

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE**

CACILDA ROCHA HILDEBRAND

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE FIBRAS SOBRE A INFLAMAÇÃO E
ESTEATOSE HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS *SWISS* ALIMENTADOS COM
DIETAS RICAS EM CARBOIDRATOS**

CAMPO GRANDE

2020

CACILDA ROCHA HILDEBRAND

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE FIBRAS SOBRE A INFLAMAÇÃO E
ESTEATOSE HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS *SWISS* ALIMENTADOS COM
DIETAS RICAS EM CARBOIDRATOS**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste/PPGSD, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/FUFMS, sob orientação da Prof^a Dr^a Andréia C. M. Brochado Antonioli Silva e co-orientação da Prof^a Dr^a Débora Marchetti Chaves Thomaz.

CAMPO GRANDE

2020

CACILDA ROCHA HILDEBRAND

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE FIBRAS SOBRE A INFLAMAÇÃO E
ESTEATOSE HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS *SWISS* ALIMENTADOS COM
DIETAS RICAS EM CARBOIDRATOS**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste/PPGSD, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/FUFMS, sob orientação da Prof^a Dr^a Andréia C. M. Brochado Antonioli Silva e co-orientação da Prof^a Dr^a Débora Marchetti Chaves Thomaz.

A banca examinadora, após avaliação do trabalho, atribuiu à candidata o conceito _____.

Campo Grande, 24 de março de 2020.

BANCA EXAMINADORA

NOTA/CONCEITO

Andréia C. M. Brochado Antonioli Silva – Faculdade de Medicina/FUFMS

Doroty Mesquita Dourado – UNIDERP

Elisvânia Freitas dos Santos - FACFAN/FUFMS

Wilson de Barros Cantero – FAMED/FUFMS

Adriana Conceição Guercio Menezes – InBio/FUFMS

Roberto Antonioli da Silva – FAMED/FUFMS

*Dedico este trabalho à minha família, especialmente aos meus pais e ao meu esposo,
que além de significarem muito amor, respeito e fortaleza em minha vida,
sempre me incentivaram a fazer o meu melhor, por onde eu fosse ou no que eu fizesse.
Meu eterno amor e admiração por eles.*

AGRADECIMENTOS

Quatro anos...

E aqui cheguei. Mas não cheguei sozinha!

*Quero agradecer a todos os que estiveram ao meu lado nesta caminhada,
que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste sonho.*

*Meus sinceros agradecimentos à Deus, o qual me permite acordar todos os dias, grata por
tudo o que tenho e sempre acreditando em dias melhores.*

*Aos meus pais, Sr. Orestes e Sra. Silvana, por tudo! Pelo incentivo em todos os momentos,
pelos ensinamentos, lições de vida, cuidados, dedicação e amor.*

Tenho muita sorte e orgulho em tê-los como meus pais.

*Ao meu esposo Henrique, por todo o carinho, paciência, amor e apoio incondicional. Ele faz
muito mais do que me incentivar. Ele me impulsiona para alcançar todos os meus sonhos!*

*À minha Orientadora e amiga Andréia Antonioli, por me motivar e fazer acreditar que tudo é
possível. Um exemplo de simplicidade, humildade, otimismo e força de vontade.*

*À minha Co-orientadora e amiga Débora Thomaz um exemplo de ser humano, espírito de luz,
que me ensina e me inspira a ser uma pessoa mais amorosa, bondosa, resiliente e paciente.*

*À Prof^a Dra. Rita de Cássia Avellaneda Guimarães, pelo seu amor e dedicação em ensinar,
pelo apoio em diversos momentos da minha vida profissional.*

*À minha amiga Amariles Diniz Ramires, parceira de horas, dias e meses de experimento.
Sua experiência e incentivo foram fundamentais à concretização deste estudo.*

Minha grande parceira.

*À toda a equipe do Inbio/UFMS, Laboratório de Imunologia e Análises Clínicas da UFMS,
as quais não mediram esforços para apoio e operacionalização deste estudo.*

*Não posso deixar de agradecer ainda, aos animais envolvidos neste estudo, sem os quais esta
tese não seria possível. Meu profundo respeito.*

“Somos seres desejantes destinados a incompletude. E é isso que nos faz caminhar”

Jacques Lacan

RESUMO

Introdução: A alimentação pode atuar de forma preventiva ou como fator desencadeante para muitas doenças crônicas não transmissíveis/DCNT. Diante da relação destas doenças com a alimentação e a inflamação, diferentes proporções de macronutrientes da dieta podem estimular distúrbios metabólicos e inflamatórios, especialmente relacionados ao alto consumo de carboidratos. Além dos malefícios de uma dieta rica em carboidratos, o efeito terapêutico das fibras deve ser melhor elucidado, tendo modelos animais de doença assumida relevância nesta investigação. **Objetivo:** Avaliar o efeito da suplementação de fibras sobre a inflamação e esteatose hepática em camundongos *Swiss* alimentados com dietas ricas em carboidratos. **Material e Métodos:** Estudo experimental de 16 semanas, realizado com 32 camundongos *Swiss*, machos, de 60 dias de idade, distribuídos em 4 grupos experimentais, os quais receberam um dos 2 tipos de rações isocalóricas elaboradas: dieta amido (55%) e dieta frutose (55%). Nas últimas 4 semanas do experimento, foi realizada suplementação de fruto-oligossacarídeo/FOS a 5% por gavagem. Após a eutanásia dos animais, foram realizadas análises bioquímicas, de citocinas inflamatórias e histológica do fígado dos animais. Para análise estatística, foi utilizado o *software* GraphPad Prism 5, determinadas a média e erro-padrão da média (EPM), análise de variância (ANOVA) seguida do teste Bonferroni, considerando um nível de significância estatística $p < 0,05$. Protocolo CEUA/UFMS n. 813/2016. **Resultados:** Os animais que receberam frutose apresentaram maior peso final ($p=0,022$), consumiram mais ração ($p=0,018$), maiores níveis de TNF ($p=0,018$) e MCP-1 ($p=0,017$), maior grau de esteatose hepática ($p<0,001$) e maior peso do fígado ($p<0,001$) do que os animais que receberam amido. Os animais que receberam amido porém, apresentaram maior contagem de focos inflamatórios (0,005) e score inflamatório ($p<0,001$). A suplementação de FOS foi eficiente na redução dos níveis de uréia ($p=0,026$), colesterol total ($p=0,002$) e HDL ($p<0,001$) dos animais amido e, do peso do fígado ($p=0,033$) e grau de esteatose hepática ($pp<0,001$) dos animais frutose. Os animais frutose suplementados com FOS desenvolveram um quadro de degeneração do tecido hepático, estatisticamente significante, com maiores níveis de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-10, IFN e IL-12), possivelmente associada a drástica redução do grau de esteatose no fígado dos animais. **Conclusão:** Apesar da dieta rica em amido ter induzido maior quantidade de focos inflamatórios hepáticos, a dieta rica em frutose causou piores efeitos de inflamação e esteatose hepática. A suplementação de FOS reduziu os níveis de uréia, colesterol total e HDL no animais Amido, além de ter reduzido o grau de esteatose hepática, principalmente nos Animais Frutose, acompanhado de expressiva elevação das citocinas inflamatórias.

Palavras-chave: Carboidratos. Inflamação. Fibras. Roedores.

ABSTRACT

Introduction: Food can act preventively or as a triggering factor for many chronic non-communicable diseases/NCDs. Given the relationship of these diseases with food and inflammation, different proportions of macronutrients in the diet can stimulate metabolic and inflammatory disorders, especially related to high carbohydrate consumption. In addition to the harms of a diet rich in carbohydrates, the therapeutic effect of the fibers should be better elucidated, with animal models of disease taking on relevance in this investigation. **Objective:** To evaluate the effect of fiber supplementation on inflammation and fatty liver in Swiss mice fed diets rich in carbohydrates. **Material and Methods:** 16-week experimental study, carried out with 32 Swiss, 60-day-old male mice, distributed in 4 experimental groups, which received one of the 2 types of elaborated isocaloric diets: starch diet (55%) and fructose diet (55%). In the last 4 weeks of the experiment, supplementation of 5% fructooligosaccharide/ FOS was performed by gavage. After the animals were euthanized, biochemical, inflammatory cytokine and histological analyzes of the animals's liver were performed. For statistical analysis, the GraphPad Prism 5 software was used, determining the mean and standard error of the mean (EPM), analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni test, considering a level of statistical significance $p < 0.05$. CEUA/UFMS Protocol n. 813/2016. **Results:** The animals that received fructose had higher final weight ($p = 0.022$), consumed more food ($p = 0.018$), higher levels of TNF ($p = 0.018$) and MCP-1 ($p = 0.017$), higher degree of hepatic steatosis ($p < 0.001$) and greater liver weight ($p < 0.001$) than animals that received starch. The animals that received starch, however, had a higher inflammatory foci count (0.005) and an inflammatory score ($p < 0.001$). FOS supplementation was effective in reducing the levels of urea ($p = 0.026$), total cholesterol ($p = 0.002$) and HDL ($p < 0.001$) in starch animals, and liver weight ($p = 0.033$) and degree of steatosis hepatic ($p < 0.001$) of the fructose animals. The fructose animals supplemented with FOS developed a state of liver tissue degeneration, statistically significant, with higher levels of inflammatory cytokines (IL-6, IL-10, IFN and IL-12), possibly associated with a drastic reduction in the degree of steatosis in the animal liver. **Conclusion:** Although the starch-rich diet induced more hepatic inflammatory foci, the fructose-rich diet caused worse effects of inflammation and fatty liver. FOS supplementation reduced the levels of urea, total cholesterol and HDL in animals Starch, in addition to reducing the degree of hepatic steatosis, especially in animals Fructose, accompanied by a significant increase in inflammatory cytokines.

Keywords: Carbohydrates. Inflammation. Fibers. Rodents.

LISTA DE ISLUTRAÇÕES

Figura 1 – Efeitos potenciais da adoção de padrões alimentares considerados saudáveis e aterogênicos sobre o risco para doenças crônicas e mortalidade.....	20
Figura 2 – Visão generalizada do processo inflamatório.....	22
Figura 3 – Geração da inflamação no tecido adiposo.....	25
Figura 4 – Etiologia do processo inflamatório e sua relação com o fígado.....	26
Figura 5 – Dano hepático induzido a partir de uma dieta rica em carboidratos.....	32
Figura 6 – Esquema representativo dos tipos de carboidratos existentes.....	34
Figura 7 – Fluxograma ilustrando o desenho experimental, com a distribuição dos animais em grupos de acordo com os tipos de dieta ofertados e suplementação de fibras/FOS (n=32).....	44
Figura 8 – Fotografia da acomodação dos animais em caixas de polipropileno durante o experimento, lotação máxima de 3 animais por caixa, estando os animais identificados com de canetas dermográficas na cauda.....	45
Figura 9 – Fotografia da acomodação dos animais em caixas de polipropileno durante o experimento, com acesso <i>ad libitum</i> a água e ração.....	46
Figura 10 – Fotografia da acomodação dos animais em caixas de polipropileno durante o experimento, em prateleiras, nas mediações do laboratório InBio-UFMS.....	46
Quadro 1 – Distribuição da composição em macronutrientes das rações experimentais, elaboradas em g/100g.....	47
Figura 11 – Fotografia das rações ofertadas aos grupos experimentais. (A) Amido, alta em amido e (B) Frutose, alta em frutose. Rhoster®	48
Figura 12 – Fotografia do procedimento de gavagem realizado nos camundongos durante o experimento.....	49
Figura 13 – Fotografia do procedimento de punção de veia cava para coleta de sangue após a eutanásia.....	51
Figura 14 – Fotomicrografias representativas para o score de gradação da esteatose hepática. Score 0, Score 1, Score 2 e Score 3.....	55
Figura 15 – Fotomicrografias representativas para o score utilizado para a gradação da quantidade de focos inflamatórios. Score 0, Score 1, Score 2 e Score 3.....	56

Tabela 1 – Resultados da comparação entre grupos experimentais (Amido X AmidoF; Frutose X FrutoseF, Amido X Frutose) em relação ao peso, ao ganho de peso, consumo de ração e variáveis bioquímicas dos animais avaliados neste estudo.....	59
Tabela 2 – Resultados da comparação entre grupos experimentais (Amido X AmidoF; Frutose X FrutoseF, Amido X Frutose) em relação às citocinas inflamatórias, peso do fígado, grau de esteatose, focos inflamatórios e pontos de fibrose dos animais avaliados neste estudo.....	60
Figura 16 – Gráfico demonstrando a dosagem de citocinas inflamatórias por meio da citometria de fluxo nos grupos experimentais (Amido: dieta com alta concentração de amido; Frutose: dieta com alta concentração de frutose), de acordo com a suplementação de FOS. A: IL-6, B: IL-10, C: IL-12, D: TNF- α , E: IFN- γ , F: MCP-1.....	61
Figura 17 – Gráfico demonstrando o grau de esteatose no fígado dos animais (Amido: dieta com alta concentração de amido; Frutose: dieta com alta concentração de frutose), de acordo com a suplementação de FOS.....	62
Figura 18 – Fotomicrografia dos cortes hepáticos corados em HE, com setas indicando pontos de esteatose hepática de acordo com os grupos de análise. (A) Amido, (B) AmidoF, (C) Frutose e (D) FrutoseF.....	62
Figura 19 – Gráfico representando focos inflamatórios no fígado dos animais (Amido – dieta com alta concentração de amido, Frutose - dieta com alta concentração de frutose), de acordo com a suplementação de FOS.....	63
Figura 20 – Fotomicrografia dos cortes hepáticos corados em HE, com setas indicando pontos de focos inflamatórios, de acordo com os grupos de análise. (A) Amido, (B) AmidoF, (C) Frutose e (D) FrutoseF.....	63
Figura 21 – Gráfico demonstrando os pontos de fibrose no fígado dos animais (Amido – dieta com alta concentração de amido, Frutose - dieta com alta concentração de frutose), de acordo com a suplementação de FOS.....	64
Figura 22 – Fotomicrografia dos cortes hepáticos corados em Tricrômio de Masson, com setas indicando fibras colágenas (coradas em azul), de acordo com os grupos de análise. (A) Amido, (B) AmidoF, (C) Frutose e (D) FrutoseF.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A-SAA – Proteína Amilóide Sérica A
ADA – *American Association Diabetes*
AVE – Acidente Vascular Encefálico
AXOS – Arabino-oligossacarídeo
CAF – Cafeteria
CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
CG – Carga glicêmica
CHE – Colesterol esterase
CHO – Carboidratos
CHOD – Colesterol oxidase
DCNT – Doenças crônicas não-transmissíveis
DCV – Doenças cardiovasculares
DHGNA – Doença hepática gordurosa não alcoólica
DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica
ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
FOS – Frutooligossacarídeo
GK – Glicerol quinase
GOD – Glicose oxidase
GOS – Galactooligossacarídeo
HC – *High carb*
HDL – Lipoproteína de alta densidade
HE – Hematoxilina eosilina
HF – *High fat*
IFN – Interferon
IG – Índice glicêmico
IL – Interleucina
InBio – Instituto de Biociências
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
LIP – Lipídeos

MCP-1 – Proteína quimiotática de monócito
MIF – Fator de inibição da migração de macrófago
MOS – Mananoligossacarídeo
NASH – *Nonalcoholic steatohepatitis*
OMS – Organização Mundial da Saúde
OMS – Organização Mundial da Saúde
PAI-1 – Inibidor do Ativador de Plasminogênio Tipo 1
PCR – Proteína C Reativa
PCR-US – Proteína C reativa ultrasensível
POD – Peroxidase
PTN – Proteínas
PURE – *Prospective urban rural epidemiology*
RANTES – *Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*
TM – Tricrômio de Masson
TNF – Fator de necrose tumoral
UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 DOENÇAS CRÔNICAS NÃO-TRANSMISSÍVEIS E A ALIMENTAÇÃO	16
2.2 DCNT E A INFLAMAÇÃO	17
2.3 INFLAMAÇÃO	21
2.4 ESTEATOSE HEPÁTICA	28
2.5 EFEITOS DE DIETAS RICAS EM CARBOIDRATOS.....	29
2.5.1 Carboidratos	33
2.5.2 Pré-bióticos, Fibras e Frutooligossacarídeo/FOS.....	36
2.6 EFEITOS DA ALIMENTAÇÃO EM MODELOS ANIMAIS	40
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo Geral	43
3.2 Objetivos Específicos.....	43
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	44
4.2 PROCEDIMENTOS REALIZADOS.....	47
4.2.1 Confecção das Rações	47
4.2.2 Oferta de Água e Rações.....	48
4.2.3 Suplementação de Fibras.....	48
4.2.4 Rotina de cuidados dos animais	50

4.2.5 Eutanásia	50
4.3 VARIÁVEIS DE ANÁLISE	51
4.3.1 Variáveis morfométricas	52
4.3.2 Variáveis bioquímicas	52
4.3.3 Variáveis Inflamatórias:	54
4.3.4 Variável Histológica:.....	54
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
5 RESULTADOS.....	57
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÕES	81
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
9 ANEXOS	100
Anexo1 – Protocolo de aprovação CEUA	100
Anexo 2 – Comprovante de Treinamento Biotério Central/UFMS.....	102
10 APÊNDICE.....	103
Apêndice 1 – Planilha de acompanhamento dos animais.....	103

1 INTRODUÇÃO

A alimentação possui importante influência sobre a saúde de uma população, podendo atuar de forma preventiva para muitas morbidades, ou, como fator desencadeante para doenças crônicas não transmissíveis/DCNT de impacto à saúde pública.

Obesidade, Diabetes, Hipertensão Arterial, Síndrome Metabólica, bem como outras DCNT, tem sido crescentes na população mundial, tendo como um dos seus principais fatores de risco a composição da dieta alimentar.

Para muitas destas doenças, a inflamação tem sido destacada como o mecanismo básico para a sua origem e, a alimentação, como um dos principais pontos chave para a sua deflagração.

Alterações metabólicas e inflamatórias podem ser decorrentes da distribuição da composição de macronutrientes numa dieta alimentar, podendo haver diferentes efeitos de acordo com a proporção e o tipo de macronutriente ingerido, tendo os carboidratos assumido destaque no meio científico nos últimos anos.

Estudos demonstram que ainda existem lacunas de conhecimentos sobre a proporção ideal de macronutrientes na dieta alimentar, bem como a sua relação com parâmetros metabólicos, inflamatórios e de microbiota intestinal.

Apesar dos avanços e de muitos estudos serem realizados sobre a alimentação e a sua influência sobre a otimização do metabolismo e prevenção de doenças, ainda não há consenso sobre um modelo alimentar ideal. As atuais recomendações brasileiras ainda são baseadas em uma maior proporção composta por carboidratos, sendo discutida a necessidade de revisão deste modelo alimentar, considerando os efeitos dos carboidratos numa dieta, no tocante a quantidade e qualidade dos mesmos.

Alguns estudos têm apontado inclusive, que dietas ricas em carboidratos podem apresentar efeitos maléficos tão ruins quanto dietas ricas em gorduras, influenciando o estado metabólico e inflamatório do indivíduo.

Existem inúmeras preocupações quanto a hiperglicemia induzida pela dieta rica em carboidratos, sobrecarga hepática por dietas hiperproteicas ou hiperlipídicas, malefícios causados por dietas enriquecidas com frutose e seus respectivos reflexos ainda necessitam ser melhor explorados.

Ressalta-se que diferentes tipos de carboidratos induzem diferentes respostas, em especial a frutose, a qual possui uma via metabólica diferenciada e teve aumento de consumo

nos últimos anos, principalmente a partir de dietas ocidentalizadas. Apesar do seu crescente consumo, ainda existem lacunas de conhecimento sobre o seu efeito, merecendo serem realizados estudos mais aprofundados.

A metabolização da frutose não depende da ação da insulina, sendo convertida no fígado diretamente em ácidos graxos, propiciando o acúmulo de gordura hepática e outros efeitos metabólicos e inflamatórios que necessitam ser melhor investigados.

Adicionalmente, o papel dos pré-bióticos, especialmente das fibras alimentares, tem sido estudado diante do possível controle sobre os efeitos maléficos de dietas ricas em carboidratos, bem como outros efeitos benéficos ao organismo.

Buscar medidas terapêuticas ou preventivas através da alimentação, é uma estratégia importante, de efeito sistêmico, com benefícios que provavelmente atuarão em mais de uma morbidade, minimizando problemas de saúde maiores, decorrentes ou influenciados pela alimentação.

Neste contexto, modelos animais têm assumido importante papel no meio científico por reproduzirem situações similares as que ocorrem em humanos, viabilizando o estudo de hipóteses inviáveis ou de difícil aplicação em seres humanos.

Apesar de haverem muitos estudos que avaliem os efeitos de dietas ricas em carboidratos em modelos animais, poucos estudam buscam estudar os efeitos de uma dieta rica em frutose em si, incluindo a sua associação ao consumo de fibras.

Diante do exposto, este estudo experimental visa estudar o efeito da suplementação de fibras sobre a inflamação e a esteatose hepática em camundongos *Swiss* alimentados com dietas ricas em carboidratos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇAS CRÔNICAS NÃO-TRANSMISSÍVEIS E A ALIMENTAÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis/DCNT são as principais causas de morte e incapacidade em todo o mundo. Estima-se que em 2016 cerca de 71% de todas as 57 milhões de mortes tenham ocorrido por estas doenças (WHO, 2018).

Dentre as principais DCNT estão as doenças cardiovasculares, os cânceres, as doenças respiratórias crônicas e o diabetes mellitus. No Brasil, no ano de 2015 estima-se que 51,6% do total de óbitos na população de 30 a 69 anos tenha sido causado por este grupo de doenças (BRASIL, 2019).

A prevenção de DCNT representa um grande desafio para a saúde global, especialmente para os países em desenvolvimento. Muitos são os fatores de risco para estas doenças, onde cada vez mais tem sido demonstrada a importância da alimentação na sua prevenção e controle.

Segundo a Organização Mundial da Saúde/OMS (WHO, 2004), o consumo de dietas inadequadas, juntamente com a inatividade física, está entre os principais fatores de risco para a morbimortalidade causada pelas DCNT. O aumento destas doenças nas últimas décadas deu-se por uma série de fatores que interferem sobre o metabolismo, dentre eles uma alimentação com maior aporte calórico, consumo de álcool e tabaco. A alimentação, inserida em um pequeno conjunto de fatores de risco, responde pela grande maioria das mortes por DCNT e outras doenças decorrentes (WHO, 2011).

No Brasil, existe uma preocupação adicional com os efeitos da alimentação sobre a saúde da população, uma vez que no geral é baseada no excesso de calorias provenientes de açúcares livres e de gorduras saturadas, com menor presença de frutas, legumes e verduras (LEVY *et al.*, 2012).

Dentre as doenças crônicas, a obesidade possui íntima relação com estado inflamatório, a qual tem ganhado destaque e é confirmada por dados alarmantes. O número de indivíduos obesos quase que dobrou de 1980 para 2008, atingindo adultos e crianças no mundo todo (WHO, 2011). No Brasil, dados mais recentes indicam aumento da obesidade em ambos os sexos, em todas as faixas etárias, servindo como um alerta a medidas de prevenção e controle (MALTA *et al.*, 2019).

Outra DCNT de impacto à saúde pública com sérios reflexos pela sua mortalidade, complicações e incapacidades geradas, é o Diabetes. De acordo com a *American Diabetes Association/ADA* (ADA, 2014), o controle nutricional é eficaz em reduzir a incidência de Diabetes tipo 2, uma das DCNT que mais causa complicações, devendo a alimentação ser o foco em todas as fases de vida.

Ademais, recentemente, consideráveis ensaios clínicos em humanos (*Prospective Urban Rural Epidemiology/PURE*) foram realizados em diversas regiões do mundo, tendo apontado interessantes resultados de morbimortalidade por doenças cardiovasculares relacionados ao consumo de alimentos (MILLER *et al.*, 2017; DEGHAN *et al.*, 2017).

De acordo com um destes estudos, uma coorte realizada em 18 países, por 7 anos, com um total de 135.335 indivíduos acompanhados, o maior consumo de carboidratos em humanos foi associado a um maior risco de mortalidade total, quando comparado ao consumo elevado de gorduras totais ou todos os seus subtipos. Adicionalmente, a gordura total e os seus tipos não foram associados a doenças cardiovasculares, infarto do miocárdio ou mortalidade por doenças cardiovasculares, havendo ainda uma associação inversa entre o consumo de gordura saturada e a ocorrência de acidente vascular encefálico/AVE (DEGHAN *et al.*, 2017).

Estes achados nos fornecem dados importantes, denotando que ainda há lacunas de conhecimento sobre os reais efeitos da alimentação sobre a saúde de uma população, incluindo sobre os efeitos de morbimortalidade influenciada pela proporção de macronutrientes ingeridos e seus subtipos.

Dentre os mecanismos causais para DCNT que já estavam claros nas últimas décadas, estudos também têm apontado a relação das doenças crônicas com o processo inflamatório (DANDONA *et al.*, 2007; FESTA *et al.*, 2000; PEARSON *et al.*, 2003; YUDKIN *et al.*, 2004).

Ainda de acordo com Geraldo e Alfenas (2008), diferentes proporções de macronutrientes da dieta podem causar estresse oxidativo, podendo desencadear processo inflamatório crônico de baixa intensidade, influenciando desenvolvimento de doenças.

2.2 DCNT E A INFLAMAÇÃO

Muitos componentes da dieta podem influenciar vários elementos da inflamação, tendo a nutrição a possibilidade de desempenhar um papel, seja para a continuidade de

condições inflamatórias favoráveis ao desenvolvimento de danos ou, para a prevenção dos mesmos (CALDER *et al.*, 2009).

Uma alimentação caracterizada pelo elevado consumo de alimentos de alto índice glicêmico, pobres em fibras e ricos em gordura trans, é causa de um estado inflamatório através da ativação do sistema imune inato, com consequente excessiva produção de mediadores pró-inflamatórios e redução dos anti-inflamatórios (GERALDO; ALFENAS, 2008).

Há algumas décadas pensava-se que o estado inflamatório era uma consequência das doenças crônicas. Hoje, já se sabe que a inflamação na verdade pode ser o ponto de partida para as DCNT.

De acordo com Dandona e coautores (2007), a inflamação apresenta uma possível conexão bidirecional com a síndrome metabólica através da resistência à insulina, de forma que qualquer processo inflamatório crônico leva à resistência à insulina, o que por sua vez influencia o processo inflamatório no corpo. Ademais, inflamação também é um importante mediador do desenvolvimento resistência a insulina induzida pela obesidade (LEE; LEE, 2014).

O processo inflamatório também é o elo entre a síndrome metabólica e as doenças cardiovasculares, onde os biomarcadores inflamatórios como as citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, adipocinas, chemocinas, marcadores inflamatórios hepáticos dentre outros, são importantes no monitoramento de riscos (VOLP *et al.*, 2008).

Em humanos, as principais doenças crônicas relacionadas ao processo inflamatório crônico são diabetes, doenças cardiovasculares, aterosclerose, alergias e doença pulmonar obstrutiva crônica/DPOC (FOUGÈRE *et al.*, 2017).

Estudos vem sendo realizados com o intuito de investigar a patogênese de doenças crônicas como a obesidade, síndrome metabólica, diabetes e doenças cardiovasculares, e a sua relação com inflamação subclínica, ou inflamação crônica de baixo grau (FURMAN *et al.*, 2019; VOLP *et al.*, 2008).

A inflamação crônica de baixo grau associada a DCNT é discutida há muitos anos, similarmente como ocorre em indivíduos com doenças cardiovasculares/DCV, os quais apresentam níveis aumentados de marcadores inflamatórios, especialmente de proteína C reativa/PCR (RIDKER, 2000).

Esta inflamação tem sido relacionada a algumas doenças crônicas, tendo o estresse inflamatório corpóreo e a disfunção endotelial como uns dos principais mecanismos. A

redução de peso, melhora da qualidade da dieta e atividade física são apontadas como medidas que podem modificar este nível de inflamação (UUSITUPA; SCHWAB, 2013).

De acordo com Lemos (2006), parte do início das doenças inflamatórias possui ligação a distúrbios do processo digestivo normal, o qual através de uma sequência de eventos pode ocasionar a produção de compostos inflamatórios, tais como interleucinas, fibrinogênio, dentre outros, com alteração das funções normais do corpo e degeneração de tecidos e órgãos. Segundo o autor, é a partir deste processo que surge o termo “controle nutricional” do processo inflamatório.

Para Ostan e colaboradores (2015), controlar os níveis de inflamação é um desafio na prevenção do câncer, para o qual a inflamação crônica aumenta o seu risco e afeta todos os estágios de desenvolvimento de câncer, desde o seu início por meio de mutações genéticas e epigenéticas, até o seu desenvolvimento e disseminação através de metástases.

De acordo com Myers e Allen (2012), mudanças no estilo de vida, associadas a uma alimentação saudável, melhoram o balanço energético de nutrientes no organismo e reduz a sinalização inflamatória, diminuindo o risco para DCNT.

Para Bressan e coautores (2009), uma alimentação saudável é fator determinante para o desenvolvimento de doenças crônicas, considerando dentre outros fatores, a capacidade da dieta modular marcadores da sensibilidade à insulina, aterogênicos e inflamatórios. Os alimentos exercem influência sobre a sensibilidade à insulina, aterogênese, inflamação e função endotelial, existindo a atual discussão sobre a regulação hormonal, metabólica e inflamatória. A Figura 1 aponta alguns destes efeitos listados pelo autor, relacionando-os com uma alimentação saudável.

