UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

PRISCILA NOGUEIRA BEZAN

Efeitos da suplementação de frutooligossacarídeos em parâmetros metabólicos em camundongos C57BL alimentados com dieta hiperlipídica

Ribeirão Preto

2019

PRISCILA NOGUEIRA BEZAN

Efeitos da suplementação de frutooligossacarídeos em parâmetros metabólicos em camundongos C57BL alimentados com dieta hiperlipídica

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre do Programa de Clínica Médica.

Área de Concentração: Investigação Biomédica.

Orientador: Alceu Afonso Jordão Júnior

Ribeirão Preto

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Bezan, Priscila Nogueira

Efeitos da suplementação de frutooligossacarídeos em parâmetros metabólicos em camundongos C57BL alimentados com dieta hiperlipídica. Ribeirão Preto, 2019.

56 p. : il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Investigação Biomédica.

Orientador: Jordão Júnior, Alceu Afonso.

1. Frutooligossacarídeos. 2. Camundongos C57BL. 3. Parâmetros metabólicos. 4. Dieta hiperlipídica. 5. Nutrição experimental.

Nome: BEZAN, Priscila Nogueira

Título: Efeitos da suplementação de frutooligossacarídeos em parâmetros metabólicos em camundongos C57BL alimentados com dieta hiperlipídica

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre do Programa de Clínica Médica.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu namorado, André, por toda paciência, compreensão, carinho e amor. Aos meus melhores amigos, Tamiris e Héric, que estiveram ao meu lado durante essa longa caminhada. Também dedico aos meus pais, com quem compartilhei minhas conquistas, tristezas e ansiedade. Por fim, dedico à minha irmã, Ingrid, que sempre me ajudou a ser perseverante.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alceu A. Jordão Júnior, que, durante o processo de definição e orientação, muito me ensinou e contribuiu para meu crescimento pessoal, científico e intelectual.

Aos doutorandos, Camila S. Manca e Héric Holland, à mestranda, Mariane C. Pereira, e ao aluno de iniciação científica, Gabriel P. Esteves, que auxiliaram no desenvolvimento do experimento.

À Profa. Dra. Leandra N. Z. Ramalho por colocar o seu laboratório à disposição e por realizar as análises histopatológicas dos tecidos.

À mestre Paula P. Ovidio pela contribuição dada ao desenvolvimento do projeto, principalmente com relação às análises bioquímicas.

Ao amigo Victor C. Costacurta, que muito me auxiliou na conclusão da dissertação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa mestrado e pelo apoio para a realização desta pesquisa.

Ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

RESUMO

BEZAN, Priscila Nogueira. **Efeitos da suplementação de frutooligossacarídeos em parâmetros metabólicos em camundongos C57BL alimentados com dieta hiperlipídica.** 2019. 56 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Uma dieta rica em gordura leva sabidamente a efeitos deletérios, associados a síndrome metabólica, por outro lado carboidratos como os frutooligossacarídeos (FOS) estão associados à melhora da saúde gastrintestinal e à prevenção do excesso de gordura corporal e das alterações metabólicas associadas. O presente estudo avaliou os efeitos em longo prazo de quantidades elevadas de FOS em parâmetros metabólicos, na esteatose hepática não alcoólica (EHNA) e nos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) das fezes de camundongos C57BL recebendo dieta normolipídica e hiperlipídica. Foram utilizados 60 animais divididos em seis grupos que receberam por quatro meses as seguintes dietas experimentais: controle (C), normolipídica rica em fibra (F), normolipídica suplementada com FOS (FOS), hiperlipídica (HL), hiperlipídica rica em fibras (HLF) e hiperlipídica com FOS (HLFOS). A dieta controle continha 5% de celulose microcristalina, enquanto a rica em fibras continha 15%; já as suplementadas com FOS, ambas continham 15% desse prebiótico. Foram analisados: peso dos animais; composição corporal; ingestão alimentar; glicemia de jejum; perfil lipídico sérico e hepático; histologias hepática e intestinal; malondialdeído (MDA), retinol e α-tocoferol hepáticos; AGCC nas fezes. Ao final do período experimental não foi verificada alteração no consumo calórico entre os grupos, mas a suplementação com FOS na dieta hiperlipídica promoveu menor ganho de peso corporal e redução dos pesos do fígado e do tecido adiposo retroperitoneal em comparação ao HL e HF. O FOS preveniu a EHNA e diminuiu os níveis de da alanina aminotransferase e de colesterol sérico nos modelos experimentais animais de obesidade e síndrome metabólica (SM), mas sem alterações significativas no perfil lipídico hepático, na glicemia de jejum, na capacidade antioxidante total ou nas dosagens hepáticas de MDA, de retinol e de α-tocoferol. Os grupos que receberam dieta rica em fibras não apresentaram melhora nos parâmetros metabólicos ou na EHNA como ocorreu com a suplementação de FOS, sendo que o grupo HLF apresentou aumento do MDA no fígado. Já na dieta normolipídica, o FOS e a celulose foram eficazes na preservação da vitamina E hepática. A histologia intestinal evidenciou que a dieta hiperlipídica aumentou o diâmetro total da luz intestinal e reduziu a espessura muscular

entérica, sendo que tanto a suplementação com FOS como com celulose reverteram esses achados, sendo o FOS o mais efetivo. Já com relação aos grupos que receberam dieta normolipídica, houve diminuição da espessura muscular entérica tanto no grupo F como no FOS, sendo a celulose a que apresentou a maior redução, e o aumento do diâmetro da luz intestinal só foi verificado no grupo F. Por fim, não houve alteração nas dosagens dos três principais AGCC nas fezes. A suplementação em longo prazo com altas doses de FOS foi efetiva na redução do peso, da adiposidade, da EHNA e do colesterol sérico em camundongos C57BL com obesidade e SM induzidas por dieta hiperlipídica, além de prevenir parcialmente as alterações morfológicas do intestino presentes nesses modelos experimentais. Os benefícios encontrados com a oferta de altas doses de FOS não foram verificados nos grupos enriquecidos com celulose microcristalina.

Palavras-chaves: Frutooligossacrídeos (FOS); Camundongos C57BL; Dieta Hiperlipídica; EHNA

ABSTRACT

BEZAN, Priscila Nogueira. **Effects of supplementation of fructooligosaccharides on metabolites in C57BL mice fed a hyperlipidic diet**. 2019. 56 p. Dissertation (Masters in Clinical Medicine) - Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A high-fat diet is known to lead to deleterious effects associated with metabolic syndrome, on the other hand carbohydrates such as fructooligosaccharides (FOS) are associated with improved gastrointestinal health and prevention of excess body fat and associated metabolic abnormalities. The present study evaluated the long-term effects of high doses of FOS on metabolic parameters, non-alcoholic hepatic steatosis (NASH) and short chain fatty acids (SCFAs) from feces of C57BL mice receiving normolipid and hyperlipidic diets. A total of 60 animals were divided into six groups, which received the following experimental diets for four months: control (C), fiber-rich normolipid (F), normolipid supplemented with FOS (FOS), hyperlipidic (HL), high-fiber hyperlipid (HLF) and hyperlipidemic with FOS (HLFOS). The control diet contained 5% microcrystalline cellulose, while the high fiber contained 15%; and those supplemented with FOS, both contained 15% of this prebiotic. It was analyzed: weight of the animals; body composition; food intake; fasting blood glucose; serum and hepatic lipid profile; hepatic and intestinal histologies; malondialdehyde (MDA), hepatic α-tocopherol and retinol; AGCC in feces. At the end of the experimental period, no change in caloric intake between groups was observed, but supplementation with FOS in the hyperlipid diet promoted a lower body weight gain and reduced weights of the liver and retroperitoneal adipose tissue compared to HL and HF. FOS prevented NASH and decreased levels of alanine aminotransferase and serum cholesterol in experimental animal models of obesity and metabolic syndrome (MS), but without significant changes in hepatic lipid profile, fasting glycemia, total antioxidant capacity or dosages of MDA, retinol and α-tocopherol. The groups that received a high fiber diet showed no improvement in metabolic parameters or NASH as occurred with FOS supplementation, and the HLF group presented increased MDA in the liver. In the normolipid diet, FOS and cellulose were effective in the preservation of hepatic vitamin E. The intestinal histology evidenced that the hyperlipidic diet increased the total diameter of the intestinal lumen and reduced enteric muscle thickness, and both FOS and cellulose supplementation reversed these findings, with FOS being the most effective. Regarding the groups that received a normolipid diet, there was a decrease in enteric muscle

thickness in both the F and FOS groups, with the cellulose being the one with the greatest reduction, and the increase in the diameter of the intestinal lumen was only verified in the F group. Finally, there was no change in the dosages of the three main SCFAs in the feces. Long-term supplementation with high doses of FOS was effective in reducing weight, adiposity, NASH and serum cholesterol in C57BL mice with obesity and MS induced by a hyperlipid diet, in addition to partially preventing the morphological alterations of the intestine present in these models experiments. The benefits found in the supply of high doses of FOS were not verified in groups enriched with microcrystalline celulose.

Keywords: Fructooligosaccharides (FOS); C57BL mice; Hyperlipidic Diet; NASH

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Evolução de peso dos grupos experimentais expresso em média e desvio padrão ao longo das semanas.....30
Figura 2 - Lâminas da histologia do fígado coradas com Hematoxilina de Harris e Eosina e no aumento de 20 vezes.....33
Figura 3 - Lâminas da histologia do fígado coradas com Hematoxilina de Harris e Eosina e no aumento de 40 vezes.....34
Figura 4 - Lâminas da histologia do intestino coradas com Hematoxilina de Harris e Eosina e no aumento de 20 vezes.....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais por 100 g.....25
Tabela 2 - Comparação da média do consumo calórico mensal por animal de cada grupo experimental.....31
Tabela 3 - Comparação do peso de cada grupo experimental durante os quatro meses.....31
Tabela 4 - Comparação do peso dos tecidos hepático e adiposo de cada grupo experimental.....32
Tabela 5 - Perfil lipídico hepático dos grupos experimentais.....32
Tabela 6 - Análise do grau de esteatose hepática dos grupos experimentais.....35
Tabela 7 - Comparação das dosagens séricas de glicemia de jejum, da aspartato aminotransferase (AST), da alanina aminotransferase (ALT), da Capacidade Antioxidante Total (CAT), do colesterol e dos triglicerídeos de acordo com o grupo experimental.....36
Tabela 8 - Análise hepática do malondialdeído (MDA), do retinol e do α-tocoferol de acordo com o grupo experimental.....37
Tabela 9 - Comparação do diâmetro total da luz intestinal e da espessura muscular intestinal de acordo com o grupo experimental.....39
Tabela 10 - Comparação das concentrações de ácidos graxos de cadeia curta analisados nas fezes de acordo com o grupo experimental.....39

LISTA DE SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância *one-way*
AST	Aspartato aminotransferase
BHT	di-terc-butil metil fenol
CAT	Capacidade Antioxidante Total
CG	Cromatógrafo Gasoso
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
EHNA	Esteatose Hepática Não Alcoólica
FOS	Frutooligossacarídeos
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
g	grama
GLP-1	*Glucagon Like Peptide-1*(Peptídeo tipo glucagon)
GPR	*G Protein Receptor* (Receptor acoplado a proteína G)
GPR41	*G Protein Receptor 41*(Receptor acoplado a proteína G 41)
GPR43	*G Protein Receptor 43*(Receptor acoplado a proteína G 43)
HDL-c	*High-Density Lipoprotein cholesterol* (Lipoproteína de alta densidade - colesterol)
HE	Hematoxilina de Harris e Eosina
HPLC	*High performance liquid chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)
IgA	Imunoglobulina A

IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de Massa Corporal
Kg	quilograma
kg/m^2	quilograma por metro ao quadrado
LPS	Lipopolissacarídeos
M	molar
MDA	Malondialdeído
mg	miligrama
min	minuto
mmol	milimol
nm	nanômetro
nmol	nanomol
pH	potencial hidrogeniônico
PYY	Peptídeo YY
RNA	*ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)
rpm	rotação por minuto
scFOS	*short-chain fructooligosaccharides* (frutooligossacarídeos de cadeia curta)
SII	Síndrome do intestino irritável
SM	Síndrome Metabólica
TLR4	*Toll-Like Receptor* 4 (Receptor tipo Toll 4)
TNF-α	*Tumor Necrosis Factor*-α (Fator de necrose tumoral α)
USP	Universidade de São Paulo
UV	ultravioleta
v/v	volume por volume

LISTA DE SÍMBOLOS

β	beta
α	alfa
≥	maior ou igual
<	menor
✞	cruz
±	mais ou menos
%	porcentagem
°C	graus Celsius
µ	micro
µL	microlitro
µm	micrometro
µL	microlitro
nº	número

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16
2. OBJETIVO GERAL 23
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 23
3. MATERIAL E MÉTODOS 24
3.1. Animais e protocolo experimental 24
3.2. Composição das dietas 24
3.3. Análise histopatológica do intestino 25
3.4. Análise histopatológica do fígado 25
3.5. Quantificação de gordura hepática 26
3.6. Determinação de proteína 26
3.7. Determinação da concentração de malondialdeído hepático 26
3.8. Determinação da concentração de α-tocoferol e de retinol no fígado 27
3.9. Determinação das frações lipídicas 27
3.10. Determinação da glicemia de jejum 27
3.11. Determinação de AST e ALT 28
3.12. Determinação da Capacidade Antioxidante Total (CAT) 28
3.13. Determinação de Ácidos graxos de cadeia curta em fezes 29
3.14. Análise estatística 29
4. RESULTADOS 30
5. DISCUSSÃO 40
6. CONCLUSÃO 48

1. INTRODUÇÃO

A obesidade tem aumentado consistentemente nos últimos anos em todo o mundo; segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2016 39% dos adultos com idade acima de 18 anos estavam com excesso de peso (IMC $\geq$ 25 kg/m^2), sendo que 11% dos homens e 15% das mulheres estavam obesas (IMC $\geq$ 30 kg/m^2) (WHO, 2018). O excesso de gordura corporal está relacionado a uma série de alterações metabólicas como a dislipidemia, a resistência à insulina, o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e a esteatose hepática não alcoólica (EHNA) (KOPELMAN, 2000; ALBERTI et al., 2009; LUNA-LUNA et al., 2015). A Síndrome Metabólica (SM) é um conjunto de alterações fisiológicas, bioquímicas e metabólicas, diagnosticada quando há a presença de três dos cinco critérios a seguir: redução do HDL-c (*High-Density Lipoprotein cholesterol*) e aumento da circunferência abdominal (obesidade), dos triglicerídeos séricos, da pressão arterial e da glicemia de jejum (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2005; ALBERTI et al., 2009). Apesar de não constar como um dos critérios para diagnóstico da SM, a EHNA, o estado pró-inflamatório e a disfunção endotelial estão reconhecidamente associadas às alterações metabólicas, fisiológicas e bioquímicas dessa síndrome (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2005; ALBERTI et al., 2009). O estado inflamatório sub clínico crônico encontrado na obesidade tem grande importância no desenvolvimento dessas alterações metabólicas, uma vez que a elevação da IL-6 (Interleucina-6) e do TNF-α (*Tumor Necrosis Factor*-α) está associada à promoção de resistência insulínica, que está envolvida na patogênese do DM2, assim como, na da EHNA (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005; CONTOS; SANYAL, 2002).

