysis and inflammation relate to insulin resistance in male obese humans". *Scientific Reports*, Vol. 8 No. 1, pp. 1-8. doi: 10.1038/s41598-018-22962-x.



Vieira, A. P. B. M. (2011), "Effects of linseed oil and Brazil nuts oil on the clinical and laboratorial parameters in male and female rats with cafeteria diet-induced obesity". Dissertation (Master in Agricultural Sciences), Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 28 September.

von Eyben, F.E., Mouritsen, E., Holm, J., Montvilas, P., Dimcevski, G., Suciú, G., Helleberg, I., Kristensen, L. and von Eyben, R. (2003), "Intra-abdominal obesity and metabolic risk factors: a study of young adults". *International Journal of Obesity*, Vol. 27, No. 8, pp. 941-949. doi: 10.1038/sj.ijo.0802309.

Zhong, Q., Lin, R. and Nong, Q. (2018), "Adiposity and Serum Selenium in U.S. Adults". *Nutrients*, Vol.10 No. 6 pp. 1-11. doi: 10.3390/nu10060727

**Figure 1. Weight and Area of WAT-I and WAT-P in Bno supplemented non obese and obese male rats**

**1a.** WAT-I weight (g/100g body weight); **1b.** Adipocyte Size of WAT-I ( $\mu\text{m}^2$ ); **1c.** Photomicroscopy of CTL♂Ns; **1d.** Photomicroscopy of CTL♂Bno; **1e.** Photomicroscopy of MSG♂Ns; **1f.** Photomicroscopy of MSG♂Bno; **1g.** WAT-P weight (g/100g body weight); **1h.** Adipocyte Size of WAT-P ( $\mu\text{m}^2$ ); **1i.** Photomicroscopy of CTL♂Ns; **1j.** Photomicroscopy of CTL♂Bno; **1k.** Photomicroscopy of MSG♂Ns; **1l.** Photomicroscopy of MSG♂Bno; Data are mean $\pm$ SEM (n=5 rats/group). The p-value show F effects in Anova two-way analysis being I: interaction; M: MSG treatment and Bno: Bno supplementation. Letter above the bars indicates differences between groups at Tukey post-test (p<0.05) being <sup>a</sup>CTL♂Ns; <sup>b</sup>CTL♂Bno; <sup>c</sup>MSG♂Ns; <sup>d</sup>MSG♂Bno.

**Figure 2. Weight and Area of WAT-I and WAT-P in Bno supplemented non-obese and obese female rats**

**2a.** WAT-I weight (g/200g body weight); **2b.** Adipocyte Size of WAT-I ( $\mu\text{m}^2$ ); **2c.** Photomicroscopy of CTL♀Ns; **2d.** Photomicroscopy of CTL♀Bno; **2e.** Photomicroscopy of MSG♀Ns; **2f.** Photomicroscopy of MSG♀Bno; **2g.** WAT-P weight (g/200g body weight); **2h.** Adipocyte Size of WAT-P ( $\mu\text{m}^2$ ); **2i.** Photomicroscopy of CTL♀Ns; **2j.** Photomicroscopy of CTL♀Bno; **2k.** Photomicroscopy of MSG♀Ns; **2l.** Photomicroscopy of MSG♀Bno; Data are mean $\pm$ SEM (n=5 rats/group). The p-value show F effects in Anova two-way analysis being I: interaction; M: MSG treatment and Bno: Bno supplementation. Letter above the bars indicates differences between groups at Tukey post-test (p<0.05) being <sup>a</sup>CTL♀Ns; <sup>b</sup>CTL♀Bno; <sup>c</sup>MSG♀Ns; <sup>d</sup>MSG♀Bno.

**Table I – Body Weight gain and growth in Bno supplemented non-obese and obese male rats.**

Data are mean $\pm$ SEM (n=5 rats/group). The p-value column show F effects in Anova two-way analysis being I: interaction; M: MSG treatment and Bno: Bno supplementation. Letter above of number indicates differences between groups at Tukey post-test (p<0.05) being <sup>a</sup>CTL♂Ns; <sup>b</sup>CTL♂Bno; <sup>c</sup>MSG♂Ns; <sup>d</sup>MSG♂Bno. NAL: naso-anal length; LI: Lee Index.

**Table II – Body Weight gain and growth in Bno supplemented non-obese and obese female rats.**

Data are mean $\pm$ SEM (n=5 rats/group). The p-value column show F effects in Anova two-way analysis being I: interaction; M: MSG treatment and Bno: Bno supplementation. Letter above of number indicates differences between groups at Tukey post-test (p<0.05) being <sup>a</sup>CTL♀Ns; <sup>b</sup>CTL♀Bno; <sup>c</sup>MSG♀Ns; <sup>d</sup>MSG♀Bno. NAL: naso-anal length; LI: Lee Index.

**Table III – Percentage of adipocyte size Bno supplemented non-obese and obese male rats**

Data are mean $\pm$ SEM (n=5 rats/group). The p-value column show F effects in Anova two-way analysis being I: interaction; M: MSG treatment and Bno: Bno supplementation. Letter above of number indicates differences between groups at Tukey post-test (p<0.05) being <sup>a</sup>CTL♀Ns; <sup>b</sup>CTL♀Bno; <sup>c</sup>MSG♀Ns; <sup>d</sup>MSG♀Bno.