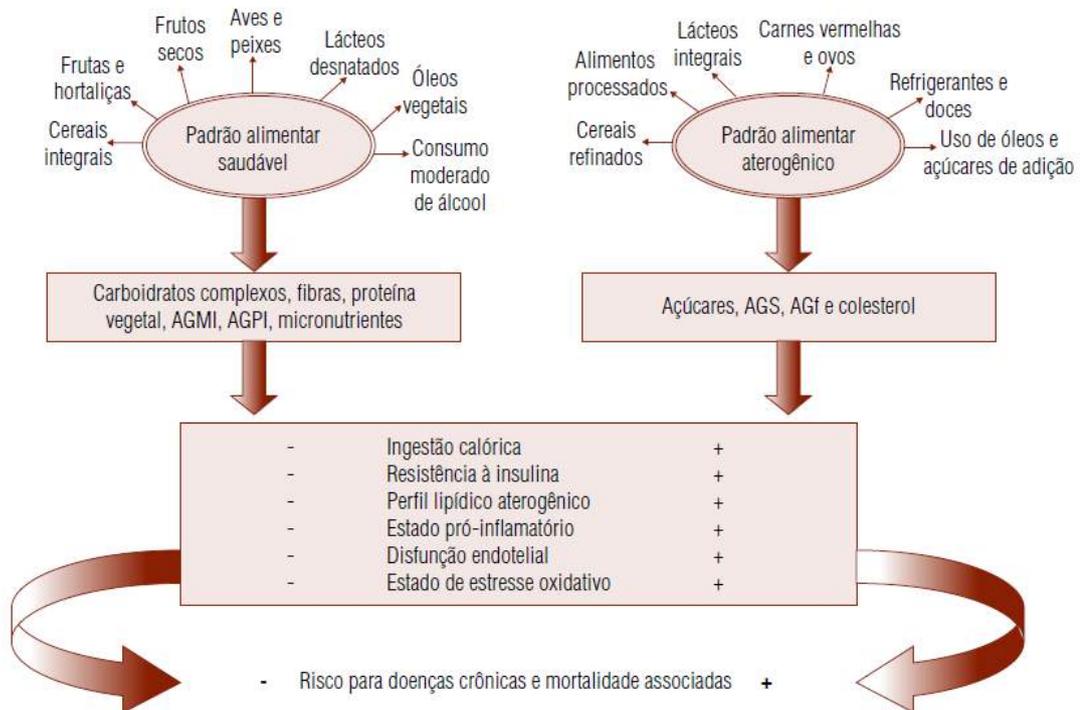
Uma alimentação saudável portanto, é capaz de influenciar na redução de marcadores inflamatórios, com produção de citocinas anti-inflamatórias atuando na prevenção de DCNT. Esta alimentação deve ser capaz de manter o peso corpóreo baseada num teor moderado de gordura, baixo baixos de açúcares simples, de gorduras trans e saturada e rica em frutas, hortaliças e alimentos integrais (GERALDO; ALFENAS, 2008).

De acordo com Calder e colaboradores (2011), uma alimentação saudável baseada em grãos integrais, vegetais, frutas e peixes, é associada com menores níveis de marcadores inflamatórios circulantes.

Dada a importância da alimentação sobre a saúde de uma população e sua relação com as DCNT e inflamação, há vários anos índices para avaliação dos padrões alimentares vem sendo utilizados por alguns países, avaliando o risco para doenças crônicas relacionadas

à dieta, com associação destes índices a marcadores inflamatórios e aterogênicos (BRESSAN *et al.*, 2009).

Figura 1 - Efeitos potenciais da adoção de padrões alimentares considerados saudáveis e aterogênicos sobre o risco para doenças crônicas e mortalidade.



Fonte: BRESSAN *et al.* (2009)

Para Geraldo e Alfenas (2008), o conhecimento sobre as propriedades funcionais de alimentos e nutrientes que promovem efeitos benéficos à saúde, especialmente aqueles que contribuem para a redução dos níveis de biomarcadores inflamatórios, é um campo de pesquisa futurista e relevante.

De acordo com Oliveira e coautores (2013), também é importante a realização de estudos que analisem diferentes dietas experimentais para entender as mudanças induzidas por aumento da adiposidade, bem por outros efeitos metabólicos.

É possível ter padrões de dieta que reduzam o estresse inflamatório no corpo e melhorem disfunções endoteliais. Estudos sugerem que a escolha de hábitos saudáveis de alimentação modulam os níveis de citocinas e marcadores inflamatórios em pessoas com diabetes e previnem eventos cardiovasculares em pessoas com alto risco (CASAL; GARCIA, 2014; UUSITUPA; SCHWAB, 2013).

Outros autores afirmam que mudanças quantitativas e qualitativas na composição da dieta, além de protegerem para a obesidade, atuam reduzindo os níveis de marcadores inflamatórios no organismo (BOURASSA *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2016; UUSITUPA; SCHWAB, 2013).

Enquanto muitos estudos vêm sendo realizados sobre hábitos alimentares que contribuem para a inflamação, poucos estudos tem sido realizados para uma alimentação anti-inflamatória. De acordo com Calder e colaboradores (2011), grãos integrais, dietas ricas em fibras, flavonoides e ácidos graxos poli-insaturados provenientes de peixes e algumas vitaminas podem proteger contra a inflamação de baixo grau.

A partir da investigação da patogênese das doenças crônicas e sua verdadeira relação com processo inflamatório, medidas preventivas e terapêuticas podem ser implementadas.

2.3 INFLAMAÇÃO

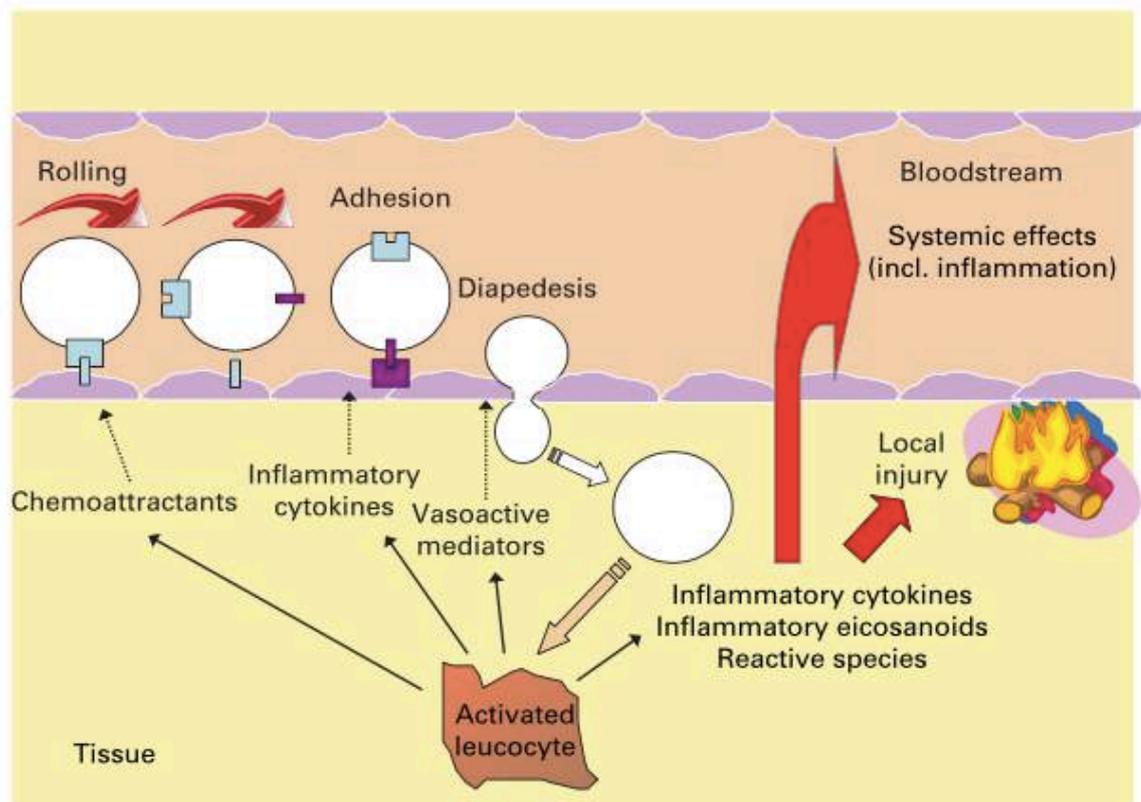
Inflamação é uma reação complexa a vários agentes nocivos, ligada ao processo de reparo que consiste de respostas vasculares, migração e ativação de leucócitos e reações sistêmicas. Quando exacerbada, as reações inflamatórias são os pilares para doenças crônicas (KUMAR *et al.*, 2010).

É um processo fisiológico indispensável para o equilíbrio do organismo. Disfunções nesta resposta, de modo agudo ou crônico, podem contribuir para o desenvolvimento ou manutenção de enfermidade, incluindo as doenças crônicas (ARNER *et al.*, 2007; BULLÓ *et al.*, 2007; CASAL; GARCIA, 2014).

A inflamação é caracterizada por um aumento de citocinas inflamatórias na circulação sanguínea e de infiltrados de células imunes no tecido alvo da inflamação (LEE; LEE, 2014). A figura 2 demonstra uma representação generalizada do processo inflamatório a partir de um estímulo num órgão alvo.

De acordo com Calder e colaboradores (2009), independente da origem do processo inflamatório (infecciosa, irritante, alérgica ou neurogênica), a inflamação envolve 4 fases: 1) aumento de suprimento de sangue para o sítio da inflamação; 2) aumento da permeabilidade capilar, com transporte de mediadores químicos; 3) migração leucocitária, mediada por quimioatraentes; 4) liberação pelos leucócitos de outros mediadores químicos envolvidos no processo inflamatório, podendo alguns atuarem a nível sistêmico, além do local do sítio do processo inflamatório.

Figura 2 – Visão generalizada do processo inflamatório.



Fonte: Calder *et al.* (2009)

Citocinas inflamatórias são proteínas de baixo peso molecular, secretadas em sua maior parte por adipócitos, com diversas funções metabólicas e endócrinas, que participam da inflamação e resposta do sistema imune. As principais citocinas envolvidas na inflamação são: interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-8 (IL-8), interleucina-1 β (IL-1 β) e CD40 e CD40L (CARVALHO; COLAÇO; FORTES, 2006; VOLP *et al.*, 2008).

A presença de um estado inflamatório pode ser determinado pela medição da concentração sérica de marcadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, sendo os mais comuns: proteína C reativa (PCR), IL-6, TNF- α e interleucina 18 (IL-18) (MYERS; ALLEN, 2012), tendo alguns destes marcadores sido utilizados em estudos de intervenção dietética (BASU; DEVARAJ; JIALAL, 2006; CALDER *et al.*, 2011; LOPEZ-GARCIA *et al.*, 2004).

Já de acordo com Uusitupa e Schwab (2013), dentre os principais marcadores inflamatórios que tem sido utilizados para monitorar o impacto da inflamação de baixo grau em doenças crônicas estão: PCR, PCR ultrasensível (PCR-US), IL-6, TNF- α , Proteína Amilóide Sérica A (A-SAA), Inibidor do Ativador de Plasminogênio Tipo 1 (PAI-1),

Interleucina 1 alfa (IL-1- α), IL-1- β , IL-8, IL-10, IL-18, *regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted* (RANTES) e Fator de inibição da migração de macrófago (MIF).

Sistemicamente citocinas inflamatórias como o TNF, IL-1 β e IL-6 têm a capacidade de prejudicar a ação da insulina e a captação de glicose no tecido periférico, bem como limitar o armazenamento de gordura no tecido adiposo e redistribuir essa gordura para outros tecidos que produzem gordura ectópica. Já localmente, no tecido adiposo, estas citocinas têm a capacidade de modular a lipólise e diferenciação dos adipócitos (GRANT; DIXIT, 2015).

Além do tecido adiposo atuar como um órgão armazenador de gordura, o mesmo tem um papel ativo nos sistemas endócrino e imune. Dentre as principais adipocinas inflamatórias secretadas pelo tecido adiposo, responsáveis por desencadear este papel inflamatório estão: leptina, TNF- α , IL-6, PAI-1, proteína quimio atraiante de monócito (MCP-1), resistina, adiponectina e proteína transportadora de retinol-4 (RBP-4), as quais contribuem para um estado inflamatório sistêmico e influenciam na resistência insulínica (FRANCISQUETI; NASCIMENTO; CORRÊA, 2015; GRANT; DIXIT, 2015; RANA *et al.*, 2007; VAN GAAL; MERTENS; DE BLOCK, 2006).

O tecido adiposo portanto é um grande produtor das adipocinas inflamatórias, as quais contribuem para a inflamação de baixo grau, com influência também sobre outras doenças crônicas (TRZECIAK *et al.*, 2011).

Ademais, o tecido adiposo contém inúmeros tipos de células imunes, com um aumento destas células com a obesidade, especialmente macrófagos. Células imunes pró-inflamatórias e anti-inflamatórias normalmente trabalham em homeostase neste processo. Com a obesidade, há um desequilíbrio, tornando o ambiente mais pró-inflamatório (LEE; LEE, 2014; WEISBERG *et al.*, 2003).

Este mecanismo inflamatório relacionado à obesidade é explicado uma vez que com o aumento do número e tamanho dos adipócitos decorrentes do excesso de nutrientes, ocorre consequente hipoperfusão e microhipóxia do tecido adiposo, com secreção de substâncias pró-inflamatórias, que atraem mais células imunes ao tecido, as quais vão secretar mais quimiocinas e citocinas inflamatórias (FRANCISQUETI; NASCIMENTO; CORRÊA, 2015).

Com a morte de adipócitos, macrófagos são atraídos, realizam a fagocitose e liberam substâncias químicas que atraem e estimulam a produção de mais células do sistema imune, as quais por sua vez atuam na secreção de outras substâncias relacionadas ao processo inflamatório (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2003).

Em humanos, as citocinas produzidas por células do sistema imune decorrentes da inflamação contribuem para a obesidade relacionada a inflamação, fibrogênese e desregulação metabólica do tecido adiposo (CAËR *et al.*, 2017).

Apesar da inflamação induzida pela obesidade ter mecanismos semelhantes a de inflamação por qualquer outro motivo, a mesma possui níveis de citocinas mais baixos na circulação e normalmente é considerada crônica (LEE; LEE, 2014).

Uma das possíveis vias causais para a relação da obesidade com a inflamação, é que as alterações no tecido adiposo são responsáveis por desencadear processos inflamatórios de baixo grau por uma maior produção de adipocinas, citocinas, e fatores inflamatórios relacionados ao aparecimento de outros distúrbios metabólicos (GOMES *et al.*, 2016; SANYAL *et al.*, 2017; VELLOSA *et al.*, 2013; UUSITUPA; SCHWAB, 2013).

Para Calder e colaboradores (2011), não há um conceito bem delimitado sobre inflamação crônica, sistêmica e de baixo grau. No geral, é bem estabelecida por critérios clínicos e sua associação com a elevação de marcadores inflamatórios em casos de síndrome metabólica, diabetes tipo 2 e outras desordens metabólicas, sendo aceitáveis para este quadro os marcadores inflamatórios estarem ao menos de 2 vezes acima que os grupos controle. Os autores citam alguns marcadores utilizados para avaliação como o TNF- α , IL-6, IL-18, MCP-1, interferon (IFN- γ), MIF (fator de inibição de migração de macrófago), PCR, tendo uma variação desses mediadores em cerca de 10 vezes entre obesos e não obesos.

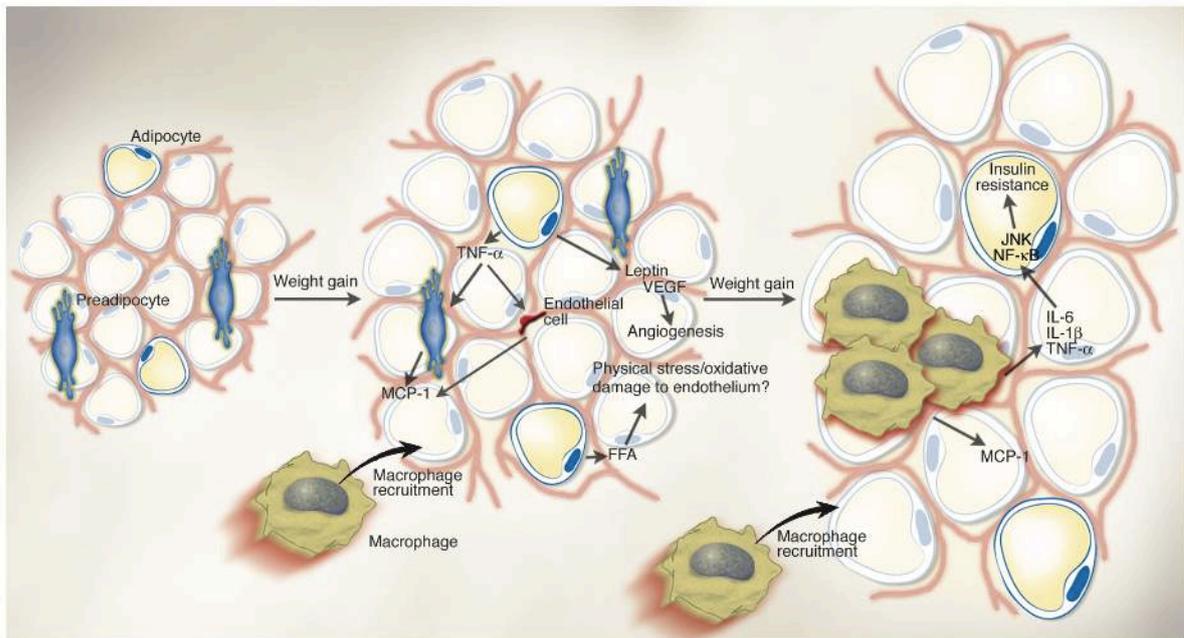
Apesar da relação da obesidade com a inflamação, alguns mediadores inflamatórios por si só podem desencadear alterações metabólicas maléficas como a resistência à insulina, mesmo na ausência de obesidade ou outras comorbidades (SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006).

A Figura 3 apresenta um esquema do processo inflamatório no tecido adiposo, com participação de células do sistema imune e produção de marcadores inflamatórios.

Embora não seja o foco deste estudo, estudar as complicações decorrentes da obesidade, seja por uma dieta alta em gorduras (*high fat/HF*) ou alta em carboidratos (*high carb/HC*) e consequente expansão do tecido adiposo, é importante considerando a relação sabida da obesidade com a elevação dos marcadores inflamatórios, bem como células imunes nos tecidos, em especial no tecido adiposo (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Para Tamer e colaboradores (2019), para diminuir o estresse oxidativo e a inflamação relacionados a dieta, a redução do consumo de gordura saturada e açúcar ou substituição pela gordura insaturada e carboidratos complexos da dieta, são medidas que podem minimizar danos.

Figura 3 - Geração da inflamação no tecido adiposo.



Fonte: WELLEN & HOTAMISLIGIL (2003)

O tema tem despertado interesse na comunidade científica no mundo todo. Nos últimos 10 anos tem crescido consideravelmente o número de publicações científicas relacionando a obesidade com inflamação. No que tange a esta temática em estudos realizados com modelos animais de doença, a maior parte são realizados com roedores, especialmente ratos e camundongos, com dietas compostas por diferentes proporções de macronutrientes, especialmente hipercalóricas e/ou hiperlipídicas (HILDEBRAND *et al.*, 2017).

De acordo com estes autores (HILDEBRAND *et al.*, 2017), este estado inflamatório também pode ser observado sistematicamente em outros órgãos como fígado, músculo esquelético, pâncreas, cérebro e intestino, porém pouco estudado em seres humanos, em partes justificado por considerar a dificuldade ou inviabilidade de análise histológica destes órgãos em humanos, diferente do que ocorre com modelos animais de doença.

Além do tecido adiposo, o fígado é outro órgão afetado pela alimentação e envolvido intimamente com o processo inflamatório, o qual sofre exposição regular a produtos dietéticos e microbianos (ROBINSON, HARMON; O'FARRELLY, 2016).

O fígado é um ótimo órgão marcador dos efeitos dos nutrientes absorvidos, por ser o primeiro órgão a receber a circulação esplênica (KUMAR *et al.*, 2010). Os papéis imunológicos e metabólicos do fígado estão relacionados ao metabolismo lipídico, metabolismo do glicogênio, desintoxicação, remoção de endotoxinas, produção de proteínas

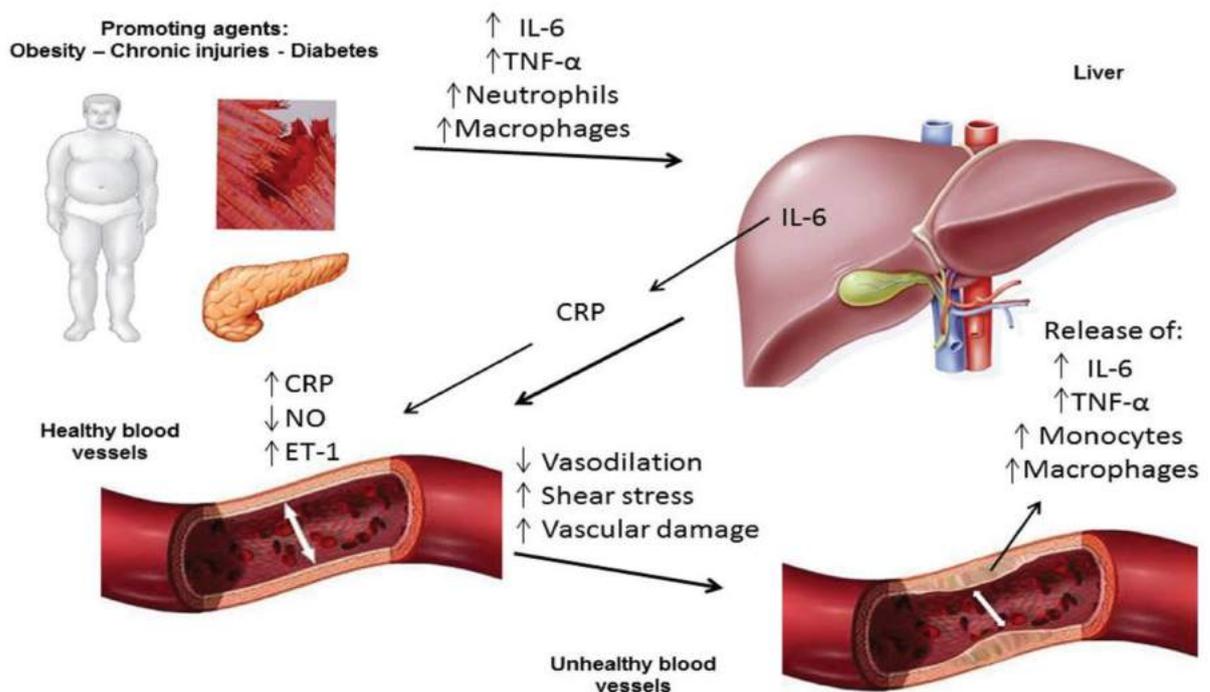
antimicrobianas, apresentação de antígenos, produção de citocinas, fatores do sistema complemento, entre outros (ROBINSON; HARMON; O'FARRELLY, 2016).

Além da exposição a carga microbiana derivada do intestino pela circulação portal, o microambiente hepático é influenciado ainda pelos altos níveis de gorduras e carboidratos na dieta, com influência direta sobre o processo inflamatório neste órgão. Carboidratos são convertidos pelo fígado em glicogênio, enquanto que as gorduras são processadas para lipoproteínas, sendo distribuídas por todo o corpo (ROBINSON; HARMON; O'FARRELLY, 2016; TALL; YVAN-CHARVET, 2015; TANNAHILL *et al.*, 2013).

Assim, hábitos alimentares podem causar acúmulo lipídico hepático, dano nos hepatócitos que podem incluir a esteatose hepática não alcoólica, que quando crônica pode aumentar o processo inflamatório no fígado, podendo progredir para fibrose, cirrose e insuficiência hepática (LAU; ZHANG; YU, 2017; ROBINSON; HARMON; O'FARRELLY, 2016).

O fígado, estimulado por questões relacionadas a obesidade, injúrias crônicas e diabetes, juntamente com o pâncreas participa ativamente da cascata inflamatória com a produção de citocinas inflamatórias, sendo ainda hospedeiro para mais células do sistema imune, as quais por sua vez realizam a produção de mais citocinas (Figura 4).

Figura 4 - Etiologia do processo inflamatório e sua relação com o fígado.



Fonte: Teixeira *et al.*, 2014

Alguns estudos apontam a elevação de marcadores inflamatórios derivados de hepatócitos, como a PCR, SSA, e o fibrinogênio, nos casos de processo inflamatório crônico subclínico associado à obesidade e síndrome metabólica (RANA *et al.*, 2007; VOLP *et al.*, 2008; ZULET *et al.*, 2007).

A presença de células imune no fígado é importante para a homeostase hepática (ROBINSON; HARMON; O'FARRELLY, 2016). A regeneração hepática por exemplo, é influenciada por IL-1 α , TNF α e IL-6 e células residentes (MICHALOPOULOS, 2007). As células de Kupffer liberam TNF- α e IL-6, as quais promovem proliferação dos hepatócitos e consequente regeneração hepática (SELZNER *et al.*, 2003).

Basicamente, a partir de uma injúria no fígado, células imunes residentes são ativadas (macrófagos – Células de Kupffer), produzindo citocinas inflamatórias. Estas recrutam mais células do sistema imune para o tecido hepático, as quais irão produzir outras citocinas pró-inflamatórias. Este processo inflamatório quando crônico, pode induzir a fibrose hepática (LAU; ZHANG; YU, 2017; ROBINSON; HARMON; O'FARRELLY, 2016).

Em busca de compostos alimentares terapêuticos para este estado inflamatório, estudo realizado em ratos por Mesquita e colaboradores (2011) foi demonstrado efeito anti-inflamatório através da suplementação dietética com ácido graxo ômega-3 (200 mg/Kg/dia), comparável entre o emprego de tenoxican (1mg/Kg/dia), um antiinflamatório não esteroideal.

Já Ostan e colaboradores (2015), apontaram que a dieta mediterrânea tem a capacidade de interferir sobre fatores envolvidos na carcinogênese e resposta inflamatória, tanto quanto na produção de radicais livres, com efeitos sobre o balanço entre fatores pró e anti-inflamatórios, homeostasia da microbiota e modulação epigenética da oncogênese.

De acordo com Hildebrand e colaboradores (2017), considerando os efeitos maléficos já investigados até então por uma dieta ocidental, rica em carboidratos refinados, característica de países em desenvolvimento, e a sua relação com DCNT, é necessária a realização de estudos com componentes alimentares otimizadores do metabolismo, atuando com efeitos anti-inflamatórios, com melhora dos riscos advindos da obesidade e outras doenças.

2.4 ESTEATOSE HEPÁTICA

As manifestações consequentes de uma dieta no fígado, podem ser relacionadas ao desenvolvimento de um estado inflamatório e/ou acúmulo de gorduras, como ocorre na doença hepática gordurosa não alcoólica/DHGNA (BROWN; KLEINER, 2016).

A DHGNA é a doença hepática mais comum em diversos países do mundo (NOMURA; YAMANOUCHI, 2012; YOUNOSSI *et al.*, 2016; SAYINER *et al.*, 2016). Sua prevalência foi aumentada nas últimas décadas pelo aumento do consumo de frutose através de xaropes de milho em alimentos industrializados, bebidas açucaradas, muito comuns em dietas ocidentais (CONSORTIUM, 2013; STANHOPE; SCHWARZ; HAVEL, 2013).

A partir do acúmulo de gordura no fígado, a sua cronicidade pode evoluir para a esteatose hepática não alcoólica, uma doença hepática progressiva caracterizada por um padrão particular de esteatose com alterações inflamatórias e lesões hepatocelulares, de cura difícil e com a possibilidade de evolução para fibrose hepática e cirrose (BROWN; KLEINER, 2016).

Nesta condição, além do estado inflamatório, ocorre o aumento do estresse oxidativo hepático com o influxo de triglicerídeos no fígado, culminando também no aumento de morte de células hepáticas, principalmente por apoptose (ALKHOURI; KENT; FELDSTEIN, 2011; BROWNING; HORTON, 2004).

A DHGNA envolve doenças caracterizadas pelo acúmulo de gordura no fígado sob a forma triglicerídeos, sendo a esteatose hepática o seu marcador. A progressão e cronicidade deste acúmulo pode evoluir para a esteato hepatite não alcoólica (*Non-Alcoholic SteatoHepatitis/NASH*) e, em casos mais graves, para fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular. NASH é desenvolvida pela persistência do acúmulo e gordura que ocorre na simples esteatose, sendo a forma mais perigosa de DHGNA, caracterizada pelo desenvolvimento de lesão hepatocelular, balão ou balonamento hepatocelular e inflamação no hepatócito esteatótico (BROWN; KLEINER, 2016; DOWMAN *et al.*, 2010).