O papel da microbiota intestinal na obesidade tem sido descrito desde 2005, sendo que mais recentemente tem sido estudada sua contribuição no desenvolvimento da EHNA, que ocorre através da influência no armazenamento de energia, no metabolismo de lipídios e de colina, na produção de etanol, no equilíbrio imunológico e na inflamação (LEY et al., 2005; ARON-WISNEWSKY et al., 2013; LAU; CARVALHO; FREITAS, 2015). Segundo revisão de Brahe, Astrup e Larsen (2016), o microbioma de indivíduos metabolicamente saudáveis parece ser caracterizado por genes bacterianos envolvidos na motilidade celular, no metabolismo de cofatores e de vitaminas, e na produção de butirato; enquanto o de obesos com doenças metabólicas associadas apresenta genes bacterianos que proporcionam capacidade aumentada para o metabolismo energético, o transporte de membrana e o potencial pró-inflamatório. Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como as

observadas na obesidade, e a hiperinsulinemia alteram as propriedades de barreira do epitélio intestinal, que é a primeira linha de defesa do organismo contra ingestão de agentes tóxicos (BRUEWER et al., 2003; BRUN et al., 2007; GROSCHWITZ; HOGAN, 2009). O aumento da permeabilidade da mucosa intestinal em indivíduos obesos propicia extravasamento de endotoxina da membrana externa de bactérias gram-negativas na circulação portal, expondo o fígado aos lipopolissacarídeos (LPS) e contribuindo para as morbidades relacionadas ao excesso de peso (BRUN et al., 2007). Os LPS são glicolipídeos que tem capacidade de incitar uma resposta inflamatória vigorosa, que desencadeia a ativação de receptores como o *Toll-Like Receptor* 4 (TLR4) promovendo resistência insulínica (SU, 2002; TSUKUMO et al., 2007).

A composição da microbiota intestinal é altamente influenciada pelo ambiente hospedeiro, sendo a dieta um dos vários fatores de interferência (POWER et al., 2014; LECOMTE et al., 2015). A primeira evidência de que o fenótipo obeso estava relacionado a mudanças na microbiota ocorreu em camundongos obesos ob/ob que apresentaram menos *Bacteroidetes* e mais *Firmicutes* (LEY et al., 2005), que são os dois filos predominantes também na flora intestinal humana (HUMANMICROBIOME PROJECT CONSORTIUM NATURE, 2012). Entretanto, não se pode estabelecer uma relação entre a prevalência dos filos bacterianos e a obesidade visto que alguns estudos encontraram resultados divergentes dos descritos previamente por Ley et al (2005), demonstrando relação entre o excesso de peso e o aumento da prevalência de *Bacteroidetes* e redução de *Firmicutes* (SCHWIERTZ et al., 2010; COLLADO et al., 2008). Não há consenso sobre o tamanho e a composição de uma microbiota intestinal saudável, entretanto, sugere-se que uma contagem inferior a 480.000 genes bacterianos esteja relacionada à maior massa corporal de gordura, à resistência à insulina, à dislipidemia e à inflamação sistêmica (LE CHATELIER et al., 2013; TURNBAUGH et al., 2009; COTILLARD et al., 2013). Apesar de não ser possível estabelecer um papel causal da microbiota intestinal no desenvolvimento das alterações metabólicas relacionadas à obesidade, estudos com intervenção dietética sugerem que a modulação da microbiota intestinal pode melhorar parâmetros de risco metabólico em humanos (BRAHE; ASTRUP; LARSEN, 2016).

A modulação da microbiota pode se dar através da utilização de componentes alimentares que estimulam seletivamente a proliferação e/ou atividade de bactérias desejáveis, que são os prebióticos; ou através da administração do próprio microrganismo vivo desejado, que são os probióticos (DELZENNE; NEYRINCK; CANI, 2013). Segundo revisão recente, as principais cepas utilizadas como probióticos são as espécies de *Lactobacillus*,

Bifidobacterium e *Lactococcus*, mas para que um microrganismo seja classificado como probiótico é necessário que seja um habitante normal do trato intestinal saudável e que seja seguro para o consumo humano, além disso, deve sobreviver à digestão, tendo a capacidade de aderir à mucosa intestinal e proliferar (SARAO; ARORA, 2017). Enquanto os prebióticos consistem em um ingrediente alimentar não digerível, que estimula seletivamente os microrganismos potencialmente promotores da saúde que já residem no cólon humano, como as bifidobactérias e os lactobacilos (SARAO; ARORA, 2017). O uso de prebióticos na modulação da microbiota apresenta vantagens sobre o de probióticos, sendo que a principal delas está relacionada com a capacidade de sobrevivência dos microrganismos (SARAO; ARORA, 2017).

Dentre os componentes alimentares que podem apresentar características prebióticas estão as fibras dietéticas, que são carboidratos não digeríveis e lignina presentes de forma intacta nas plantas, e as fibras funcionais, que são carboidratos não digeríveis isolados e que apresentam efeitos fisiológicos benéficos em humanos (IOM, 2005). Fibras dietéticas e funcionais, proteínas ou peptídeos que não são digeridos pelas enzimas do trato gastrointestinal sofrem fermentação pela microbiota do ceco e do cólon, produzindo ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Os principais AGCC produzidos são acetato, propionato e butirato, sendo que em menor quantidade pode ocorrer a produção de isobutirato, 2-metilbutirato e isovalerato, sendo que estes últimos são originários da fermentação de aminoácidos de cadeia ramificada valina, isoleucina e leucina (SMITH; MACFARLANE, 1997; GIBSON; FULLER, 2000; MONTAGNE; PLUSKE; HAMPSON, 2003). Os AGCC afetam vários processos fisiológicos e podem contribuir para o processo saúde-doença ao servir como substratos energéticos, inibir as histonas desacetilases e ativar diretamente receptores acoplados a proteína G (GPR41 e GPR43), que estão envolvidos na interação entre hospedeiro e microbiota intestinal (KOH et al., 2016; ANG; DING, 2016; LU et al., 2016). Os diferentes AGCC parecem desempenhar funções distintas no organismo, visto que o acetato age a nível central controlando a ingestão alimentar, enquanto o propionato está envolvido na redução do acúmulo de triglicerídeos hepáticos e no aumento da sensibilidade à insulina, e o butirato está associado à prevenção da obesidade e do câncer de cólon, assim como à redução da inflamação intestinal por servir como fonte de energia para enterócitos e colonócitos (KOH et al., 2016; WEITKUNAT et al., 2016; MCNABNEY; HENAGAN, 2017).

Os açúcares não digeríveis tem ganhado destaque na pesquisa alimentar e nutricional devido a suas propriedades prebióticas e a benefícios na saúde humana e animal. Esses açúcares englobam uma variedade de carboidratos, como mono, di e oligossacarídeos, e a

maioria dos álcoois de açúcar. Dentre as características que determinam seu efeito como prebiótico estão a natureza cristalina, a solubilidade em água e, principalmente, a resistência à ação hidrolítica das enzimas do intestino delgado do ser humano e de animais monogástricos. Devido à sua indigestibilidade atravessam o intestino delgado e ficam disponíveis à ação dos microrganismos do ceco e do cólon, onde serão degradados em AGCC e gases (XIAO; METZLER-ZEBELI; ZEBELI, 2015). Os principais produtos finais de sua fermentação são o acetato, propionato, butirato, ácido lático, água, vários gases (dióxido de carbono, hidrogênio e metano), biomassa celular bacteriana e calor (GIBSON; FULLER, 2000; MONTAGNE; PLUSKE; HAMPSON, 2003).

Em estudo recente realizado com camundongos recebendo dieta hiperlipídica, verificou-se que a suplementação com diferentes fibras dietéticas (β-glucana, pectina, inulina e ésteres de inulina) foi eficaz na prevenção da obesidade e exerceu efeitos semelhantes na composição corporal e na expressão de marcadores genéticos selecionados do ceco e do fígado do hospedeiro, mas sem relação com alterações taxonômicas da microbiota intestinal (DREW et al., 2018). O consumo de fibras compostas por diferentes tamanhos de partículas tem apesentado diferentes respostas inflamatórias e metabólicas, assim como na modulação da microbiota e na permeabilidade intestinais (LIU et al., 2016; SURIANO et al., 2017). Everard et al (2011) verificaram que a oferta de oligofrutose promoveu redução dos níveis plasmáticos de LPS, modulação da microbiota intestinal, diminuição do tecido adiposo e melhora de parâmetros metabólicos e de marcadores inflamatórios em camundongos C57BL/6 *ob/ob* recebendo dieta normolipídica. Nesse mesmo estudo foi realizado um segundo experimento com camundongos C57BL/6J com obesidade e DM2 induzidas por dieta hiperlipídica, no qual a oferta de oligofrutose reduziu os níveis plasmáticos de glicose, assim como a taxa de adiposidade e o peso corporal (EVERARD et al., 2011).

Em artigo de revisão recente, Xiao, Metzler-Zebeli e Zebeli (2015) relataram que o principal benefício do consumo de açúcares não digeríveis é a promoção da proliferação de bifidobactérias sacarolíticas e espécies de lactobacilos acompanhada por redução de bactérias prejudiciais como *Enterobacteriaceae, Clostridium sensu strictu, Streptococcus faecalis and Proteus sp* na microbiota intestinal. Além disso, os efeitos desses açúcares não digeríveis na microbiota variam nos diferentes segmentos intestinais, o que pode estar relacionado à progressão da fermentação (XIAO; METZLER-ZEBELI; ZEBELI, 2015). Ainda segundo revisão de Xiao, Metzler-Zebeli e Zebeli (2015), como esses carboidratos e álcoois não são digeridos, não interferem na glicemia ou na secreção de insulina, sendo que diminuem a eficiência alimentar e o ganho de peso em ratos, o que tem sido atribuído principalmente à

redução da digestibilidade de gorduras. Por fim, verificou-se que os ácidos graxos de cadeia curta, especialmente o butirato, aumentam o fornecimento de energia para as células epiteliais intestinais e regulam a troca de eletrólitos, facilitando a absorção de minerais pelo cólon (XIAO; METZLER-ZEBELI; ZEBELI, 2015).

Com isso, cresce o interesse no desenvolvimento de alvos terapêuticos para a modulação da microbiota intestinal, sendo que a utilização de frutanos na pesquisa alimentar e nutricional tem apresentado resultados satisfatórios com relação à modulação da microbiota intestinal, à diminuição da permeabilidade intestinal e à melhoria de parâmetros metabólicos e de EHNA (RESPONDEK et al., 2013; XIAO; METZLER-ZEBELI; ZEBELI, 2015; LIU et al., 2016; MATSUMOTO et al., 2017; MAO et al., 2018). Os frutanos são compostos por oligômeros de frutose cuja unidade frutosil está ligada na posição β-2,1 da sacarose (ROBERFROID; DELZENNE, 1998). Os frutanos são encontrados em vegetais como alcachofra, cebola, alho, alho-poró e chicória, sendo que essa classe de açúcares não digeríveis é dividida de acordo com o grau de polimerização, na qual a inulina é a que apresenta o maior grau, seguida pelos frutooligossacarídeos (FOS) de cadeia curta (ROBERFROID; DELZENNE, 1998).

Diferentes açúcares não digeríveis dão origem a diferentes AGCC, sendo que quanto menor o grau de polimerização, mais rápida a sua taxa de fermentação (STEWART; TIMM; SLAVIN, 2008). Dessa forma, verificou-se que o FOS aumenta principalmente as concentrações dos ácidos butírico e acético, que estão relacionados ao aumento significativo da população de *Lactobacillus spp*. e de *Bifidobaterium spp* (XIAO; METZLER-ZEBELI; ZEBELI, 2015). Além disso, o FOS promoveu a diminuição de cópias do gene de bactérias do grupo *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*, *Clostridium clusters XI* e *XIVa*, *Enterobacteriaceae* e *Clostridium difficile toxin B* nas fezes de ratos (KOLEVA et al., 2012). Enquanto em modelos experimentais de constipação com camundongos BALB/c, observou-se que a suplementação com FOS aumentou a proporção de ácido acético e diminuiu as proporções de ácidos propiônico e butírico nas fezes, modulando a microbiota ao aumentar os níveis de *Lacobacillus* e *Bifidobacterium* e diminuir os de *Odoribacter*, *Alistipes* e *Bacteroides* (WANG et al., 2017).

Dentre os benefícios atribuídos à ingestão oral de FOS estão: aumento da frequência das evacuações e da qualidade das fezes (WANG et al., 2013; WANG et al., 2017); melhora da absorção intestinal de cálcio, magnésio, ferro, zinco e cobre (LOBO et al., 2014; WANG et al., 2010; JOHNSON et al., 2011); redução da glicose sérica em indivíduos com DM2 (COSTA; GUIMARÃES; SAMPAIO, 2012); redução do estresse oxidativo e da IL-1

(Interleucina-1) no cólon (EVERARD et al., 2011). Por se tratar de um carboidrato não absorvível, o FOS não aumenta os níveis de glicose, frutose e insulina séricas (COSTA; GUIMARÃES; SAMPAIO, 2012). Além disso, em estudo recente foi observado que a oferta de frutanos afetou positivamente a integridade intestinal e a inflamação sistêmica em camundongos obesos recebendo dieta hiperlipídica (LIU et al., 2016). Entretanto, altas doses de FOS, em camundongos C57BL/6 com síndrome do intestino irritável (SII) induzida por estresse, intensificaram a hipersensibilidade visceral e a inflamação intestinal, que estavam associadas a maior produção intestinal de AGCC (CHEN et al., 2017). Embora esses achados relacionem os AGCC à piora dos parâmetros inflamatórios na SII, há estudos demonstrando melhora de modelos animais experimentais de doenças inflamatórias intestinais com a oferta de ácidos graxos de cadeia curta (SUN et al., 2017).