**Table IV – Percentage of adipocyte size Bno supplemented non-obese and obese female rats**

Data are mean±SEM (n=5 rats/group). The p-value column show F effects in Anova two-way analysis being I: interaction; M: MSG treatment and Bno: Bno supplementation. Letter above of number indicates differences between groups at Tukey post-test (p<0.05) being <sup>a</sup>CTL<sub>♀</sub>Ns; <sup>b</sup>CTL<sub>♀</sub>Bno; <sup>c</sup>MSG<sub>♀</sub>Ns; <sup>d</sup>MSG<sub>♀</sub>Bno.

**Figure 1.**

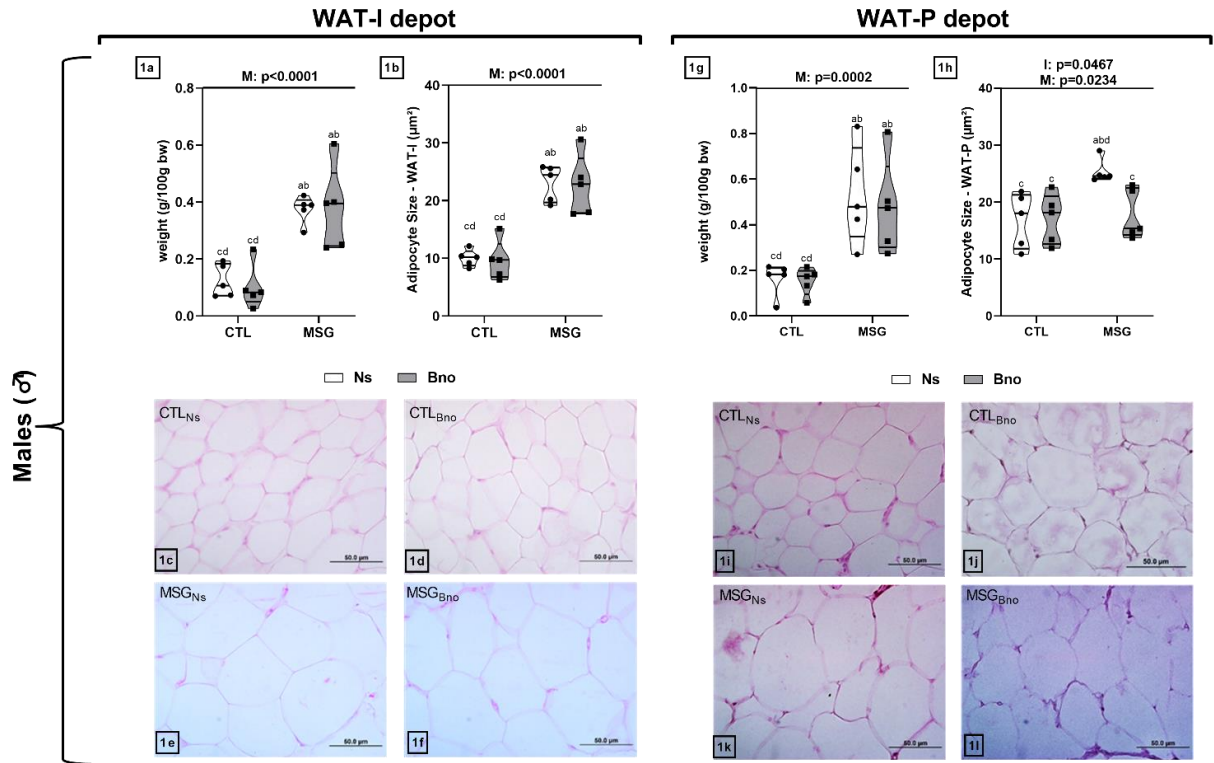


Figure 2.