Aumento do estresse oxidativo, citocinas pró-inflamatórias, endotoxinas, resistência insulínica e adipocinas, são consequências do acúmulo de lipídeos no tecido hepático (BUZZETTI *et al.*, 2016)

A inflamação do tecido hepático pode ser expressa através de infiltrado inflamatório no tecido e/ou aumento das citocinas inflamatórias, incluindo TNF- α e IL-6 (TILG, 2010), sendo o TNF- α considerado o principal marcador inflamatório, associado a DHGNA em alguns estudos (SEO *et al.*, 2013; THEODORE *et al.*, 2012).

Apesar do aumento dos casos de DHGNA no mundo e dos avanços da pesquisa neste tema, a patogênese desta doença ainda não é clara, sendo necessário o esclarecimento da influência de fatores dietéticos para o seu desenvolvimento, prevenção e tratamento (CHOI; ABDELMEGEED; SONG, 2017.)

Sabe-se que a obesidade e resistência insulínica são intimamente relacionados ao desenvolvimento de DHGNA (ANSTEE; GOLDIN, 2006; DAY, 2002), porém mais estudos são necessários nesta área.

Neste campo de pesquisa, modelos animais tem assumido relevância ao passo que buscam reproduzir o mecanismo de desenvolvimento que ocorrem em humanos, investigando cada etapa de desenvolvimento de DHGNA, bem como buscam possibilidades terapêuticas que minimizem o seu crescente avanço na população mundial (LAU; ZHANG; YU, 2017).

Dentre os modelos animais para indução de DHGNA apontados por Lau e colaboradores (2017), dietas ricas em frutose encontram-se entre os modelos utilizados, sendo apontado por Kohli e colaboradores (2010) que o consumo de frutose é necessário à progressão do acúmulo de gordura e fibrose hepática, mesmo em modelos animais *high fat*, considerando o stress oxidativo hepático, fibrogênese, deposição de colágeno e envolvimento celular no tecido hepático relacionado a frutose.

2.5 EFEITOS DE DIETAS RICAS EM CARBOIDRATOS

De acordo com Jonasson e coautores (2014), recomendações para seguir uma dieta pobre em carboidratos têm um impacto favorável na inflamação de baixo grau no diabetes tipo 2, em comparação com as recomendações para seguir uma dieta pobre em gordura.

Reforçando esta afirmação, a recomendação de dieta baixas em gorduras por consequência induz a população a substituir a gordura da dieta por carboidratos, com reflexos maléficos diretos desta dieta hiperglicídica sobre a saúde como aumento da trigliceridemia, diminuição das concentrações de HDL e efeitos sobre a adiposidade (POLACOW; LANCHÁ JUNIOR, 2007).

Em uma coorte de 4.154 indivíduos, alterações metabólicas importantes, como síndrome metabólica e hiperlipedemia, foram detectadas a partir de uma alimentação rica em carboidratos totais e carboidratos derivados do amido (FENG *et al.*, 2015).

Em ensaio clínico realizado com homens por Rizi (2016), uma dieta rica em carboidratos predispôs a maior resistência insulínica. Os efeitos adversos cumulativos desta

dieta, de ordem imuno metabólica, induziram a resistência insulínica, com maior risco cardiovascular.

No geral, observa-se que fatores nutricionais incluindo energia em excesso, ingestão elevada de carboidratos simples, gordura saturada e baixa ingestão de fibras, contribuem para sobrepeso e obesidade, com efeitos pró-inflamatório e de estresse oxidativo no organismo (FENG *et al.*, 2015).

Como um mal do mundo moderno, a dieta ocidental definida por Kerver e colaboradores (2003), é caracterizada pelo alto consumo de alimentos com alta densidade energética, carnes e outros alimentos processados, ovos, carnes vermelhas e laticínios ricos em gordura, com a combinação de cereais, açúcares, óleos vegetais prejudiciais e adição de sal.

Para Greenberg e Obin (2006), a consequência da acumulação lipídica decorrente de uma dieta ocidental é a quebra do balanço da sinalização celular sistêmica na produção de adipocinas e citocinas, promovendo um estado pró-inflamatório.

Diferentes tipos de dieta apresentam efeitos distintos sobre o funcionamento do corpo. De acordo com Myers e Allen (2012), a dieta ocidental pode agir como fator pró-inflamatório sistêmico, com influência sobre diversas morbidades, incluindo as DCNT.

As consequências inflamatórias advindas da ingestão de macronutrientes numa dieta, vão além das relacionadas diretamente a obesidade ou órgãos comumente apontados como órgãos alvo, como o fígado.

Estudos são realizados para entender os efeitos individuais dos macronutrientes (lipídios, proteínas e carboidratos) e seus subtipos sobre a ação da insulina e obesidade, com menos informações sobre os carboidratos e seus subtipos (STORLIEN *et al.*, 2000).

Já é sabido o efeito inflamatório dos carboidratos, especialmente os refinados, sobre o organismo. Porém, de acordo com Oliveira e coautores (2013), estes efeitos sobre parâmetros inflamatórios e metabólicos são pouco estudados.

Fatores importantes a serem considerados como influenciadores do metabolismo dos carboidratos é o índice glicêmico/IG (medida do potencial de um carboidrato em aumentar a glicose sanguínea) e a carga glicêmica/CG (quantidade de carboidrato presente na porção de alimento consumido, comparado com um alimento padrão). Numa escala de IG, a glicose é o carboidrato de maior índice glicêmico, seguido da sacarose (moderado IG) e da frutose (baixo índice glicêmico) (DICKINSON; BRAND-MILLER, 2005).

Em uma coorte realizada com humanos, foram demonstrados os malefícios de uma dieta a base de carboidratos derivados do amido estiveram associados ao maior risco para

síndrome metabólica (RR 2,24) e hiperlipidemia (RR 3,05) (FENG *et al.*, 2015). Já em estudo realizado com homens magros sensíveis a insulina e homens obesos já resistentes à insulina, uma dieta rica em carboidrato pode predispor mais a riscos para doenças cardiovasculares (PARVARESH *et al.*, 2016).

Outros autores tem afirmado que a ingestão de dietas hipercalóricas, ricas em gordura ou glicose possa provocar resposta inflamatória em curto período de tempo (BASHAN *et al.*, 2009; BURTON-FREEMAN, 2010; HYSON *et al.*, 2002; MOHANTY *et al.*, 2000), e que mesmo na ausência de co-morbidades, mediadores inflamatórios podem por si desencadear resistência insulínica (SHOELSON *et al.*, 2006).

Em estudo realizado por Oliveira e colaboradores (2013), foi observado um elevado número de leucócitos no sangue periférico de camundongos alimentados com ração e dieta HC quando comparado à dieta controle desde o primeiro dia de estudo, tendo a se normalizar a partir da 4 semana, caracterizando o envolvimento celular agudo, e no tecido adiposo a partir do 3 dia de estudo.

Pelo fígado ser um dos primeiros órgãos a receber a circulação esplânquica proveniente do intestino no processo de digestão, com ativo papel no metabolismo dos nutrientes (KUMAR *et al.*, 2010), o mesmo sofre influência direta de uma dieta rica em carboidratos.

A Figura 5 apresenta uma representação do dano hepático a partir de uma dieta rica em carboidratos.

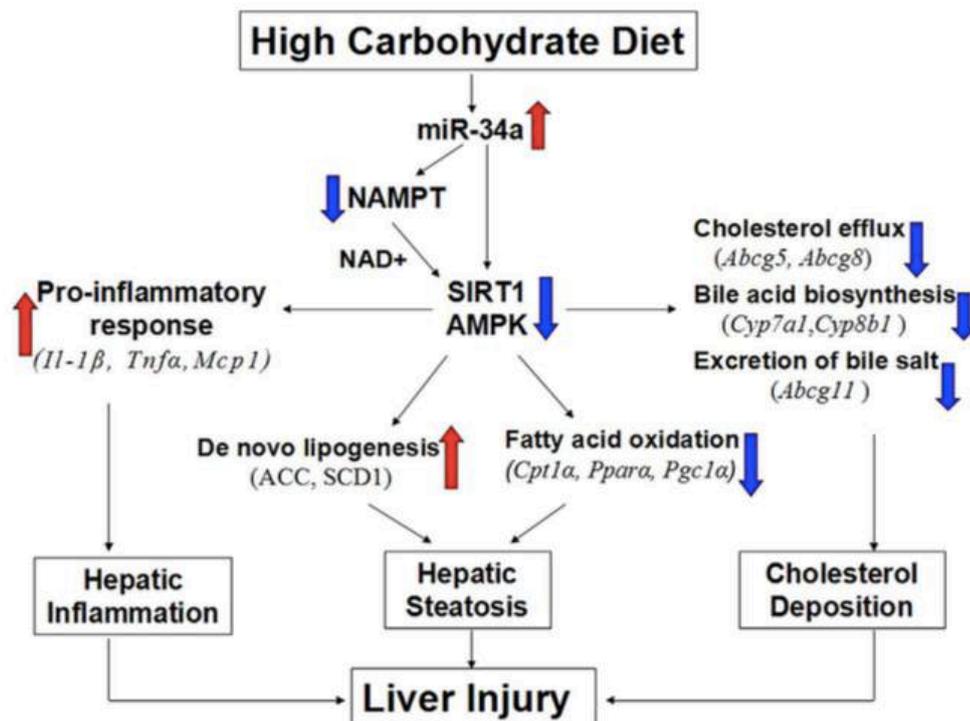
Em estudos experimentais em roedores, que buscaram comparar os efeitos de dietas *high fat* (HF) e *high carb* (HC), diferentes proporções de gordura e carboidratos na dieta causam diferentes efeitos com modulação da deposição de lipídeos no fígado (LI *et al.*, 2015; SILVA-SANTI *et al.*, 2016).

Além dos danos hepáticos, estudos experimentais realizados com dietas *high carb/HC*, especialmente com açúcares refinados, demonstraram uma rápida expansão do tecido adiposo, associado ao influxo de leucócitos no tecido adiposo, podendo contribuir para terem aumentado o nível de citocinas, como IL-6, TNF- α , IL-10, TGF- β 1, CCL2 e CXCL1 (OLIVEIRA *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2012).

De acordo com Masi e colaboradores (2017), o qual avaliou os danos inflamatórios decorrentes de camundongos alimentados com uma dieta rica em carboidratos (enriquecida com leite condensado), outra rica em gorduras e a combinação destas duas dietas, as 3 dietas foram obesogênicas e induziram disfunção metabólica, tendo a rica em carboidratos sido mais pro-inflamatória, a rica em gorduras causado mais resistência a insulina e esteatose hepática, e

a combinação de ambas apresentou piores resultados. Estes dados confirmam diferentes efeitos de acordo com a proporção do macronutriente na dieta, havendo uma necessidade de melhor elucidação sobre o tema.

Figura 5 – Dano hepático induzido a partir de uma dieta rica em carboidratos.



Fonte: LI *et al.* (2015)

Outro estudo em que estudou o efeito da combinação de dieta rica em carboidrato (sacarose) e gorduras, em camundongos alimentados por 2 ou 4 semanas, demonstrou o rápido início da hepatosteatose, hipertrofia do tecido adiposo e hiperinsulinemia provavelmente devido à resposta rápida dos genes lipogênicos, sinalizadores de insulina e inflamatórios (YANG *et al.*, 2012).

Um mês de alimentação de diet de cafeteria (65% gorduras saturadas em sua maior parte) em ratos *Wistar* foi capaz de induzir características de síndrome metabólica e DHGNA (PASARÍN *et al.*, 2012).

Em estudo realizado por Oliveira e colaboradores (2014) que buscou avaliar o perfil inflamatório e o dano hepático em camundongos alimentados com uma dieta rica em sacarose, lipídeos ou a combinação de ambos por 8 semanas, apesar a dieta alta em sacarose não ter levado a obesidade, a mesma levou a hipertrofia dos adipócitos, intolerância a glicose,

hiperinsulinemia, hiperlipidemia, esteatose hepática e aumentou os níveis de citocinas inflamatórias.

Um estudo experimental em camundongos, utilizando uma dieta *high carb/HC* e outra *high fat/HF*, a dieta rica em carboidratos causou mais esteatose hepática e inflamação do que a dieta rica em gorduras. A dieta com excesso de carboidratos foi associada a obesidade e alterações metabólicas importantes, incluindo o excesso de colesterol (LI *et al.*, 2015). De acordo com Casal e Garcia (2014), picos glicêmicos e consequentes picos insulínicos relacionados à ingesta alimentar rica em carboidratos, podem causar efeitos inflamatórios no organismo.

Os efeitos das várias formas de carboidratos complexos são poucos explorados. Há uma necessidade de alguns esclarecimentos sobre o uso de amidos resistentes e fibras na resistência à insulina, onde açúcares simples comparados aos complexos possuem efeitos negativos sobre a ação da insulina (STORLIEN *et al.*, 2000).

Brand Miller e colaboradores (2007) abordaram a importância de cereais integrais na alimentação, especialmente aqueles com baixo índice glicêmico, os quais evitam o aumento súbito da glicose no sangue, limitam a secreção de insulina, consequentemente a inflamação.

Em modelos animais de doença observa-se que a resposta inflamatória e metabólica induzida por dieta ainda possui lacunas de conhecimento, no que concerne à proporção de macronutrientes, tipo de carboidrato, bem como a componentes que possam atuar como efeito de prevenção ou terapêutico, como as fibras (HILDEBRAND *et al.*, 2017).

2.5.1 Carboidratos

Os carboidratos, também conhecidos como hidratos de carbono, glicídios, glúcidos, glucídeos, glúcidos, glúcides, sacarídeos ou açúcares, são as macromoléculas mais abundantes na natureza, sendo os principais elementos da dieta em diversas partes do mundo. Dentre as diversas funções atribuídas aos carboidratos, a principal é a energética (NELSON, 2018).

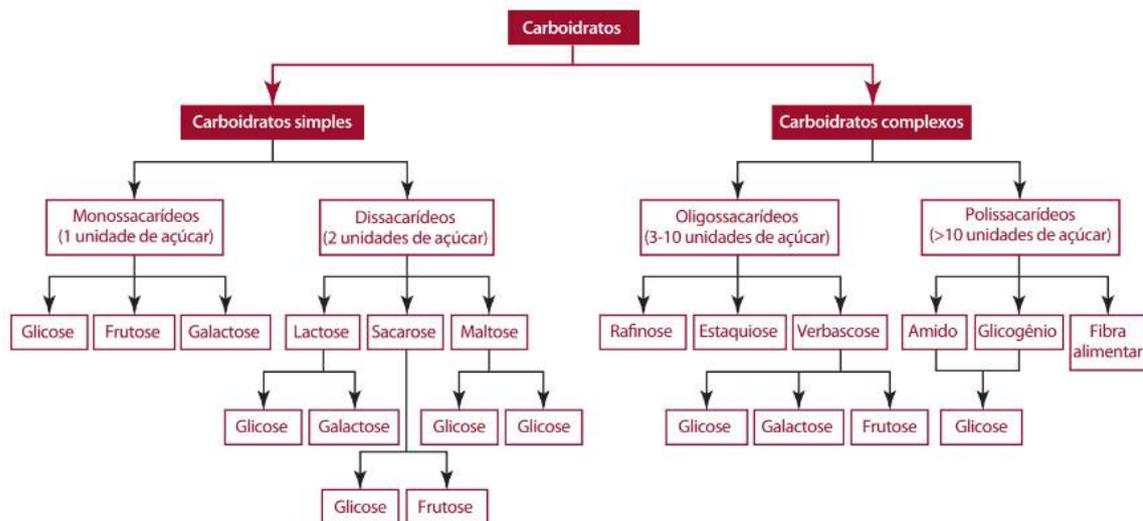
Os carboidratos são a principal fonte de energia na alimentação, tanto para humanos quanto para animais. Compreendem dois grandes grupos: simples (monossacarídeos, dissacarídeos) e complexos (oligossacarídeos, polissacarídeos), conforme esquema representado pela figura 6.

A glicose é o carboidrato monossacarídeo mais utilizado pelo organismo para obtenção de energia, sendo o amido composto por centenas a milhares de moléculas de

glicose, este, por sua vez a principal fonte energética em plantas e para a nutrição animal (SILVA, 2018).

O amido, polissacarídeo constituído apenas por moléculas de glicose, possui alto índice glicêmico (DICKINSON; BRAND-MILLER, 2005). Já a frutose, monossacarídeo encontrado em frutas e vegetais, nas últimas décadas mais presente nas dietas ocidentais, é muito relacionada ao consumo de comidas *fast food* e refrigerantes (BARREIROS; BOSSOLAN; TRINDADE, 2005). Em modelos animais, o uso da frutose em dietas experimentais tem relacionado diversas desordens no metabolismo lipídico (BOTEZELLI *et al.*, 2010).

Figura 6 – Esquema representativo dos tipos de carboidratos existentes.



Fonte: GROPPER (2016)

De acordo com Dziadek e colaboradores (2019), apesar das frutas apresentarem muita frutose, as mesmas também apresentam outros compostos que podem trazer benefícios e equilíbrio na metabolização da frutose, diferentemente dos alimentos industrializados que sofreram adição de frutose pura.

A frutose merece uma atenção especial, uma vez que apresenta uma via metabólica diferente da glicose (a qual é metabolizada em todos os tecidos corporais), sendo primeiramente metabolizada no fígado, estando prontamente disponível para a lipogênese hepática (MAYE, 1993).

As maiores concentrações de frutose são encontradas no xarope de milho (55% a 90% de frutose), mel (40% de frutose) e frutas (mais de 7.6% de frutose) (RAATZ, JOHNSON; PICKLO, 2015; SUN; EMPIE, 2012).

A frutose dietética é apontada como o maior candidato ao desenvolvimento de DHGNA (AKAR *et al.*, 2012). Em modelos animais de doenças com uso de dietas enriquecidas por frutose não é diferente, havendo maior ocorrência de esteatose hepática quando consumo de dietas enriquecidas em frutose (YANG *et al.*, 2019; USHIO *et al.*, 2013).

Além do seu metabolismo ser mais lento (com índice glicêmico menor do que da glicose), a absorção da frutose não depende da ação da insulina e é independente do gradiente de glicose na célula. É absorvida de forma muito mais eficiente no fígado, onde é fosforilada e presa, de forma que não haja frutose disponível na circulação sanguínea (GROPPER, 2016).

Devido ao elevado poder de doçura (presente em muitos adoçantes e bebidas açucaradas) e ao baixo custo, a frutose teve grande aumento no consumo nos últimos anos, especialmente em substituição a gordura da dieta por recomendações amplamente divulgadas entre a população, tendo alguns autores sugerido que este aumento pode ser um fator potencialmente importante nas taxas de crescimento da obesidade e da síndrome metabólica (ADELI, 2007; FERDER; FERDER, INSERRA, 2010; RUTLEDGE; HAVEL, 2005; TAPPY, 2012).

Ainda de acordo com Horst e Serlie (2017), o consumo regular de frutose é fator importante no desenvolvimento de desordens lipídicas, estresse oxidativo e inflamação crônica. Estes distúrbios seriam associados ao efeito pró-oxidativo e pró-inflamatório da frutose com produção de radicais livres e citocinas inflamatórias (PEKTAS *et al.*, 2016; ZAGRODZKI *et al.*, 2007)

Outra questão importante é referente ao uso controverso da frutose por pacientes diabéticos, em substituição a glicose, por sua via metabólica não depender da ação da insulina. O uso exagerado de frutose, especialmente através de adoçantes ou bebidas açucaradas, pode exercer piores efeitos quando analisado o metabolismo lipídico, com aumento do colesterol e triglicerídeos sanguíneos, além de efeitos direto sobre o fígado, com aumento do acúmulo de gordura hepática (BARREIROS; BOSSOLAN; TRINDADE, 2005).

Em alguns modelos animais, dietas ricas em frutose tem sido utilizadas para a indução de DHGNA (CHOI; ABDELMEGEED; SONG, 2017; YANG *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2018), a maior parte através do fornecimento de frutose pela água (LI; LU, 2018; MEDRANO *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2019; SPRUSS *et al.*, 2012).

Estudo realizado com ratos *Wistar* a partir do consumo de refrigerante rico em frutose resultou em alterações desfavoráveis ao perfil lipídico dos animais (BOTEZELLI *et al.*, 2010).

Outros estudos em modelos animais apontaram efeitos maléficos de dietas ricas em frutose como problemas cardiovasculares, disfunções renais e síndrome metabólica (ALZAMENDI *et al.*, 2009; BOCARSLY *et al.*, 2010; LINDQVIST; BAELEMANS; ALBERTSSON, 2008).

Uma dieta rica em frutose em roedores (apenas 20% de frutose oferecida por 12 semanas) causou síndrome metabólica, como elevação dos triglicerídeos séricos, aumento da pressão arterial, diminuição da sensibilidade à insulina com hiperinsulinemia e secreção alterada de lipoproteína de densidade muito baixa (KELLEY; ALLAN; AZHAR, 2004).

Curiosamente, em um estudo realizado na busca de avaliar os efeitos combinados de uma dieta rica em frutose, associado ao consumo de cigarro no enfisema pulmonar em camundongos, a ingestão de frutose por si só foi capaz de causar dano e enfisema pulmonares a partir da instalação de um ambiente inflamatório sistêmico de baixo grau (SUEHIRO *et al.*, 2019).

Alguns autores descrevem outros efeitos deletérios da combinação do consumo de dietas ricas em gorduras e frutose, como prejuízo no desempenho cognitivo, possivelmente induzidas por fatores inflamatórios, e dano hepático mais severo (KOHLI *et al.*, 2010; MARISSAL-ARVY *et al.*, 2014; WOODIE; BLYTHE, 2017).

Em um estudo que buscou avaliar os diferentes efeitos de dietas ricas em gorduras (60% gordura) e frutose (55% frutose) na fisiologia e no comportamento de ratos machos, os animais alimentados com frutose tiveram maiores níveis de insulina e triglicerídeos (WOODIE; BLYTHE, 2017).

Embora alguns estudos tenham sido realizados sobre os efeitos de dietas ricas em frutose sobre o metabolismo e o perfil inflamatório, muito ainda deve ser elucidado, a considerar principalmente as particularidades da via de metabolização da mesma (MILLER; ADELI, 2008).

2.5.2 Pré-bióticos, Fibras e Frutooligossacarídeo/FOS

Os prebióticos, fibras alimentares ou fibras dietéticas, são carboidratos não absorvíveis e não digeríveis pelo organismo, presentes principalmente nos alimentos de

origem vegetal, podendo serem divididos em solúveis e não solúveis. Apresentam importantes funções relacionadas especialmente ao funcionamento intestinal, proliferação e/ou multiplicação de maneira seletiva da microbiota intestinal, redução do peso, níveis de colesterol e glicose sanguíneos (BERNAUD; RODRIGUES, 2013; KACZMARCZYK; MILLER; FREUND, 2012; RASTALL; GIBSON, 2015; SAKAI *et al.*, 2001).

De acordo com Slavin (2008), populações que consomem mais fibras apresentam menos doenças crônicas, através da diminuição dos fatores de risco para DCNT.

Os benefícios estão relacionados a redução da digestão e absorção de macronutrientes, bem como diminuição do contato de algumas substâncias carcinogênicas no lúmen intestinal e diminuição das taxas de glicose sanguínea, a partir da diminuição da velocidade de absorção da glicose por aumento da viscosidade no lúmen intestinal (KACZMARCZYK; MILLER; FREUND, 2012).

Os mecanismos envolvidos a estes benefícios podem ser relacionados a a melhora do trânsito intestinal, alterações na viscosidade intestinal, alteração da absorção de nutrientes com redução da velocidade de absorção da glicose, interferência no metabolismo lipídico e produção de ácidos graxos essenciais, aumentando a excreção de colesterol pela bile, dentre outros e produção de hormônios intestinais (KACZMARCZYK; MILLER; FREUND, 2012; KUSMINSKI *et al.*, 2007)

Frutas e vegetais são boas fontes de vitaminas, minerais, fibras alimentares, e outros nutrientes benéficos para a saúde, podendo reduzir o risco para algumas DCNT (WHO, 2019). Em uma ampla corte realizada com humanos, o maior consumo de frutas, vegetais e leguminosas foi associado a um menor risco de mortalidade não cardiovascular e total. Os benefícios foram máximos para a mortalidade não cardiovascular e a mortalidade total de três a quatro porções por dia (equivalente a 375–500 g / dia) (MILLER *et al.*, 2017).

De acordo com a *American Diabetes Association* (ADA, 2004), a fibra solúvel exerce papel no controle de dislipidemias e da glicemia através da ação sobre a absorção intestinal de colesterol e carboidratos.

De uma forma geral, entre outros benefícios, o consumo de fibras parece estar associado a menores valores dos marcadores inflamatórios, com redução de processos inflamatórios de baixo grau, e um menor risco ao desenvolvimento de algumas doenças crônicas como doença coronariana, hipertensão, obesidade, diabetes e câncer de cólon (BERNAUD; RODRIGUES, 2013; KACZMARCZYK; MILLER; FREUND, 2012).

Em um estudo realizado com mulheres em idade pós menopausa, Ma e colaboradores (2008) reportaram que uma dieta rica em fibras é associada a baixos níveis plasmáticos de

interleucinas IL-6 e TNF- α , sugerindo que este tipo de dieta possa ser um meio para reduzir a inflamação do organismo e doenças relacionadas a mesma. Em outro estudo realizado pelos mesmos autores (MA *et al.*, 2006), foi sugerido que este tipo de dieta protege para altos níveis de PCR.

O consumo de fibras também tem influência sobre o sistema imune, ao passo que altera as concentrações plasmáticas de PCR e TNF- α , podendo atuar como efeito anti-inflamatório (KACZMARCZYK; MILLER; FREUND, 2012).

Em humanos, em um estudo realizado com 1.958 mulheres em pós menopausa, o consumo de fibras foi inversamente associado aos níveis de IL-6 e TNF- α (MA *et al.*, 2008). Em outro estudo realizado pelo mesmo autor principal com 524 participantes adultos (MA *et al.*, 2006), o consumo de fibra dietética teve um efeito protetor contra níveis elevados de PCR.

Uma dificuldade na escolha da dose a ser suplementada em estudos clínicos realizados em humanos é referente as diferentes concentrações utilizadas (5-25g/dia), bem como o pouco tempo de exposição (14-20 dias) a que os indivíduos são submetidos na maior parte dos estudos (COSTA; GUIMARAES; SAMPAIO, 2012).

De acordo com a Associação Dietética Americana (ADA) (SLAVIN, 2008), as recomendações de consumo diário de fibras em humanos é de 14g/1000.kcal, ou de 25 g para mulheres adultas ou de 38 g para homens adultos.

O consumo de fibras tem sido amplamente estudado em modelos animais de doença, sugerindo efeitos pré-bióticos, com melhora da constipação e do metabolismo de nutrientes, especialmente com destaque para a absorção de minerais (XIAO *et al.*, 2015), porém com uma ampla variedade de doses ofertadas.

Dentre os prebióticos estão inulina, β -glucanos, lactulose, lactitol, xilitol, e alguns oligossacarídeos não digestíveis como o frutooligossacarídeo (FOS), Mananoligossacarídeo (MOS), galacto-oligossacarídeo (GOS), Arabino-oligossacarídeo (AXOS) (KARIMIA *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2014; STEFE *et al.*, 2008).

O FOS é um tipo de fibra dietética, oligossacarídeo resistente, da classe frutanos juntamente com a inulina e a oligofrutose, com benefícios diretos sobre a microbiota intestinal, muito utilizado em estudos dietéticos a partir de modelos animais de doença. É capaz de reduzir a absorção de macronutrientes, aumentando a viscosidade do conteúdo luminal e alterando o tempo de trânsito intestinal (KACZMARCZYK; MILLER; FREUND, 2012).

Os benefícios do consumo de FOS sobre a microbiota intestinal, em partes está relacionado com a sua influência sobre o crescimento de bifidobactérias nas fezes, com efeito pré-biótico ao organismo (GIBSON, 1999; GROPPER, 2016).

Em um estudo experimental realizado tanto com roedores, quanto com humanos, o consumo de FOS melhorou o trânsito intestinal e foi efetivo na evacuação intestinal, sugerindo a FOS ser útil e segura na melhora da constipação (WANG *et al.*, 2013).

Já em outro estudo, realizado com camundongos, o consumo de FOS suprimiu o acúmulo de gordura abdominal dos animais alimentados com dietas HF (NAKAMURA *et al.*, 2011).

De acordo com Malaguarnera e colaboradores (2012), os efeitos metabólicos e inflamatórios da FOS são decorrentes da melhora da microbiota intestinal, propiciando mecanismos anti-inflamatórios e efeitos imunomodulatórios, os quais podem reduzir a exposição hepáticas a compostos intestinais que possam causar algum malefício.

Os estudos sobre a alteração da microbiota intestinal com crescimento de bifidobactéria ainda são controversos, mas é fato de que a FOS possui interferência positiva na maior parte dos estudos, seja por alteração da microbiota, trânsito intestinal, diminuição de marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo ou outros.

Outros estudos tem demonstrado efeito da FOS em humanos, com melhora da síndrome metabólica e resistência insulínica e diminuição da glicemia pós prandial (ESLAMPARAST *et al.*, 2014; RESPONDEK *et al.*, 2014) e em animais com a diminuição de citocinas inflamatórias, estresse oxidativo e melhora da sensibilidade à insulina (HSIA *et al.*, 2012; SHINOKI; HARA, 2011; YEH *et al.*, 2014).