Tem crescido o interesse na utilização de FOS como prebiótico em modelos experimentais animais de obesidade e de síndrome metabólica, entretanto, alguns estudos apresentam resultados contrários aos benefícios do FOS já observados na saúde gastrointestinal (ZHU; BAKER; BAKER, 2015; XIAO; METZLER-ZEBELI; ZEBELI, 2015; LIU et al., 2016; CHEN et al., 2017). Estudos experimentais utilizam doses de frutanos variadas, que podem ser ofertadas na composição da dieta (5 a 25%) ou por gavagem (0,8 a 8 g/kg de peso do animal) associadas com diferentes teores lipídicos da ingestão calórica, sendo que os períodos experimentais vão de semanas a meses (RESPONDEK et al., 2013; LIU et al., 2016; WANG et al., 2017; CHEN et al., 2017; WEITKUNAT et al., 2017; MATSUMOTO et al., 2017; DREW et al., 2018; MAO et al., 2018). A maioria dos estudos utiliza doses que variam de 5 a 10% de frutanos, que são ofertadas em períodos curtos de tempo, cuja duração fica entre 3 e 8 semanas de experimento (RESPONDEK et al., 2013; LIU et al., 2016; MATSUMOTO et al., 2017; DREW et al., 2018). Dois estudos compararam doses de FOS consideradas altas e baixas, tendo encontrado mais benefícios com a suplementação das doses mais altas do prebiótico; entretanto, ambos foram experimentos de curto prazo (duas e quatro semanas) (MAO et al., 2018; WANG et al., 2017). Apesar de o estudo de Mao et al (2018) verificar mais benefícios com a oferta de 25% de FOS, essa quantidade não seria tolerada se reproduzida em humanos, visto que a dose utilizada em estudos clínicos varia de 5 a 8 g/dia, sendo que 16 g é o limite de tolerância (HESS et al., 2011). Entretanto, faz se necessário o desenvolvimento de desenhos experimentais animais que analisem os efeitos de elevadas doses de FOS com o intuito de elucidar seus potenciais benefícios, assim como possíveis malefícios à saúde humana e animal. Por fim, o único estudo, com desenho experimental relevante nessa área de investigação, que verificou os

efeitos de frutanos em longo prazo, foi o de Weitkunat et al (2017), que avaliou a suplementação com 7% de inulina em camundongos C57BL/6JRj recebendo dieta hiperlipídica durante 30 semanas. Nenhum dos estudos que analisou a oferta de FOS em dieta hiperlipídica estabeleceu um grupo controle recebendo dieta normolipídica suplementada com a mesma quantidade de prebiótico, que seria um dado relevante para estabelecer comparações dos efeitos do FOS de acordo com o teor lipídico da dieta.

Para elucidar os benefícios potenciais do FOS na melhora da saúde gastrointestinal, da inflamação sistêmica e de parâmetros metabólicos é preciso estabelecer um protocolo experimental animal que avalie uma intervenção dietética com esse prebiótico em longo prazo. Espera-se que a oferta de elevadas doses de FOS contribua para a consolidação de benefícios, assim como para a investigação de possíveis malefícios, em modelos experimentais animais. Embora tenha sido verificada a utilização de 25% de FOS no estudo de Mao et al (2018), essa quantidade é demasiadamente alta se considerarmos o limite de tolerância em humanos. O presente trabalho investiu em diferenciais metodológicos ao analisar altas doses de FOS suplementadas em dietas com dois tipos de composição lipídica e ofertadas em longo prazo, que é pouco descrito em estudos semelhantes na literatura. Dessa forma, foram avaliados os efeitos da suplementação de 15% de FOS por quatro meses em parâmetros metabólicos e na produção de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes de camundongos C57BL alimentados tanto com dieta normolipídica como com hiperlipídica ricas em fibras.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da suplementação em longo prazo de altas doses de FOS e de celulose microcristalina nos parâmetros metabólicos e na proporção de ácidos graxos de cadeia curta das fezes em camundongos C57BL alimentados com dietas normo e hiperlipídicas.

2.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os efeitos do FOS na composição corporal dos animais que receberam dieta hiperlipídica;
- Verificar a quantidade de gordura hepática e a presença de esteatose hepática não alcoólica;
- Realizar a análise histopatológica do intestino e do fígado;
- Quantificar parâmetros do sistema antioxidante hepático e sérico;
- Verificar a presença de alteração na glicemia de jejum;
- Analisar modificações na proporção de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes;
- Comparar os efeitos da suplementação de FOS com a de celulose microcristalina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.Animais e protocolo experimental

Este trabalho foi aprovado pela Conselho de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) nº 10/2016 seguindo as normas preconizadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Foram utilizados 60 camundongos machos da linhagem C57BL com peso aproximado de 20 g, oriundos do Biotério Central da Prefeitura do Campus da Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto e, posteriormente, mantidos no Biotério do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP. Foi mantido constante o regime de claro-escuro de 12 em 12 horas e temperatura controlada de 24 ± 2ºC. Os animais ficaram alocados em caixas com sistema de fluxo de ventilação filtrada, ficando quatro animais por caixa.

Os animais passaram por um período de adaptação de sete dias ao ambiente e à dieta. Neste período, as dietas experimentais foram gradativamente introduzidas. Após a primeira semana, os animais foram mantidos por 18 semanas até a eutanásia, que foi feita por decapitação com os animais anestesiados. Os animais foram pesados semanalmente.

3.2.Composição das dietas

Foram seis tipos de dietas experimentais: controle (C), normolipídica rica em fibra (F), normolipídica suplementada com FOS (FOS), hiperlipídica (HL), hiperlipídica rica em fibras (HLF) e hiperlipídica com FOS (HLFOS). Para a suplementação de FOS nas dietas foi utilizado o produto Orafti® SIPX (2016) da *Beneo Animal Nutrition*, que consiste em inulina de chicória em pó contendo uma mistura de oligossacarídeos e polissacarídeos compostos por unidades de frutose. Todas as dietas foram baseadas na AIN-93 e estão descritas na tabela 1 (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

As dietas foram ofertadas através das grades de inox das caixas individuais. A quantidade consumida foi aferida duas vezes por semana, deixando sempre quantidade suficiente disponível, enquanto a água foi oferecida *ad libitum*.

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais por 100 g.

Ingredientes	C	F	FOS	HL	HLF	HLFOS
Caseína (g)	20	20	20	20	20	20
Amido de milho (g)	63	53	53	25	15	15
Óleo de Soja (g)	7	7	7	0	0	0
Banha (g)	0	0	0	45	45	45
FOS (g)	0	0	15	0	0	15
Fibra (g)	5	15	0	5	15	0
Minerais (g)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Vitaminas (g)	1	1	1	1	1	1
L-cistina (g)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Colina (g)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
BHT (mg)	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Calorias (kcal)	415	415	415	605	605	605

C – grupo controle; CF – grupo dieta normolipídica rica em fibras; FOS – grupo dieta normolipídica com FOS; HL – grupo dieta hiperlipídica; HLF – grupo dieta hiperlipídica rica em fibra; HLFOS – grupo dieta hiperlipídica com FOS.
FOS – frutooligossacarídeos
BHT - di-terc-butil metil fenol

3.3.Análise histopatológica do intestino

Fragmentos do cólon foram seccionados em corte transversal anular do cólon distal, sendo o material mergulhado em formalina tamponada. Os fragmentos foram analisados, sendo escolhidas laminas com cortes transversais aparentes e contínuos (GURMINI et al., 2005). Para esta análise foi utilizado um microscópio de luz convencional com aumento de 20 vezes. Posteriormente as imagens foram analisadas com o *softwear Image J* para a quantificação da espessura muscular entérica externa e do diâmetro total da luz intestinal.

3.4.Análise histopatológica do fígado

Fragmentos de tecido hepático foram incluídos em parafina. Posteriormente foram cortados fragmentos, com espessura de 4 μm, e corados com HE (Hematoxilina de Harris e Eosina). A esteatose hepática foi avaliada semi-quantitativamente e classificada em cruzes, segundo Oh et al. (1998) com algumas modificações. O grau de esteatose está associado com a localização morfológica do fígado (zona 1, 2 e 3), sendo atribuídas cruzes de acordo com o grau da esteatose: sem esteatose (0✞); 1-25% apenas na zona 3 (1✞); 25-50% apenas na zona 3 (2✞); 50-75% abrangendo zonas 2 e 3 (3✞) e 75-100% envolvendo zonas 1, 2 e 3 (4✞). Além disso, também foi avaliada a presença de infiltrado inflamatório (L: leve; M: moderado e I: intenso) e corpúsculos de Mallory (A: ausente; PC: poucos corpúsculos e MC: muitos

corpúsculos). Para estas análises foi utilizado um microscópio de luz convencional com aumentos de 20 e de 40 vezes.

3.5.Quantificação de gordura hepática

Para determinação e quantificação de gordura total no fígado, foi utilizado o método proposto por Bligh e Dyer (1959). Para a análise, 250 mg de tecido foram homogeneizados em 400 µL de água ultra pura. Em seguida foi adicionado 1 mL de metanol e 500 µL de clorofórmio e agitado em vórtex por 1 minuto. Feito isso foram acrescentados 500 µL de água ultra pura e 500 µL de clorofórmio e agitado novamente em vórtex por 2 minutos. Depois foi centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos, obtendo-se três fases, sendo a fase inferior clorofórmica, a qual foi transferida para um microtubo tipo *eppendorf* de 1,5 mL contendo sulfato de sódio anidro. Esse microtubo foi agitado em vórtex e centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos, sendo posteriormente, retirado 250 µL do sobrenadante e transferido para um novo microtubo previamente pesado. A fase clorofórmica foi evaporada em estufa, de forma que ficasse somente a gordura no microtubo. Por fim, foi realizada nova pesagem do microtubo, subtraindo-se o peso inicial e obtendo-se, desse valor, um quarto do peso da gordura total do tecido hepático analisado.

3.6.Determinação de proteína

A determinação de proteína no fígado e soro foi realizada por kit comercial utilizando o método de Biureto (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil).

3.7.Determinação da concentração de malondialdeído hepático

Esta análise foi feita através da medida da concentração de malondialdeído (MDA) hepático, pelo método adaptado de Gerard-Monnier et al. (1998). Foram utilizados 100 mg de tecido, que foram homogeneizados em 500 µL de tampão fosfato com pH 7.4 e, posteriormente, centrifugados a 3500 rpm por 10 minutos. Retirou-se uma alíquota de 100 µL do sobrenadante, adicionando-se a este 300 µL de solução de 1-metil-fenilindol 10 mmol/L em acetonitrila e metanol (2:1, v/v) e 75 µL de HCL (ácido clorídrico) puro (37%). Logo após, os microtubos tipo *eppendorf* foram agitados em vórtex e incubados em banho-maria a 45ºC por 40 minutos. Em seguida, as amostras foram resfriadas em gelo e centrifugadas a

4000 rpm por 10 minutos. No sobrenadante foi feita a leitura de absorbância em comprimento de onda de 586 nm. A concentração de MDA foi calculada comparando-a a uma curva de malondialdeído. (GERARD-MONNIER et al., 1998)

3.8.Determinação da concentração de α-tocoferol e de retinol no fígado

As análises de α-tocoferol e de retinol foram realizadas juntas, distinguindo-se apenas o comprimento de onda no momento da leitura no HPLC (*High performance liquid chromatography*). A metodologia utilizada foi baseada em Arnaud et al. (1991) e descrita em Jordão et al. (2004). Para as análises, foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu modelo LC-20AT; coluna tipo C-18 (250 x 4,6 mm - 5µm); detector UV-visível modelo SPD-20A; velocidade de fluxo de 1,0 mL/min. As concentrações foram determinadas por meio do uso de padrão externo e os resultados foram expressos em µmolar.

Foi homogeneizado um fragmento de aproximadamente 200 mg de fígado com 1 mL de etanol. Posteriormente foi adicionado 1 mL de heptano, agitando em vórtex por 1 min, e em seguida centrifugando a 3000 rpm por 10 min. Retirou-se 200 µL do sobrenadante que foi então seco em fluxo de nitrogênio. A ressuspensão do resíduo seco foi realizada com 200 µL da fase móvel Acetonitrila/Diclorometano/Metanol na proporção 7/2/1. 20 µL foram injetados no HPLC. Para a análise de α-tocoferol foi realizada leitura no comprimento de onda de 292 nm, enquanto na de retinol a leitura foi em 325 nm.

3.9.Determinação das frações lipídicas

O colesterol total e os triglicerídeos séricos, assim como os hepáticos, foram determinados através de kits comerciais da Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil).

3.10.Determinação da glicemia de jejum

Os camundongos passaram por jejum de 5 a 6 horas, sendo então anestesiados com xilasina 0,6 µL/g de peso e ketamina 0,9 µL/g de peso. Em seguida foi retirada uma amostra de sangue para a medida da glicemia basal, utilizando-se para isso o glicosímetro (ACCU-CHEK® Active) e fitas reagentes.

3.11. Determinação de AST e ALT

As transaminases aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram determinadas através de Kit comercial da Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil).

3.12. Determinação da Capacidade Antioxidante Total (CAT)

A análise da Capacidade Antioxidante Total (CAT) foi realizada com base na metodologia descrita por Erel (2004). Para a análise foi necessário o preparo de dois reagentes conforme descrito a seguir.

Para os primeiro reagente foi preparada uma solução de acetato de sódio com concentração de 0,4 mol/L dissolvendo 32,8 g de CH3COONa (acetato de sódio) em 1000 mL de água deionizada. Separadamente, 22,8 mL de ácido acético glacial de grau reagente foram diluídos para 1000 mL com água deionizada, chegando-se a concentração final de 0,4 mol/L. Posteriormente, 940 mL da solução de acetato de sódio foi misturada com 60 mL de solução de ácido acético sob um medidor de pH, de forma que o tampão ácido acético-acetato de sódio tivesse pH final de 5,8.

Para o segundo reagente foram realizadas etapas semelhantes àquelas realizadas para preparo do primeiro reagente. Foi diluído 2,46 g de CH3COONa (acetato de sódio) em 1000 mL de água deionizada, obtendo uma solução tampão de acetato a 30 mmol/L com pH 3,6. Separadamente, 1,705 mL de ácido acético glacial de grau reagente foram diluídos para 1000 mL com água deionizada, chegando-se a concentração final de 30 mmol/L. 75 mL da solução de acetato de sódio foi misturada com 925 mL de solução de ácido acético sob um medidor de pH, obtendo-se pH final de 3,6 para o tampão ácido acético-acetato de sódio. Em seguida foram diluídos 278 μL de solução comercial de peróxido de hidrogênio (35%) para 1000 mL com a solução tampão, ficando com concentração final de 2 mmol/L. Por fim, 0,549 g de ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) foram dissolvidos em 100 mL de solução preparada, obtendo-se concentração final de 10 mmol/L. Depois de 1 hora de incubação em temperatura ambiente verifica-se a cor característica do cátion ABTS.

Após o preparo dos dois reagentes foi retirado uma alíquota de 5 μL do soro em uma microplaca de fundo chato e acrescentado a 200 μL do primeiro reagente, sendo realizada a leitura da primeira absorbância com comprimento de onda de 660 nm, sendo utilizada esta absorbância como branco da amostra. Em seguida foram acrescentado 20 μL do segundo reagente, ficando incubado por 5 minutos, quando foi realizada uma nova leitura no

espectrofotômetro com o mesmo comprimento de onda. A concentração de CAT foi calculada comparando a absorbância a uma curva padrão Trolox.