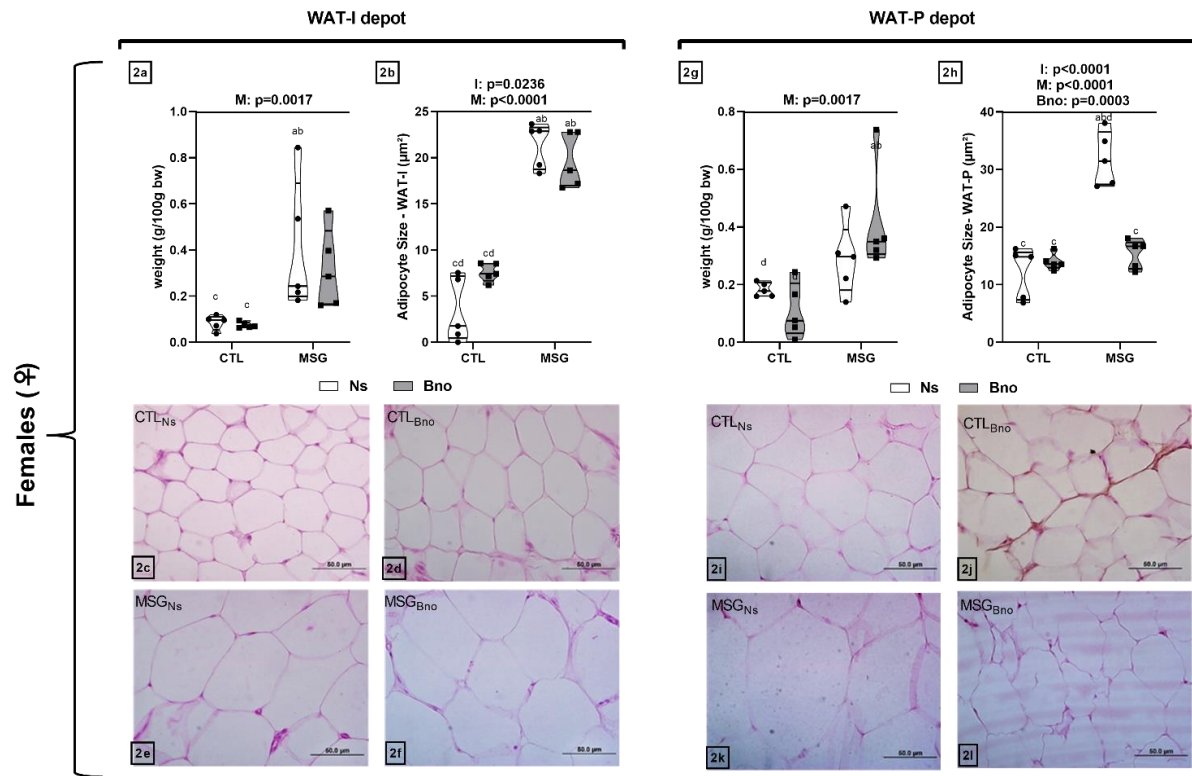


Table I – Body Weight gain and growth in Bno supplemented non-obese and obese male rats.

	Males (♂)				p-value		
	CTL <sub>Ns</sub>	CTL <sub>Bno</sub>	MSG <sub>Ns</sub>	MSG <sub>Bno</sub>	I	M	Bno
	<b>BW gain (g)</b>	250.0±8.96 <sup>cd</sup>	220.6±10.99 <sup>cd</sup>	180.2±9.82 <sup>ab</sup>	173.2±8.14 <sup>ab</sup>	0.2581	0.0001
<b>NAL (cm)</b>	22.4±0.12 <sup>cd</sup>	21.6±0.24 <sup>cd</sup>	18.6±0.24 <sup>ab</sup>	18.3±0.43 <sup>ab</sup>	0.4644	0.0001	0.1186
<b>LI (cm<sup>3</sup>)</b>	0.30±0.00 <sup>cd</sup>	0.31±0.00 <sup>c</sup>	0.34±0.00 <sup>ab</sup>	0.34±0.00 <sup>a</sup>	0.6342	0.0001	0.6342

Data are mean±SEM (n=5 rats/group). The p-value column show F effects in Anova two-way analysis being I: interaction; M: MSG treatment and Bno: Bno supplementation. Letter above of number indicates differences between groups at Tukey post-test (p<0.05) being <sup>a</sup>CTL♂<sub>Ns</sub>; <sup>b</sup>CTL♂<sub>Bno</sub>; <sup>c</sup>MSG♂<sub>Ns</sub>; <sup>d</sup>MSG♂<sub>Bno</sub>. NAL: naso-anal length; LI: Lee Index.

**Table II – Body Weight gain and growth in Bno supplemented non-obese and obese female rats.**

	Females (♀)						
	CTL <sub>NS</sub>	CTL <sub>Bno</sub>	MSG <sub>NS</sub>	MSG <sub>Bno</sub>	p-value		
					I	M	Bno
<b>BW gain (g)</b>	150.8±8.34 <sup>cd</sup>	141.6±5.55 <sup>cd</sup>	111.4±3.50 <sup>ab</sup>	112.0±3.51 <sup>ab</sup>	0.3936	0.0001	0.4529
<b>NAL (cm)</b>	19.5±0.50 <sup>cd</sup>	18.2±0.49 <sup>cd</sup>	16.6±0.29 <sup>ab</sup>	16.4±0.19 <sup>ab</sup>	0.1781	0.0001	0.0728
<b>LI (cm<sup>3</sup>)</b>	0.31±0.01 <sup>d</sup>	0.32±0.01	0.34±0.00	0.34±0.01 <sup>a</sup>	0.2474	0.0012	0.2474

Data are mean±SEM (n=5 rats/group). The p-value column show F effects in Anova two-way analysis being I: interaction; M: MSG treatment and Bno: Bno supplementation. Letter above of number indicates differences between groups at Tukey post-test (p<0.05) being <sup>a</sup>CTL<sub>♀NS</sub>; <sup>b</sup>CTL<sub>♀Bno</sub>; <sup>c</sup>MSG<sub>♀NS</sub>; <sup>d</sup>MSG<sub>♀Bno</sub>. NAL: naso-anal length; LI: Lee Index.