De acordo com Costa e colaboradores (2012), o consumo de FOS melhora o metabolismo de carboidratos e reduz a disponibilidade de radicais livres em animais diabéticos. Já Lomax e Calder (2009), afirmam que a FOS é capaz de modular alguns aspectos da função imune, melhorar a capacidade do organismo de responder com sucesso a certas infecções intestinais e modificar algumas condições inflamatórias.

Em outro estudo realizado por Nakamura e coautores (2014), camundongos alimentados diariamente com FOS (em substituição da 5% de sacarose da dieta AIN-93) por um período de 38 semanas, tiveram desaceleração na senescência, alteração de microbiota intestinal, diminuição dos marcadores de estresse oxidativo e citocinas inflamatórias, sugerindo os autores que estes resultados deram-se provavelmente pela melhora da microbiota intestinal, a qual teve aumento significativo de bifidobactérias.

Em um estudo realizado em ratos, que avaliou o tratamento de DHGNA e esteatose cardíaca induzida por uma dieta rica em carboidratos (HAUBERT *et al.*, 2015), no qual foi realizada suplementação terapêutica de colina a 3g/100 g e frutooligossacarídeo/FOS a 10g/100g, ambos os tratamentos foram efetivos para a redução da esteatose hepática e cardíaca.

De acordo com Shinoki e Hara (2011), dieta rica em FOS (5g/100g) melhorou a sensibilidade à insulina juntamente redução da massa gorda do intestino grosso e da secreção de adipocitocinas em células de gordura mesentérica em ratos.

Especificamente em um estudo realizado com ratos que receberam uma dieta rica em frutose, a administração de FOS foi capaz de proteger os animais ao desenvolvimento de hipertrigliceridemia e efeitos pró-oxidativos (BUSSEROLLES *et al.*, 2003).

Em busca de melhor esclarecer os mecanismos preventivos e terapêuticos da FOS com a obesidade, Aguilar e colaboradores (2014) sugerem a realização de novos estudos, incluindo a análise da expressão gênica relacionada ao metabolismo lipídico hepático e quantificação de citocinas anti-inflamatórias.

2.6 EFEITOS DA ALIMENTAÇÃO EM MODELOS ANIMAIS

Modelos animais de doença assumem grande importância para o início de estudos clínicos para uma variedade de doenças e condições de saúde. São a base da evidência científica para futuros estudos clínicos em humanos.

Considerando os efeitos que diferentes dietas causam sobre o organismo, com influências sobre o estado metabólico e inflamatório por diversos mecanismos, juntamente com a atual gradativa ingestão aumentada de carboidratos em dietas ocidentais observadas principalmente em países em desenvolvimento, e ainda, a dificuldade de avaliar em humanos os efeitos dessa dieta, os modelos animais têm sido utilizados para avaliar efeitos inflamatórios causados pela alimentação (HILDEBRAND *et al.*, 2017).

Em modelos experimentais de obesidade e resistência à insulina, modelos animais tem relevância ao passo que facilitam a investigação de maneira estritamente controlada das variáveis relacionadas as suas formações e complicações (CESARETTI; KOHLMANN JUNIOR, 2006).

Dentre os modelos animais, os roedores tem sido um dos mais utilizados considerando a disponibilidade da sequência genômica completa, ciclo de vida relativamente

curto, facilidade de criação, capacidade de controlar o meio ambiente para criação, bem como a similaridade de processos fisiológicos (COX; CHURCH, 2011; LEON, 2005), além de permitirem análises que seriam inviáveis em seres humanos.

Estudos a partir de modelos animais de doença podem facilitar a investigação dos mecanismos relacionados a indução de disfunções metabólicas pela obesidade em humanos, geralmente realizados com roedores e com uso de dietas hipercalóricas ou hiperlipídicas. São comprovadamente um modelo eficiente para o estudo da fisiopatologia das complicações associadas à obesidade e resistência insulínica, com similaridade a forma como ocorre em humanos (CESARETTI; KOHLMANN, 2006; ROSINI; SILVA; MORAES, 2012; STORLIEN *et al.*, 2000).

Modelos animais também têm sido importantes nos estudos dos efeitos de fatores dietéticos sobre a ação da insulina, os quais de maneira controlada investigam a fisiopatologia da obesidade e resistência insulínica (CESARETTI; KOHLMANN JÚNIOR, 2006). Outros estudos avaliam complicações de doenças cardiovasculares em roedores (OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2010).

De acordo com Rosini e colaboradores (2012), estudos com roedores são eficientes para analisar as complicações de obesidade induzida por dieta, devido a sua semelhança com a formação da obesidade e respostas metabólicas em humanos, diferentemente do que ocorre com os modelos animais genéticos, os quais retratam a realidade de uma minoria em humanos.

Normalmente estudos de intervenção dietética em animais requerem um longo tempo de exposição a dieta (> 8 semanas) para avaliação das suas reais complicações (LEE; LEE, 2014), embora outros autores tenham detectado alterações metabólicas, hormonais e inflamatórias após um curto período de exposição (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Dietas HF são tradicionalmente mais utilizadas para a indução de obesidade em roedores, tendo alguns autores demonstrado outro robusto modelo com o mesmo fim, porém mais similar ao que ocorre com os humanos em consumo da dieta ocidental, baseado em dietas ricas em carboidratos e gorduras, chamadas de dieta de cafeteria/CAF quando constituídas por alimentos altamente palatáveis e com alta densidade energética. Este modelo também está mais relacionado ao estresse oxidativo (JOHNSON *et al.*, 2016; SAMPEY *et al.*, 2011; ZEENI *et al.*, 2015).

Sampey e colaboradores (2011), em um estudo realizado com camundongos, comparando dieta HF com HC, demonstrou as consequências obesogênicas e inflamatórias rápidas e severas da CAF em comparação com a dieta HF, incluindo ganho de peso rápido,

aumento de marcadores da síndrome metabólica, acúmulo de lipídios em vários tecidos e inflamação dramática.

Outro estudo demonstrou que a dieta de CAF, mesmo que por um curto período, é capaz de causar distúrbios metabólicos e aumentar a adiposidade abdominal, sem alterar o peso corpóreo (CASTRO *et al.*, 2014).

As dietas de cafeteria, uma tentativa de reproduzir as dietas “ocidentalizadas”, de *fast foods*, altamente palatáveis, tem sido capazes de aumentar o peso corporal dos animais em 30-40% em 12 semanas de estudo, com aumento de gordura visceral, resistência à insulina e hiperleptinemia (PAULA; SILVA; HALL, 2004).

Em um estudo de revisão sobre a avaliação da inflamação causada por dietas ricas em carboidratos em modelos animais de doença (HILDEBRAND *et al.*, 2017), estas dietas foram relacionadas à efeitos maléficos ao organismo como inflamação, danos sistêmicos e teciduais principalmente nos níveis adiposo, cardíaco e hepático, com maior expressão citocinas pró-inflamatórias juntamente com maior adiposidade visceral.

Em modelos animais, foi verificado que uma dieta rica em frutose (similarmente ao que ocorre em humanos com a substituição como adoçantes no lugar da sacarose em bebidas e doces por frutose), pode desencadear hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, resistência insulínica e aumento da pressão arterial (VASDEV; LONGERICH; GILL, 2004).

Em um estudo com camundongos, uma dieta rica em carboidratos refinados (74,2% de CHO, sendo 30% de açúcares refinados, especialmente a sacarose) foi capaz de induzir alterações inflamatórias no tecido adiposo a partir do 3º dia de seguimento. Alterações nos níveis de IL-12 foram detectadas a partir da 12ª semana de exposição a dieta (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Assim, estudos em modelos animais têm sido muito importantes em estudos de etiologia da resistência insulínica por meio de intervenções dietéticas estritamente controladas, as quais não são possíveis em humanos (STORLIEN *et al.*, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito da suplementação de fibras sobre a inflamação e esteatose hepática em camundongos *Swiss* alimentados com dietas ricas em carboidratos.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar estudo morfométrico: consumo de ração, ganho de peso, peso do fígado dos animais;
- Realizar estudo do perfil bioquímico (glicemia, triglicérides, colesterol total e frações, ureia, creatinina);
- Realizar estudo das citocinas inflamatórias (PCR, IL-6, IL-10 e IL-12, insulina, MCP-1, TNF e IFN- γ);
- Realizar estudo histológico do fígado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

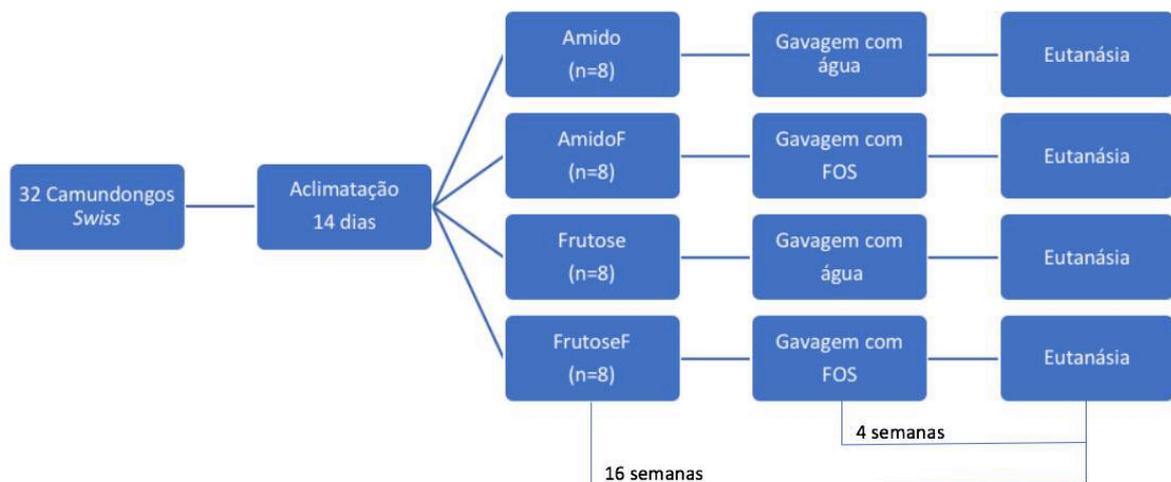
Estudo experimental, realizado no Biotério Central do Instituto de Biociências (InBio) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, em condições controladas de luz (fotoperíodo de 12/12 horas de claro/escuro), temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade ($55 \pm 10\%$).

Foram utilizados 32 (trinta e dois) camundongos (*Mus musculus*), linhagem *Swiss*, machos, com 60 dias de idade, procedentes do InBio/UFMS, acompanhados entre os meses de janeiro a maio de 2018, totalizando um período de 16 (dezesesseis) semanas de seguimento.

Após a aclimação de 14 dias, os animais foram pesados e, randomicamente, distribuídos em caixas em 4 grupos experimentais, de 8 animais cada, com acesso *ad libitum* a água e ração.

Para cada grupo experimental, foi oferecido um dos 2 tipos de rações isocalóricas elaboradas (rica em amido ou rica em frutose), por um período de 16 semanas. Nas últimas 4 semanas do experimento, em 2 grupos foi realizada a suplementação de fibras (FOS) por meio de gavagem. Nos demais 2 grupos foi realizada gavagem com água, conforme protocolo do desenho experimental ilustrado na Figura 7.

Figura 7 - Fluxograma ilustrando o desenho experimental, com a distribuição dos animais em grupos de acordo com os tipos de dieta ofertados e suplementação de fibras/FOS (n=32).



Cada grupo foi acomodado em caixas de polipropileno (30 x 20 x 13 cm), na lotação máxima de 3 animais por caixa. Os animais foram identificados com marcação de caneta dermográfica na cauda, permitindo o acompanhamento individual de cada animal (Figuras 8, 9 e 10).

O estudo foi submetido para análise no Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS), seguindo as recomendações éticas em tratamento animal de acordo com o CEUA – UFMS, *Guide for the care and use of laboratory animals do National Research Council* (NRC, 1996) e os Princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991). Teve sua aprovação em 09 de dezembro de 2016 sob nº de Protocolo 813/2016 (Anexo 1).

Para acesso as instalações do InBio/UFMS, a pesquisadora responsável participou de treinamento oferecido laboratório envolvido, como pré-requisito ao início do experimento (Anexo 2).

Figura 8 - Fotografia da acomodação dos animais em caixas de polipropileno durante o experimento, lotação máxima de 3 animais por caixa, estando os animais identificados com de canetas dermográficas na cauda.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 9 - Fotografia da acomodação dos animais em caixas de polipropileno durante o experimento, com acesso *ad libitum* a água e ração.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 10 - Fotografia da acomodação dos animais em caixas de polipropileno durante o experimento, em prateleiras, nas mediações do laboratório InBio-UFMS.



Fonte: Arquivo pessoal

4.2 PROCEDIMENTOS REALIZADOS

4.2.1 Confeção das Rações

Para a realização do experimento, foram confeccionadas rações isocalóricas, de acordo com o protocolo experimental do *American Institute of Nutrition* (AIN), e armazenadas em temperatura de 8° C, evitando oxidação lipídica e alterações na sua composição (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

Considerando os animais utilizados neste estudo serem considerados adultos jovens, os quais atingem a sua maturidade sexual entre 40/50-60 dias (ANDRADE; PINTO & OLIVEIRA, 2002; QUINN, 2005), as rações confeccionadas foram baseadas na dieta AIN-93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

As rações diferiram apenas na fonte de carboidratos, conforme o Quadro 1, sendo: ração alta em amido, tendo o amido de milho com fonte principal de carboidratos e, ração alta de frutose, tendo a frutose como a principal fonte para carboidrato. Para os demais macronutrientes, a caseína foi utilizada como fonte de proteína e o óleo de soja para lipídeo.

Quadro 1 - Distribuição da composição em macronutrientes das rações experimentais, elaboradas em g/100g.

COMPONENTES (%)	RAÇÃO ALTA EM AMIDO	RAÇÃO ALTA EM FRUTOSE
Proteína (>85%)	22,00	22,00
Lipídeo	5,00	5,00
Carboidrato	65,00	65,00
<i>Amido milho</i>	55,00	10,00
<i>Frutose</i>	-	55,00
<i>Maltodextrina</i>	10,00	-
Celulose	5,00	5,00
Mix mineral	3,50	3,50
Mix vitamínico	1,00	1,00
L- Cistina	0,18	0,18
Bitartarato de colina	0,25	0,25
Tertbutilhidroquinona	0,008	0,008
Total	101,94	101,94

*Outros: umidade, vitaminas e minerais

As rações (Figura 11) foram elaboradas por laboratório terceirizado (Rhooster[®]), de renome na área, sendo realizado teste piloto para fabricação da ração, e ainda, análise da composição centesimal por laboratório terceirizado.

Figura 11 - Fotografia das rações ofertadas aos grupos experimentais. (A) Amido, alta em amido e (B) Frutose, alta em frutose. Rhoster®



Fonte: Arquivo pessoal

4.2.2 Oferta de Água e Rações

A oferta de água e ração foi *ad libitum*, com troca da água 2 vezes por semana e de ração 1 vez por semana. O controle do consumo de ração foi realizado por cada caixa de cada grupo de análise, por meio da diferença entre a oferta e a sobra de ração, sendo utilizada balança semi-analítica para a realização das aferições.

A avaliação do consumo alimentar dos animais foi realizada por gramas de ração/dia. Foi mensurada a quantidade restante de alimento em cada caixa, podendo-se avaliar o consumo pela diferença de peso da ração oferecida na semana anterior por animal.

4.2.3 Suplementação de Fibras

A suplementação de fibras foi realizada por meio de gavagem diária dos animais com FOS nas últimas 4 semanas do experimento (Figura 12), utilizando agulha curva própria para gavagem de camundongos (em aço inox, com comprimento de 31 cm, diâmetro de 1,0 mm e esfera de 1,7 mm, da marca Bonther®).

Figura 12 - Fotografia do procedimento de gavagem realizado nos camundongos durante o experimento.



Fonte: Arquivo pessoal

O volume gavado respeitou a capacidade gástrica dos animais conforme preconizado por Wolfensohn e Llooyd (2003), variando de um animal para outro de acordo com o peso corpóreo aferido semanalmente.

O cálculo para gavagem foi baseado na concentração de 5% de FOS, equivalente a 5 g de FOS para cada 100 g de ração consumida, considerando a média de consumo de ração e do peso dos animais até a 12^a semana do experimento. O volume a ser gavado foi atualizado semanalmente durante as 4 semanas finais do estudo, de acordo com evolução do peso dos animais, tendo todos os animais recebido FOS ou água por gavagem nas últimas quatro semanas do experimento, conforme o desenho experimental ilustrado anteriormente.

As gavagens foram realizadas durante o período de luz, quando os animais não se alimentam, no mesmo horário todos os dias, de modo a minimizar riscos de extrapolar a capacidade gástrica pela suplementação concomitante com a ingestão de ração, bem como, minimizar os possíveis efeitos de distensão gástrica ou outros desconfortos no animal, que pudessem por viéz minimizar o consumo de ração.

4.2.4 Rotina de cuidados dos animais

O seguimento dos animais foi realizado semanalmente, por meio da pesagem individual de cada um, juntamente com o controle da ração consumida em cada caixa. Foi utilizada uma planilha de acompanhamento dos animais durante o experimento (Apêndice 1).

Durante o experimento houve o acompanhamento diário dos animais pelas técnicas responsáveis pelo laboratório, bem como pela pesquisadora e médica veterinária responsáveis.

Apesar de ter ocorrido a perda de 2 animais durante o experimento (01 no grupo amido fibras e outro no grupo frutose fibras), foram avaliadas como aleatórias pela veterinária responsável pelo acompanhamento, sendo observados comportamentos mínimos de estresse nos animais, sem ocorrência de brigas e lesões entre os mesmos, diarreia ou outras situações dignas de nota.

4.2.5 Eutanásia

Na noite anterior à eutanásia, os animais foram mantidos em jejum (por um período de 8 horas), sendo mantido o fornecimento apenas de água.

Na manhã seguinte, imediatamente antes da realização da eutanásia, cada animal foi pesado individualmente, tendo seus dados anotados em planilha de controle.

Foi realizada anestesia inalatória com Isoflurano, onde após a parada cardiorrespiratória, foi realizada laparotomia mediana e punção da veia cava para coleta de sangue (Figura 13).

O sangue foi coletado por profissional médica veterinária com experiência, na quantidade máxima possível em cada animal, por punção do sistema porta após abertura da cavidade abdominal.

As amostras foram armazenadas em tubo próprio com capacidade para 1 ml, devidamente identificados e centrifugadas logo em seguida, até a obtenção de soro límpido (3.500 rpm por 10 min).

Após a separação do soro, o mesmo foi depositado em eppendorf, sendo feita análise em seguida das variáveis bioquímicas. O restante do soro foi depositado em tubo criogênico, congelado a -20°C e posteriormente a -90°C , até o momento de análise das citocinas inflamatórias.

Após a coleta do sangue dos animais, foi realizada exérese do fígado, pesagem e acondicionamento em solução de formalina 10% tamponada para análise histológica.

Figura 13 - Fotografia do procedimento de punção de veia cava para coleta de sangue após a eutanásia.



Fonte: Arquivo pessoal

4.3 VARIÁVEIS DE ANÁLISE

Após o término do experimento, com a eutanásia e coleta dos materiais para estudo, foram analisadas as seguintes variáveis:

- Morfométricas: consumo de ração, ganho de peso, peso do fígado;
- Bioquímicas: glicemia, triglicérides, colesterol total e frações, ureia, creatinina;
- Inflamatórias: PCR, IL-6, IL-10 e IL-12, insulina, MCP-1, TNF e IFN- γ ;
- Histologia do fígado.

4.3.1 Variáveis morfométricas

A avaliação do peso corporal dos animais foi verificada no início do experimento e semanalmente até o final do experimento em balança semi-analítica.

4.3.2 Variáveis bioquímicas

As determinações das variáveis bioquímicas foram realizadas pela análise do soro dos animais, com a determinação de glicose, triglicerídeos, colesterol total e frações, ureia e creatinina, em analisador automático Roche/Hitache - Cobas 501 (Roche Diagnostics®), com kits específicos segundo recomendações do fabricante.

Determinação de Glicose (POD-GOD)

Método colorimétrico-enzimático: a glicose é oxidada enzimaticamente sob ação da glicose oxidase (GOD), formando ácido glucônico e água oxigenada. A água oxigenada formada reage sob ação catalizadora da peroxidase (POD) que reage como doador de hidrogênio com 4-aminofenazona (4-AF) e fenol. Dessa reação oxidativa forma como produto antipirilquinonimina de coloração cereja com absorvância máxima de 505 nm, cuja intensidade de cor é proporcional a concentração de glicose (CAREY, FELBRUEGGE; WESTGARD, 1974).

Determinação de Triglicerídeos

Método: Colorimétrico-enzimático: os triglicerídeos são desdobrados em glicerol e ácidos graxos mediante ação da enzima lipase. O glicerol produzido determinado de forma totalmente enzimática por meio de uma sequência de reações que inclui a fosforilação a glicerol-1-fosfato em presença da enzima glicerol-quinase/GK e oxidação por ação da enzima glicerolfosfato oxidase/GPO, com produção de água oxigenada (peróxido de hidrogênio). A absorvância máxima em 505 nm, diretamente proporcional à concentração de triglicérides na amostra (HAGEN; HAGEN, 1962).

Determinação de Colesterol Total

Método Colorimétrico-Enzimático: os ésteres de colesterol são hidrolisados pelo colesterol esterase/CHE-Lipase de origem fúngica formando colesterol livre, que após oxidação pelo colesterol oxidase/CHOD forma peróxido de hidrogênio. Desta forma, reagindo com substrato em presença da peroxidase/POD, origina-se um cromóforo de coloração cereja. A absorvância máxima é de 505 nm, diretamente proporcional à concentração de colesterol da amostra (FLEG, 1973).

Determinação do Colesterol-HDL

Método Colorimétrico-Enzimático: as lipoproteínas de alta densidade/HDL se separam precipitando seletivamente as lipoproteínas de baixa densidade e muito baixa densidade (LDL e VLDL) mediante acréscimo de Sulfato de Dextran de PM 500.000 em presença de Mg^{++} (cloreto de magnésio), ou utilizando ácido fosfotungstico e cloreto de magnésio. No sobrenadante separado por centrifugação, ficam as HDL sendo realizada a determinação do colesterol ligado, empregando-se o sistema enzimático Colesterol/Oxidase/Peroxidase com colorimetria Trinder (fenol/4-amino-fenazona) (FLEG, 1973).

Determinação do Colesterol-LDL e Colesterol-VLDL

As concentrações dos colesteróis VLDL e LDL foram calculadas utilizando a equação de Friedwald que é exata para amostras cuja concentração de triglicerídios não ultrapasse 400 mg/dL (FLEG, 1973). O cálculo para determinação das frações foi realizado da seguinte forma:

- 1- Colesterol-LDL = Colesterol total - (HDL+ VLDL)
- 2- Colesterol VLDL = Triglicerídeos/5

Determinação de Uréia

Método colorimétrico-enzimático: a uréia é hidrolisada pela urease à íons amônio e CO_2 . Os 2 íons amônio reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a

ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar azul de indofenol. A intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de uréia na amostra.

Determinação de Creatinina

Método colorimétrico: a creatinina e outros componentes da amostra reagem com a solução de picrato em meio alcalino formando um complexo de cor vermelha que é medido fotometricamente. A adição de um acidificante abaixa o pH para 5,0, promovendo a decomposição do picrato de creatinina, permanecendo inalterada a cor derivada dos cromogênios, que também é medida fotometricamente. A diferença entre as duas leituras fornece o valor da creatinina (não corrigida).

4.3.3 Variáveis Inflamatórias:

As citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, IL-6, IL10, IL-12, TNF, IFN- γ e MCP-1, foram quantificadas por citometria de fluxo, utilizando o Kit *CBA Inflammation (Cytometric Bead Assay)* da marca BD[®] (Lote 8171794) no citômetro de fluxo FACSCanto II, de acordo com protocolo indicado pelo fabricante.

A determinação de Proteína C Reativa/PCR foi quantificada pelo método Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) (YU et al., 2010).

4.3.4 Variável Histológica:

Para análise histopatológica, cada fígado foi individualmente imerso em solução de fosfato de formalina 10% (v/v) tamponada logo após a coleta. No prazo de 1 semana após coleta, o tecido foi processado em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e incluído em parafina histológica.

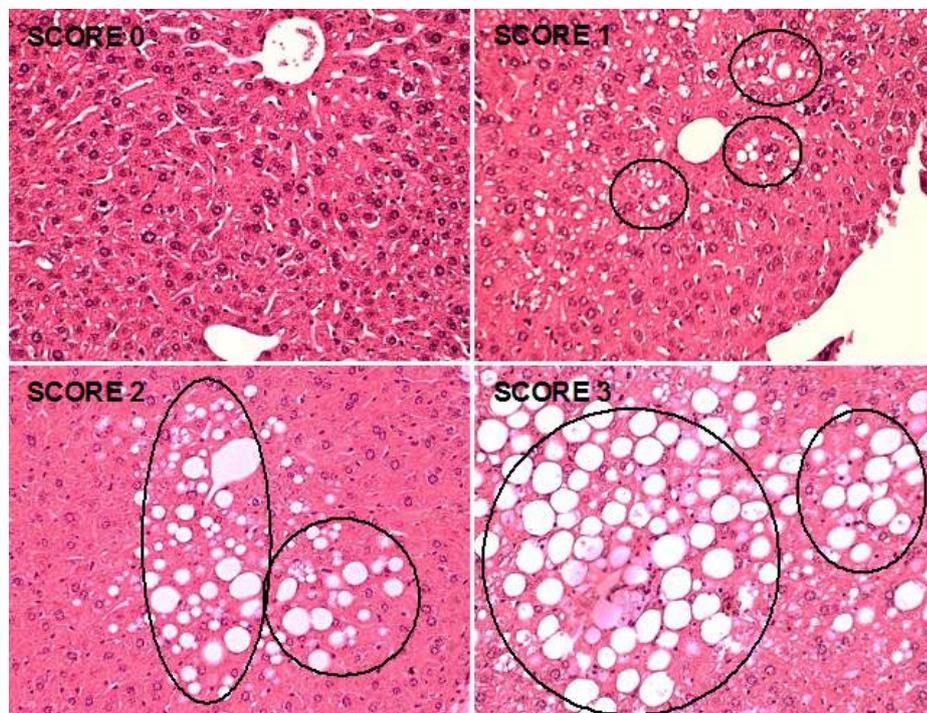
Das peças parafinadas foram confeccionadas secções transversais de 5 μ m de espessura, com auxílio de micrótomo rotativo (Microm HM320). As secções obtidas foram coradas pela técnica de Hematoxilina-Eosina/HE (LUNA, 1968; BEHMER; TOLOSA; FREITAS-NETO, 1976) e Tricromio de Masson/TM (GOLDNER, 1938).

Os fragmentos dos fígados corados com HE foram analisados quanto à morfologia tecidual, com análise de presença de esteatose e focos inflamatórios. Para tanto foram capturados 10 campos aleatórios.

Todas as análises foram realizadas por um único examinador, com experiência, em microscópio óptico.

De acordo com a metodologia de Kleiner *et al.* (2005), na esteatose foi determinada a porcentagem de esteatose em cada campo com a aplicação de escores, sendo < 5% (0), 5-33% (1), >33-66% (2) e >66% (3), conforme Figura 14.

Figura 14 - Fotomicrografias representativas para o score de gradação da esteatose hepática. Score 0, Score 1, Score 2 e Score 3.

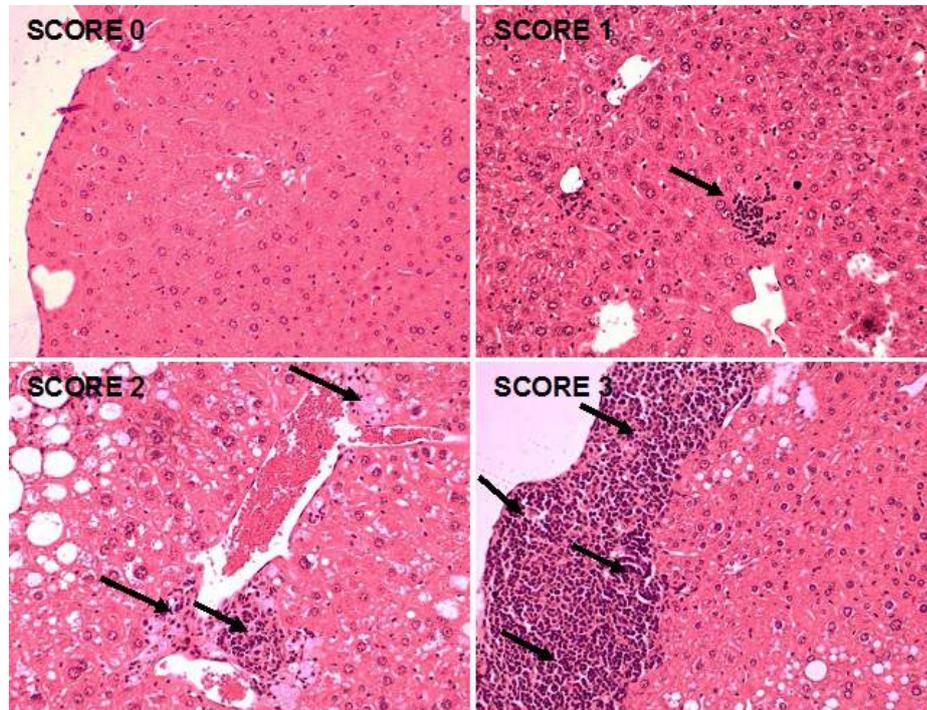


Fonte: Arquivo pessoal

De forma semelhante, seguindo a metodologia proposta por Kleiner e colaboradores (2005), foram aplicados escores de acordo com a contagem dos focos inflamatórios e quando não foi observado foco inflamatório, foi determinado como Score 0, de 1 a 2 focos (Score 1), 3 a 4 focos (Score 2) e mais que 4 focos (Score 3), conforme figura 15.