3.13. Determinação de Ácidos graxos de cadeia curta em fezes

As fezes dos animais foram extraídas da porção final do cólon após a eutanásia e armazenadas em microtubos tipo *eppendorf* e congeladas a -20°C. A determinação de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes foi realizada com base na metodologia de Zhao, Nyman e Jonsson (2006) com adaptações. Em um tubo de ensaio de 5 mL foi pesado 0,25 g de fezes coletadas diretamente do cólon dos animais no dia da eutanásia. Em seguida, foram adicionados 1,25 mL de água ultrapura e homogeneizado até obtenção de homogenato uniforme. O pH da suspensão foi medido com fitas indicadoras de pH para medir a acidez e ajustado para de 2 a 3, adicionando o equivalente a 2 gotas de HCl 5 M com auxílio de uma pipeta. A suspensão foi mantida em temperatura ambiente por 10 minutos, agitando-se ocasionalmente. Posteriormente, a suspensão foi transferida para microtubos tipo *eppendorf* de 2 mL e centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtros de 0,2 µm acoplados em seringas. Após a filtragem, a amostra foi injetada no Cromatógrafo Gasoso (CG).

Os ácidos graxos foram determinados em um cromatógrafo a gás SHIMADZU, CG-2014 com auto-injetor AOC-20i, com coluna de sílica fundida de AGILENT de 30 m de comprimento, 0,535 mm de diâmetro interno e 0,50 µm de espessura de filme. O gás de arraste utilizado foi o hélio, com fluxo de 15 mL/min com corrida de 17,5 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250°C. O padrão utilizado era composto por um mix de ácidos graxos da Supelco (Supelco WSFA – 4 Mix).

Através da análise do CG foram obtidos os dados: tempo de retenção em minutos, área sob a curva, concentração em porcentagem e altura do pico. O pico do solvente foi excluído da análise e, para a comparação entre os grupos, foi utilizada a porcentagem de cada ácido graxo encontrado, de modo que a soma destes totalizassem 100%.

3.14. Análise estatística

O instrumento estatístico para comparação entre grupos foi à análise de variância *one-way* (ANOVA) com pós-teste de *Tukey*, considerando $p<0,05$ como nível de significância. Os resultados foram apresentados em média ± desvio padrão.

4. RESULTADOS

Verificou-se, no primeiro mês, maior consumo calórico pelos animais dos três grupos que receberam dieta hiperlipídica em comparação ao grupo controle normolipídica, sendo que a suplementação com fibras ou com FOS não promoveu alterações no consumo calórico dentro dos grupos de teor lipídico semelhante. Já nos demais meses, não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre o consumo calórico mensal de cada grupo experimental (Tabela 2). No primeiro mês experimental, o maior consumo calórico dos animais que receberam dieta hiperlipídica promoveu maior ganho de peso no grupo HL em comparação aos demais grupos, sendo que a suplementação com fibras e com FOS reduziu o ganho de peso dos animais que consumiram dieta hiperlipídica. Apesar de não ter sido verificada diferença estatisticamente significativa no consumo calórico dos animais no segundo, terceiro e quarto mês, foi verificada na evolução de peso (Figura 1) que a partir da quinta semana experimental os grupos HL e HLF apresentaram pesos significativamente maiores que os demais grupos, sendo que no último dia de experimento o peso do grupo HLFOS não apresentou diferença estatística em relação aos três grupos que receberam dieta normolipídica (Tabela 3).

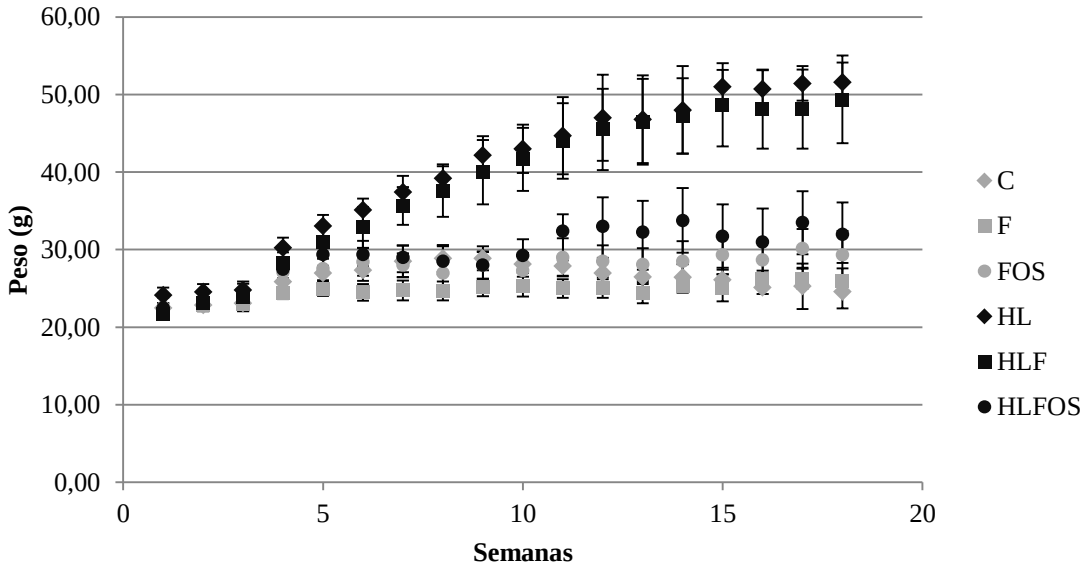

Figura 1. Evolução de peso dos grupos experimentais expresso em média e desvio padrão ao longo das semanas.
C – grupo controle; CF – grupo dieta normolipídica rica em fibras; FOS – grupo dieta normolipídica com FOS; HL – grupo dieta hiperlipídica; HLF – grupo dieta hiperlipídica rica em fibra; HLFOS – grupo dieta hiperlipídica com FOS. FOS – frutooligossacarídeos.

Tabela 2 – Comparação da média do consumo calórico mensal por animal de cada grupo experimental.

Consumo calórico	C	F	FOS	HL	HLF	HLFOS
1º Mês	83,71 ± 16,55 [a]	94,31 ± 18,39 [a,b]	111,91 ± 30,46 [a,b,c]	134,23 ± 32,50 [b,c]	139,53 ± 29,28 [c]	131,02 ± 31,00 [b,c]
2º Mês	109,54 ± 20,84	123,68 ± 20,06	107,73 ± 23,69	110,98 ± 34,09	119,87 ± 38,00	86,59 ± 6,94
3º Mês	89,83 ± 25,01	95,87 ± 20,99	111,09 ± 26,50	106,44 ± 32,00	110,41 ± 14,86	104,36 ± 23,14
4º Mês	87,49 ± 18,05	89,94 ± 18,44	96,60 ± 39,55	99,07 ± 29,38	97,25 ± 16,10	97,00 ± 10,51

[a,b,c] Valores seguidos por letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa com $p<0,05$. C – grupo controle; CF – grupo dieta normolipídica rica em fibras; FOS – grupo dieta normolipídica com FOS; HL – grupo dieta hiperlipídica; HLF – grupo dieta hiperlipídica rica em fibra; HLFOS – grupo dieta hiperlipídica com FOS. FOS – frutooligossacarídeos.

Tabela 3 – Comparação do peso de cada grupo experimental durante os quatro meses.

Peso (g)	C	F	FOS	HL	HLF	HLFOS
1º Mês	24,72 ± 0,67 [a,c]	23,77 ± 0,68 [a]	25,66 ± 1,20 [c,d]	28,17 ± 0,72 [b]	26,55 ± 0,86 [d]	26,03 ± 1,03 [c,d]
2º Mês	28,41 ± 1,60 [a]	24,77 ± 1,00 [b]	27,92 ± 1,67 [a]	38,48 ± 1,85 [c]	36,50 ± 3,08 [c]	28,72 ± 1,74 [a]
3º Mês	27,38 ± 1,15 [a,c]	24,92 ± 1,19 [a]	28,23 ± 2,12 [a,c]	45,38 ± 4,70 [b]	44,41 ± 4,84 [b]	31,72 ± 3,38 [c]
4º Mês	25,72 ± 1,44 [a]	25,73 ± 1,17 [a]	29,17 ± 2,49 [a,c]	48,78 ± 5,92 [b]	48,05 ± 5,07 [b]	33,14 ± 4,36 [c]
Último dia	26,36 ± 3,41 [a]	27,10 ± 2,73 [a]	30,40 ± 3,41 [a]	48,33 ± 6,87 [b]	46,70 ± 7,53 [b]	31,89 ± 3,30 [a]

[a,b,c,d] Valores seguidos por letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa com $p<0,05$. C – grupo controle; CF – grupo dieta normolipídica rica em fibras; FOS – grupo dieta normolipídica com FOS; HL – grupo dieta hiperlipídica; HLF – grupo dieta hiperlipídica rica em fibra; HLFOS – grupo dieta hiperlipídica com FOS. FOS – frutooligossacarídeos.

Embora a dieta hiperlipídica enriquecida com FOS tenha proporcionado menor peso corporal e redução do tecido adiposo retroperitoneal em comparação aos grupos HL e HLF, não foi verificada diferença estatisticamente significativa com relação ao peso do tecido adiposo epididimal e à somatória dos tecidos adiposos analisados entre esses grupos (Tabela 4).

Apesar de não ter sido verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação à dosagem hepática de gordura ou de colesterol totais (Tabela 5), verificou-se que a oferta de FOS na dieta hiperlipídica promoveu menor peso do fígado (Tabela 4) e redução do grau de esteatose hepática (Tabela 6 e Figuras 2 e 3). Não foi identificada a presença de infiltrado inflamatório ou de corpúsculos de Mallory na análise histopatológica das lâminas do fígado.

Tabela 4 – Comparação do peso dos tecidos hepático e adiposo de cada grupo experimental.

	C	F	FOS	HL	HLF	HLFOS
Fígado (g)	0,93 ± 0,23 [a]	0,96 ± 0,28 [a]	1,14 ± 0,29 [a]	2,24 ± 0,71 [b]	1,84 ± 0,58 [b]	1,12 ± 0,15 [a]
Tecido Adiposo Epididimal (g)	0,27 ± 0,13 [a]	0,36 ± 0,12 [a]	0,54 ± 0,27 [a]	1,46 ± 0,33 [b]	1,51 ± 0,46 [b]	1,34 ± 0,67 [b]
Tecido Adiposo Retroperitoneal (g)	0,07 ± 0,05 [a]	0,10 ± 0,06 [a]	0,17 ± 0,14 [a,c]	1,02 ± 0,42 [b]	1,08 ± 0,41 [b]	0,54 ± 0,35 [c]
Razão Fígado/Peso	3,50 ± 0,55 [a]	3,49 ± 0,68 [a]	3,73 ± 0,77 [a,b]	4,53 ± 1,07 [b]	3,86 ± 0,77 [a,b]	3,52 ± 0,50 [a,b]
Soma dos Tecidos Adiposos (g)	0,34 ± 0,18 [a]	0,46 ± 0,16 [a]	0,71 ± 0,41 [a]	2,48 ± 0,63 [b]	2,59 ± 0,71 [b]	1,88 ± 1,02 [b]
Razão da Soma dos Tecidos Adiposos/Peso dos animais	1,32 ± 0,74 [a]	1,73 ± 0,58 [a]	2,26 ± 1,08 [a]	5,14 ± 1,14 [b]	5,55 ± 1,35 [b]	5,88 ± 3,04 [b]

[a,b,c] Valores seguidos por letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa com $p<0,05$. C – grupo controle; CF – grupo dieta normolipídica rica em fibras; FOS – grupo dieta normolipídica com FOS; HL – grupo dieta hiperlipídica; HLF – grupo dieta hiperlipídica rica em fibra; HLFOS – grupo dieta hiperlipídica com FOS. FOS – frutooligossacarídeos.

Tabela 5 – Perfil lipídico hepático dos grupos experimentais.

	C	F	FOS	HL	HLF	HLFOS
Gordura total (g/g Tecido)	0,37 ± 0,04	0,43 ± 0,20	0,36 ± 0,05	0,53 ± 0,22	0,39 ± 0,06	0,39 ± 0,03
Colesterol Total (mg/g Gordura Total)	9,47 ± 1,53	7,70 ± 2,36	8,18 ± 2,05	8,62 ± 0,88	8,41 ± 1,26	7,70 ± 1,06
Triglicerídeos (mg/g Gordura Total)	72,81 ± 54,06 [a,b]	33,05 ± 43,16 [a]	39,14 ± 20,44 [a]	184,76 ± 104,33 [b]	130,24 ± 85,93 [a,b]	77,59 ± 36,89 [a,b]

[a,b] Valores seguidos por letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa com $p<0,05$. C – grupo controle; CF – grupo dieta normolipídica rica em fibras; FOS – grupo dieta normolipídica com FOS; HL – grupo dieta hiperlipídica; HLF – grupo dieta hiperlipídica rica em fibra; HLFOS – grupo dieta hiperlipídica com FOS. FOS – frutooligossacarídeos.

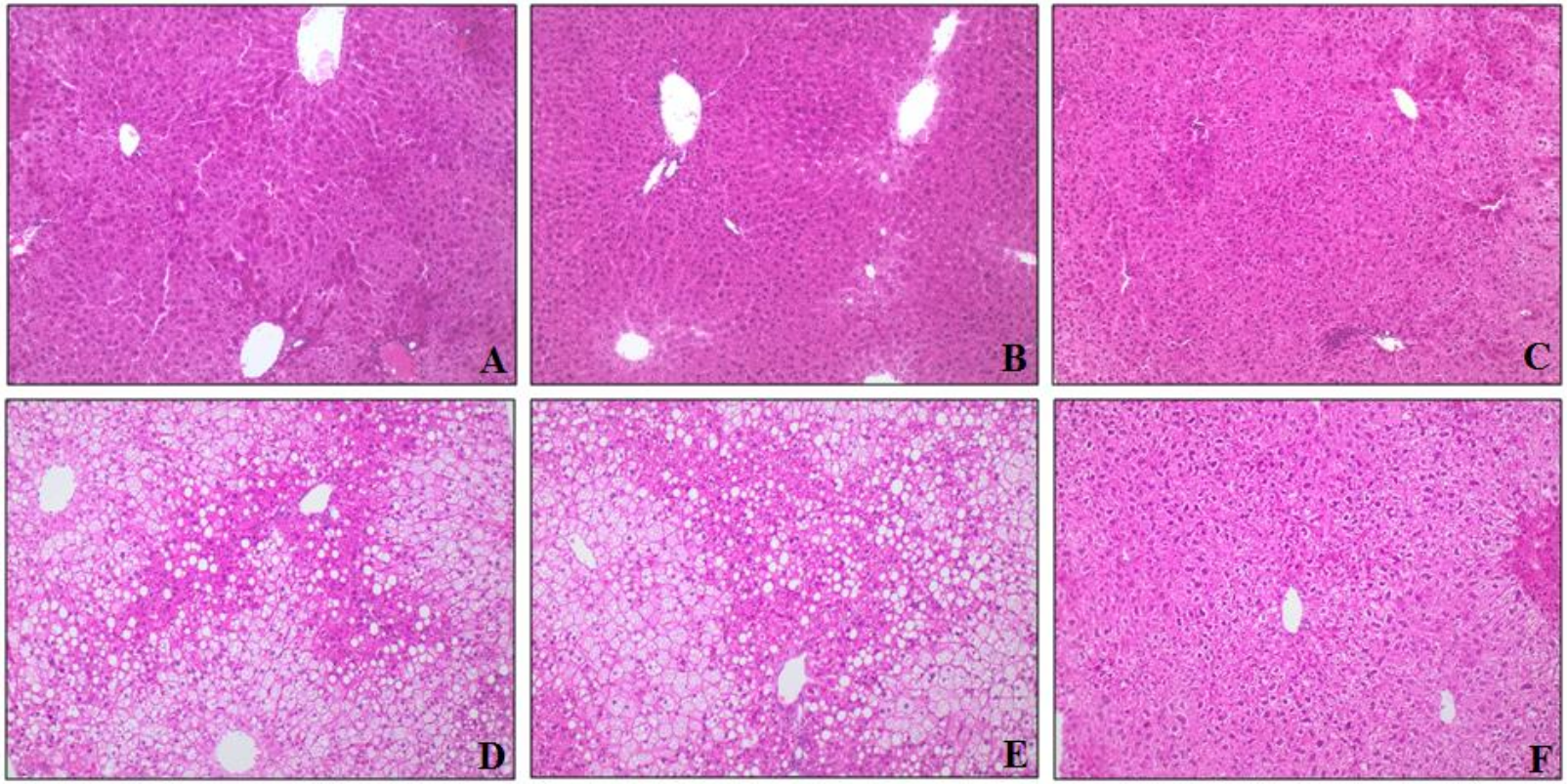

Figura 2. Corte histológico do fígado corado com Hematoxilina de Harris e Eosina e no aumento original de 20 vezes. A = Controle; B = Controle rico em fibras; C = Controle suplementado com frutooligossacarídeos; D = Hiperlipídica controle; E = Hiperlipídica rica em fibras; F = Hiperlipídica suplementada com frutooligossacarídeos.