**Table III – Percentage of adipocyte size Bno supplemented non-obese and obese male rats**

	Males (♂)							
	CTL <sub>NS</sub>	CTL <sub>Bno</sub>	MSG <sub>NS</sub>	MSG <sub>Bno</sub>	p-value			
					I	M	Bno	
<b>(%) WAT-I</b>	<b>Small</b>	24.7±4.12	30.4±8.52 <sup>cd</sup>	5.8±0.76 <sup>b</sup>	8.7±1.59 <sup>b</sup>	0.7790	0.0007	0.3825
	<b>Medium</b>	62.4±1.71 <sup>cd</sup>	57.0±4.66 <sup>cd</sup>	25.3±1.80 <sup>ab</sup>	21.0±5.03 <sup>ab</sup>	0.8820	0.0001	0.2055
	<b>Large</b>	12.9±3.34 <sup>cd</sup>	12.6±7.39 <sup>cd</sup>	68.9±1.29 <sup>ab</sup>	70.2±5.82 <sup>ab</sup>	0.8709	0.0001	0.9228
<b>(%) WAT-P</b>	<b>Small</b>	23.9±6.51	19.6±6.38	12.2±1.70	29.7±5.50	0.0605	0.8802	0.2409
	<b>Medium</b>	52.2±1.45 <sup>c</sup>	58.4±3.70 <sup>cd</sup>	36.8±2.31 <sup>ab</sup>	41.9±5.22 <sup>b</sup>	0.8622	0.0003	0.1202
	<b>Large</b>	23.8±7.88	21.8±7.31 <sup>c</sup>	50.9±3.87 <sup>b</sup>	28.4±7.75	0.1558	0.0268	0.0942

Data are mean±SEM (n=5 rats/group). The p-value column show F effects in Anova two-way analysis being I: interaction; M: MSG treatment and Bno: Bno supplementation. Letter above of number indicates differences between groups at Tukey post-test (p<0.05) being <sup>a</sup>CTL<sub>♂NS</sub>; <sup>b</sup>CTL<sub>♂Bno</sub>; <sup>c</sup>MSG<sub>♂NS</sub>; <sup>d</sup>MSG<sub>♂Bno</sub>.

**Table IV – Percentage of adipocyte size Bno supplemented non-obese and obese female rats**

	Females (♀)							
	CTL <sub>NS</sub>	CTL <sub>Bno</sub>	MSG <sub>NS</sub>	MSG <sub>Bno</sub>	p-value			
					I	M	Bno	
<b>(%) WAT-I</b>	<b>Small</b>	55.4±22.5 <sup>bcd</sup>	0±0 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>	0.0266	0.0266	0.0266
	<b>Medium</b>	36.4±19.48 <sup>b</sup>	83.2±4.66 <sup>acd</sup>	20.4±2.32 <sup>b</sup>	20.0±2.22 <sup>b</sup>	0.0336	0.0013	0.0361
	<b>Large</b>	8.57±3.97 <sup>cd</sup>	16.8±4.66 <sup>cd</sup>	79.5±2.32 <sup>ab</sup>	79.9±2.22 <sup>ab</sup>	0.2711	0.0001	0.2310
<b>(%) WAT-P</b>	<b>Small</b>	27.7±10.51	16.3±2.43	6.4±1.67	18.8±1.29	0.0463	0.1069	0.9325
	<b>Medium</b>	52.2±3.51 <sup>c</sup>	58.7±4.34 <sup>cd</sup>	23.3±3.60 <sup>ab</sup>	52.1±3.36 <sup>b</sup>	0.0087	0.0002	0.0002
	<b>Large</b>	20.0±7.42	25.4±4.13 <sup>c</sup>	70.2±4.29 <sup>b</sup>	29.1±4.08	0.0004	0.0001	0.0031

Data are mean±SEM (n=5 rats/group). The p-value column show F effects in Anova two-way analysis being I: interaction; M: MSG treatment and Bno: Bno supplementation. Letter above of number indicates differences between groups at Tukey post-test (p<0.05) being <sup>a</sup>CTL<sub>♀NS</sub>; <sup>b</sup>CTL<sub>♀Bno</sub>; <sup>c</sup>MSG<sub>♀NS</sub>; <sup>d</sup>MSG<sub>♀Bno</sub>.

## **CONSIDERAÇÕES/CONCLUSÕES FINAIS**

Este estudo avaliou o impacto da suplementação com Bno sobre a histologia dos depósitos de TAB de ratos obesos e não obesos, avaliando também os efeitos Bno sobre as diferenças entre os sexos. Assim, esse estudo mostrou que a suplementação crônica com Bno é capaz de reduzir a hipertrofia TAB perirrenal em roedores machos e fêmeas obesos-MSG, tendo esses efeitos mais pronunciados na adiposidade das ratas. Sendo assim, esses resultados foram importantes para esclarecer efeitos específicos do Bno, sobretudo na adiposidade, além de estabelecer influências do dimorfismo sexual.