Para verificar a presença de fibrose, as lâminas de fígado foram coradas em Tricrômio de Masson/TM e analisadas quanto à presença de fibras colágenas, que são coradas em azul.

Figura 15 - Fotomicrografias representativas para o score utilizado para a gradação da quantidade de focos inflamatórios. Score 0, Score 1, Score 2 e Score 3.



Fonte: Arquivo pessoal

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tratados utilizando *software* GraphPad Prism 5, sendo determinadas a média e erro-padrão da média (EPM). A comparação entre grupos foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste Bonferroni, considerando um nível de significância estatística $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Para análise e discussão dos resultados, os grupos experimentais serão denominados Amido (dieta alta em amido), AmidoF (dieta alta em amido com suplementação de FOS), Frutose (dieta alta em frutose) e FrutoseF (dieta alta em frutose com suplementação de FOS).

No decorrer do experimento, dos 32 animais envolvidos 2 animais morreram, sendo um do grupo amidoF e outro do grupo frutoseF, não sendo observada associação a trauma referente ao procedimento de gavagem ou tipo de ração oferecida. Não foram observados também sinais de estresse significativo nos animais durante o experimento em nenhum dos grupos.

Objetivando a suplementação estritamente controlada de FOS de acordo com o peso do animal, foi optada pela administração de FOS separadamente da ração, por gavagem e em período de jejum, minimizando os efeitos da redução da ingestão da ração por desconfortos gástricos imediatos ao procedimento de gavagem.

As Tabelas 1 e 2 apresentam a distribuição das variáveis morfométricas e bioquímicas, e dos efeitos inflamatórios e de esteatose hepática a partir de dietas ricas em carboidratos, buscando-se também avaliar os possíveis efeitos terapêuticos da suplementação de FOS.

Conforme demonstrado na Tabela 1, até a 12^a semana de seguimento todos os animais obtiveram aumento de peso com as rações ofertadas, sendo um aumento de 33,9% para o grupo amido e de 41,8% no grupo frutose. Os animais do grupo frutose apresentaram maior peso ao final do estudo em comparação aos animais do grupo amido ($p=0,022$), tendo também consumido mais ração em todas as fases do estudo.

Após o início da realização de gavagem nos animais, foi observada redução do ganho de peso em todos os grupos experimentais, incluindo nos animais dos grupos controles, com ocorrência de perda de peso nos animais dos grupos amido, amidoF e frutoseF.

A suplementação de FOS nos animais Frutose demonstrou efeito diferencial entre os grupos, tendo os animais do grupo FrutoseF apresentado perda de peso significativa, quando comparado ao grupo Frutose ($-4,6\pm 1,17$ gramas, $p<0,001$), interferindo na diferença do peso final dos animais ($p=0,044$), acompanhado de redução no consumo de ração ($p<0,001$).

Na análise de todas as variáveis bioquímicas (Tabela 1), a frutose não induziu piores resultados comparando-se com animais alimentados com amido. No geral, foram encontradas diferenças estaticamente significantes apenas analisando a suplementação de FOS nos animais

alimentados com amido, tendo a suplementação reduzido os níveis de ureia, colesterol total e HDL.

No tocante as citocinas inflamatórias, os animais alimentados com frutose apresentaram maiores níveis de MCP1 e TNF quando comparado aos animais alimentados com amido ($p < 0,05$), expressos na Tabela 2 e na Figura 16.

A suplementação de FOS interferiu apenas nas citocinas inflamatórias dos animais alimentados com frutose, tendo aumentado os níveis de IL6, IL10, IFN e de IL12 ($p < 0,05$) nos animais do grupo FrutoseF. Nota-se que o peso do fígado destes animais foi significativamente menor do que naqueles que receberam apenas frutose ($p = 0,033$).

Na comparação da esteatose hepática entre todos os grupos experimentais (Tabela 2, Figuras 17 e 18), a utilização de dieta com alta concentração de amido induziu pouco acúmulo de lipídeo no fígado dos animais (score $0,25 \pm 0,05$), tendo o peso do fígado dos animais do grupo amido sido menor do que dos animais do grupo frutose ($p < 0,001$). A suplementação de FOS nos animais AmidoF causou redução significativa da esteatose em todos os animais ($p = 0,009$).

A dieta com alta concentração de frutose também desencadeou esteatose (score $0,86 \pm 0,10$), sendo estatisticamente superior ao grupo amido ($p < 0,001$) e claramente evidenciada na análise histológica (Figura 18). Novamente, a suplementação com fibras foi eficaz em reduzir e/ou impedir o acúmulo de lipídeos no fígado ($p < 0,001$).

Quanto à análise dos focos inflamatórios (Tabela 2, Figuras 19 e 20), os animais do grupo amido apresentaram maior quantidade de focos inflamatórios ($p = 0,005$), bem como maior score inflamatório ($p < 0,001$) do que os animais do grupo frutose. Não houve efeito da suplementação de FOS em ambos os grupos para esta variável.

Quanto à análise das fibras colágenas pela coloração Tricrômio de Masson, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos, nem quanto o tipo de carboidrato nem quanto a suplementação de FOS (Figuras 21 e 22).

Tabela 1 - Resultados da comparação entre grupos experimentais (Amido X AmidoF; Frutose X FrutoseF, Amido X Frutose) em relação ao peso, ao ganho de peso, consumo de ração e variáveis bioquímicas dos animais avaliados neste estudo.

Variáveis	Amido	AmidoF	P Valor	Frutose	FrutoseF	P Valor	Amido	Frutose	P Valor
Peso (g)									
Inicial	36,5 ± 0,85	37,3 ± 0,99	0,929	36,4 ± 1,02	36,0 ± 1,18	0,991	36,5 ± 0,85	36,4 ± 1,02	1,000
12 semanas	48,9 ± 1,26	50,7 ± 1,43	0,713	51,6 ± 1,30	52,4 ± 1,38	0,966	48,9 ± 1,26	51,6 ± 1,30	0,374
Final	45,9 ± 1,11	47,6 ± 2,10	0,888	53,1 ± 2,00	47,9 ± 2,03	0,148	45,9 ± 1,11	53,1 ± 2,00	* 0,022
Ganho de peso (g)									
12 semanas	12,4 ± 0,98	13,4 ± 0,95	0,882	15,3 ± 0,88	16,4 ± 1,59	0,843	12,4 ± 0,98	15,3 ± 0,88	0,196
Suplemento	-3,0 ± 0,65	-3,1 ± 0,86	0,999	1,5 ± 0,82	-4,6 ± 1,17	*** < 0,001	-3,0 ± 0,65	1,5 ± 0,82	** 0,003
Final	9,4 ± 0,98	10,29 ± 1,3	0,972	16,8 ± 1,31	11,9 ± 2,66	* 0,044	9,4 ± 0,98	16,8 ± 1,31	** 0,008
Consumo médio (g)									
12 semanas	30,9 ± 1,22	32,5 ± 0,20	0,409	34,1 ± 0,59	32,0 ± 0,58	0,212	30,9 ± 1,22	34,1 ± 0,59	* 0,018
Suplemento	27,3 ± 0,90	26,3 ± 0,65	0,613	32,0 ± 0,51	26,0 ± 0,30	*** < 0,001	27,3 ± 0,90	32,0 ± 0,51	*** < 0,001
Final	30,0 ± 1,14	30,9 ± 0,31	0,740	33,6 ± 0,56	30,5 ± 0,36	** 0,004	30,0 ± 1,14	33,6 ± 0,56	* 0,018
Variáveis Bioquímicas (mg/dL)									
Insulina	0,2 ± 0,00	0,2 ± 0,00	1,000	0,2 ± 0,00	0,2 ± 0,00	1,000	0,2 ± 0,00	0,2 ± 0,00	1,000
Proteína C reativa	0,2 ± 0,05	0,3 ± 0,07	0,718	0,1 ± 0,08	0,2 ± 0,06	0,929	0,2 ± 0,05	0,1 ± 0,08	0,749
Glicose	416,5 ± 47,86	372,7 ± 30,23	0,902	474,8 ± 60,69	513,2 ± 67,72	0,958	416,5 ± 47,86	474,8 ± 60,69	0,853
Ureia	62,8 ± 4,99	45,1 ± 2,28	* 0,026	56,7 ± 1,98	53,5 ± 5,68	0,964	62,8 ± 4,99	56,7 ± 1,98	0,772
Creatinina	0,3 ± 0,02	0,2 ± 0,03	0,115	0,3 ± 0,05	0,3 ± 0,05	1,000	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,05	0,974
Ácido úrico	7,9 ± 0,72	6,8 ± 0,51	0,794	6,0 ± 1,51	6,9 ± 1,27	0,928	7,9 ± 0,72	6,0 ± 1,51	0,534
Colesterol total	155,3 ± 8,20	91,7 ± 9,33	** 0,002	163,5 ± 22,32	135,5 ± 11,56	0,375	155,3 ± 8,20	163,5 ± 22,32	0,954
HDL	156,8 ± 7,99	96,0 ± 9,14	*** < 0,001	155,7 ± 18,98	130,1 ± 9,26	0,353	156,8 ± 7,99	155,7 ± 18,98	1,000
VLDL	33,2 ± 2,41	24,4 ± 3,46	0,580	38,6 ± 10,15	37,9 ± 9,22	1,000	33,2 ± 2,41	38,6 ± 10,15	0,897
Triglicérides	166,1 ± 12,08	121,3 ± 17,31	0,548	192,8 ± 50,65	191,8 ± 37,74	1,000	166,1 ± 12,08	192,8 ± 50,65	0,893

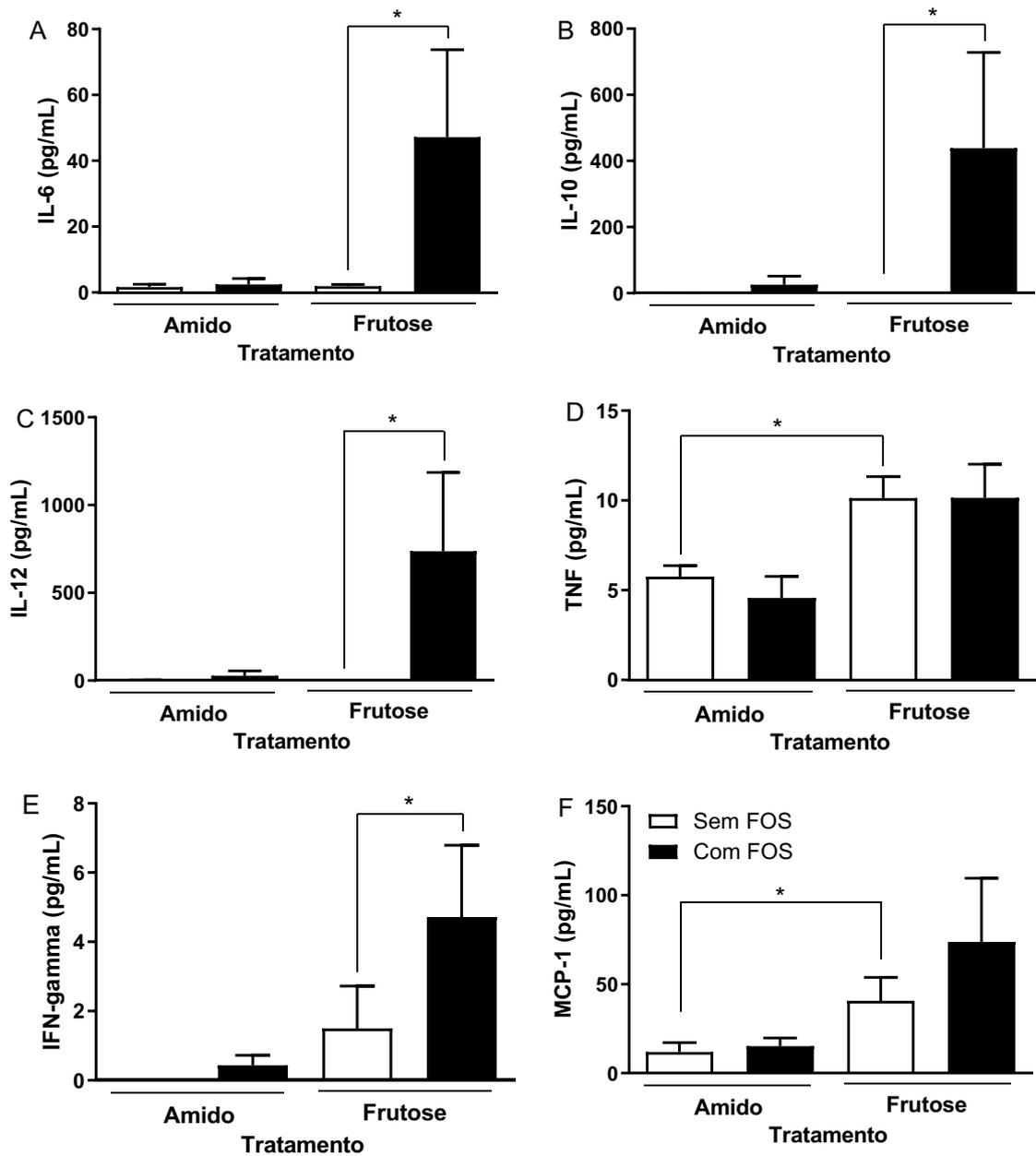
Os resultados foram expressos como média ± EPM (n=7-8). ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni, considerando $p < 0,05$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Tabela 2 - Resultados da comparação entre grupos experimentais (Amido X AmidoF; Frutose X FrutoseF, Amido X Frutose) em relação às citocinas inflamatórias, peso do fígado, grau de esteatose, focos inflamatórios e pontos de fibrose dos animais avaliados neste estudo.

Variáveis	Amido	AmidoF	P Valor	Frutose	FrutoseF	P Valor	Amido	Frutose	P Valor
Citocinas Inflamatórias									
IL6 (pg/mL)	1,6 ± 0,84	2,4 ± 1,78	1,000	1,9 ± 0,55	47,1 ± 26,62	* 0,047	1,6 ± 0,84	1,9 ± 0,55	1,000
IL10 (pg/mL)	0,5 ± 0,5	25,9 ± 25,9	0,999	0,4 ± 0,26	438,0 ± 290,40	* 0,031	0,5 ± 0,5	0,4 ± 0,26	1,000
MCP1 (pg/mL)	11,9 ± 5,28	15,1 ± 4,64	0,999	40,6 ± 13,25	73,9 ± 35,71	0,513	11,9 ± 5,28	40,6 ± 13,25	* 0,017
IFN (pg/mL)	0,0 ± 0,00	0,4 ± 0,30	0,992	1,5 ± 1,23	4,7 ± 2,08	* 0,031	0,0 ± 0,00	1,5 ± 1,23	0,738
TNF (pg/mL)	5,8 ± 0,62	4,6 ± 1,19	0,886	10,1 ± 1,20	10,1 ± 1,87	1,000	5,8 ± 0,62	10,1 ± 1,20	* 0,018
IL12 (pg/mL)	1,9 ± 1,88	27,6 ± 27,57	1,000	0,3 ± 0,33	736,4 ± 449,50	* 0,036	1,9 ± 1,88	0,3 ± 0,33	1,000
Peso do Fígado (mg)	1807 ± 80,56	1767 ± 127,30	0,995	2786 ± 169,8	2276 ± 130,5	* 0,033	1807 ± 80,56	2786 ± 169,8	*** <0,001
Grau de esteatose	0,25 ± 0,05	0,00 ± 0,00	** 0,009	0,86 ± 0,10	0,17 ± 0,05	*** <0,001	0,25 ± 0,05	0,86 ± 0,10	*** <0,001
Focos Inflamatórios									
Contagem dos focos	3,1 ± 0,20	2,8 ± 0,17	0,630	2,25 ± 0,23	2,3 ± 0,20	0,999	3,1 ± 0,20	2,25 ± 0,23	** 0,005
Escore inflamatório	1,86 ± 0,08	1,7 ± 0,12	0,378	1,3 ± 0,09	1,4 ± 0,09	0,818	1,86 ± 0,08	1,3 ± 0,09	*** <0,001
Pontos de Fibrose	9,3 ± 0,92	11,8 ± 0,91	0,134	11,5 ± 0,82	9,6 ± 0,65	0,337	9,3 ± 0,92	11,5 ± 0,82	0,174

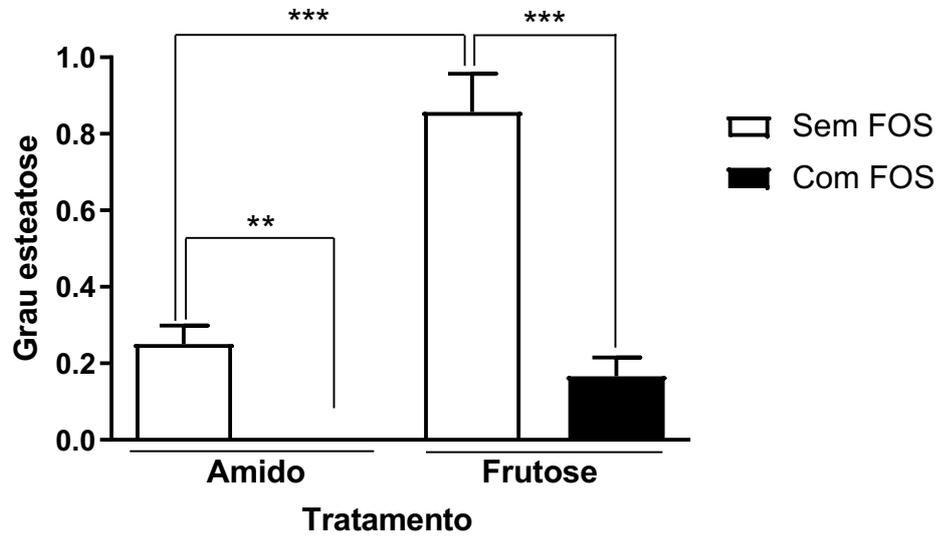
Os resultados foram expressos como média ± EPM (n=7-8). ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni, considerando $p < 0,05$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Figura 16 - Gráfico demonstrando a dosagem de citocinas inflamatórias por meio da citometria de fluxo nos grupos experimentais (Amido: dieta com alta concentração de amido; Frutose: dieta com alta concentração de frutose), de acordo com a suplementação de FOS. A: IL-6, B: IL-10, C: IL-12, D: TNF, E: IFN- γ , F: MCP-1.



Nota: Os resultados foram expressos como média \pm EPM (n=7-8). ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni, considerando $p < 0,05$. * $p < 0,05$.

Figura 17 - Gráfico demonstrando o grau de esteatose no fígado dos animais (Amido: dieta com alta concentração de amido; Frutose: dieta com alta concentração de frutose), de acordo com a suplementação de FOS.



Nota: Os resultados foram expressos como média \pm EPM (n=7-8). ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni, considerando $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Figura 18 - Fotomicrografia dos cortes hepáticos corados em HE, com setas indicando pontos de esteatose hepática de acordo com os grupos de análise. (A) Amido, (B) AmidoF, (C) Frutose e (D) FrutoseF.

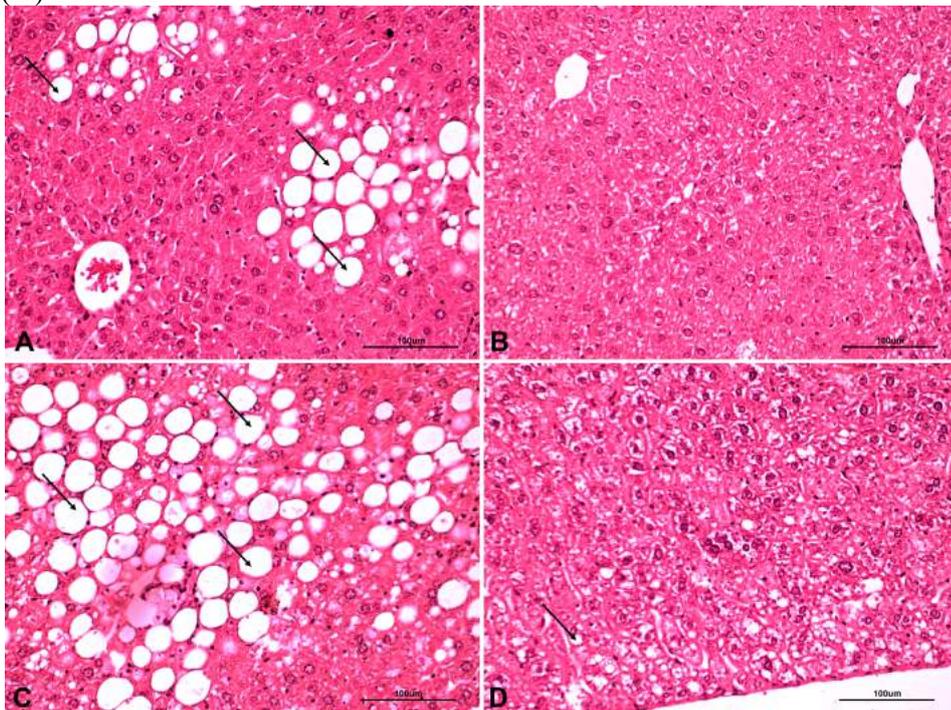
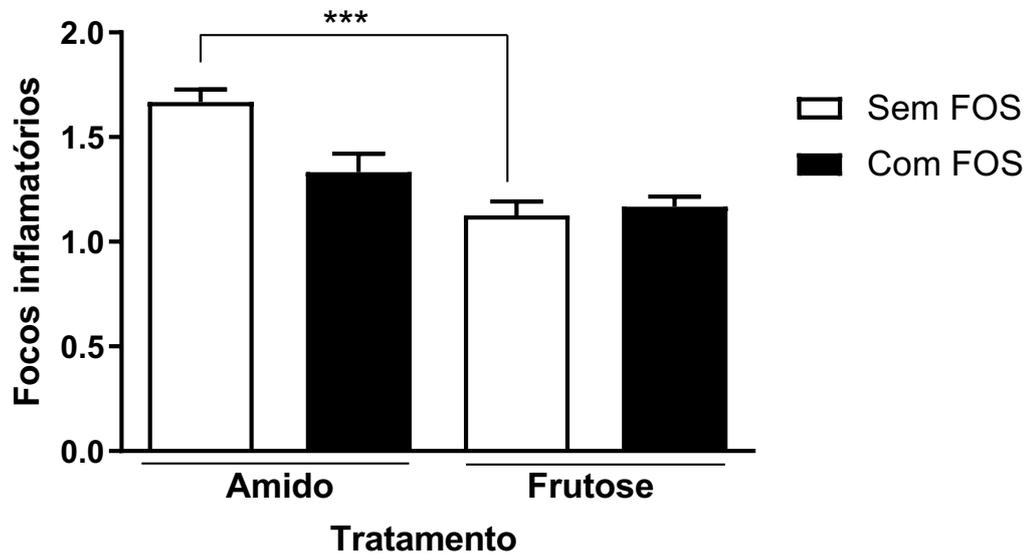


Figura 19 - Gráfico representando focos inflamatórios no fígado dos animais (Amido – dieta com alta concentração de amido, Frutose - dieta com alta concentração de frutose), de acordo com a suplementação de FOS.



Nota: Os resultados foram expressos como média \pm EPM (n=7-8). ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni, considerando $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Figura 20 - Fotomicrografia dos cortes hepáticos corados em HE, com setas indicando pontos de focos inflamatórios, de acordo com os grupos de análise. (A) Amido, (B) AmidoF, (C) Frutose e (D) FrutoseF.

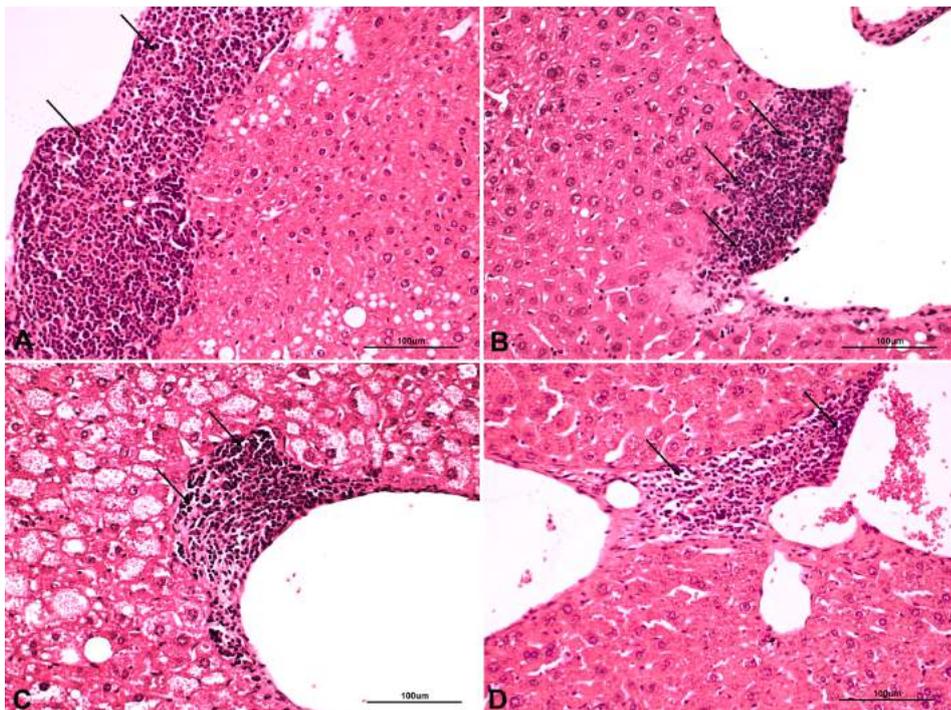
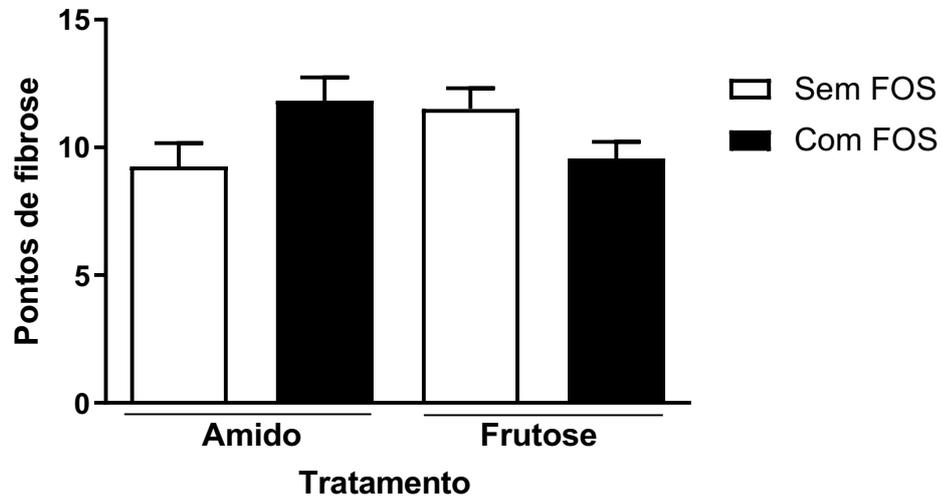
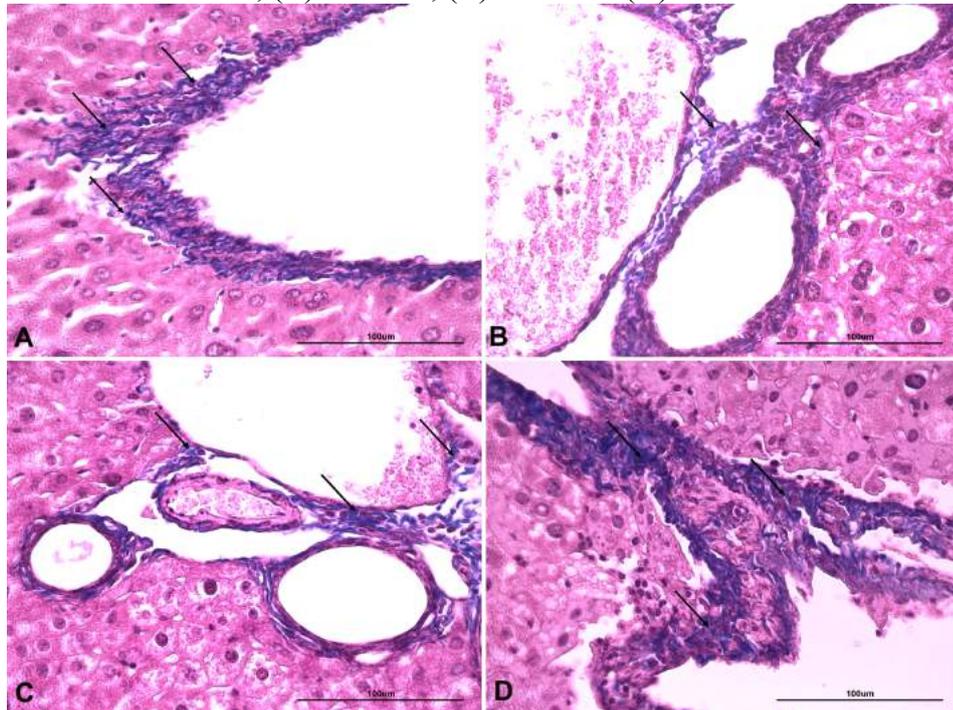


Figura 21 - Gráfico demonstrando os pontos de fibrose no fígado dos animais (Amido – dieta com alta concentração de amido, Frutose - dieta com alta concentração de frutose), de acordo com a suplementação de FOS.