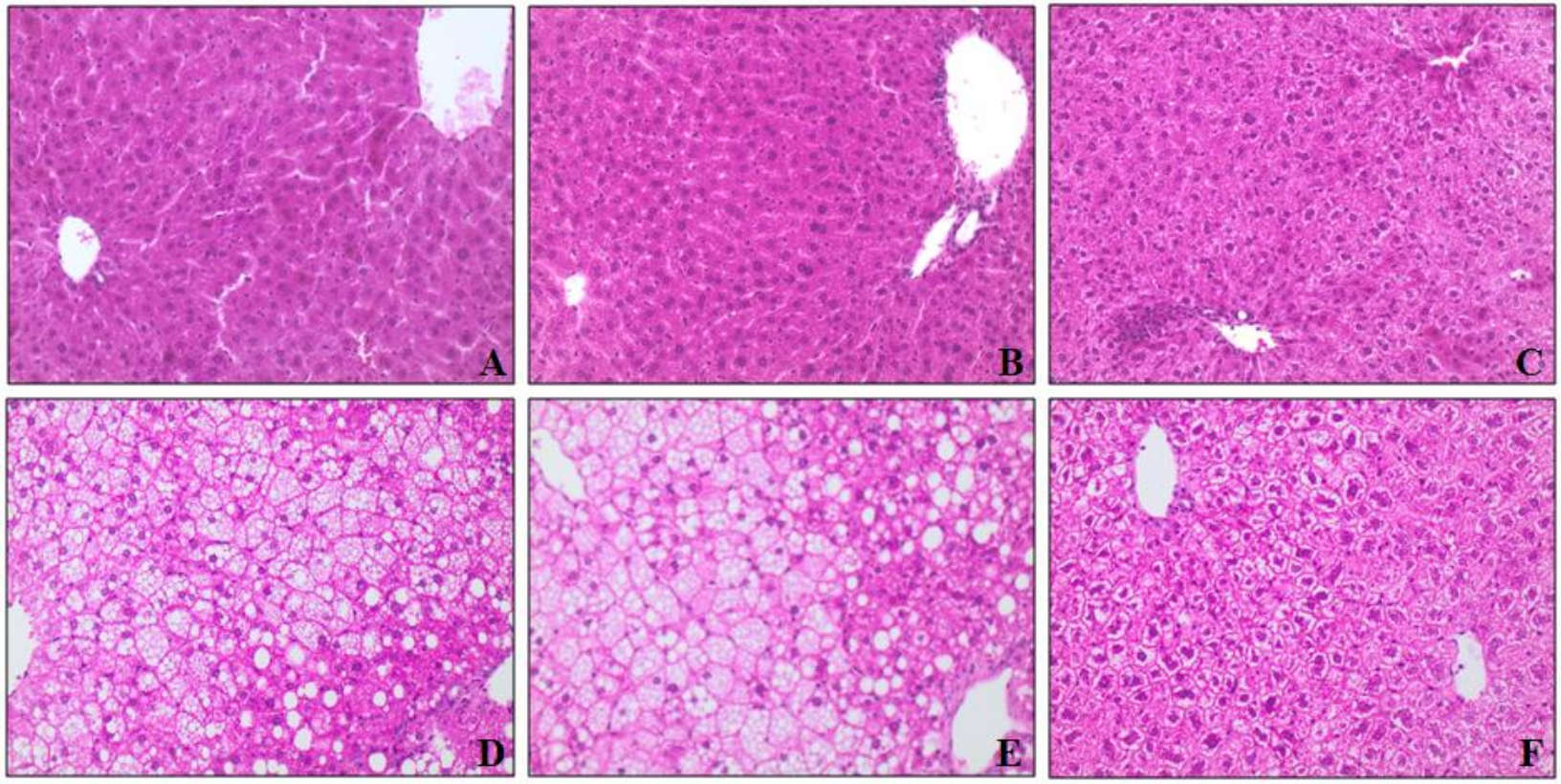

Figura 3. Corte histológico do fígado corado com Hematoxilina de Harris e Eosina e no aumento original de 40 vezes. A = Controle; B = Controle rico em fibras; C = Controle suplementado com frutooligossacarídeos; D = Hiperlipídica controle; E = Hiperlipídica rica em fibras; F = Hiperlipídica suplementada com frutooligossacarídeos.

Tabela 6 – Análise do grau de esteatose hepática dos grupos experimentais.

	C	F	FOS	HL	HLF	HLFOS
Nenhuma Cruz (Sem esteatose)	100%	100%	100%	0%	0%	56%
1 Cruz (1 - 25% apenas na zona 3)	0%	0%	0%	0%	0%	44%
2 Cruzes (25 - 50% apenas na zona 3)	0%	0%	0%	0%	11%	0%
3 Cruzes (50 - 75% nas zonas 2 e 3)	0%	0%	0%	100%	89%	0%
4 Cruzes (75 - 100% nas zonas 1, 2 e 3)	0%	0%	0%	0%	0%	0%

C – grupo controle; CF – grupo dieta normolipídica rica em fibras; FOS – grupo dieta normolipídica com FOS; HL – grupo dieta hiperlipídica; HLF – grupo dieta hiperlipídica rica em fibra; HLFOS – grupo dieta hiperlipídica com FOS. FOS – frutooligossacarídeos.

Com relação às dosagens séricas, não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de AST e de triglicerídeos, assim como na razão AST/ALT e na CAT. Verificou-se que a dieta hiperlipídica promoveu maior glicemia de jejum em comparação às dietas normolipídicas, não sendo observadas diferenças estatísticas com a suplementação de fibras ou de FOS. A dosagem de ALT foi significativamente maior nos grupos HL e HLF em comparação com os grupos C e F, sendo que a suplementação com FOS na dieta hiperlipídica promoveu redução no valor de ALT de modo que não apresentasse diferença estatística quando comparado aos animais que receberam dieta normolipídica. Por fim, as dosagens de colesterol sérico também foram significativamente maiores nos grupos HL e HLF, sendo que a suplementação da dieta hiperlipídica com FOS reduziu o colesterol sérico de modo que não houvesse diferença deste com o grupo F (Tabela 7).

Tabela 7 – Comparação das dosagens séricas de glicemia de jejum, da aspartato aminotransferase (AST), da alanina aminotransferase (ALT), da Capacidade Antioxidante Total (CAT), do colesterol e dos triglicerídeos de acordo com o grupo experimental.

	C	F	FOS	HL	HLF	HLFOS
Glicemia de jejum (mg/dL)	124,36 ± 21,17 [a]	117,00 ± 15,42 [a]	131,00 ± 27,16 [a]	189,89 ± 29,42 [b]	177,90 ± 22,06 [b]	170,00 ± 35,00 [b]
AST (U/mL)	84,73 ± 32,48	70,49 ± 46,16	81,57 ± 25,44	80,71 ± 18,27	96,17 ± 15,92	75,82 ± 24,78
ALT (U/mL)	23,66 ± 5,74 [a]	22,08 ± 4,72 [a]	24,60 ± 4,44 [a,c]	38,80 ± 15,87 [b]	36,23 ± 12,88 [b,c]	25,08 ± 6,27 [a,c]
Razão AST/ALT	3,61 ± 1,17	3,13 ± 1,70	3,34 ± 0,90	2,34 ± 0,87	2,91 ± 0,94	3,03 ± 0,59
Colesterol sérico (mg/dL)	125,03 ± 28,90 [a]	133,33 ± 11,05 [a,c]	126,70 ± 30,02 [a]	284,88 ± 96,44 [b]	272,29 ± 62,57 [b]	202,17 ± 24,76 [c]
Triglicerídeos séricos (mg/dL)	85,24 ± 27,67	96,77 ± 34,71	82,95 ± 14,58	92,10 ± 29,84	99,09 ± 18,63	99,48 ± 18,44
CAT (µM)	2,26 ± 0,12	2,19 ± 0,05	2,25 ± 0,08	2,24 ± 0,09	2,22 ± 0,11	2,20 ± 0,13

[a,b,c] Valores seguidos por letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa com $p<0,05$. C – grupo controle; CF – grupo dieta normolipídica rica em fibras; FOS – grupo dieta normolipídica com FOS; HL – grupo dieta hiperlipídica; HLF – grupo dieta hiperlipídica rica em fibra; HLFOS – grupo dieta hiperlipídica com FOS. FOS – frutooligossacarídeos.

Houve um aumento significativo do MDA no grupo HLF quando comparado aos demais grupos que receberam dieta normolipídica. Já com relação aos parâmetros antioxidantes hepáticos, não foi observada diferença estatisticamente significativa nas dosagens de retinol, enquanto nas de α-tocoferol foi verificado que a dieta hiperlipídica promoveu redução desse antioxidante no fígado, sendo que a oferta de FOS promoveu uma tendência de aumento desse parâmetro nos animais que ingeriram dieta rica em gordura, mas sem relevância estatística. Por fim, a suplementação com celulose microcristalina e com FOS aumentou significativamente o α-tocoferol hepático nos grupos que receberam dieta normolipídica, sendo que o maior valor foi verificado no grupo F em comparação aos demais grupos experimentais (Tabela 8).

Tabela 8 – Análise hepática do malondialdeído (MDA), do retinol e do α-tocoferol de acordo com o grupo experimental.

	C	F	FOS	HL	HLF	HLFOS
MDA (µmol/g Proteína)	1,65 ± 0,56 [a]	1,65 ± 0,25 [a]	1,42 ± 0,34 [a]	2,10 ± 0,69 [a,b]	2,65 ± 0,82 [b]	1,90 ± 0,57 [a,b]
α-Tocoferol (nmol/ g tecido)	101,69 ± 46,16 [a]	218,97 ± 42,65 [b]	160,13 ± 57,04 [c]	34,33 ± 31,63 [d]	28,81 ± 24,29 [d]	90,60 ± 18,48 [a,d]
Retinol (nmol/ g tecido)	71,35 ± 41,99	58,30 ± 28,19	86,77 ± 55,02	42,05 ± 10,98	44,90 ± 16,57	63,37 ± 20,04
Razão α-Tocoferol/ MDA	0,33 ± 0,13 [a,c]	1,05 ± 0,51 [b]	0,59 ± 0,23 [a]	0,12 ± 0,12 [c]	0,11 ± 0,10 [c]	0,35 ± 0,13 [a,c]

[a,b,c] Valores seguidos por letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa com $p<0,05$. C – grupo controle; CF – grupo dieta normolipídica rica em fibras; FOS – grupo dieta normolipídica com FOS; HL – grupo dieta hiperlipídica; HLF – grupo dieta hiperlipídica rica em fibra; HLFOS – grupo dieta hiperlipídica com FOS. FOS – frutooligossacarídeos.

A análise histológica do cólon verificou que o maior diâmetro total da luz intestinal ocorreu no grupo HL, seguido pelo grupo HLF e depois pelo HLFOS, sendo que o menor valor do diâmetro foi encontrado nos animais dos grupos C e FOS, que não apresentaram diferença estatística entre si. Já a espessura muscular intestinal apresentou diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos, sendo que a menor espessura foi encontrada no grupo HL, seguido pelo HLF e depois pelo F; a suplementação com FOS aumentou a espessura da musculatura intestinal nos animais que receberam dieta hiperlipídica, mas reduziu naqueles que consumiram dieta normolipídica (Tabela 9 e Figura 4).

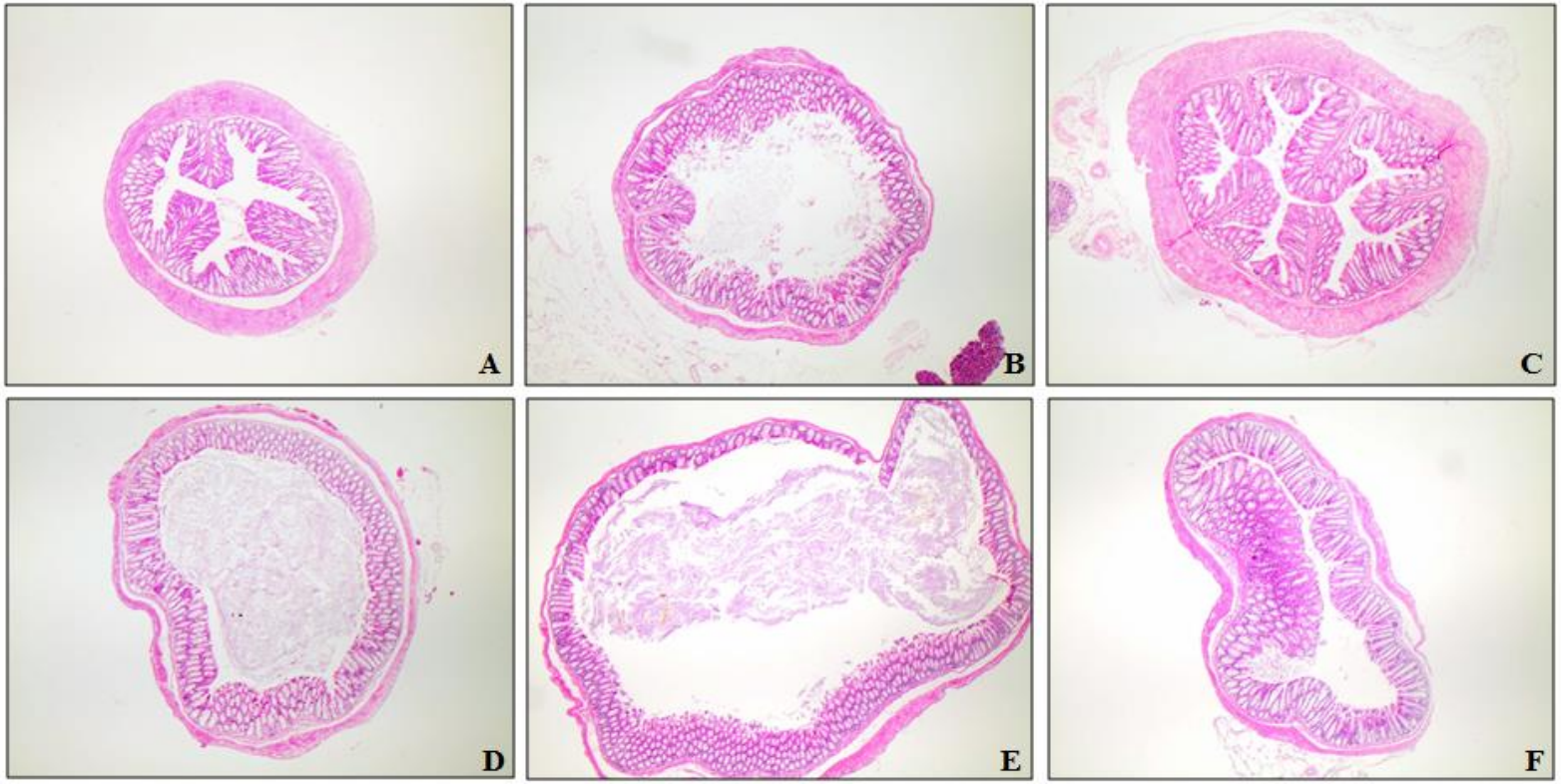

Figura 4. Corte histológico do intestino corado com Hematoxilina de Harris e Eosina e no aumento original de 20 vezes.
A = Controle; B = Controle rico em fibras; C = Controle suplementado com frutooligossacarídeos; D = Hiperlipídica controle; E = Hiperlipídica rica em fibras; F = Hiperlipídica suplementada com frutooligossacarídeos.