## REFERÊNCIAS GERAIS

- BAHADORAN, Z. *et al.* The association of dietary phytochemical index and cardiometabolic risk factors in adults: tehran lipid and glucose study. **Journal Of Human Nutrition And Dietetics**, [S.L.], v. 26, p. 145-153, 15 abr. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jhn.12048>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23581519/>. Acesso em: 05 jun. 2021.
- BAI, Y.; SUN, Q. Macrophage recruitment in obese adipose tissue. **Obesity Reviews**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 127-136, 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/obr.12242>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4304983/pdf/nihms-644514.pdf>. Acesso em: 13 out. 2020.
- BALLAK, D. B. *et al.* IL-1 family members in the pathogenesis and treatment of metabolic disease: focus on adipose tissue inflammation and insulin resistance. **Cytokine**, [S.L.], v. 75, n. 2, p. 280-290, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.005>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4553099/pdf/nihms706884.pdf>. Acesso em: 06 dez. 2020.
- BAUTISTA, R. J. H. *et al.* Obesity: pathophysiology, monosodium glutamate-induced model and anti-obesity medicinal plants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 111, p. 503-516, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.108>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332218372718?via%3Dihub>. Acesso em: 05 jun. 2021.
- BERNARDI, F.; CICHELERO, C.; VITOLO, M. R. Comportamento de restrição alimentar e obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 1, p. 85-93, 2005. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-52732005000100008&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732005000100008&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 28 abr. 2020.
- BERNARDIS, L.L.; PATTERSON, B. D. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamis lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527 – 528, abr. 1968. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4868415>. Acesso em: 10 abr. 2020.
- BJØRNDAL, B. *et al.* Different Adipose Depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. **Journal Of Obesity**, [S.L.], v. 2011, p. 1-15, 2011. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/490650>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/job/2011/490650/>. Acesso em: 10 dez. 2020.
- BOTELHO, A. P. *et al.* A suplementação com ácido linoleico conjugado reduziu a gordura corporal em ratos Wistar. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 561 – 565, 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rn/v18n4/25853.pdf>. Acesso em: 03 nov. 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Pesquisa nacional de saúde: 2019 - Atenção primária à saúde e informações antropométricas: Brasil / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento**. Rio de Janeiro: IBGE, 2020. Disponível em: <https://www.pns.icict.fiocruz.br/wp-content/uploads/2021/02/liv101758.pdf>. Acesso em: 6 dez. 2021

CARDOSO, B. R. *et al.* Brazil nuts: nutritional composition, health benefits and safety aspects. **Food Research International**, [S.L.], v. 100, p. 9-18, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.036>.

CHANG, E. *et al.* Gender and Sex Differences in Adipose Tissue. **Current Diabetes Reports**, [S.L.], v. 18, n. 9, p. 1-17, 30 jul. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11892-018-1031-3>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6525964/pdf/nihms-1028748.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2021.

CLEGG, D. J. *et al.* Gonadal Hormones Determine Sensitivity to Central Leptin and Insulin. **Diabetes**, [S.L.], v. 55, n. 4, p. 978-987, 27 mar. 2006. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.55.04.06.db05-1339>. Disponível em: <https://diabetes.diabetesjournals.org/content/55/4/978.full-text.pdf>. Acesso em: 21 out. 2021.

COELHO, M. *et al.* State of the art paper Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. **Archives Of Medical Science**, [S.L.], v. 2, p. 191-200, 2013. Termedia Sp. z.o.o.. <http://dx.doi.org/10.5114/aoms.2013.33181>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3648822/pdf/AMS-9-20246.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2020.

COLPO, E. *et al.* Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. **Nutrition**, [S.L.], v. 30, n. 4, p. 459-465, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.005>.

COSTA, T.; JORGE, N. Compostos Bioativos Benéficos Presentes em Castanhas e Nozes. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, n. 3, p. 195-203, mar. 2011. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/122387>. Acesso em: 30 out. 2020.

CRISTÓVÃO, M. F., SATO, A. P. S., FUJIMORI, E. Excesso de peso e obesidade abdominal em mulheres atendidas em Unidade da Estratégia Saúde da Família. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 45, n. 2, p. 1667-1672, 2011.

DOLNIKOFF, M *et al.* Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. **International Journal Of Obesity**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 426-433, mar. 2001. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ijo.0801517>.

ESSER, N. *et al.* Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**. 12 abr. 2014. Elsevier Scientific. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2014.04.006>



FAO, Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura; OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. **América Latina y el Caribe: Panorama de la seguridad alimentaria y nutricional. Sistemas alimentarios sostenibles para poner fin al hambre y la malnutrición, 2016**. FAO, 2017.

FERRANTE, A. W. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. **Journal Of Internal Medicine**, [S.L.], v. 262, n. 4, p. 408-414, out. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01852.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2796.2007.01852.x>. Acesso em: 13 out. 2020.

FRAUSTO-GONZÁLEZ, O. *et al.* Bertholletia excelsa Seeds Reduce Anxiety-Like Behavior, Lipids, and Overweight in Mice. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 11, p. 3212, 27 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26113212>.