Nota: Os resultados foram expressos como média \pm EPM (n=7-8), ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni, considerando $p < 0,05$, $***p < 0,001$

Figura 22 - Fotomicrografia dos cortes hepáticos corados em Tricrômio de Masson, com setas indicando fibras colágenas (coradas em azul), de acordo com os grupos de análise. (A) Amido, (B) AmidoF, (C) Frutose e (D) FrutoseF.



6 DISCUSSÃO

Diversos estudos em humanos tem apontado os efeitos maléficos de uma dieta rica em carboidratos (DEHGHAN *et al.*, 2017; FENG *et al.*, 2015), com destaque as consequências do crescente consumo de frutose no mundo, estimulado principalmente a partir de dietas ocidentais (HAVEL, 2013; HAVEL, 2005; HORST & SERLIE, 2017; RAATZ; JOHNSON; PICKLO, 2015; STANHOPE; SCHWARZ).

No tocante a estudos em modelos animais de doença, roedores tem sido os animais mais utilizados para análise de estudos de intervenção dietética, especialmente de inflamação relacionada a obesidade desencadeada por dietas ricas em gorduras e/ou carboidratos (HILDEBRAND *et al.*, 2017).

Com a utilização de estudos experimentais em modelos animais, nota-se a existência de diversos estudos que avaliam o efeito do alto consumo de carboidratos em si (LI *et al.*, 2015; MASI *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2013), porém, em menor quantidade, estudos que avaliam os efeitos exclusivos de dietas enriquecidas em frutose.

A maioria dos estudos encontrados referentes ao alto consumo de frutose, avaliam o possível efeito terapêutico de algum composto específico sobre malefícios (como estresse oxidativo, inflamação, esteatose hepática e outros) induzidos por estas dietas (ARVY *et al.*, 2013; CECILIANO *et al.*, 2019; DZIADEK *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2019; LI & LU, 2018; MEDRANO *et al.*, 2019).

Estes estudos utilizam doses diversificadas de frutose, que variam entre 15 a 85% e realizam a sua oferta aos animais de diferentes formas, seja adicionada a própria ração (CHOI; ABDELMEGEED; CECILIANO *et al.*, 2019; GUIMARÃES *et al.*, 2018; SONG, 2017; TAMER *et al.*, 2019) ou de forma líquida, diluída na água, como dieta principal ou como suplementação (DO *et al.*, 2018; DZIADEK *et al.*, 2019; MEDRANO *et al.*, 2019; SANGUESSA *et al.*, 2017).

Em nosso estudo, foi optada pela oferta da frutose misturada a ração em substituição ao amido. Considerando a consistência viscosa da frutose, buscando a garantia de consistência dos pellets da ração e a elaboração de rações isocalóricas, a quantidade máxima possível para oferta na própria ração foi de 55% de frutose.

No tocante à suplementação de FOS, existem diversas dosagens utilizadas em modelos animais, chegando a ocasionar dificuldade na escolha da dose a ser utilizada, bem

como na comparação dos seus resultados, adicionado ainda a diversidade de linhagem, idade e sexo dos animais.

No geral, as doses de suplementação de FOS variam entre 2,5% a 15% da composição da dieta (HAUBERT *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015; NAKAMURA *et al.*, 2014; YEH *et al.*, 2014), sendo misturada a ração (BUSSEROLES *et al.*, 2003; SHINOKI & HARA, 2011; WANG *et al.*, 2013) ou uma minoria sob forma líquida, por gavagem (AGUILAR *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2017).

Há de se considerar também as diferenças de cálculo para a dosagem de FOS a ser utilizada. Alguns estudos utilizam FOS por porcentagem de peso da composição da dieta (DELGADO *et al.*, 2012; GENDA *et al.*, 2018; HAUBERT *et al.*, 2015) e outros de acordo com o peso do animal (AGUILAR *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2013).

A suplementação de FOS a 5% foi realizada por gavagem neste estudo (equivalente a 5g/100g de ração), objetivando a suplementação estritamente controlada de FOS e em período de jejum, minimizando o risco de possíveis efeitos da redução da ingestão da ração por desconfortos gástricos imediatos ao procedimento de gavagem.

Foi escolhida esta dosagem de FOS, por considerar a composição das rações já ter 5% de celulose, bem como minimizar os riscos de ocorrência de diarreia nos animais, como citado em estudo realizado por Busseroles e colaboradores (2003).

No geral, os resultados da influência do tipo do carboidrato sobre o peso dos animais são conflitantes na literatura. Alguns estudos apontam pouca influência sobre o ganho de peso nos animais alimentados com dietas enriquecidas com carboidratos (LI *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2013), mesmo quando comparados a dietas controle, ricas em gorduras ou ricas em carboidratos com gorduras (FERRAMOSCA *et al.*, 2014; MASI *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2012).

Apesar disso, mesmo sem alterações significantes de peso dos animais, estes e outros estudos apontam efeitos maléficis de dietas ricas em carboidratos, sobre a inflamação e acúmulo de gordura hepática, além de outros distúrbios metabólicos (LI *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Em estudo realizado por Oliveira e colaboradores (2013), apesar de não ter havido diferença de ganho de peso e consumo de ração entre camundongos alimentados com dieta rica em carboidratos (CHO 74,2%, dos quais 30% eram compostos por carboidratos refinados) quando comparados a uma dieta controle, os animais do grupo experimental apresentaram maior adiposidade visceral, intolerância a glicose, glicemia, marcadores

inflamatórios, bioquímicos e genéticos de inflamação, infiltrado de macrófagos no tecido adiposo e menor sensibilidade à insulina.

De acordo com Li e coautores (2015), em estudo realizado com camundongos machos de 6 semanas de idade, apesar de uma dieta líquida rica em carboidratos (70% a base de maltose dextrina) não ter sido associada a maior peso, a mesma induziu mais dano hepático, com aumento da resposta inflamatória, produção de citocinas inflamatórias e esteatose hepática, do que uma dieta rica em gorduras (60%).

O mesmo foi observado em estudo realizado por Oliveira e colaboradores (2014). Camundongos com 3 meses de idade alimentados com dieta rica em sacarose (CHO 76%, sendo 32% de sacarose) não apresentaram ganho significativo de peso, apesar de terem apresentado hipertrofia dos adipócitos e esteatose hepática em níveis semelhantes ao de uma dieta rica em gorduras.

Dentre os carboidratos, a frutose merece uma atenção especial por apresentar uma via metabólica diferente de absorção. De acordo com Takashi e colaboradores (2017), apesar do seu já apontado malefício do consumo excessivo de frutose, poucos estudos têm correlacionado desfechos negativos de saúde ao alto consumo de glicose ou frutose.

Dentre os poucos estudos encontrados em modelos animais que objetivaram analisar o efeito da frutose em si, estão os realizados por Tillman e colaboradores (2014) e por Woodie e Blythe (2017).

No estudo realizado por Tillman e coautores (2014), a alimentação de ratos por 3 meses com frutose (60%) falhou na indução do ganho de peso, acompanhado de ausência de alterações de glicemia, triglicerídeos e ácidos graxos livres, apesar de ter aumentado a ingestão alimentar e taxa metabólica, contrariando a maior parte dos estudos que trabalham com dieta rica em frutose.

Já em estudo realizado por Woodie e Blythe (2017), foi realizada a comparação da oferta de dieta rica em gorduras com uma dieta rica em frutose em ratos machos. Os autores encontraram que a dieta rica em gorduras acumulou mais gordura e induziu maior ganho de peso nos animais. Porém a dieta rica em frutose induziu mais resistência insulínica e elevou os triglicerídeos. Os autores concluíram que estes dois macronutrientes combinados podem exacerbar os efeitos maléficos um do outro.

Em outro estudo, camundongos submetidos a suplementação de frutose na água a 30%, não consumiram mais ração, embora os mesmos apresentassem maior peso ao final do

estudo, acompanhado de maior peso do fígado, maiores níveis de colesterol e triglicerídeos séricos, MCP-1 e TNF- α (LI *et al.*, 2019).

Ramos, Batista e Albuquerque (2017), em estudo realizado com ratos *Wistar* alimentados com solução de frutose a 20% por 8 semanas, apesar de não ter havido diferença de peso dos animais ao final do estudo, os animais que receberam frutose apresentaram maior percentual de gordura corporal, bem como depósito de gordura retroperitoneal e epididimal, além de maiores níveis de triglicerídeo plasmático. Os autores atribuíram a possibilidade do pouco tempo de estudo não ter influenciado no peso dos animais.

Outro estudo também não encontrou diferenças no ganho de peso comparando ratos *Wistar* que receberam solução de frutose a 20%. Apesar disso, os animais que receberam frutose apresentaram maior acúmulo de gordura abdominal e níveis de triglicerídeos (RAMOS; BATISTA; ALBUQUERQUE, 2017).

Já em estudo realizado por Choi, Abdelmegeed e Song (2017) não foram encontradas diferenças significantes entre o peso corpóreo e do fígado dos animais, comparando com animais que consumiram uma dieta rica em frutose (35%). Nota-se que além da quantidade de frutose ofertada ter sido menor do que no presente estudo, o tempo de seguimento foi de apenas 3 semanas.

Em estudo realizado por Leung e colaboradores (2016), com um longo tempo de exposição (33 semanas) de camundongos a uma dieta rica em gorduras e frutose (mesmo que em uma quantidade menor do que neste nosso estudo), foi suficiente para induzir uma expressiva diferença de peso corpóreo e peso do fígado dos animais.

Contrariando os dados acima apresentados, outros estudos vão de encontro aos resultados encontrados no presente estudo, onde o consumo de dieta rica em frutose induziu maior ganho de peso, acompanhado ou não de maior consumo de ração. Estes ofertaram dietas ricas em frutose em diferentes concentrações (30 a 85%) e em diferentes formas (misturada a ração ou diluída na água) (AGUILAR *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2019; LI & LU, 2018).

Camundongos machos que receberam suplementação de frutose a 30% diluída na água por 8 semanas, apresentaram maior peso, ganho de peso, peso do fígado, maiores níveis de colesterol, triglicerídeos, LDL e menor de HDL, não acompanhado de um maior consumo de ração (LI *et al.*, 2019).

Em outro estudo de metodologia semelhante, com camundongos acompanhados por 8 semanas com oferta de frutose a 30% diluída na água, os animais apresentaram maior ganho

de peso e peso do fígado dos animais, associado a maiores taxas de colesterol e triglicerídeos e menores de HDL (LI & LU, 2018).

Resultados semelhantes foram encontrados em ratos *Wistar* acompanhados por 12 semanas, onde os animais que receberam frutose a 20% apresentaram maior peso, níveis de colesterol e triglicerídeos séricos, além da elevação de alguns marcadores inflamatórios (AGUILAR *et al.*, 2014)

De acordo TILLMAN e colaboradores (2014), os diferentes resultados encontrados na literatura em estudos experimentais com modelos animais, podem ser atribuídos as diferenças de linhagens, na idade dos animais e forma de oferta da frutose.

A perda de peso na fase de suplementação nos animais dos grupos amido parece ter sido como resultado do procedimento de gavagem em si, considerando o grupo controle amido ter tido perda de peso semelhante ao grupo AmidoF, embora não tenham sido observadas intercorrências dignas de nota durante o procedimento de gavagem nas últimas 4 semanas do experimento.

Foi observado que o maior peso dos animais do grupo frutose no nosso estudo, pode ter sido influenciado pelo maior consumo de ração dos animais em todas as fases do experimento, e, principalmente pela fase de suplementação, quando a diferença de peso entre os grupos amido e frutose foi aumentada, também influenciada pela perda de peso dos animais do grupo amido, tendo os animais do grupo frutose mantido ganho de peso, porém em menor proporção.

Considerando os hábitos dos roedores, idade dos animais, bem como o acesso *ad libitum* à ração, era esperado que os animais ganhassem peso durante o experimento. A utilização de grupos controles com diferentes proporções e tipos de macronutrientes é fundamental para uma comparação do quanto o componente dietético avaliado interfere sobre o ganho de peso, obesidade e suas consequências.

Cabe ressaltar o tempo de experimento no presente estudo, o qual é superior a maior parte dos estudos encontrados, o que também pode ter contribuído para que tenha havido tempo hábil do aumento de peso dos animais.

Ademais, de acordo com Aguilar e colaboradores (2014), o acúmulo de gordura e os níveis de triglicerídeo em ratos alimentados com dietas ricas em frutose explica o aumento do peso dos animais.

A suplementação de FOS no presente estudo induziu perda de peso apenas nos animais alimentados com frutose, acompanhado de redução do grau de esteatose hepática em ambos os grupos, com expressiva redução do peso do fígado destes animais.

Em estudo realizado por Shinoki e Hara (2011), a suplementação de FOS a 5% em uma dieta controle por 3 e 5 semanas não interferiu no peso final ou consumo de ração, embora tenha reduzido a gordura abdominal, acompanhado de um aumento da sensibilidade à insulina.

Outros estudos também associaram a perda de peso dos animais a suplementação de FOS (AGUILAR *et al.*, 2014; GUENDA *et al.*, 2018).

Os autores atribuíram a perda de peso, redução de colesterol e triglicérides a melhora da digestão intestinal pela suplementação de FOS, prevenindo o acúmulo de gorduras e o aumento de citocinas inflamatórias (AGUILAR *et al.*, 2014).

Alguns estudos tratam dos efeitos de FOS diretamente sobre a mucosa intestinal, atuando principalmente no aumento da sua permeabilidade. Outros buscam os efeitos de FOS sobre outros órgãos como pulmão, como em estudo realizado por Yeh e colaboradores (2014).

Dentre os efeitos do consumo de fibras, existe associação a maior saciedade e talvez por isso, tenha ocorrido o menor consumo de ração entre os animais alimentados com frutose e conseqüente redução do ganho de peso.

Cabe ressaltar a influência do procedimento de gavagem em si, principalmente nos animais alimentados com dieta rica em amido, os quais apresentaram perda de peso independente da suplementação de FOS.

Embora não seja possível fazer referência quanto ao efeito de FOS sobre o consumo de ração e perda de peso nos animais que receberam dieta rica em amido, foi observada influencia sobre variáveis bioquímicas, as quais serão discutidas adiante.

Apesar do papel das fibras ser amplamente discutido, o meio científico ainda carece esclarecer o possível efeito terapêutico de fibras frente aos diferentes macronutrientes e dietas consumidas.

São poucos os estudos que objetivam apontar os valores de referência para variáveis bioquímicas em roedores, onde para a comparação de alguns dados deste estudo foram utilizados 3 estudos nacionais realizados com camundongos, que objetivaram a definição de valores de referencia (RESTEL, 2012; SANTOS *et al.*, 2016; SPINELLI *et al.*, 2012).

Em estudo realizado por Santos e colaboradores (2016), os valores de glicemia em camundongos de 2-3 meses de idade alimentados com dieta AIN-93 M apresentaram média

de 158 mg/dL para *Swiss*, para C57BL/6 de 185 mg/dL e para BALB/c de 112 mg/dL, ou seja, independente da linhagem dos animais, todos os valores foram muito abaixo dos encontrados em nosso estudo. O mesmo ocorreu para os níveis de colesterol e triglicerídeos.

Em outro estudo, realizado no mesmo laboratório onde foi realizada nossa pesquisa, em camundongos *Swiss* machos de 30 a 120 dias de vida, alimentados com ração comercial, os animais apresentaram menor colesterol, creatinina com valores semelhantes e maiores níveis de triglicerídeos em relação aos dados do nosso estudo (RESTEL, 2012).

Já em estudo realizado por Spinelli e coautores (2012), em camundongos machos, de diferentes linhagens e idades, foram encontrados valores de creatinina foram semelhantes ($0.28 \pm 0,15$ mg/dL), com menores níveis de colesterol (140.00 ± 26.05 mg/dL), triglicerídeos 79.60 ± 33.30 mg/dL e VLDL 15.92 ± 15.92 mg/dL.

Em estudo realizado por Oliveira e colaboradores (2013) com dieta rica em carboidrato (CHO 74,2%, dos quais 30% eram refinados), diferenças importantes nos níveis de triglicerídeos, colesterol e glicose séricos foram observadas a partir do terceiro dia do estudo, persistentes até a 12^a semana de experimento. Além do mais, o aumento precoce dos processos inflamatórios locais e sistêmicos induzidos pela dieta esteve associado ao aumento dos níveis lipídicos séricos, intolerância à glicose e resistência à insulina.

Em estudo realizado por Do e coautores (2018), com camundongos alimentados com dietas ricas em glicose (85%), frutose (85%) ou gordura (61,2%), quando comparados ao grupo controle a dieta rica em frutose induziu maiores taxas de glicemia e colesterol do que a rica em glicose.

Apesar do estudo acima ser muito interessante e reforçar que dietas ricas em carboidratos podem apresentar desfechos metabólicos e inflamatórios tão ruins quanto os causados por dietas ricas em gorduras, os autores não aprofundaram as análises e discussão sobre o efeito comparativo entre os dois tipos de carboidratos avaliados (DO *et al.*, 2018).

Já em estudo realizado por Tillman e colaboradores (2014), a dieta rica em frutose ofertada a camundongos não alterou os níveis de glicose e triglicerídeos circulantes quando comparada a dieta controle rica em amido.

Outros estudos demonstraram a ausência de diferença nos níveis de glicose sanguíneos quando comparado o consumo de frutose com outros carboidratos (DZIADEK *et al.*, 2019; RAMOS; BATISTA; ALBUQUERQUE, 2017; TILLMAN *et al.*, 2014).

Um das possíveis causas para não haver diferença glicêmica entre os animais que receberam frutose dos que receberam amido em nosso estudo, é a composição isocalórica das

rações, bem como o índice glicêmico da frutose ser menor que do amido, havendo a frutose pouca influência sobre o metabolismo de carboidratos.

Apesar de terem sido observados no nosso estudo valores de glicemia muito acima dos encontrados em outros estudos em roedores, entre os grupos experimentais deste estudo não foram observadas diferenças de glicemia comparando o tipo de dieta ofertada e a suplementação de FOS.

Mesmo com o possível efeito hiperglicêmico da FOS, a suplementação da FOS também não interferiu na glicemia dos animais.

No presente estudo, todos os animais apresentaram o mesmo valor de insulina, mesmo tendo sido seguido com rigor metodológico os procedimentos necessários à análise das variáveis, com utilização de kits reagentes próprios, em aparelho devidamente calibrado.

Considerando pequena quantidade de soro obtida dos animais e a priorização da análise das citocinas inflamatórias, infelizmente não houve soro suficiente para realização de contraprova.

Tendo por base a comparação dos nossos resultados de acordo com a dieta ofertada e a suplementação de FOS, na análise de todas as variáveis bioquímicas foram encontradas diferenças estatísticas apenas nos animais alimentados com amido, tendo a suplementação reduzido os níveis de ureia, colesterol total e HDL.

Embora não tenham sido encontradas diferenças nos níveis de lipídeos e frações no presente estudo nos animais alimentados com frutose, outro estudo apontou maiores níveis de colesterol e triglicerídeos séricos e hepáticos relacionados ao maior consumo de frutose (CHOI; ABDELMEGEED; SONG, 2017).

Em um estudo realizado em ratos, que avaliou o tratamento de doença gordurosa do fígado não alcoólica e esteatose cardíaca induzida por uma dieta rica em carboidratos, a suplementação de colina e FOS foi capaz de reduzir os níveis de uréia, colesterol e triglicerídeo, onde apenas a FOS foi efetiva na redução do colesterol. O autor justificou o achado devido as possíveis mudanças da microbiota intestinal induzida pela FOS (HAUBERT *et al.*, 2015).

Ratos *Wistar* alimentados com dieta rica em frutose (65%) por 4 semanas, apresentaram maiores níveis de insulina, triglicerídeos séricos, hepáticos e marcadores de estresse oxidativo do que os alimentados com amido. Nos animais que receberam frutose, a suplementação de FOS foi capaz de diminuir o acúmulo e triglicerídeos no fígado e a hiperlipidemia (BUSSEROLLES *et al.*, 2003).

Em estudo realizado com ratos *Wistar* de 12 semanas de idade, por 12 semanas, alimentados com dieta rica em frutose (20%), os animais do grupo frutose apresentaram maior peso corporal, níveis de colesterol e triglicerídeos. A suplementação de FOS foi eficiente para a redução do peso corporal, colesterol e triglicerídeo (AGUILAR *et al.*, 2014).

De acordo com Matida e colaboradores (2015), em estudo realizado no mesmo laboratório do nosso estudo, também com camundongos *Swiss*, de 60 e 180 dias de idade, a análise das variáveis bioquímicas foi prejudicada considerando a dificuldade de obtenção de amostra de sangue, em detrimento a análise das variáveis hematológicas, não sendo possível utilizar para comparação neste estudo. Fato semelhante ocorreu neste estudo, onde a análise de algumas variáveis bioquímicas como insulina e HDL foi prejudicada considerando a priorização da análise das citocinas inflamatórias.

Li e Lu (2018) afirmaram que a suplementação crônica de frutose em camundongos aumenta o risco para desordens metabólicas, estresse oxidativo, resposta inflamatória e dano hepático.

Dentre os estudos que utilizam dietas enriquecidas com carboidratos, nota-se que os que utilizam dietas com alto teor de frutose apresentam piores efeitos, seja no aumento de gordura corporal, hepática, inflamação e estresse oxidativo, acompanhados ou não de alterações do peso corporal (TAMER *et al.*, 2019; MEDRANO *et al.*, 2019; GUIMARAES *et al.*, 2018).

Além de todo o exposto sobre os efeitos da frutose, novamente uma das possíveis causas de inflamação e desregulação metabólica no fígado dos animais relacionada ao alto consumo e frutose, são as alterações das comunidades microbianas intestinais (JENA *et al.*, 2014).

Dietas ricas em glicose ou frutose podem induzir mudanças na microbiota intestinal, permeabilidade intestinal, inflamação, esteatose hepática e acúmulo de gorduras (DO *et al.*, 2018).

Na análise das citocinas inflamatórias, os animais que receberam frutose apresentaram maiores níveis de MCP1 e TNF do que aqueles que receberam apenas amido. Além disso, o peso do fígado dos animais que receberam frutose foi consideravelmente maior do que o daqueles que receberam amido.

O TNF- α é apontado como a principal citocina pro-inflamatória, estando aumentada no tecido adiposo de roedores obesos (SENN *et al.*, 2003), também tendo sido associado a

processos inflamatórios no fígado dos animais, particularmente em animais com DHGNA (SEO *et al.*, 2013; THEODORE *et al.*, 2012).

Considerando o TNF- α ser considerado o principal marcador inflamatório, tendo sido associado a DHGNA em alguns estudos (SEO *et al.*, 2013; THEODORE *et al.*, 2012), é possível que o aumento de TNF no presente estudo nos animais Frutose possa estar diretamente relacionado ao acúmulo de gordura hepática neste grupo, quando comparado ao grupo Amido.

Em estudo realizado por Do e coautores (2018), com camundongos alimentados com dietas ricas em glicose, frutose ou gordura, quando comparados ao grupo controle, os animais alimentados com dietas ricas em glicose e frutose apresentaram maiores níveis de MCP-1 e IL1- β , além de mais esteatose hepática do que os que alimentaram-se com gorduras.

Aguilar e colaboradores (2014) encontraram resultados semelhantes, onde os animais que receberam frutose a 20% apresentaram maiores níveis de TNF- α , MCP-1 e IL1- α , quando comparado ao grupo controle.

Em estudo realizado por Li e colaboradores (2019), a suplementação de frutose a 20% na água em camundongos por 8 semanas também induziu ao aumento de TNF- α e MCP-1, associado ao acúmulo de gordura hepática.

Já em estudo realizado por Li e Lu (2018), a suplementação de frutose a 30% diluída na água induziu o aumento TNF- α e IL-1. Os autores concluíram ainda que a suplementação crônica de frutose aumenta o risco para desordens metabólicas, estresse oxidativo, resposta inflamatória e dano hepático.

Em estudo realizado por Oliveira e colaboradores (2013), com o objetivo de avaliar o tempo e a progressão da disfunção metabólica e inflamatória induzida pela dieta HC em camundongos (CHO 74.2%, LIP 5.8% e PTN 20), sendo composta por pelos menos 30% de CHO refinados), foi observada uma resposta inflamatória no tecido adiposo logo no início do experimento (a partir de 3 dias de estudo), tendo sido sustentada por períodos mais longos (até 12 semanas), quando comparada a dieta controle. No geral a concentração de marcadores inflamatórios foi elevada no decorrer do estudo, especialmente de TNF- α e IL-6. Já a concentração de IL-10 foi elevando-se, tendendo a cair à linha de base até a 12ª semana de estudo.

Em estudo realizado com camundongos, onde os animais foram alimentados com uma dieta rica em frutose (20%) por 12 semanas, os animais apresentaram múltiplas

alterações do perfil das citocinas, incluindo níveis aumentados também de IL-1 β , IL-6 e IL-10 (KELLEY; ALLAN; AZHAR, 2004).

Em outro estudo, realizado por 8 semanas com camundongos machos de 4 semanas de idade alimentados com uma dieta controle, foi demonstrado que a suplementação crônica de frutose na água (30%) aumentou o risco para desordens lipometabólicas, estresse oxidativo, dano e resposta inflamatória hepática (LI; LU, 2018).

No presente estudo, além da diferença apontada de maiores níveis de MCP-1 e TNF nos animais Frutose, chama-se a atenção na comparação das citocinas inflamatórias dos animais alimentados com frutose e que receberam suplementação de FOS. Os níveis de IL6, IL10, IFN- γ e de IL12 nos animais FrutoseF foram significativamente maiores do que nos animais do grupo frutose. Tendo a suplementação de FOS porém, reduzido consideravelmente o peso do fígado e o grau de esteatose hepática, claramente observado nas lâminas histológicas.

Apesar do possível efeito anti-inflamatório da FOS, o presente estudo apontou um considerável aumento das citocinas inflamatórias após a suplementação nos animais alimentados com frutose.

Uma das possíveis hipóteses para uma maior concentração das interleucinas inflamatórias nos animais do grupo frutose que receberam FOS, é a abrupta redução da esteatose hepática, com provável morte de hepatócitos, ocorrência de apoptose e liberação de mediadores pró-inflamatórios.

Nos dois únicos estudos encontrados que realizaram a suplementação de FOS por gavagem, em estudo realizado por Chen e colaboradores (2017), na dose de 8 g/Kg de peso do animal por 14 dias, em camundongos induzidos à síndrome do intestino irritável, a suplementação de FOS foi associada a uma maior hipersensibilidade visceral, maior produção de IL-23 (marcador pro-inflamatório intestinal) no íleo e IL-1 β no colón e maior produção de ácidos e cadeia curta (CHEN *et al.*, 2017).

No segundo, em estudo realizado com ratos *Wistar* por 12 semanas com uma dieta com frutose a 20%, a gavagem de FOS a 150 mg/kg/dia apresentou efeito oposto ao encontrado em nosso estudo, sendo um efeito anti-inflamatório, com redução de citocinas inflamatórias como IL6, MCP-1, TNF, IFN, IL1-a e IL1-b (AGUILAR *et al.*, 2014).

De acordo com estudo realizado por Yeh e colaboradores (2012), em um modelo experimental de inflamação e fibrose pulmonar com camundongos com 12 semanas de idade

em 49 dias de experimento, FOS a 2,5% atenuou a produção de citocinas pró-inflamatórias pulmonares em camundongos induzidos a inflamação por D-galactose.

Os dados do presente estudo destacam que apesar do aumento de várias citocinas inflamatórias no grupo frutose que recebeu FOS, também ocorreu o aumento de uma importante citocina anti-inflamatória, a IL-10.

Em estudo realizado por Oliveira e colaboradores (2013), com camundongos alimentados com dieta rica em carboidrato (30% de açúcares refinados), mesmo que em curtos períodos de tempo, ocorreu o aumento da IL-10, sendo explicado pelos autores como uma tentativa de homeostase dada o também aumento de citocinas inflamatórias em camundongos.

Acreditamos que tenha ocorrido fato semelhante neste estudo, dada a drástica redução de gordura hepática observada nas lâminas histológicas dos animais que receberam FOS, com diminuição considerável do grau de esteatose acompanhado da redução do peso do fígado dos animais, havendo degeneração e morte de hepatócitos, seguido de liberação de citocinas pró-inflamatórias, das quais se inclui a IL-10 numa tentativa de equilibrar o ambiente inflamado.

No caso de acúmulo de gordura no fígado, com ocorrência de DHGNA, ocorre aumento de morte de células hepáticas, principalmente por apoptose (ALKHOURI; CARTER; FELDSTEIN, 2011), assim como ocorreu em estudo realizado por CHOI e coautores (2017).