Tabela 9 – Comparação do diâmetro total da luz intestinal e da espessura muscular intestinal de acordo com o grupo experimental.

	C	F	FOS	HL	HLF	HLFOS
Diâmetro total da luz intestinal (µm)	555,22 ± 16,94 [a]	618,04 ± 20,43 [b]	554,67 ± 8,48 [a]	846,81 ± 7,82 [c]	718,46 ± 6,78 [d]	668,37 ± 10,60 [e]
Espessura muscular intestinal (µm)	59,04 ± 1,80 [a]	28,58 ± 1,33 [b]	54,76 ± 1,46 [c]	8,51 ± 0,51 [d]	23,32 ± 1,44 [e]	41,70 ± 0,72 [f]

[a,b,c,d,e,f] Valores seguidos por letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa com $p<0,05$. C – grupo controle; CF – grupo dieta normolipídica rica em fibras; FOS – grupo dieta normolipídica com FOS; HL – grupo dieta hiperlipídica; HLF – grupo dieta hiperlipídica rica em fibra; HLFOS – grupo dieta hiperlipídica com FOS. FOS – frutooligossacarídeos.

A análise dos ácidos graxos de cadeia curta das fezes não encontrou diferença estatisticamente significativa nas análises dos ácidos propiônico, butírico e valérico. Entretanto, verificou-se que a suplementação com celulose microcristalina desempenhou efeitos opostos na concentração de ácido acético dependendo do teor lipídico da dieta. Já com relação aos ácidos isobutírico e isovalérico foi observado que o grupo HLFOS apresentou concentrações significativamente menores em comparação ao grupo F, sendo que no caso do isobutírico essa diferença se estendeu ao grupo C (Tabela 10).

Tabela 10 – Comparação das concentrações de ácidos graxos de cadeia curta analisados nas fezes de acordo com o grupo experimental.

	C	F	FOS	HL	HLF	HLFOS
Ácido Acético	61,66 ± 7,75 [a,b]	52,03 ± 7,59 [a]	57,33 ± 6,11 [a,b]	60,87 ± 6,80 [a,b]	63,96 ± 3,53 [b]	56,77 ± 12,43 [a,b]
Ácido Propiônico	15,10 ± 2,85	14,42 ± 2,14	17,27 ± 3,24	14,48 ± 3,37	14,57 ± 3,13	13,46 ± 4,27
Ácido Isobutírico	2,07 ± 0,77 [a]	2,03 ± 0,79 [a]	1,77 ± 0,67 [a,b]	1,87 ± 0,64 [a,b]	1,63 ± 0,57 [a,b]	1,00 ± 0,42 [b]
Ácido Butírico	15,83 ± 9,83	23,82 ± 9,36	17,89 ± 11,40	15,92 ± 5,82	13,57 ± 4,28	23,76 ± 9,57
Ácido Isovalérico	3,08 ± 1,24 [a,b]	4,25 ± 2,02 [a]	3,13 ± 1,30 [a,b]	3,80 ± 1,04 [a,b]	3,60 ± 0,53 [a,b]	2,30 ± 1,03 [b]
Ácido Valérico	2,25 ± 0,60	3,43 ± 1,44	2,60 ± 0,87	3,05 ± 0,74	2,67 ± 0,54	2,70 ± 0,97

[a,b] Valores seguidos por letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa com $p<0,05$. C – grupo controle; CF – grupo dieta normolipídica rica em fibras; FOS – grupo dieta normolipídica com FOS; HL – grupo dieta hiperlipídica; HLF – grupo dieta hiperlipídica rica em fibra; HLFOS – grupo dieta hiperlipídica com FOS. FOS – frutooligossacarídeos.

5. DISCUSSÃO

A dieta hiperlipídica utilizada no presente estudo foi efetiva na indução da obesidade e da SM em camundongos C57BL, visto que, em comparação ao grupo C, o HL apresentou maior peso corporal, acúmulo de tecido adiposo, aumento da glicemia de jejum e dislipidemia, além de EHNA. Embora a esteatose hepática não faça parte dos critérios diagnósticos da SM, a sua presença aumenta muito o risco de um evento cardiovascular em indivíduos portadores da síndrome metabólica (LUNA-LUNA et al., 2015). O presente estudo avaliou os efeitos em longo prazo da suplementação de 15% de FOS comparada a de 15% de celulose microcristalina em modelos experimentais animais com obesidade e SM induzidas por dieta hiperlipídica, assim como em animais recebendo dieta normolipídica, a fim de verificar os benefícios desse prebiótico na composição corporal, nos parâmetros metabólicos e na produção de ácidos graxos de cadeia curta das fezes.

Apesar de a suplementação com FOS não ter interferido no consumo calórico mensal independente do teor lipídico da dieta, a partir da quinta semana experimental, foi verificado menor peso dos animais que receberam dieta hiperlipídica com FOS (HLFOS), sendo que ao final das dezoito semanas o peso do grupo HLFOS se igualou ao dos grupos que receberam dieta normolipídica, o que não foi observado com a dieta enriquecida com celulose microcristalina. Além disso, houve redução do peso do tecido adiposo retroperitoneal no grupo HLFOS em comparação aos demais grupos que receberam dieta hiperlipídica. Já com relação à oferta de altas doses de FOS ou de celulose nos grupos recebendo dieta normolipídica, não houve diferença estatisticamente significativa no peso final ou na composição corporal dos animais. Esses achados são condizentes com os encontrados por Everard et al (2011), no qual a oferta de oligofrutose (0,3 g/animal/dia) por oito semanas promoveu redução da taxa de adiposidade e do peso corporal em camundongos C57BL/6J com obesidade e DM2 induzidas por dieta hiperlipídica. Entretanto, o mesmo não ocorreu com o estudo de Liu et al (2016), que teve duração de quatro semanas e comparou os efeitos da suplementação com celulose (5 e 10%) e com 10% de scFOS (*short-chain fructooligosaccharides*) em camundongos C57BL/6J com obesidade induzida pela dieta hiperlipídica. Neste experimento houve maior ingestão alimentar no grupo rico em celulose, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação ao peso final dos animais, apesar de ter sido observado menor ganho de peso no grupo rico em celulose comparado ao grupo que recebeu scFOS (LIU et al., 2016). Já em estudo recente com duração de quatro semanas, Mao et al. (2018) verificaram redução do peso corporal em

camundongos recebendo dieta normolipídica rica em FOS (25%), mas o mesmo não foi constatado nos animais que receberam apenas 5% desse prebiótico. Por fim, em experimento com camundongos C57BL/6J germ-free inoculados com a microbiota de um indivíduo adulto saudável, Respondek et al (2013) verificaram que a oferta da dieta hiperlipídica suplementada com 10% scFOS reduziu o peso corporal e a ingestão alimentar dos animais, mas sem interferir na quantidade de tecido adiposo epididimal.

Os benefícios do FOS na redução do ganho de peso podem ser decorrentes da produção de AGCC a partir das bactérias intestinais, visto que Lu et al (2016) verificaram que a oferta em longo prazo de dieta hiperlipídica suplementada com 5% dos principais AGCC, isolados ou misturados, estimulou a adipogênese bege, aumentando a oxidação de gordura e o gasto energético mediado pela ativação de GPR43 e de GPR41. Além disso, os AGCC também estão relacionados ao aumento da concentração plasmática de PYY (Peptídeo YY), que é um hormônio peptídico intestinal secretado no período pós prandial e que diminui a motilidade intestinal e exerce efeitos anorexígenos tanto em indivíduos eutróficos como em obesos (KOH et al., 2016; BATTERHAM et al., 2003). A divergência de achados com relação aos efeitos do FOS no consumo alimentar e na composição corporal pode ser explicada pelas diferentes metodologias encontradas seja com relação à duração do experimento, ao tipo de dieta ou à quantidade de FOS.

Os grupos que receberam dieta normolipídica não apresentaram alteração no peso do fígado, nas enzimas hepáticas ou desenvolvimento de EHNA, sendo que a suplementação com FOS ou com celulose não influenciaram esses resultados. Já os animais que receberam dieta hiperlipídica tiveram maior peso hepático, presença de esteatose hepática e aumento da ALT, de modo que a oferta de FOS em longo prazo preveniu o desenvolvimento de EHNA e reduziu o peso hepático e os níveis de ALT, enquanto o mesmo não foi observado nos animais que receberam dieta hiperlipídica com altas doses de celulose. Esses resultados foram condizentes com os encontrados por Matsumoto et al (2017) em camundongos C57BL com EHNA induzida por dieta deficiente em colina, nos quais a oferta de 5% de FOS por 3 semanas melhorou os parâmetros hepáticos com redução nos níveis de ALT, assim como no grau de esteatose, na presença de inflamação e de balonização hepáticas. Matsumoto et al (2017) verificaram que a prevenção da EHNA pelo FOS esteve associada à diminuição da permeabilidade intestinal, ao aumento da produção de IgA (Imunoglobulina A) e da contagem de *Lactobacillales spp.* e à produção de AGCC pelas bactérias intestinais.

Em revisão de Aron-Wisnewsky et al (2013), concluiu-se que microbiota intestinal pode promover a EHNA, assim como a progressão para esteato-hepatite, através da alteração da

permeabilidade intestinal, da inflamação sub clínica crônica e do equilíbrio imunológico, modulando o metabolismo da colina dietética, regulando o metabolismo do ácido biliar e produzindo etanol endógeno. A modulação da microbiota intestinal parece ser uma direção promissora para o tratamento da EHNA (ZHU; BAKER; BAKER, 2015). A produção de AGCC pelas bactérias intestinais desempenha papel importante na saúde hepática, visto que de um lado contribui para o aumento da absorção intestinal e, consequentemente, da ingestão calórica, e de outro suprime a inflamação do cólon via ativação do GPR43, protegendo o fígado contra componentes tóxicos advindos pela veia porta (ZHU; BAKER; BAKER, 2015). A ativação do GPR43 pelos AGCC também contribui para a saúde do fígado ao regular negativamente a sinalização da insulina no tecido adiposo (ZHU; BAKER; BAKER, 2015). Ademais, quando foram analisados os efeitos dos AGCC isolados, verificou-se que o propionato desempenha papel importante na redução de triglicerídeos hepáticos e na diminuição de distúrbios metabólicos associados à obesidade (WEITKUNAT et al., 2016). Associado a isso, os AGCC proporcionam aumento na concentração plasmática de GLP-1 (*Glucagon Like Peptide-1*), que é uma incretina produzida pelas células enteroendócrinas do trato gastrointestinal inferior que tem apresentado efeitos terapêuticos na prevenção e tratamento de distúrbios metabólicos, como DM2 e EHNA, através da modulação de micro RNA (KOH et al., 2016; CAPUANI et al., 2018). Dessa forma, os benefícios do FOS na esteatose hepática não alcoólica estariam relacionados a suas propriedades prebióticas, o que pode ser confirmado com os resultados do presente estudo, uma vez que a EHNA induzida pela dieta hiperlipídica só foi prevenida pela oferta de FOS, ao passo que a suplementação com celulose microcristalina, que não apresenta características prebióticas em animais monogástricos, não desempenhou os mesmos efeitos.

Era esperado no presente estudo que, além da redução do peso corporal, do tecido adiposo retroperitoneal e da EHNA, a oferta de FOS melhorasse a glicemia de jejum e os triglicerídeos séricos nos modelos experimentais animais de obesidade e SM, mas não houve diferença estatisticamente significativa nessas análises, sendo observada apenas redução do colesterol sérico no grupo HLFOS em comparação ao HL e ao HLF. Respondek et al (2013) também não verificaram melhora no teste de tolerância à glicose, nos níveis séricos de insulina ou na dosagem de triglicerídeos séricos em seu experimento com modelos experimentais animais recebendo dieta hiperlipídica e FOS. Já no estudo de Everard et al (2011), foi verificado que a oferta de oligofrutose modulou a microbiota intestinal de camundongos C57BL/6J com obesidade e DM2, melhorando a homeostase da glicose, a sensibilidade à leptina e a atividade celular enteroendócrina. Por fim, os grupos que

receberam dieta normolipídica apresentaram tendência de redução da glicemia de jejum com a dieta enriquecida com celulose e de diminuição dos triglicerídeos séricos com a suplementação com FOS, mas não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Esses achados foram condizentes com os de Mao et al. (2018), cuja oferta de FOS em uma dieta normolipídica não interferiu nos parâmetros bioquímicos séricos analisados, mesmo com a utilização de quantidades elevadas desse prebiótico.

O FOS contribui para a hipocolesterolemia através da redução da absorção de colesterol e aumento de sua excreção nas fezes, assim como, da produção de AGCC após fermentação bacteriana intestinal (COSTA et al., 2015). As fibras fermentáveis reduzem a captação do colesterol intestinal ao aumentar a viscosidade do trato digestivo e a espessura da camada não agitada entérica, que é composta por água, muco e glicocálix adjacente ao epitélio intestinal formando uma barreira à absorção de gorduras (COSTA et al., 2015). O presente estudo confirma os efeitos benéficos de doses elevadas de FOS na regulação do colesterol sérico em modelos animais de obesidade e SM, entretanto, o mesmo não foi confirmado com relação aos triglicerídeos sanguíneos.