GUARESCHI, Z. M. *et al.* The effect of chronic oral vitamin D supplementation on adiposity and insulin secretion in hypothalamic obese rats. **British Journal Of Nutrition**, [S.L.], v. 121, n. 12, p. 1334-1344, 13 jun. 2019. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0007114519000667>. Disponível em: [https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/220BE2F31A9DD09AF3B7B45F108EA3D7/S0007114519000667a.pdf/effect\\_of\\_chronic\\_oral\\_vitamin\\_d\\_supplementation\\_on\\_adiposity\\_and\\_insulin\\_secretion\\_in\\_hypothalamic\\_obese\\_rats.pdf](https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/220BE2F31A9DD09AF3B7B45F108EA3D7/S0007114519000667a.pdf/effect_of_chronic_oral_vitamin_d_supplementation_on_adiposity_and_insulin_secretion_in_hypothalamic_obese_rats.pdf). Acesso em: 23 nov. 2020.

GROSSMANN, M. Low Testosterone in Men with Type 2 Diabetes: significance and treatment. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S.L.], v. 96, n. 8, p. 2341-2353, ago. 2011. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2011-0118>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jcem/article/96/8/2341/2834088>. Acesso em: 17 out. 2021.

HAJHASANI, M. *et al.* Natural products as safeguards against monosodium glutamate-induced toxicity. **Iranian Journal Of Basic Medical Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 4, p. 416-430, abr. 2020. Mashhad University of Medical Sciences. <http://dx.doi.org/10.22038/ijbms.2020.43060.10123>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7239414/pdf/IJBMS-23-416.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2021.

HEINONEN, S. *et al.* Adipocyte morphology and implications for metabolic derangements in acquired obesity. **International Journal Of Obesity**, [S.L.], v. 38, n. 11, p. 1423-1431, 19 fev. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2014.31>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ijo201431>. Acesso em: 06 dez. 2020.

HEREDIA, F. P. *et al.* Obesity, inflammation and the immune system. **Proceedings Of The Nutrition Society**, [S.L.], v. 71, n. 2, p. 332-338, 20 mar. 2012. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0029665112000092>. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/BBA951027B413AEE76E3DA11A81173F1/S0029665112000092a.pdf/obesity-inflammation-and-the-immune-system.pdf>. Acesso em: 06 dez. 2020.

LUBACZEUSKI, C. *et al.* Vagotomy ameliorates islet morphofunction and body metabolic homeostasis in MSG-obese rats. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, [S.L.], v. 48, n. 5, p. 447-457, mai. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20144340>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjmr/a/Cn4WYPChh3CcMbBYhQSZRNb/?lang=en>. Acesso em: 17 nov. 2020.

LUDWIG, R. G. **Caracterização Metabólica de Adipócitos em Resposta ao Soro de Roedores Submetidos à Restrição Dietética**. 2018. 55 p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Campinas; Campinas, 2018.

LUZ, G. *et al.* Suplementação de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 reduz marcadores inflamatórios e melhora a ação da insulina em fígado de camundongos. **Revista de Nutrição**, [S.L.], v. 25, n. 5, p. 621-629, out. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-52732012000500007>.

MANCUSO, P. The role of adipokines in chronic inflammation. **Immunotargets And Therapy**, [S.L.], p. 47, maio 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/itt.s73223>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4970637/pdf/itt-5-047.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2021.

MARANHÃO, P. *et al.* Brazil nuts intake improves lipid profile, oxidative stress and microvascular function in obese adolescents: a randomized controlled trial. **Nutrition & Metabolism**, [S.L.], v. 8, p. 1-8, 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-7075-8-32>. Disponível em: <https://nutritionandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-7075-8-32#citeas>. Acesso em: 30 out. 2020.

MARIATH, A. B. *et al.* Obesidade e fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis entre usuários de unidade de alimentação e nutrição. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 4, p. 897-905, abr. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/csp/v23n4/16.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2020.

MARTIN, J. M. *et al.* Maternal Diet Supplementation with n-6/n-3 Essential Fatty Acids in a 1.2 : \*\*1.0 ratio attenuates metabolic dysfunction in msg-induced obese mice. **International Journal Of Endocrinology**, [S.L.], v. 2016, p. 1-10, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9242319>.

MARTINEZ-SANTIBAÑEZ, G. *et al.* Imaging White Adipose Tissue with Confocal Microscopy. **Methods In Enzymology**, [S.L.], p. 17-30, 2014. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-411619-1.00002-1>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4233125/>. Acesso em: 12 jan. 2021.

MARTINS, A. C. P. *et al.* Adrenal medullary function and expression of catecholamine-synthesizing enzymes in mice with hypothalamic obesity. **Life**

**Sciences**, [S.L.], v. 74, n. 26, p. 3211-3222, mai. 2004. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2003.10.034>.

MATTARAIA, V. G. M.; MOURA, A. S. A. M. T. Produtividade de ratos Wistar em diferentes sistemas de acasalamento. **Ciência Rural**; v. 42, n. 8, p. 1490-1496, 2012. Disponível em:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782012000800026&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782012000800026&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 03 abr. 2020.