Na comparação da esteatose hepática entre todos os grupos experimentais no presente estudo, a utilização de dieta com alta concentração de amido induziu pouco acúmulo de lipídeo no fígado dos animais, porém a suplementação com fibras causou redução significativa da esteatose, com score 0 em todos os animais.

Diferentemente do grupo do amido, a dieta com alta concentração de frutose desencadeou maior esteatose (score $0,86 \pm 0,10$), sendo estatisticamente superior ao grupo amido, refletindo no peso do fígado dos animais. Novamente, a suplementação com fibras foi eficaz em reduzir e/ou impedir o acúmulo de lipídeos no fígado e, os animais que receberam dieta com alta concentração de frutose e suplementação de fibras.

Ressalta-se ainda, que apesar de não terem sido encontradas diferenças de variáveis bioquímicas entre os grupos Amido e Frutose, incluindo no perfil lipídico, os animais do grupo Frutose apresentaram uma importante diferença no grau de esteatose e peso do fígado dos animais.

Apesar de estudo realizado por Spruss e coautores (2012) ter apontado que camundongos fêmeas são mais suscetíveis ao desenvolvimento de esteatose hepática por dietas enriquecidas por frutose, nosso estudo demonstrou que o mesmo ocorre em animais machos.

A considerar a alta concentração de frutose em dietas ocidentalizadas e industrializadas, as quais contém adição de frutose em sua composição, buscando representar esta condição em modelos animais considerado o alto acúmulo de gordura hepática a partir de dietas ricas em frutose, o consumo destas dietas tornou-se um modelo experimental de obesidade e esteatose hepática em modelos animais (LEUNG *et al.*, 2016; KOHLI *et al.*, 2010).

Observa-se que inúmeros estudos em modelos animais utilizam a frutose para indução de DHGNA, apesar de poucos destes estudos analisarem de maneira aprofundada os efeitos de uma dieta rica em frutose. De acordo com Marinho e colaboradores (2019) o seu mecanismo da influência do consumo de frutose sobre a DHGNA ainda é incerto.

Devido as similaridades as condições humanas, camundongos tem sido amplamente utilizados em estudos de avaliação de desenvolvimento de DGHNA, considerando os mecanismos relacionados ao seu desenvolvimento, evolução para esteatose hepática, apoptose e fibrose (GREGG *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2015; SHEEDFAR *et al.*, 2013).

Complementarmente, modelos animais de doença, também tem sido utilizados para avaliação do desenvolvimento, prevenção e tratamento da DHGNA, com análises diversas considerando acúmulo de triglicérideo, inflamação, apoptose e fibrose hepáticos (CHOI; ABDELMEGEED; SONG, 2017), sendo necessário ainda o aprofundamento neste campo.

Em estudo realizado com camundongos de 6 semanas de idade, comparando os efeitos de uma dieta controle (CHO 62%, LIP 14%, PTN 24%) com uma dieta rica em frutose (35%) por 3 semanas de experimento, os animais do grupo frutose apresentaram maior acúmulo de gotículas lipídicas no fígado, acompanhado de maior esteatose, porém sem score inflamatório associado. Os níveis de triglicérideos sérico e hepático e colesterol sérico foram significativamente maiores, além de ter ocorrido mais apoptose (CHOI; ABDELMEGEED; SONG, 2017).

Os dados do presente estudo estão de acordo com a maior parte da literatura encontrada, uma vez que além da frutose ter induzido mais esteatose hepática a suplementação de FOS reduziu os o acúmulo de gordura no fígado dos animais.

Camundongos alimentados com dieta de cafeteria (carboidrato 69,6%, lipídeos 9,6% e proteínas 19%) tiveram mais esteatose hepática e peso de fígado, quando comparado ao grupo controle (ZEENI *et al.*, 2015).

Em estudo realizado por Ushio e coautores (2013), uma dieta com alto teor de frutose também desencadeou esteatose hepática.

Em estudo realizado em camundongos por Savari e colaboradores (2019), que buscou reproduzir um modelo animal de esteatose hepática similar a condições dietéticas e ambientais que ocorrem em humanos, com diferentes dietas com suplementação de frutose na água a 30%, os animais alimentados exclusivamente com dieta controle e frutose não apresentaram sinais óbvios de esteatose, mas apresentaram nível leve de inflamação. Já os demais grupos que receberam dieta rica em gordura e dieta ocidental, ambas com suplementação de frutose, apresentaram alterações significativas no nível de esteatose, de acordo com a mesma metodologia de mensuração utilizada neste estudo, proposta por Kleinner e colaboradores (2005).

Em estudo realizado em ratos *Wistar*, com a suplementação de colina e FOS para o tratamento de esteatose hepática induzida por uma dieta rica em sacarose, houve uma redução significativa de gordura hepática nos animais que receberam a suplementação (HAUBERT *et al.*, 2015).

Quanto à análise dos focos inflamatórios, houve diferença apenas entre os grupos amido e frutose, onde os animais amido apresentaram maior contagem e score de focos inflamatórios do que o grupo frutose. A suplementação de fibras não induziu alterações nesta variável, mesmo com as alterações de citocinas inflamatórias observadas nos animais frutose.

Não ficou esclarecida a maior quantidade de focos inflamatórios no grupo amido em comparação ao grupo frutose. É possível que o maior índice glicêmico do amido e consequente hiperinsulinemia, possa ter induzido a um maior aglomerado de células inflamatórias no fígado, já em estado crônico, seguindo o fluxo normal de deflagração do processo inflamatório.

Os animais que receberam frutose apresentaram menos focos inflamatórios do que os do grupo amido ($p < 0,001$), porém sem efeito das fibras sobre esta variável de análise.

Normalmente os estudos avaliam o infiltrado inflamatório dos animais no tecido adiposo, sendo aumentado o número de focos inflamatórios em animais alimentados com dieta rica em frutose (CHOI; ABDELMEGEED; SONG, 2017). Sabe-se que o aumento de células imune no tecido adiposo tem relação com a apoptose do tecido adiposo, o que por sua

vez contribui para o aumento da produção de citocinas inflamatórias (FRANCISQUETI; NASCIMENTO; CORRÊA, 2015; WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2003).

O aumento do peso do fígado em um estudo realizado com ratos *wistar* alimentados com uma dieta de cafeteria, foi relacionado ao aumento dos triglicerídeos hepáticos, já que os animais apresentaram esteatose hepática acentuada (PASARÍN *et al.*, 2012), assim como o observado neste estudo.

Neste estudo, foi buscada a análise das fibras colágenas considerando a relação do consumo de frutose com a fibrogenese e acúmulo de fibras colágeno, conforme apontado por Kohli e colaboradores (2011).

No entanto, analisando as fibras colágenas pela coloração Tricrômio de Masson/TM, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos, como observados em outros estudos.

Apesar do aumento da esteatose hepática induzida por ratos *Wistar* alimentados por 1 mês com uma dieta de cafeteria (65% gordura saturada), os animais não apresentaram inflamação ou fibrose hepáticas (PASARÍN *et al.*, 2012).

Disfunções endoteliais no fígado de animais alimentados por 1 mês com uma dieta de cafeteria (65% gorduras saturadas em sua maior parte) ocorreram antes da ocorrência de fibrose inflamação (PASARÍN *et al.*, 2012).

Em outro estudo, solução de frutose a 30% na água, os animais (em ratos) desenvolveram esteatose hepática porem sem a ocorrência de fibrose hepática após 3 meses de experimento (MEJIA *et al.*, 2018).

Em estudo realizado com camundongos em tempo o dobro deste estudo, uma dieta rica em gorduras (21%) e frutose (10%) foi capaz de induzir a esteatose e fibrose hepática, tendo o autor associado a composição da dieta e ao longo tempo de seguimento (LEUNG *et al.*, 2016).

Em estudo realizado por Li e colaboradores (2018), animais alimentados com dieta rica em frutose apresentaram mais fibrose, porem sem diferenças no score de inflamação.

No geral, o presente estudo apresentou algumas dificuldades de análise das variáveis a considerar a diversidade de linhagens, idade dos animais e deficiência de estudos que abordem parâmetros laboratoriais para uma melhor comparação entre os resultados encontrados nos grupos experimentais.

A quantidade de soro dos animais, também dificultou algumas análises, sendo sugerido para futuros estudos a utilização de animais que forneçam maiores quantidades de

sangue para análise, ou, a realização de outros métodos de determinação das variáveis. A realização de estudos com uma maior quantidade de animais também auxiliaria na estratificação dos grupos de acordo com as variáveis a serem analisadas.

A realização de novas pesquisas é importante, a considerar os efeitos maléficos ainda pouco elucidados da frutose, bem como outras formas de suplementação de FOS, em diferentes doses, com análise de variáveis genéticas e de microbiota intestinal, bem como análise histológica de outros órgãos como coração, intestino e cérebro.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que o tipo de carboidrato e a suplementação de fibras causam diferentes efeitos sobre variáveis bioquímicas, inflamatórias e histológicas em camundongos *Swiss*.

Os resultados apontaram que apesar dos animais Amido terem apresentado maior quantidade de focos inflamatórios hepáticos, a dieta rica em frutose causou piores efeitos de inflamação e esteatose hepática em camundongos *Swiss*, tendo os animais do grupo frutose apresentados maior consumo de ração e ganho de peso, maiores níveis de TNF e MCP-1, além de mais esteatose hepática e maior peso do fígado.

Nos animais alimentados com dieta rica em amido, a suplementação de FOS apresentou efeito sobre as variáveis bioquímicas na redução apenas dos níveis de uréia, colesterol total e HDL. Já nos animais alimentados com dieta rica em frutose, a suplementação de FOS reduziu drasticamente a esteatose hepática e o peso do fígado dos animais, causando um estado inflamatório com elevação citocinas inflamatórias.

Também demonstrou o possível efeito terapêutico das fibras na alimentação, especialmente no acúmulo de gordura hepática, porém, devendo se melhor elucidado sobre a melhor dose, via e horário de administração, considerando o efeito inflamatório observado neste estudo.

Acredita-se que este estudo apresentou novas evidências e hipóteses para estudos futuros que foquem a revisão dos atuais padrões alimentares, os quais em sua maior parte são compostos por carboidratos. O tema estudado é emergente, considerando o aumento de doenças crônicas e a sua relação com questões alimentares, especialmente ao consumo exagerado de carboidratos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA, American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. **Diab. Care**, Jan, n. 37(Suppl 1), 2014.

ADA, American Diabetes Association. The prevention or delay of type 2 diabetes (Position Statement). **Diabetes Care**, n. 27 (Suppl 1), p. 47-54, 2004.

AGUILAR, H. M.; BAEZ, D. A.; ESTRADA, M. J.; GUERRERO, G. M.; BAUTISTA, R. J. H.; NOTARIO, A. D. C. S.; PÉREZ, E. H.; DÍAZGUERRERO, N. E. L.; PÉREZ, J. C. A.; FLORES, G. B.; RAMOS, R. R.; AGUILAR, F. J. A. Effect of Fructooligosaccharides Fraction from *Psacalium decompositum* on Inflammation and Dyslipidemia in Rats with Fructose-Induced Obesity. **Nutrients**, n. 6, p. 591-604, 2014.

AKAR, F.; ULUDAG, O.; AYDIN, A.; AYTEKIN, Y. A.; ELBEG, S.; TUZCU, M.; SAHIN, K. High-fructose corn syrup causes vascular dysfunction associated with metabolic disturbance in rats: protective effect of resveratrol. **Food Chem Toxicol.**, n. 50, p. 2135–2141, 2012.

ALKHOURI, N.; KENT, C. C.; FELDSTEIN, A. E. Apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic and therapeutic implications. **Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, n. 5, p. 201–212, 2011.

ALZAMENDI, A.; GIOVAMBATTISTA, A.; RASCHIA, A.; MADRID, V.; GAILLARD, R.C.; REBOLLEDO, O.; GAGLIARDINO, J.J.; SPINEDI, E. Fructose-rich diet-induced abdominal adipose tissue endocrine dysfunction in normal male rats. **Endocrine**, n. 35, p. 227–232, 2009.

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. orgs. **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 388 p., 2002.

ANSTEE, Q. M.; GOLDIN, R. D. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steato hepatitis research. **Int. J. Exp. Pathol.**, n. 87, p. 1–16, 2006.

ARNER, P. Introduction: the inflammation orchestra in adipose tissue. **J. Intern. Med.**, v. 262, p. 404–407, 2007.

ARVY, N. M.; BATANDIERS, C.; DALLENNES, J.; CANINI, F.; POULET, L.;COUTURIER, K.; FAVIR, I. H.; MOISAN, M. P.; ROUSSEL, A. M.; MORMEDE, P. Effect of a high-fat-high-fructose diet, stress and cinnamon on central expression of genes related to immune system, hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis function and cerebral plasticity in rats. **British Journal of Nutrition**, n. 111, p. 1190-1201, 2014.

BARREIROS, R. C.; G. BOSSOLAN; TRINDADE, C. E. P. Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 377-389, 2005.

BASHAN, N.; KOVSAN, J.; KACHKO, I.; OVADIA, H.; RUDICH, A. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. **Physiol. Rev.**, v. 89, p. 27–71, 2009.

BASU, A.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Dietary factors that promote or retard inflammation. **Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.**, n. 26, p. 995-1001, 2006.

BAYLEY, B. J. R. Tables of the Bonferroni t statistic. **J. Am. Stat. Assoc.**, n. 72, p. 469-478, 1977.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart, 1976.

BERNAUD, F. S. R.; RODRIGUES, T. C. Fibra alimentar – Ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 57, n. 6, p. 397-405, 2013.

BOCARSLY, M.E.; POWELL, E.S.; AVENA, N.M.; HOEBEL, B.G. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: Increased body weight, body fat and triglyceride levels. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, n. 97, p. 101–106, 2010.

BOTEZELLI, J. D.; DALIA, R. A.; REIS, I. M.; BARBIERI, R. A.; REZENDE, T. M.; PELARIGO, J. G.; CODOGNO, J.; GONÇALVES, R.; MELLO, M. A. Chronic consumption of fructose rich soft drinks alters tissue lipids of rats. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 2, n. 43, p. 1-8, 2010.

BOURASSA, M. W., ALIM, I., BULTMAN, S. J., RATAN, R. R. Butyrate, neuroepigenetics and the gut microbiome: can a high fiber diet improve brain health?. **Neuroscience Letters**, n. 625, p. 56-63, 2016.

BRAND-MILLER, J.; DICKINSON, S.; BARCLAY, A.; CELERMAJER, D. The glycemic index and cardiovascular disease risk. **Curr. Atheroscler. Rep.**, n. 9, p. 479-485, 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. Vigilância em Saúde. **Vigilância das Doenças Crônicas Não-Transmissíveis (DCNT)**. Acesso em 23/10/2019. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/vigilancia-em-saude/vigilancia-de-doencas-cronicas-nao-transmissiveis-dcnt>

BRESSAN, J.; HERMSDORFF, H. H. M.; ZULET, M. A.; MARTÍNEZ, J. A. Impacto hormonal e inflamatório de diferentes composições dietéticas: ênfase em padrões alimentares e fatores dietéticos específicos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 53, n. 5, 2009.

BROWN, G. T., KLEINER, D. E. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. **Metabolism**, n. 65, 1080–1086. 2016.

BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **J. Clin. Invest.**, n. 114, p. 147–152, 2004.

BULLÓ, M.; CASAS-AGUSTENCH, P.; AMIGÓ-CORREIG, P.; ARANCETA, J.; SALAS-SALVADÓ, J. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. **Public. Health Nutr.**, v. 10, p. 1164–1172, 2007.

BURTON-FREEMAN, B. Postprandial metabolic events and fruit - derived phenolics: a review of the science. **British Journal of Nutrition**, v. 104, p. S1–S14, 2010.

BUSSEROLLES, J.; GUEUX, E.; ROCK, E.; DEMIGNE, C.; MAZUR, A.; RAYSSIGUIER, Y. Oligofructose Protects against the Hypertriglyceridemic and Pro-oxidative Effects of a High Fructose Diet in Rats. **The Journal of Nutrition**, May, n. 133, p. 1903-1908, 2003.

CAËR, C.; ROUAULT, C.; ROY, T. L.; POITOU1, C.; WISNEWSKY, J. A.; TORCIVIA, A.; BICHET, J. C.; CLÉMENT, K.; MILLO, M. G.; ANDRÉ, S. Immune cell-derived cytokines contribute to obesity-related inflammation, lipogenesis and metabolic deregulation in human adipose tissue. **Scientific Reports, Nature**, n. 7: 3000, 2017.

CALDER, P. C.; AHLUWALIA, N.; BROUNS, F. *et al.* Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. **British Journal of Nutrition**, n. 106 (Suppl), p. S1-78, 2011.

CALDER, P. C.; ALBERS, r.; ANTOINE. J. M.; BLUM, S.; SICARD, R. B.; FERNS, G. A.; FOLKERTS, G.; FRIEDMANN, P. S.; FROST, G. S.; GUARNER, F.; LØVIK, M.; MACFARLANE, S.; MEYER, P. D.; M'RABET. L.; SERAFINI, L.; EDEN, W. V.; LOO, J. V.; DIAS, W. V.; VIDRY, S.; ROOB, B. M. W.; ZHAO, J. Inflammatory Disease Processes and Interactions with Nutrition. **British Journal of Nutrition**, vol. 101, suppl. n. S1, May, 2009.

CAREY, R. N.; FELBRUEGGE, C.; WESTGARD, J. O. Evaluation of the adaptation of the glucose oxidase/peroxidase-3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone-N, N-dimethylaniline procedure to the technicon SMA 12/60 and comparison with other automated methods for glucose. **Clinical Medicine**, v. 20, p. 595-602, 1974.

CARVALHO, M. H. C.; COLAÇO, A. L.; FORTES, Z. B. Citocinas, Disfunção Endotelial e Resistência à Insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, n. 2, p. 304-312, 2006.

CASTRO, H.; POMAR, C. A.; PICÓ, C.; SÁNCHEZ, J.; PALOU, A. Cafeteria diet overfeeding in young male rats impairs the adaptive response to fed/fasted conditions and increases adiposity independent of body weight. **International Journal of Obesity**, p. 1–8, 2014.

CECILIANO, T. C. M.; DUTRA, R. R.; AGUILA, M. B.; LACERDA, C. A. M. The deficiency and the supplementation of vitam D and liver: lessons of chronic fructose-rich diet in mice. **J. Steroid Biochemistry aand Molecular Biology**, n. 192, p. 1-11, 2019.

CESARETTI, M. L.; KOHLMANN JÚNIOR, O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. **Arq. Bras. de Endocrinol. e Metab.**, n. 50, p. 190-197, 2006.

CHEN, B. R.; DU, L. J.; HE, H. Q.; KIM, J. J.; ZHAO, Y.; ZHANG, Y. W.; LUO, L.; DAI, N. Fructo-oligosaccharide intensifies visceral hypersensitivity and intestinal inflammation in a stress-induced irritable bowel syndrome mouse model. **World J. Gastroenterology**, v. 23, n. 47, p. 8321-8333, 2017.

CHOI, Y.; ABDELMEGEED, M. A.; SONG, B. J. Diet high in fructose promotes liver steatosis and hepatocyte apoptosis in C57BL/6J female mice: Role of disturbed lipid homeostasis and increased oxidative stress. **Food Chem. Toxicol.**, May, n. 103: p. 111–121, 2017.

COBEA – COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Princípios éticos na experimentação animal**. 1991. Disponível em: <<http://www2.fcfa.unesp.br/Home/ComitedeEtica/principios%20eticos%20na%20experimentacao%20animal%20cobe.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2014.

CONSORTIUM, I. Consumption of sweet beverages and type 2 diabetes incidence in European adults: results from EPIC. **Inter. Act. Diabetologia**, n. 56, p. 1520–1530, 2013.

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

COX, R. D.; CHURCH, C. D. Mouse models and the interpretation of human GWAS in type 2 diabetes and obesity. **Disease Models & Mechanisms**, n. 4, p. 155-164, 2011.

DANDONA, P.; CHAUDHURI, A.; GHANIM, H.; MOHANTY, P. Proinflammatory effects of glucose and anti-inflammatory effects of insulin: relevance to cardiovascular disease. **Am. J. Cardiol.**, n. 99 (Supl), p. 15B-26, 2007

DAY, C. P. **Pathogenesis of steatohepatitis**. Best Pract Res. Clin. Gastroenterol., n. 16, p. 663–678, 2002.

DEHGHAN, M.; MENTE, A.; ZHANG, X.; SWAMINATHAN, S.; LI, W.; MOHAN, V.; IQBAL, R.; KUMAR, R.; WENTZEL-VILJOEN, E. ; et al. (Prospective Urban Rural Epidemiology (PURE) study investigators*) Associations of fats and carbohydrate intake with cardiovascular disease and mortality in 18 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. **The Lancet**, aug, p. 2050-2062, 2017.

DELGADO, G. T. C.; THOMÉ, R.; GABRIEL, D. L.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; PASTORE, G. M. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*)-derived fructooligosaccharides improves the immune parameters in the mouse. **Nutrition Research**, n. 32, p. 884-892, 2012.

DICKINSON, S.; BRAND-MILLER, J. Glycemic index, postprandial glycemia, and cardiovascular disease. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 16, p. 67–75, 2005.

DO, M. H.; LEE, E.; OH, M. J.; KIM, Y.; PARK, H. Y. High-glucose or high-fructose diet cause changes of the gut microbiota and metabolic disorders in mice without body weight change. **Nutrients**, v. 10, n. 761, p. 1-14, 2018.

- DOWMAN, J. K.; TOMLINSON, J. W.; NEWSOME, P. N. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. **QJM**, n. 103, p. 71 – 83, 2010.
- DZIADEK, K.; KOPEC, A.; PIATKOWSK, E.; LESZCZYNSKA, T. High-Fructose Diet-Induced Metabolic Disorders Were Counteracted by the Intake of Fruit and Leaves of Sweet Cherry in Wistar Rats. **Nutrients**, v. 11, n. 2638, p. 2-14, 2019.
- ESLAMPARAST, T.; ZAMANI, F.; HEKMATDOOST, A.; SHARAFKHAH, M.; EGHTEHAD, S.; MALEKZADEH, R.; POUSTCHI, H. Effects of synbiotic supplementation on insulin resistance in subjects with the metabolic syndrome: a randomised, double-blind, placebo-controlled pilot study. **Br. J. Nutr.**, Aug, v. 112, n. 3, p. 438-45, 2014.
- FENG, R.; DU, S.; CHEN, Y.; ZHENG, S.; ZHANG, W.; NA, G.; LI, Y.; SUN, C. High carbohydrate intake from starchy foods is positively associated with metabolic disorders: a Cohort Study from a Chinese population. *Scientific Reports*, **Nature**, p. 1-8, 2015.
- FERDER, L.; FERDER, M. D.; INSERRA, F. The role of high-fructose corn syrup in metabolic syndrome and hypertension. **Curr. Hypertens. Rep.**, n. 12, p. 105 – 112, 2010.
- FESTA, A.; D'AGOSTINO, R.; HOWARD, G.; MYKKANEN, L.; TRACY, R. P.; HAFFNER, S. M. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome. The insulin resistance atherosclerosis study (IRAS). **Circulation**, n. 102, p. 42-7, 2000.
- FLEG, H. M. An investigation of the determination of serum cholesterol by an enzymatic method. **Clinical Biochemistry**, v. 10, p. 79-84, 1973.
- FOUGÈRE, B.; BOULANGER, E.; NOURHASHÉMI, F.; GUYONNET, S.; CESARI, M. Chronic Inflammation: Accelerator of Biological Aging. **J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.**, Sep, v. 72, n. 9, p. 1218-1225, 2017.
- FRANCISQUETI, F. V.; NASCIMENTO, A. F.; CORRÊA, C. R. Obesidade, inflamação e complicações metabólicas. **Nutrire**, Apr, v 40, n. 1, p. 81-89, 2015.
- FURMAN, D.; CAMPISI, J.; VERDIN, E.; BASTOS, P. C.; TARG, S.; FRANCESCHI, C.; FERRUCCI, L.; GILROY, D. W.; FASANO, A.; MILLER, G. W.; MILLER, A. H.; MANTOVANI, A.; WEYAND, C. M.; BARZILAI, N.; GORONZY, J. J.; RANDO, T. A.; EFFROS, R. B.; LUCIA, A.; KLEINSTREUER, N.; SLAVICH, G. M. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. **Nat. Med.**, Dec, n. 12, p. 1822-1832, 2019.
- CASAL, M. N. G.; GARCIA, H. E. P. Dieta e inflamación. **An. Venez. Nutri.**, v. 27, n. 1, p. 47-56, 2014.
- GERALDO, J. N.; ALFENAS, R. C. G. Papel da Dieta na Prevenção e no Controle da Inflamação Crônica – Evidências Atuais. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 52, n. 6, p. 951-967, 2008.

GIBSON, G. R. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. **J. Nutr.**, n. 129, p.1438S–1441S, 1999.

GOLDNER, J. A modification of the masson trichrome technique for routine laboratory purposes. **The American Journal of Pathology**, v. 14, n. 2, p. 237-243, 1938.

GOMES, S. F.; SILVA, F.C.; VOLP, A.C.P. Efeito do consumo de frutas ricas em flavonoides sobre mediadores inflamatórios, bioquímicos e antropométricos relacionados ao metabolismo energético. **Nutrición clínica y dietética hospitalaria**, v. 36, n. 3, p. 170-180, 2016.

GRANT, R. W.; DIXIT, V. D. Adipose tissue as an immunological organ. **Obesity** (Silver Spring), March, v. 23, n. 3, p. 512–518, 2015.

GREENBERG, A. S.; OBIN, M. S. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. **Am. J. Clin. Nutr.**, n. 83, p. 461-465, 2006.

GREGG, S. Q.; GUTIERREZ, V.; ROBINSON, A. R.; WOODDELL, T.; NAKAO, A.; ROSS, M. A.; MICHALOPOULOS, G. K.; RIGATTI, L.; ROTHERMEL, C. E.; KAMILERI, I.; GARINIS, G. A.; STOLZ, D. B.; NIEDERNHOFER, L. J. A mouse model of accelerated liver aging caused by a defect in DNA repair. **Hepatology**, n. 55, p. 609–621, 2012.

GROPPER, S. S. **Nutrição avançada e metabolismo humano**. São Paulo. Cengage Learning, 2016.

GENDA, T.; KONDO, T.; HINO, S.; SUGIURA, S.; NISHIMURA, N.; MORITA, T. The impact of fructo-oligosaccharides on gut permeability and inflammatory responses in the cecal mucosa quite differs between rats fed semi-purified and non-purified diets. **J. Nutr. Sci. Vitaminol**, n. 64, p. 357-366, 2018.

GUIMARÃES, J.; BARGUT, T. C. L.; LACERDA, C. A. M.; AGUILA, M. B. Medium-chain triglyceride reinforce the hepatic damage caused by fructose intake in mice. **Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids**, n. 140, p. 64-71, 2019.

HAGEN, J. H.; HAGEN, P. B. An enzymatic method for estimation of glycerol in blood and its use to determine the effect of noradrenaline on the concentration of glycerol in blood. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 40, p. 1129-39, 1962.

HAUBERT, N. J. B. G.; MARCHINI, J. S.; CUNHA, S. F. C.; SUEN, V. M. M.; PADOVAN, G. J.; JORDAO JUNIOR, A. A.; ALVES, C. M. M. M.; MARCHINI, J. F. M.; VANNUCCHI, H. Choline and Fructooligosaccharide: Non-alcoholic Fatty Liver Disease, Cardiac Fat Deposition, and Oxidative Stress Markers. **Nutrition and Metabolic Insights**, v. 4., n. 8, p. 1-6, 2015.

HAVEL, P. J. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. **Nutr. Rev.**, v. 63, p. 113-157, 2005.

HILDEBRAND, C. R.; ANTONIOLLI SILVA, A. C. M. B.; THOMAZ, D. M. C.; ARAKAKI, D. G.; INADA, A. C.; MARCELINO, G.; GONZAGA, C. S. A. M.;

FIGUEIREDO, P. S.; SILVA, G. T.; FERNANDES, M. R.; GUIMARÃES, R. C. A. G.; FREITAS, C. C.; NASCIMENTO, V. A. Animal models in the evaluation of inflammation caused by carbohydrate-rich diets: brief scientific literature review. **International Journal of Development Research**, v. 07, n. 09, p. 15609-15615, 2017.

HORST, K.W.; SERLIE, M. J. Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Nutrients**, v. 9, n. 981, 2017.

HSIA, C. H.; WANG, C. H.; KUO, Y. W.; HO, Y. J.; CHEN, H. L. Fructooligosaccharide systemically diminished D-galactose-induced oxidative molecule damages in BALB/cJ mice. **Br. J. Nutr.**, n. 107, p. 1787–1792, 2012.

HYSON, D.A.; PAGLIERONI, T.G.; WUN, T.; RUTLEDGE, J.C. Postprandial lipemia is associated with platelet and monocyte activation and increased monocyte cytokine expression in normolipemic men. **Clin. Appl. Thromb. Haemost.**, v.8, p.147–155, 2002.

JENA, P.K.; SINGH, S.; PRAJAPATI, B.; NARESHKUMAR, G.; MEHTA, T.; SESHADRI, S. Impact of targeted specific antibiotic delivery for gut microbiota modulation on high-fructose-fed rats. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, n. 172, p. 3810–3826, 2014.