Sabe-se que o aumento da permeabilidade da mucosa intestinal na obesidade desempenha papel importante na etiologia das morbidades relacionadas ao excesso de peso, uma vez que o intestino é a primeira linha de defesa do organismo à ingestão de agentes tóxicos, dentre eles o LPS, que tem capacidade de incitar uma resposta inflamatória vigorosa e desencadear resistência insulínica (SU, 2002; TSUKUMO et al., 2007; BRUN et al., 2007). Liu et al (2016) concluíram que a suplementação com frutanos pode ser uma estratégia para melhora da saúde gastrointestinal de indivíduos obesos, uma vez que foi observada melhora da integridade intestinal, assim como mudanças positivas na microbiota intestinal, ao promover o aumento de bactérias dos gêneros *Akkermansia* e *Lactobacillus*. A *Akkermansia muciniphila* está associada à melhora de parâmetros metabólicos como: glicemia de jejum, tecido adiposo visceral, triglicerídeos séricos e inflamação sistêmica (DAO et al., 2016; ROOPCHAND et al, 2015). O consumo de FOS parece exercer benefícios ao metabolismo glicêmico, sendo que a produção de AGCC também desempenha importante papel nesse contexto (COSTA; GUIMARÃES; SAMPAIO, 2012; WEITKUNAT et al., 2016). O acetato beneficia a homeostase da glicose e a sensibilidade à insulina ao reduzir os ácidos graxos livres do plasma, que estão relacionados à menor utilização de glicose pelos tecidos periféricos e à maior resistência insulínica (COSTA; GUIMARÃES; SAMPAIO, 2012). Aliado a isso, evidências sugerem que o propionato melhora a sensibilidade à insulina através do estímulo à gliconeogênese intestinal (WEITKUNAT et al., 2016). Entretanto, o presente

estudo não pôde confirmar os benefícios do FOS na melhora da glicemia de jejum e/ou dos níveis séricos de triglicerídeos.

Considerando que o estresse oxidativo promovido pelo aumento de ácidos graxos no fígado é um fator importante na patogênese da esteato-hepatite não alcóolica decorrente da EHNA, faz se necessário o desenvolvimento de alvos terapêuticos que possam atuar nessa via. Vitaminas com propriedades antioxidantes desempenham benefícios significativos à saúde ao diminuir os níveis de espécies reativas de oxigênio e prevenir os danos oxidativos na célula, que podem acarretar em senescência celular e apoptose (PERUMPAIL et al., 2018). Nesse contexto, o α-tocoferol surge como uma opção terapêutica para o tratamento e prevenção da esteato-hepatite não alcoólica (PERUMPAIL et al., 2018). Baseado nisso, o presente estudo avaliou os efeitos do FOS nos níveis hepáticos dessa vitamina, com intuito de verificar se a preservação desse antioxidante estaria relacionada à melhora da saúde hepática. Apesar de a suplementação com altas doses de FOS ter promovido preservação do α-tocoferol hepático no grupo que recebeu dieta normolipídica, o mesmo não foi comprovado no grupo HLFOS, no qual houve uma tendência de aumento na dosagem dessa vitamina hepática, mas sem diferença estatisticamente significativa. Entretanto, a preservação do α-tocoferol hepático nos animais que receberam dieta normolipídica foi significativamente maior quando houve a suplementação de celulose microcristalina ao invés de FOS, enquanto nos animais que ingeriram dieta rica em gordura, nenhuma das duas fibras promoveu preservação significativa de vitamina E hepática, embora o grupo HLFOS tenha tido valores maiores desse antioxidante. Por fim, o grupo HLF apresentou aumento da dosagem de MDA do fígado, o que indica maior estresse oxidativo e maior predisposição a esteato-hepatite não alcoólica. Concluiu-se que a oferta de celulose microcristalina ou de FOS, em uma dieta normolipídica, foi eficaz na preservação da vitamina E hepática, mas não foi possível associar o aumento desse antioxidante a uma redução do estresse oxidativo. Ademais, o aumento não significativo do α-tocoferol hepático no grupo HLFOS impossibilita a confirmação de que a vitamina E desempenhe papel central na prevenção da EHNA observada nesse grupo, fazendo com que novos estudos sejam realizados para investigar melhor essa associação, analisando outros mecanismos que possam interferir nesses resultados.

A obesidade está associada a um estado inflamatório sub clínico crônico, sendo que a análise da peroxidação lipídica indicou que a oferta de dieta hiperlipídica promoveu uma tendência de aumento nos níveis de MDA hepático. Era esperado que a suplementação com FOS promovesse redução do MDA e melhora dos parâmetros antioxidantes analisados, visto que os AGCC, produzidos a partir de fibras fermentáveis pela microbiota intestinal, estão

relacionados à inibição da inflamação crônica e à melhora da hidrólise de triglicerídeos e da oxidação de ácidos graxos livres, que estiveram associadas ao aumento na expressão da lipase hormônio sensível (LU et al., 2016). O presente estudo não encontrou alteração da capacidade antioxidante total entre os grupos, sendo que a oferta de FOS não interferiu nas dosagens de MDA e de retinol hepáticos independente do teor lipídico da dieta. Com base nesses achados, não se pode concluir que a oferta de 15% de FOS, em longo prazo, melhorou o sistema antioxidante em modelos experimentais animais de obesidade e SM induzidas por dieta hiperlipídica.

A análise histológica do cólon demonstrou que a dieta hiperlipídica aumentou o diâmetro da luz intestinal e reduziu a espessura muscular entérica, ao passo que a suplementação com frutooligossacarídeos foi capaz de reverter essas alterações. Embora a oferta de FOS na dieta normolipídica não tenha alterado o diâmetro da luz intestinal em comparação ao grupo C, observou-se redução da musculatura entérica. Wedel et al (2006) demonstraram que distúrbios de motilidade colorretal grave, como o megacólon idiopático e a constipação de trânsito lento, estão associados a expressão deficiente de proteínas ligadas à contração do músculo liso intestinal. Em estudo de revisão, verificou-se que tanto o aumento como a diminuição da contratilidade do músculo liso estava presente na inflamação intestinal, sendo que a deficiência funcional das células da musculatura lisa pode ocorrer por mudança nas atividades de receptores muscarínicos como de canais iônicos (OHAMA; HORI; OZAKI, 2007). Dessa forma, a evidência de que fibras dietéticas fermentáveis influenciam na espessura muscular entérica e no diâmetro da luz intestinal, sugere que as alterações na saúde gastrointestinal não envolvem apenas a modulação da microbiota intestinal e a permeabilidade da mucosa.

Os principais AGCC produzidos pela fermentação das bactérias intestinais, ácidos propiônico, butírico e acético, exercem diferentes efeitos na motilidade do cólon, de modo que o ácido butírico estimula o movimento do conteúdo através do intestino, enquanto o propiônico retarda sua propulsão, promovendo a absorção (HURST et al., 2014). Ademais, em estudo recente, Blakeney et al (2018) comprovaram que o ácido isovalérico, resultante da fermentação de aminoácidos, atua em células da musculatura lisa do cólon de camundongos mediando o relaxamento do músculo intestinal. A motilidade colônica induzida pelos AGCC parece depender de um sistema intacto de relógio circadiano para manter a ritmicidade nas concentrações fecais de ácidos graxos de cadeia curta e seus efeitos funcionais (SEGERS et al., 2018). Apesar de a GPR43 ser importante mediadora entre hospedeiro e microbiota

intestinal, estudo in vitro concluiu que os AGCC modulam a motilidade intestinal de forma que pode ser independente dessa classe de receptores (DASS et al., 2007).

Em modelos animais experimentais de constipação, verificou-se que a suplementação com frutooligossacarídeos melhorou o tempo de trânsito intestinal, aumentou a proporção de acetato nas fezes, mas reduziu a de propionato e a de butirato, tendo estimulado o crescimento de *Lacobacillus* e *Bifidobacterium*, e diminuído o de *Odoribacter*, *Alistipes* e Bacteroides (WANG et al., 2017). Outro estudo observou aumento significativo da somatória de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes dos animais que receberam altas doses de FOS, mas não encontrou diferença estatística na análise individual dos AGCC, além disso, as altas doses de FOS estimularam o crescimento dos gêneros *Bifidobacterium*, *Coprococcus* e *Blautia*, enquanto baixas doses desse prebiótico aumentaram apenas a população de *Bifidobacterium* (MAO et al., 2018). Os autores encontraram ainda que dentre as espécies *Bifidobacterium* analisadas, houve aumento principalmente da *B. pseudolongum* (MAO et al., 2018). A oferta oral de *B. pseudolongum* em ratos esteve relacionada à melhora de marcadores de estresse oxidativo e à maior produção de muco intestinal, que é responsável por promover proteção às células epiteliais subjacentes contra danos oxidativos (MANGIN et al., 2018).

O efeito prebiótico do FOS é o responsável pela modulação da microbiota intestinal e pelas modificações nos AGCC; entretanto, mesmo com a oferta de doses elevadas desse prebiótico, o presente estudo não encontrou alterações significativas nas proporções dos ácidos acético, butírico ou propiônico nos grupos que receberam dieta enriquecida com FOS, sendo verificada apenas que o grupo HLFOS teve menores concentrações de ácido isobutírico em comparação com os grupos C e F e de isovalérico em comparação ao grupo F. A redução na proporção dos ácidos isobutírico e isovalérico provavelmente é decorrente da diminuição da fermentação de aminoácidos de cadeia ramificada valina e leucina (SMITH; MACFARLANE, 1997). Apesar de ter sido observada uma tendência na diminuição da proporção de ácido acético e no aumento de butírico com a suplementação de FOS, essas alterações não foram estatisticamente significativas. A ausência de relevância estatística nas análises de AGCC das fezes pode ser explicada pelo fato de terem sido coletadas amostras da porção final do cólon, onde a maior parte dos ácidos graxos de cadeia curta já foi utilizada pelas células do epitélio intestinal ou já foi absorvida (COSTA et al., 2015; KOH et al., 2016). Em revisão de Koh et al (2016) foram analisadas a biossíntese, a absorção e a distribuição de AGCC, concluindo que o butirato é utilizado localmente como fonte de energia pelos colonócitos, enquanto o propionato e o acetato são absorvidos pela circulação portal. O ácido acético é o mais abundante na circulação periférica sendo capaz de atravessar a barreira

hematoencefálica e reduzir o apetite através de um mecanismo homeostático central, enquanto o ácido propiônico é quase todo metabolizado pelo fígado (KOH et al., 2016). Os AGCC decorrentes da fermentação de fibras dietéticas pela microbiota intestinal estão relacionados à redução do ganho de peso e da ingestão calórica, à melhora da homeostase da glicose e ao aumento da concentração plasmática de PYY e de GLP-1 (KOH et al., 2016). Desse modo, é indispensável que sejam realizados novos estudos avaliando a concentração de AGCC em outros segmentos intestinais, na corrente sanguínea, assim como no fígado, para estabelecer correlações entre os benefícios observados com a suplementação de FOS e a utilização de AGCC tanto a nível local como periférico.

Apesar de bem documentados os benefícios do FOS na saúde gastrointestinal, um estudo recente apresentou resultados divergentes com modelos experimentais animais de síndrome do intestino irritável (SII) recebendo 8 g de FOS /kg de peso do animal/dia (CHEN et al., 2017). Chen et al (2017) não encontraram diferença estatisticamente significativa na produção de AGCC nos grupos controles sem SII recebendo esse prebiótico, enquanto os animais com SII suplementados com FOS apresentaram aumento na produção de ácidos acético, propiônico e butírico, assim como nos níveis de citocinas pró inflamatórias (IL-23 e IL-1β) e nas contagens de mastócitos no cólon e no íleo. Já em um estudo em humanos, o aumento da quantidade de AGCC nas fezes de indivíduos adultos foi associado à disbiose intestinal, ao excesso de adiposidade e a fatores de risco cardiometabólicos (CUESTA-ZULUAGA et al., 2018). Esses achados podem indicar que a piora dos parâmetros metabólicos e/ou inflamatórios seja decorrente da absorção e/ou da utilização menos eficientes dos AGCC.

A oferta de altas doses de FOS apresentou benefícios significativos em modelos animais experimentais de obesidade e SM induzidas por dieta hiperlipídica, mas o mesmo não foi observado nos grupos que receberam dieta normolipídica com FOS. Ademais, não foram encontrados sinais de toxicidade hepática ou piora dos parâmetros metabólicos decorrentes do uso de elevadas doses de frutooligossacarídeos, indicando que a quantidade utilizada em longo prazo não parece desencadear possíveis malefícios à saúde dos modelos animais deste experimento. Dessa forma, o presente estudo contribui para o desenvolvimento de novas pesquisas com FOS, seja para explorar os mecanismos pelos quais esse prebiótico exerce diferentes efeitos de acordo com o teor lipídico da dieta, seja para investir em protocolos experimentais que definam quantidades terapêuticas dos frutooligossacarídeos na prevenção e no tratamento da obesidade e da SM.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo verificou que a oferta em longo prazo de 15% de FOS promoveu a redução do peso corporal, do tecido adiposo retroperitoneal e do colesterol sérico e preveniu a EHNA em camundongos C57BL com obesidade e SM induzidas por dieta hiperlipídica. Entretanto, não se pôde concluir que a suplementação com FOS preveniu o desenvolvimento da síndrome metabólica visto que não houve melhora da glicemia de jejum e dos parâmetros antioxidantes analisados. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nas proporções dos três principais AGCC das fezes mesmo com a oferta de doses elevadas de FOS, o que indica que a maioria dos AGCC foi absorvida ou utilizada pelo trato gastrointestinal. Por fim, a oferta de FOS alterou o diâmetro da luz intestinal, da espessura da musculatura entérica e das concentrações de ácidos graxos de cadeia curta decorrentes da fermentação de aminoácidos de cadeia ramificada. As alterações encontradas na histologia intestinal sugerem que os benefícios do FOS na saúde gastrointestinal não se restringem à modulação da microbiota, reforçando a importância de novos estudos que investiguem os efeitos desse prebiótico a nível local, correlacionando-os com as alterações periféricas. O único benefício observado com as suplementações de FOS e de celulose microcristalina na dieta normolipídica foi a preservação da vitamina E hepática, que foi mais eficiente com a celulose. O presente estudo concluiu que, em longo prazo, as altas doses utilizadas não desencadearam sinais de toxicidade hepática ou piora dos parâmetros antioxidantes e bioquímicos analisados, sem indicação de possíveis malefícios à saúde dos modelos animais usados. Entretanto, são necessários mais experimentos avaliando a oferta, em longo prazo, de diferentes doses de FOS em modelos de obesidade e SM para consolidar e esclarecer os benefícios desse prebiótico na saúde humana e animal.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALBERTI, K.G. et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation**, v. 120, p. 1640-1645, 2009.