NASCIMENTO, L. P. S. *et al.* Benefits of the consumption of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) extract in male reproductive parameters of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal Of Diabetes & Metabolic Disorders**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 187-196, 5 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s40200-020-00490-8>.

OLNEY, J. W.. Brain Lesions, Obesity, and Other Disturbances in Mice Treated with Monosodium Glutamate. **Science**, [S.L.], v. 164, n. 3880, p. 719-721, 9 maio 1969. American Association for the Advancement of Science (AAAS).  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.164.3880.719>.

PALMER, B. F.; CLEGG, D. J.. The sexual dimorphism of obesity. **Molecular And Cellular Endocrinology**, [S.L.], v. 402, p. 113-119, fev. 2015. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2014.11.029>. Disponível em:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4326001/pdf/nihms658120.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2021.

QUINES, C. B. *et al.* Resistance training restores metabolic alterations induced by monosodium glutamate in a sex-dependent manner in male and female rats. **Journal Of Cellular Biochemistry**, [S.L.], v. 120, n. 8, p. 13426-13440, 27 mar. 2019. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1002/jcb.28617>.

RECINELLA, L. *et al.* Adipokines: new potential therapeutic target for obesity and metabolic, rheumatic, and cardiovascular diseases. **Frontiers In Physiology**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-32, 30 out. 2020. Frontiers Media SA.  
<http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2020.578966>. Disponível em:  
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2020.578966>. Acesso em: 02 maio 2020.

REIS, Bruna Zavarize *et al.* Brazil nut intake increases circulating miR-454-3p and miR-584-5p in obese women. **Nutrition Research**, [S.L.], v. 67, p. 40-52, jul. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2019.05.004>.

RIBEIRO, M.G., LIMA, S.R. 2000. **Iniciação às técnicas de preparação de material para estudo e pesquisa em morfologia**. Belo Horizonte: Segrac Editora.

ROMAN-RAMOS, R. *et al.* Monosodium Glutamate Neonatal Intoxication Associated with Obesity in Adult Stage is Characterized by Chronic Inflammation and Increased mRNA Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [S.L.], v. 108, n. 6, p. 406-413, 9 fev. 2011.

Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00671.x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21205225/>. Acesso em: 23 nov. 2020.

ROS, E. Nuts and novel biomarkers of cardiovascular disease. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, [S.L.], v. 89, n. 5, p. 1649S-1656S, 25 mar. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.2009.26736r>. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcn/article/89/5/1649S/4596956>. Acesso em: 30 out. 2020.

SAGAE, S.C. *et al.* Sex differences in brain cholinergic activity in MSG-obese rats submitted to exercise. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 89, n. 11, p. 845-853, nov. 2011.

SANCHES, J. R. *et al.* Polyphenol-Rich Extract of Syzygium cumini Leaf Dually Improves Peripheral Insulin Sensitivity and Pancreatic Islet Function in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Rats. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 7, p. 1-16, 10 mar. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2016.00048>.

SANTOS, O. V. **Estudo das potencialidades da castanha-do-brasil: produtos e subprodutos**. 2012. 215 f. Tese (Doutorado) - Curso de Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. Disponível em: [https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9133/tde-10092012-110036/publico/Tese\\_Orquidea\\_Vasconcelos\\_dos\\_Santos.pdf](https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9133/tde-10092012-110036/publico/Tese_Orquidea_Vasconcelos_dos_Santos.pdf). Acesso em: 30 out. 2020.

SCALLET, A. C.; OLNEY, J. W. Components of hypothalamic obesity: bipiperidyl-mustard lesions add hyperphagia to monosodium glutamate-induced hyperinsulinemia. **Brain Research**, [S.L.], v. 374, n. 2, p. 380-384, mai. 1986. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90434-8](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(86)90434-8).

SCHMIDT, M. I. *et al.* Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **Lancet**, v. 377, p. 1949-1961, 2011.  
SCHOETTL, T. *et al.* Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. **The Journal Of Experimental Biology**, [S.L.], v. 221, n. 1, p. 1-17, 7 mar. 2018. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.162958>. Disponível em: [https://jeb.biologists.org/content/jexbio/221/Suppl\\_1/jeb162958.full.pdf](https://jeb.biologists.org/content/jexbio/221/Suppl_1/jeb162958.full.pdf). Acesso em: 13 dez. 2020.

SETHI, J. K. *et al.* Thematic review series: adipocyte biology.adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. **Journal Of Lipid Research**, [S.L.], v. 48, n. 6, p. 1253-1262, 20 mar. 2007. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.r700005-jlr200>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17374880/>. Acesso em: 10 dez. 2020.

SVIDNICKI, P. V. *et al.* Swim training and the genetic expression of adipokines in monosodium glutamate-treated obese rats. **Archives Of Endocrinology And Metabolism**, [S.L.], v. 59, n. 3, p. 210-214, jun. 2015. Archives of Endocrinology and Metabolism. <http://dx.doi.org/10.1590/2359-3997000000039>. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/aem/v59n3/0004-2730-aem-59-3-0210.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2020.

TORREZAN, R. *et al.* Monosodium l-glutamate-obesity onset is associated with disruption of central control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and autonomic nervous system. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 31, n. 6, e12717, p.2-10. 25 mar. 2019.

VERBOVEN, K. *et al.* Abdominal subcutaneous and visceral adipocyte size, lipolysis and inflammation relate to insulin resistance in male obese humans. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-8, 16 mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-22962-x>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-22962-x>. Acesso em: 13 out. 2020.

VIEIRA, A. P. B. M. **Effects of linseed oil and Brazil nuts oil on the clinical and laboratorial parameters in male and female rats with cafeteria diet-induced obesity**. 2011. 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2011.

WANDERLEY, E. N.; FERREIRA, V. A. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 185-194, jan. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-81232010000100024>. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/csc/v15n1/a24v15n1.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Noncommunicable diseases country profiles 2018**. World Health Organization; 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Prevalence of obesity among adults, BMI  $\geq$  30 (age-standardized estimate) (%)**. 2016. Disponível em: [https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/prevalence-of-obesity-among-adults-bmi-30-\(age-standardized-estimate\)-\(-\)](https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/prevalence-of-obesity-among-adults-bmi-30-(age-standardized-estimate)-(-)). Acesso em: 11 nov. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic: Report of a WHO Consultation**. WHO technical report series, n. 894, 2000.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: a review. **Lwt - Food Science And Technology**, [S.L.], v. 42, n. 10, p. 1573-1580, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.019>.

ZHU, Q. *et al.* Neuroendocrine Regulation of Energy Metabolism Involving Different Types of Adipose Tissues. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 11, p. 1-22, 1 jun. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20112707>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/11/2707>. Acesso em: 12 jan. 2021.

ZWICK, R. K. *et al.* Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. **Cell Metabolism**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 68-83, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.002>.

## ANEXOS

### ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE



#### Autorização

O Protocolo nº 13-20 intitulado “Efeitos da suplementação crônica com os óleos de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) e copaíba (*Copaifera langsdorfii*) sobre adiposidade e homeostase glicêmica de roedores obesos-MSG machos e fêmeas”, sob a responsabilidade de **Sabrina Grassioli** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em **Ad referendum** 13/04/2020. Essa Autorização não substitui o Certificado Experimental de realização ética da pesquisa, necessitando do encaminhamento do Relatório Final de execução do Projeto para sua emissão.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/05/2020 a 10/05/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico – <i>Wistar</i> -
N. de animais	30
Peso/Idade	150-200g (Prenhas) 70 dias
Sexo	Feminino
Origem	Biotério Central Unioeste – Campus Cascavel

Cascavel, 13/04/2020

**Prof. Dra. Luciana Oliveira de Fariña**  
Coordenadora do CEUA  
Portaria nº 3126/2018-GRE

ANEXO B – Caracterização físico-química do Óleo de Castanha-do-Brasil pela empresa AmazonOil

<b>DADOS FÍSICOS-QUÍMICOS DO ÓLEO DE CASTANHA DO PARÁ</b>		
<b>CARACTERÍSTICA</b>	<b>UNIDADE</b>	<b>APRESENTAÇÃO</b>
Aparência (25C°)	----	Líquido
Cor	----	Amarelo translúcido
Odor	----	Característico
Índice de acidez	mg NaOH/g	< 20,0
Índice de peróxido	10 meq O <sub>2</sub> /kg	< 10,0
Índice de iodo	gI <sub>2</sub> /100g	90 – 110
Índice de saponificação	mgKOH/g	180 - 210
Densidade	25°C g/ml	0,910 – 0,925
Índice de refração (40°C)	-	1,4600 – 1,4800
Matéria insaponificável (bioativos)	%	0,5
Ponto de fusão	°C	4
<b>COMPOSIÇÃO DOS ACIDOS GRAXOS</b>		
Ácido palmítico (C 16:0)	% peso	16,0 - 20,0
Ácido palmitoleico (C 16:1)	% peso	0,5 - 1,2
Ácido esteárico (C18:0)	% peso	9 - 13,0
Ácido oleico (C 18:1 Omega 9)	% peso	36 - 45,0
Ácido linoleico (C 18:2 – Omega 6)	% peso	33,0 - 38,0
Outros	% peso	4,0 - 6,0
Saturado	%	25
Insaturado	%	75

## ANEXO C – Comprovante de submissão do artigo à revista British Food Journal

Please click the "Return to Dashboard" button below to view your submitted manuscript OR click the link "Log Out" at the upper right side of the screen to log out of your account.

### Submission Confirmation



Thank you for your submission

---

<b>Submitted to</b>	British Food Journal
<b>Manuscript ID</b>	BFJ-03-2022-0292
<b>Title</b>	Chronic Brazil nuts oil supplementation reduce adipocyte hypertrophy on visceral white adipose tissue depot of lean and hypothalamic obese male and female rodents
<b>Authors</b>	Daudt, Beatriz Urrutia, Marianela Guareschi, Zoé Ueda, Julia Nishiyama, Isabella Kamiji, Gustavo Grassioli, Sabrina
<b>Date Submitted</b>	28-Mar-2022

---