ANG, Z.; DING, J.L. GPR41 and GPR43 in Obesity and Inflammation - Protective or Causative? **Front. Immunol.**, Singapore, v. 7, p. 28, 2016.

ARON-WISNEWSKY, J. et al. Gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease: new insights. **Clin. Microbiol. Infect.**, France, v. 19, n. 4, p. 338 – 348, 2013.

ARNAUD, J. et al. Simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and beta-carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr**., Grenoble, v. 572, n. 1-2, p. 103-16, 1991.

BATTERHAM, R.L. et al. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. **N. Engl. J. Med.**, London, v. 349, n. 10, p. 941 – 948, 2003.

BLAKENEY, B.A. et al. Branched Short-Chain Fatty Acid Isovaleric Acid Causes Colonic Smooth Muscle Relaxation via cAMP/PKA Pathway. **Dig. Dis. Sci.**, USA, 2018.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, Canada, v. 37, n. 8, 1959.

BRAHE, L.K.; ASTRUP, A.; LARSEN, L.H. Can We Prevent Obesity-Related Metabolic Diseases by Dietary Modulation of the Gut Microbiota? American Society for Nutrition. **Advances in Nutrition**, Copenhagen, v. 7, p. 90–101, 2016.

BRUEWER, M. et al. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. **J. Immunol.**, Atlanta, v. 171, n. 11, p. 6164-72, 2003.

BRUN, P. et al. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, Padova, v. 292, n. 2, p. G518-25, 2007.

CAPUANI, B. et al. Glucagon Like Peptide 1 and MicroRNA in Metabolic Diseases: Focusing on GLP1 Action on miRNAs. **Front Endocrinol (Lausanne)**, Italy, v. 9, p. 719, 2018.

CHEN, B.R. et al. Fructo-oligosaccharide intensifies visceral hypersensitivity and intestinal inflammation in a stress-induced irritable bowel syndrome mouse model. **World J Gastroenterol**., China, v. 23, n. 47, p. 8321 – 8333, 2017.

COLLADO, M.C. et al. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. **Am J Clin Nutr**, Turku, v. 88, n. 4, p. 894-9, 2008.

CONTOS, M.J.; SANYAL, A.J. The clinicophathologic spectrum and mangement of nonalcoholic fatty liver disease. **Adv Anat Pathol**, Virginia, v.9, n. 1, p. 37-51, 2002.

COSTA, G.T.; GUIMARÃES, S.B.; SAMPAIO, H.A. Fructo-oligosaccharide effects on blood glucose: An overview. **Acta Cir. Bras.**, Brasil, v. 27, n. 3, p. 279–282, 2012.

COSTA, G.T. et al. Fructo-oligosaccharide effects on serum cholesterol levels. An overview. **Acta. Cir. Bras.**, Brasil, v. 30, n. 5, p. 366 – 370, 2015.

COTILLARD, A. et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. **Nature**, Paris, v. 500, n.7464, p. 585–8, 2013.

CUESTA-ZULUAGA, J. et al. Higher Fecal Short-Chain Fatty Acid Levels Are Associated with Gut Microbiome Dysbiosis, Obesity, Hypertension and Cardiometabolic Disease Risk Factors. **Nutrients**, Colombia, v. 11, n. 1, p. E51, 2018.

DAO, M.C. et al. Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. **Gut**, France, v. 65, n. 3, p. 426 – 436, 2016.

DASS, N.B. et al. The relationship between the effects of short-chain fatty acids on intestinal motility in vitro and GPR43 receptor activation. **Neurogastroenterol. Motil.**, UK, v. 19, n. 1, p. 66 – 74, 2007.

DELZENNE, N.M.; NEYRINCK AM, CANI PD. Gut microbiota and metabolic disorders: How prebiotic can work? **Br J Nutr**., Brussels, v. 109, 2013. Suppl 2:S81-5.

DREW, J.E. et al. Dietary fibers inhibit obesity in mice, but host responses in the cecum and liver appear unrelated to fiber-specific changes in cecal bacterial taxonomic composition. **Scientific Reports**, Aberdeen, v. 8, n.1, p. 15566, 2018.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidante capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry.**, Turkey, v. 37, n. 4, p. 277-285, 2004.

EVERARD, A. et al. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. **Diabetes**, Belgium, v. 60, p. 2775 – 2786, 2011.

GERARD-MONNIER D, et al. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. **Chem Res Toxicol.**, France, v. 11, n. 10, p. 1176-83, 1998.

GIBSON, G.R.; FULLER, R. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **J. Nutr.**, UK, v. 130, 2000. 2S Suppl. 391S–395S.

GROSCHWITZ, K.R.; HOGAN, S.P. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. **J Allergy Clin Immunol**, Ohio, v. 124, n. 1, p. 3–20, 2009.

GURMINI, J. et al. Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos *Wistar* ao nascimento e após a lactação**. J Bras Patol Med Lab**., Brasil, v. 41, n. 4, p. 271-278, 2005.

HESS, J.R. et al. Effects of short-chain fructooligosaccharides on satiety responses in healthy men and women. **Appetite**, USA, v. 56, n. 1, p. 128 – 134, 2011.

HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM NATURE. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207-14, 2012.

HURST, N.R. et al. The Short Chain Fatty Acids, Butyrate and Propionate, have Differential Effects on the Motility of the Guinea Pig Colon. **Neurogastroenterol. Motil.**, USA, v. 26, n. 11, p. 1586 – 1596, 2014.

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. **National Academy Press,** Washington (DC), p. 339-421, 2005.

JOHNSON, C.D. et al. Addition of fructooligosaccharides and dried plum to soy-based diets reverses bone loss in the ovariectomized rat. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, US, 2011.

JORDAO, A.A. JR. et al. Effect of an acute dose of ethanol on lipid peroxidation in rats: action of vitamin E. **Food Chem Toxicol.**, Brasil, v. 42, n. 3, p. 459-64, 2004.

KOH, A. et al. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. **Cell**, Sweden, v. 165, n. 6, p. 1332 – 1345, 2016.

KOLEVA, P.T. et al. Inulin and fructo-oligosaccharides have divergent effects on colitis and commensal microbiota in HLA-B27 transgenic rats. **Br. J. Nutr.**, Canada, v. 108, n. 9, p. 1633–1643, 2012.

KOPELMAN, P.G. Obesity as a medical problem. **Nature**, UK, v. 404, n. 6778, p. 635–43, 2000.

LAU, E.; CARVALHO, D.; FREITAS, P. Gut microbiota: Association with NAFLD and metabolic disturbances. **Bio Med Research International.**, Portugal, 2015.

LE CHATELIER, E. et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. **Nature**, France, v. 500, n. 7464, p. 541–6, 2013.

LECOMTE, V. et al. Changes in Gut Microbiota in Rats Fed a High Fat Diet Correlate with Obesity-Associated Metabolic Parameters. **PLoS ONE**, Sydney, v. 10, n. 5, 2015.

LEY, R.E. et al. Obesity alters gut microbial ecology. **Proc Natl Acad Sci U S A**, USA, v. 102, n. 31, p. 11070–5, 2005.

LIU, T.W. et al. Nondigestible Fructans Alter Gastrointestinal Barrier Function, Gene Expression, Histomorphology, and the Microbiota Profiles of Diet-Induced Obese C57BL/6J Mice. **J Nutr.**, Illinois, v. 146, n. 5, p. 949-956, 2016.

LOBO, A.R. et al. Fructo-oligosaccharides and iron bioavailability inanaemic rats: The effects on iron species distribution, ferroportin-1expression, crypt bifurcation and crypt cell proliferation in the caecum. **Br. J. Nutr.**, Brasil, v. 112, n.8, p. 1286–1295, 2014.

LU, Y. et al. Short Chain Fatty Acids Prevent High-fat-diet-induced Obesity in Mice by Regulating G Proteincoupled Receptors and Gut Microbiota. **Sci. Rep.**, China, v. 6, p. 37589, 2016.

LUNA-LUNA, M. et al. Adipose Tissue in Metabolic Syndrome: Onset and Progression of Atherosclerosis. **Archives of Medical Research**, Cidade do México, v. 46, n. 5, p. 392-407, 2015.

MAO, B. et al. Effects of different doses of fructooligosaccharides (FOS) on the composition of mice fecal microbiota, especially the *Bifidobacterium* composition. **Nutrients**, Beijing, v. 10, n. 8, 2018.

MANGIN, I. et al. Oral administration of viable Bifidobacterium pseudolongum strain Patronus modified colonic microbiota and increased mucus layer thickness in rat. FEMS Microbiol. Ecol., France, v. 94, n. 11, 2018.

MATSUMOTO, K. et al. Fructo-oligosaccharides and intestinal barrier function in a methionine-choline-deficient mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. **Plos One**, Kanagawa, v. 12, n. 6, 2017.

MCNABNEY, S.M.; HENAGAN, T.M. Short Chain Fatty Acids in the Colon and Peripheral Tissues: A Focus on Butyrate, Colon Cancer, Obesity and Insulin Resistance. **Nutrients**, USA, v. 9, n. 12, p. 1348, 2017.

MONTAGNE, L.; PLUSKE, J.R.; HAMPSON, D.J. A review of interactions between dietary fiber and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. **Anim. Feed Sci. Technol.**, France, v. 108, n. 1-4, p. 95–117, 2003.

OH, S.I. et al. Chronic ethanol consumption affects glutathione status in rat liver. **J Nutr.**, Korea, v. 128, n. 4, p. 758-63, 1998.

OHAMA, T.; HORI, M.; OZAKI, H. Mechanism of abnormal intestinal motility in inflammatory bowel disease: how smooth muscle contraction is reduced? **J. Smooth Muscle Res.**, v. 43, n. 2, p. 43 – 54, 2007.

ORAFIT® SIPX: inulina de chicória. Brasil: Beneo – Animal Nutrition, 2016. Bula de remédio. Disponível em: <http://www.alinat.cl/wp-content/uploads/2016/04/PS-Orafti-SIPX-F342-0712.pdf> Acesso em: 27 de dez de 2018.

PERUMPAIL, B.J. et al. The Role of Vitamin E in the Treatment of NAFLD. **Diseases**, USA, v. 6, n. 4, p. E86, 2018.

POWER, S.E. et al. Intestinal microbiota, diet and health. **Br J Nutr.**, Republic of Ireland, v. 111, n. 3, p. 387-402, 2014.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 A rodent diet. **J Nutr**., v. 123, n. 11, p. 1939-51, 1993.

RESPONDEK, F. et al. Short-Chain Fructo-Oligosaccharides Modulate Intestinal Microbiota and Metabolic Parameters of Humanized Gnotobiotic Diet Induced Obesity Mice. **Plos One**, Marseille, v. 8, n. 8, 2013.

ROOPCHAND, D.E. et al. Dietary Polyphenols Promote Growth of the Gut Bacterium Akkermansia muciniphila and Attenuate High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome. **Diabetes**, New Brunswick, v. 64, n. 8, p. 2847 – 2858, 2015.

SARAO, L. K.; ARORA, M. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. **Critical reviews in food Science and nutrition**, v. 57, n. 2, p. 344-371, 2017.

SCHWIERTZ, A. et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. **Obesity (Silver Spring)**, Germany, v. 18, n. 1, p. 190-5, 2010.

SEGERS, A. et al. The circadian clock regulates the diurnal levels of microbial short-chain fatty acids and their rhythmic effects on colon contractility in mice. **Acta. Physiol. (Oxf)**, Belgium, p. e13193, 2018.

SMITH, E.A.; MACFARLANE, G.T. Dissimilatory Amino Acid Metabolism in Human Colonic Bacteria. **Anaerobe**, UK, v. 3, n. 5, p. 327 – 337, 1997.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Brasil, v.84, 2005. Suplemento I.

STEWART, M.L.; TIMM, D.A.; SLAVIN, J.L. Fructooligosaccharides exhibit more rapid fermentation than long-chain inulin in an in vitro fermentation system. **Nutr Res**, USA, v. 28, n. 5, p. 329–34, 2008.

SU, G.L. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, USA, v. 283, n. 2, p. G256-65, 2002.

SUN, M. et al. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GCPR, and inflammatory bowel diseases. **J. Gastroenterol.**, USA, v. 52, n. 1, p. 1 – 8, 2017.

SURIANO, F. et al. Fat binding capacity and modulation of the gut microbiota both determine the effect of wheat bran fractions on adiposity. **Scientific Reports**, Belgium, v. 7, n. 5621, 2017.

TSUKUMO, D.M.L. et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes**, Brasil, v. 56, n. 8, p. 1986-98, 2007.

TURNBAUGH, P.J. et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, USA, v. 457, n. 7228, p. 480–4, 2009.

WANG, Y. et al. Laxative effect of fructooligosaccharide in mice and humans. **Curr. Top. Nutraceutical Res.**, China, v. 11, n. 1-2, p. 1–8, 2013.

WANG, Y. et al. Fructo-oligosaccharides enhance the mineral absorption and counteract the adverse effects of phytic acid in mice. **Nutrition**, China, v. 26, n. 3, p. 305–311, 2010.

WANG, L. et al. Effects of different oligosaccharides at various dosages on the composition of gut microbiota and short-chain fatty acids in mice with constipation. **Food Funct.,** v. 8, p. 1966–1978, 2017.

WEDEL, T. et al. Novel smooth muscle markers reveal abnormalities of the intestinal musculature in severe colorectal motility disorders. **Neurogastroenterol. Motil.**, Germany, v. 18, n. 7, p. 526 – 538, 2006.

WEITKUNAT, K. et al. Importance of propionate for the repression of hepatic lipogenesis and improvement of insulin sensitivity in high-fat diet-induced obesity. **Mol. Nutr. Food Res.**, Germany, v. 60, n. 12, p. 2611 – 2621, 2016.

WEITKUNAT, K. et al. Short-chain fatty acids and inulin, but not guar gum, prevent dietinduced obesity and insulin resistance through differential mechanisms in mice. **Sci. Rep.**, Germany, v. 7, n. 1, p. 6109, 2017.

WELLEN, K.E.; HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation, stress and diabetes. **J. Clin. Invest.**, USA, v. 115, n. 5, p. 1111–1119, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global health observatory (GHO) data – Overweight and Obesity. **WHO**, Genebra, 2018. Disponível em: <http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/> Acesso em: 18 jan. 2019.

XIAO J, METZLER-ZEBELI BU, ZEBELI Q. Gut Function-Enhancing Properties and Metabolic Effects of Dietary Indigestible Sugars in Rodents and Rabbits. **Nutrients**, Austria, v. 7, n. 10, p. 8348–65, 2015.

ZHAO, G.; NYMAN, M.; JONSSON, J.A. Rapid ldetermination of short chain fatty acids in colonic contentes and faeces of human and rats by acidified water extraction and direct injection gas chromatography. **Biomed. Chromatogr**., Sweden, v. 20, n. 8, p. 674-682, 2006.

ZHU, L.; BAKER, R.D.; BAKER,S.S. Gut microbiome and nonalcoholic fatty liver diseases. **Pediatr. Res.**, New York, v. 77, n. 1-2, p. 245 – 251, 2015.