JOHNSON, A. R.; WILKERSON, M. D.; SAMPEY, B. P.; TROESTER, M. A.; HAYES, D. N.; MAKOWSK, L. Cafeteria Diet-induced Obesity Causes Oxidative Damage in White Adipose. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Abr., v. 473, n. 2, p. 545–550, 2016.

JONASSON, L.; GULDBRAND, H; LUNDBERG, A. K.; NYSTROM, F. H. Advice to follow a low-carbohydrate diet has a favourable impact on low-grade inflammation in type 2 diabetes compared with advice to follow a low-fat diet. **Annals of Medicine**, n. 46, p. 182–187, 2014.

KACZMARCZYK, M. M.; MILLER, M. J.; FREUND, G. G. The health benefits of dietary fiber: Beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and colon cancer. **Metabolism**, n. 61, p. 1058–1066, 2012.

KARIMIA, R.; AZIZI, M. H.; GHASEMLOUC, M.; VAZIRI, M. Application of inulin in cheese as prebiotic, fat replacer and texturizer: A review. **Carbohydrate Polymers**, v.119, p. 85–100, mar. 2015.

KELLEY, G. L.; ALLAN, G.; AZHAR, S. High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation. **Endocrinology**, n. 145, p. 548–555, 2004.

KERVER, J. M.; YANG, E. J.; BIANCHI, L.; SONG, W. O. Dietary patterns associated with risk factors for cardiovascular disease in healthy US adults. **Am. J. Clin. Nutr.**, n. 78, p. 1103-1110, 2003.

KIM, I. H.; KISSELEVA, T.; BRENNER, D. A. Aging and liver disease. **Curr Opin Gastroenterol.**, n. 31, p. 184–191, 2015.

KLEINER, D. E.; BRUNT, E. M.; NATTA, M. V.; BEHLING, C.; CONTOS, M. J.; CUMMINGS, O. W.; FERRELL, L. D.; LIU, Y.; TORBENSON, M. S.; UNALP-ARIDA, A.; YEH, M.; MCCULLOUGH, A. J.; SANYA, A. J. Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313-1321, 2005.

KOHLI, R.; KIRBY, M.; XANTHAKOS, S. A.; *et al.* High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, n. 52: p. 934 – 944, 2010.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. Robbins. Bases patológicas das doenças. Robbins & Cotran. Patologia. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran – Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

KUSMINSKI, C. M.; SILVA, N. F.; CREELY, S. J.; FISHER, F. M.; HARTE, A. L.; BAKER, A. R.; KUMAR, S.; MCTERNAN, P. G. The *in vitro* effects of resistin on the innate immune signaling pathway in isolated human subcutaneous adipocytes. **J. Clin. Endocrinol. MeTab.**, n. 92, p. 270–276, 2007.

LAU, J. K.; ZHANG, X.; YU, J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. **J. Pathol.**, v. 241, n. 1, p. :36–44, 2017.

LEE, B. C.; LEE, J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1842, p. 446–462, 2014.

LEMOS, A. H. **Prevenção e controle de doenças pela medicina natural e ortomolecular**. 3ª Ed., Rio de Janeiro/RJ, 408 p., 2006.

LEON, L. R. The use of gene knockout mice in thermoregulation studies. **J. Therm. Biol.**, n. 30, p. 273-88, 2005.

LEUNG, C.; HERATH, C. B.; JIA, Z.; ANDRIKOPOULOS, S.; BROWN, B.; DAVIES, M. J.; RIVERA, L. R.; FURNESS, J. B.; FORBES, J. M.; ANGUS, P. W. Dietary advanced glycation end-products aggravate non-alcoholic fatty liver disease. **World J. Gastroenterol**, v. 22, n. 35, p. 8026-8040, 2016.

LEVY, R. B.; CLARO, R. M.; MONDINI, L.; SICHIERI, R.; MONTEIRO, C. A. Regional and socioeconomic distribution of household food availability in Brazil, in 2008-2009. **Rev. Saude Publica**, v. 46, n. 1, p. 6-15, 2012.

LI, W.; YANG, H.; ZHAO, Q.; WANG, X.; ZHANG, J.; ZHAO, X. Polyphenol-rich loquat fruit extract prevents fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease by modulation glycometabolism, lipometabolism, oxidative stress, inflammation, intestinal barrier, and gut microbiota in mice. **J. Agric. Food Chem.**, n. 67, p. 7726-7737, 2019.

LI, W.; LU, Y. Hepatoprotective Effects of Sophoricoside against Fructose-Induced Liver Injury via Regulating Lipid Metabolism, Oxidation, and Inflammation in Mice. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 2, p. 552-558, 2018.

LI, X.; LIAN, F.; LIU, C.; HU, K.; WANG, X. Isocaloric Pair-Fed High- Carbohydrate Diet Induced More Hepatic Steatosis and Inflammation than High-Fat Diet Mediated by miR-34a/SIRT1 Axis in Mice. *Scientific Reports*, **Nature**, n. 5, p. 1-19, 2015.

LINDQVIST, A.; BAELEMANS, A.; ERLANSON-ALBERTSSON, C. Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. **Regul. Pept.**, n. 150, p. 26–32, 2008.

LOMAX, A.; CALDER, P. C. Prebiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence. **British Journal of Nutrition**, n. 101, p. 633–658, 2009.

GARCIA, E. L.; SCHULZE, M. B.; FUNG, T. T.; et al. Major dietary patterns are related to plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. **Am. J. Clin. Nutr.**, n. 80, p. 1029-35, 2004.

LUNA, L. G. **Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology**. 3. ed. New York: McGraw Hill, 1968.

MA, Y.; GRIFFITH, J. A.; CHASAN-TABER, L.; OLENDZKI, B. C.; JACKSON, E.; STANEK III, E. J.; LI, W.; PAGOTO, S. L.; HAFNER, A. R.; OCKENE, I. S. Association between dietary fiber and serum C-reactive protein. **Am. J. Clin. Nutr.**, Apr, v. 83, n. 4, p. 760–766, 2006.

MA, Y.; HÉBERT, J.R.; LI, W.; BERTONE-JOHNSON, E.R.; OLENDZKI, B.; PAGOTO, S.L.; TINKER, L.; ROSAL, M.C.; OCKENE, I.S.; OCKENE, J.K.; *et al.* Association between dietary fiber and markers of systemic inflammation in the Women's Health Initiative Observational Study. **Nutrition**, n. 24, p. 941–949, 2008.

MALAGUARNERA, M.; VACANTE, M.; ANTIC, T.; GIORDANO, M.; CHISARI, G.; ACQUAVIVA, R.; MASTROJENI, S.; MALAGUARNERA, G., MISTRETTA, A.; LI VOLTI, G.; et al. Bifidobacterium longum with fructo-oligosaccharides in patients with non alcoholic steatohepatitis. **Dig. Dis. Sci.**, n. 57, 545–553, 2012.

MALTA, D. C.; SILVA, A. G.; TONACO, L. A. B.; FREITAS, M. I. F.; MELENDEZ, M. G. Tendência temporal da prevalência de obesidade mórbida na população adulta brasileira entre os anos de 2006 e 2017. **Cad. Saúde Pública**, v. 35, n. 9, 2019.

MARINHO, T. S.; ORNELLAS, F.; BARBOSA-DA-SILVA S.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; AGUILA, M. B. Beneficial effects of intermittent fasting on steatosis and inflammation of the liver in mice fed a high-fat or a high-fructose diet. **Nutrition**, n. 65, p. 103-112, 2019.

MARISSAL-ARVY, N.; BATANDIER, C.; DALLENNES, J.; CANINI, F.; POULET, L.; COUTURIER, K.; FAVIER, I. H.; MOISAN, M. P.; ROUSSEL, A. M.; MORME`DE, P. Effect of a high-fat–high-fructose diet, stress and cinnamon on central expression of genes related to immune system, hypothalamic–pituitary– adrenocortical axis function and cerebral plasticity in rats. **British Journal of Nutrition**, n. 111, p. 1190–1201, 2014.

MASI, L. N.; et al. Combination of a high-fat diet with sweetened condensed milk exacerbates inflammation and insulin resistance induced by each separately in mice. *Scientific reports*, **Nature**, v. 7, n. 3937, p. 1-10, 2017.

MATIDA, E. T.; ZANCANARO, A. E.; RESTEL, T. I.; GOMES, V. M. W.; BAZZANO, T.; MORI, C. M. C.; TEIXEIRA, M. A. Determinação de parâmetros bioquímicos e hematológicos em camundongos (*Mus musculus*) do Biotério Central da UFMS. **Resbcal**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 30-35, 2015.

MAYE, P. A. Intermediary metabolism of fructose. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 58, p. 754S-765S, 1993.

MEDRANO, S. S. L.; GUTMAN, L. A. B.; APOLINAR, L. M.; SANTANA, L. D.; MAR, O. A. M.; BECERRA, M. C. S.; HERNÁNDEZ, M. A. I.; FLORES, M. D. High fructose-containing drinking water-induced steatohepatitis in rats is prevented by the nicotinamide-mediated modulation of redox homeostasis and NADPH-producing enzymes. Springer, **Molecular Biology Reports**, out., 15 p., 2019.

MEJÍA, S. Á.; GUTMAN, L. A. B.; CAMARILLO, C. O.; NAVARRO, R. M.; BECERRA, M. C. S.; SANTANA, L. D.; CRUZ, M.; PÉREZ, E. H.; FLORES, M. D. Nicotinamide prevents sweet beverage-induced hepatic steatosis in rats by regulating the G6PD, NADPH/NADP⁺ and GSH/GSSG ratios and reducing oxidative and inflammatory stress. **Eur. J. Pharmacol.**, n. 818, p. 499–507, 2018.

MESQUITA, T. R.; SOUZA, A. A.; CONSTANTINO, E.; PELÓGIA, N. C. C.; POSSO, I. P.; PIRES, O. C. Efeito anti-inflamatório da suplementação dietética com ácidos graxos ômega-3, em ratos. **Rev. Dor**, São Paulo, out-dez, v. 12, n. 4, p. 337-41, 2011.

MICHALOPOULOS, G. K. Liver regeneration. **J. Cell. Physiol.**, n. 213, p. 286–300, 2007.

MILLER, A.; ADELI, K. Dietary fructose and the metabolic syndrome. **Current Opinion in Gastroenterology**, n. 24, p. 204-209, 2008.

MILLER, V.; MENTE, A.; DEHGHAN, M.; RANGARAJAN, S.; ZHANG, X.; SWAMINATHAN, S.; DAGENAIS, G.; GUPTA, R.; MOHAN, V.; et al. (Prospective Urban Rural Epidemiology (PURE) study investigators*) Fruit, vegetable, and legume intake, and cardiovascular disease and deaths in 18 countries (PURE): a prospective cohort study. **The Lancet**, aug, 2017.

MOHANTY P.; HAMOU DA, W.; GARG, R.; ALJADA, A.; GHANIM, H.; DANDONA, P. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 85, p. 2970–2973, 2000.

MYERS, J. L.; ALLEN, J. C. A. Nutrition and inflammation: insights on dietary pattern, obesity and asthma. **American Journal of Lifestyle Medicine**, p. 14-17, 2012.

NAKAMURA, S.; KONDO, N.; YAMAGUCHI, Y.; HASHIGUCHI, M.; TANABE, K.; USHIRODA, C.; KAWAHASHI-TOKUHISA, M.; YUI, K.; MIYAKODA, M.; OKU, T. Daily Feeding of Fructooligosaccharide or Glucomannan Delays Onset of Senescence in

SAMP8 Mice. Hindawi Publishing Corporation. **Gastroenterology Research and Practice**, 2014.

NAKAMURA, Y.; NATSUME, M.; YASUDA, A.; ISHIZAKA, M.; KAWAHATA, K.; KOGA, J. Fructooligosaccharides suppress high-fat diet-induced fat accumulation in C57BL/6 J mice. **BioFactors**. 2011.

NELSON, David L. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7. Porto Alegre ArtMed 2018.

NOMURA, K., YAMANOUCHI, T. The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. **J. Nutr. Biochem.**, n. 23, p. 203–208, 2012.

NRC, National Research Council. **Guide for the care and use of laboratory animals do National Research Council**. Institute for Laboratory Animal Research Division on Earth and Life Studies, 8 ed., 1996.

OLIVEIRA JUNIOR, S. A.; PAI-SILVA, M. D.; MARTINEZ, P F.; LIMA-LEOPOLDO, A. P.; CAMPOS, D. H. S.; LEOPOLDO, A. S.; OKOSHI, M. P.; OKOSHI, K.; PADOVANI, C. R.; CICOGNA, A. C. Diet-induced obesity causes metabolic, endocrine and cardiac alterations in spontaneously hypertensive rats. **Med Sci Monit**, v. 16, n. 12, p. 367-373, 2010.

OLIVEIRA, L S. C.;DAIANE A. SANTOS, SANDRA BARBOSA-DA-SILVA, CARLOS A. MANDARIM-DE-LACERDA, MARCIA B. AGUILA. The inflammatory profile and liver damage of a sucrose-rich diet in mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, n. 25, p.193–200, 2014.

OLIVEIRA, M. C.; GARCIA, Z.M.; HENRIQUES, M.C.; SORIANI, F.M.; PINHO, V.; FARIA, A.; et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Obes Res.**, v. 21, n. 9, p. E396-E40, 2013.

OSTAN R.; LANZARINI, C.; PINI, E.; SCURTI, M.; VIANELLO, D.; BERTARELLI, C.; FABBRI, C.; IZZI, M.; PALMAS, G.; BIONDI, F.; MARTUCCI, M.; BELLAVISTA, E.; SALVIOLI, S.; CAPRI, M.; FRANCESCHI, C.; SANTORO, A. Inflammation na cancer: a challenge for the mediterranean diet. **Nutrients**. n. 7, p. 2589-2621, 2015.

PARVARESH, R. E.; BAIG, S.; SHABEER, M.; TEO, Y.; MOK, S. F.; LOH, T. P.; MAGKOS, F.; VIRTUE, S.; VIDAL-PUIG, A.; TAI, E. S.; KHOO, C. M.; TOH, S. A. Meal rich in carbohydrate, but not protein or fat, reveals adverse immunometabolic responses associated with obesity. **Nutrition Journal**, Dec, v. 15, n. 1, 2016.

PASARÍN, M.; MURA, V . L.; SANCHO, J. G.; CALDERO, H. G.; VILARRUPLA, A. R.; PAGAN, J. C. G.; BOSCH, J.; ABRALDES, J. G. Sinusoidal Endothelial Dysfunction Precedes Inflammation and Fibrosis in a Model of NAFLD. **Plos One**, Apr., v. 7, n. 4, 2012.

- PAULA, R. B.; SILVA, A. A.; HALL, J. E. Aldosterone antagonism attenuates obesity-induced hypertension and glomerular hyperfiltration. **Hypertension**, n. 43, p. 41-7, 2004.
- PEARSON, T. A.; MENSAH, G. A.; ALEXANDER, R. W.; ANDERSON, J. L.; CANNON, R. O.; CRIQUI, M.; et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: Application to clinical and public health practice. **Circulation**, n. 107, p. 499-511, 2003.
- PEKTAS, M.B.; KOCA, H.B.; SADI, G.; AKAR, F. Dietary Fructose Activates Insulin Signaling and Inflammation in Adipose Tissue: Modulatory Role of Resveratrol. **BioMed Res. Int.**, 2016.
- POLACOW, V. O.; LANCHA JUNIOR, A. H. Dietas Hiperglicídicas: Efeitos da Substituição Isoenergética de Gordura por Carboidratos Sobre o Metabolismo de Lipídios, Adiposidade Corporal e Sua Associação com Atividade Física e com o Risco de Doença Cardiovascular. **Arq. Bras .Endocrinol. Metab.**, v. 51, n. 3, p. 389-400, 2007.
- QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 775-777, 2005.
- RAATZ, S. K.; JOHNSON, L. K.; PICKLO, M. J. Consumption of honey, sucrose, and high- fructose corn syrup produces similar metabolic effects in glucose-tolerant and - intolerant individuals. **Journal of Nutrition**, n. 145, p. 2265–2272, 2015.
- RAMOS, V. W.; BATISTA, L. O.; ALBUQUERQUE, K. T. Effects of fructose consumption on food intake and biochemical and body parameters in Wistar rats. **Rev. Port. Cardiol.**, v. 36, n. 12, p. 937-941, 2017.
- RANA, J. S.; NIEUWDORP, M.; JUKEMA, J. W.; KASTELEIN, J. J. Cardiovascular metabolic syndrome – an interplay of obesity, inflammation, diabetes and coronary heart disease. **Diabetes Obes. Metab.**, v. 9, n. 3, p. 218-32, 2007.
- RASTALL, R. A.; GIBSON, G. R. Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Current Opinion in Biotechnology*, **Reading**, v.32, p.42-46, 2015.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the AIN-76^a rodent diet ad hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 10, p. 1939-1952, 1993.
- RESPONDEK, F.; HILPIPRE, C. CHAUVEAU, P.; CAZAUBIEL, M.; GENDRE, D.; MAUDET, C.; WAGNER, A. Digestive tolerance and postprandial glycaemic and insulinaemic responses after consumption of dairy desserts containing maltitol and fructooligosaccharides in adults. **Eur. J. Clin. Nutr.**, may, v. 68, n. 5, p. 575-80, 2014.
- RESTEL, T. I. Avaliação ponderal hematológica e bioquímica em camundongos *Mus musculus*, linhagem *Swiss*, machos e fêmeas de diferentes idades, do biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS. **Dissertação de Mestrado, PPGSD**, 2012.

- RIDKER, P. M. Novel risk factors and markers for coronary disease. **Adv Intern Med.**, n. 45, p. 391-418, 2000.
- ROBINSON, M., W.; HARMON, C.; O'FARRELLY, C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. **Cellular & Molecular Immunology**, abr., n. 13, p. 267–276, 2016.
- ROSINI, T. C.; SILVA, A. S. R.; MORAES, C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo de distúrbios relacionados com a obesidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, mai/jun, v. 58, n. 3, p. 383-387, 2012.
- RUTLEDGE, A. C.; ADELI, K. Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms. **Nutr. Rev.**, v. 65, p. s13-s23, 2007.
- SAKAI, K.; ARAMAKI, K.; TAKASAKI, M., et al. Effect of dietary short-chain fructooligosaccharides on the cecal microflora in gastrectomized rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, n. 65, p. 264–269, 2001.
- SAMPEY, B. P.; VANHOOSE, A. M.; WINFIELD, H. M. ; FREEMERMAN, A. J.; MUEHLBAUER, M. J.; FUEGER, P. T.; NEWGARD, C. B.; MAKOWSKI, L. Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. Nature publishing group, **Obesity**, n. 19, p. 1109–1117, 2011.
- SANGUESSA, G.; BAENA, M.; HUTTER, N.; MONTANÉS, J. C.; SANCHES, R. M.; ROGLANS, N.; LAGUNA, J. C.; ALEGRET, M. The addition of liquid fructose to a western-type diet in LDL-R *-/-* mice induces liver inflammation and fibrogenesis markers without disrupting insulin receptor signaling after an insulin challenge. **Nutrients**, v. 9, n. 278, p. 1-15, 2017.
- SANTOS, E. W.; OLIVEIRA, D. C.; HASTREITER, A.; SILVA, G. B.; BELTRAN, J. S. O.; TSUJITA, M.; CRISMA, A. R.; NEVES, S. M. P.; FOCK, R. A.; BORELLI, P. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 53, n. 2, p. 138-145, 2016.
- SANYAL, A.; NAUMANN, J.; HOFFMAN, L. S.; ARNER, P.; BLÜHER, M.; PFEIFER, A. Interplay between obesity-induced inflammation and Cgmp signaling in white adipose tissue. **Cell Reports**, v. 18, n. 1, p. 225-236, 2017.
- SAVARI, F.; MARD, S. A.; BADAVIDI, M.; REZAIE, A.; NASERI, M. K. G. A new method to induce nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in mice. **BMC Gastroenterology**, v. 19, n. 125, p. 1-10, 2019.
- SAYINER, M.; KOENIG, A., HENRY, L., YOUNOSSI, Z.M. Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in the united states and the rest of the world. **Clin. Liver Dis.**, n. 20, p. 205–214, 2016.
- SELZNER, N.; SELZNER, M.; ODERMATT, B.; TIAN, Y.; ROOIJEN, N. V.; CLAVIEN, P. A. ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and

Kupffer cell-dependent release of TNF- α /IL-6 in mice. *Gastroenterology*, n. 124, p. 692–700, 2003.

SENN, J.J.; KLOVER, P.J.; NOWAK, I.A.; ZIMMERS, T.A.; KONIARIS, L.G.; FURLANETTO, R.W.; MOONEY, R.A. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, n. 278, p. 13740–13746, 2003.

SEO, Y. Y.; CHO, Y. K.; BAE, J. C.; SEO, M. H.; PARK, S. E.; RHEE, E. J.; et al. Tumor necrosis factor- α as a predictor for the development of nonalcoholic fatty liver disease: a 4-year follow-up study. *Endocrinol. Metab. (Seoul)*, v. 28, n. 1, p.41–5, 2013.

SHEEDFAR, F.; DI BIASE, S.; KOONEN, D.; VINCIGUERRA, M. Liver diseases and aging: friends or foes? *Aging Cell.*, n. 12, p. 950–954, 2013.

SHINOKI, A.; HARA, H. Dietary fructo-oligosaccharides improve insulin sensitivity along with the suppression of adipocytokine secretion from mesenteric fat cells in rats. *British Journal of Nutrition*, n. 106, p. 1190–1197, 2011.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A.B. **Inflammation and insulin resistance.** *J. Clin. Invest.*, v. 116, p. 1793–1801, 2006.

SILVA-SANTI, L. G.; DA, L. G.; ANTUNES, M. M.; ASSEF, S. M. C; CARBONERA, F.; MAIS, L. N.; CURI, R.; VISENTAINER, J. V.; BAZOTTE, R. B. Liver Fatty Acid Composition and Inflammation in Mice Fed with High-Carbohydrate Diet or High-Fat Diet. *Nutrients*, v. 8, n. 682, p.1-14, 2016.

SILVA, P. S. **Bioquímica dos alimentos.** Porto Alegre SER – SAGAH, 2018.

SLAVIN, J. L. Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. ADA, American Diabetes Association. *J. Am. Diet Assoc.*, v. 108, n. 10, p. 1716-31, 2008.

SONG S. K.; BECK, B. R.; KIM, D.; PARK, J.; KIM, J. B.; KIM, H. D.; RINGO, E. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. *Fish & Shellfish Immunology, Republic of Korea*, jun., v. 40, p. 40-48, 2014.

SPINELLI, M. O.; CRUZ, R. J.; GODOY, C. M. S.; JUNQUEIRA, M. S.; MOTTA, M. C.; BORTOLATTO, J. Perfil bioquímico dos animais de laboratório do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. RESBCAL, **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.** São Paulo, jan/Fev/ Mar, v. 1, n. 1, p. 76-81, 2012.

SPRUSS, A.; HENKEL, J.; KANURI, G.; BLANK, D.; PUSCHEL, G. P.; BISCHOFF, S. C.; BERGHEIM, I. Female mice are more susceptible to nonalcoholic fatty liver disease: sex-specific regulation of the hepatic AMP-activated protein kinase-plasminogen activator inhibitor 1 cascade, but not the hepatic endotoxin response. *Mol Med.*, n. 18, p. 1346–1355, 2012.

STANHOPE, K. L., SCHWARZ, J. M., HAVEL, P. J. Adverse metabolic effects of dietary fructose: Results from the recent epidemiological, clinical, and mechanistic studies. **Curr. Opin. Lipidol.**, n. 24, p. 198–206; 2013.

STEFÉ, C. A.; ALVES, M. A.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, prebióticos e simbióticos, Artigo de revisão. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, jan/jun, v. 3, n. 1, p. 16-33, 2008.

STORLIEN, L. H.; HIGGINS, J. A.; THOMAS, T. C.; BROWN, M. A.; WANG, H. Q., HUANG, X. F.; ELSE, P. L. Diet composition and insulin action in animal models. Metabolic Research Centre, Faculty of Health & Behavioural Sciences, University of Wollongong, **British Journal of Nutrition**, v. 83 (supl. 1), p. S85-S90, 2000.

SUEHIRO, C. L.; ARRUDA, A. C. T.; VIEIRA, R. P.; ALMEIDA, F. M.; OLIVO, C. R.; MARTINS, M. A.; LIN, C. J. A possible association between fructose consumption and pulmonary emphysema. Scientific Reports, **Nature**, v. 9, n. 9.344, p. 1-9, 2019.

SUN, S. Z.; EMPIE, M. W. Fructose metabolism in humans-what isotopic tracer studies tell us. **Nutrition and Metabolism**, v. 9, n. 89, 2012.

TAKAHASHI, Y.; SUGIMOTO, K.; SOEJIMA, Y.; KUMAGAI, A.; KOEDA, T.; SHOJO, A.; NAKAGAWA, K.; HARADA, N.; YAMAJI, R.; INUI, H. Inhibitory effects of eucalyptus and banana leaf extracts on nonalcoholic steatohepatitis induced by a high-fructose/high-glucose diet in rats. **Biomed. Res. Int.**, 2015.

TALL, A. R.; CHARVET, L. Y. Cholesterol, inflammation and innate immunity. **Nat Rev. Immunol.**, n. 15, p. 104–116, 2015.

TAMER, F.; ULUGA, E.; AKYOLB, A.; UNAL, R. N. The potential efficacy of dietary fatty acids and fructose induced inflammation and oxidative stress on the insulin signaling and fat accumulation in mice. **Food and Chemical Toxicology**, p. 1-9, 2019.

TANNAHILL, G. M.; CURTIS, A. M.; ADAMIK, J.; PALSSON-MCDERMOTT, E. M.; BMCGETTRICK, A. F.; GOEL, G. et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . **Nature**, n. 496, p. 238–242, 2013.

TAPPY, L. Q&A: ‘toxic’ effects of sugar: should we be afraid of fructose? **BMC Biol** 10, n. 42, 2012.

TEIXEIRA, B. C.; LOPES, A. L.; MACEDO, R. C. O.; CORREA, C. S.; RAMIS, T. R.; RIBEIRO, J. R.; REISCHAK-OLIVEIRA, A. Marcadores inflamatórios, função endotelial e riscos cardiovasculares. Porto Alegre, **J. Vasc. Bras.**, v. 13, n.2 abr/jun, 2014.

THEODORE, C.; FRIEDMAN, I. S. H.; PARVEEN, M.; NAJJAR, S. M.; LIU, Y.; MANGUBAT, M.; SHIN C. S.; LYZLOV, A.; IVEY, R.; SHAHEEN, M.; FRENCH, S. W.; SINHA-HIKIM, A. P. Additive effects of nicotine and high-fat diet on hepatic steatosis in male mice. **Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.**, v. 153, n. 12, p. 5809–20, 2012.

TILG, H. The role of cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. **Dig. Dis.**, n. 28, p. 179–185, 2010.

TILLMAN, E. J.; MORGAN, D. A.; RAHMOUNI, K.; SWOAP, S. J. Three Months of High-Fructose Feeding Fails to Induce Excessive Weight Gain or Leptin Resistance in Mice. **Plos One**, Sep, v. 9, n. 9, 2014.

TRZECIAK, R. A.; TOKARZ, D. B.; RYSTWEJ, N. P.; DEPTULA, W. Adipose tissue – component of the immune system. **Centr. Eur. J. Immunol.**, n. 36, p. 95-9, 2011.

USHIO, M.; NISHIO, Y.; SEKINE, O.; NAGAI, Y.; MAENO, Y.; et al. Ezetimibe prevents hepatic steatosis induced by a high-fat but not a high-fructose diet. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, n. 305, p. E293–E304, 2013.

UUSITUPA, M.; SCHWAB, U. Diet, Inflammation and prediabetes – impact of quality of diet. **Canadian Journal of Diabetes**, n. 37, p. 327-331, 2013.

VAN GAAL, L. F.; MERTENS, I. L.; DE BLOCK, C. E. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 875-80, 2006.

VASDEV, S.; LONGERICH, L.; GILL, V. Prevention of fructose induced hypertension by dietary vitamins. **Clin. Biochem.**, n. 37, p. 1-9, 2004.

VELLOSA, J. C. R.; PARABOCZ, G. C.; MANENTE, F.A.; RIBAS, J. T.; LIMA, L. W. Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 305-312, 2013.

VOLP, A. C. P.; ALFENAS, R. C. G.; COSTA, N. M. B.; MINIM, V. P. R.; STRINGUETA, P. C.; BRESSAN, J. Capacidade dos Biomarcadores Inflamatórios em Predizer a Síndrome Metabólica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 52, n.3, p. 537-549, 2008.

WANG, Y.; ZENG, B.; WANG, C. E.; LI, A.; GUO, A. Y.; JIN, A.; YU, C. X. Laxative effect of fructooligosaccharide in mice and humans. **Current Topics in Nutraceutical Research**, v. 11, n. 1/2, p. 1-8, 2013.

WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R. L.; AND FERRANTE JR, A. W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of Clinical Investigation**, Dec., v. 112, n. 12, p. 1796-1808, 2003.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. **The Journal of Clinical Investigation**, Dec., v. 112, n. 12, p. 1785-1788, 2003.

WHO, World Health Organization. **Global status report on non communicable diseases 2010**. Geneva: World Health Organization, 2011.

WHO, World Health Organization. **Increasing Fruit and Vegetable Consumption to Reduce the Risk of Noncommunicable Diseases.** Available online: https://www.who.int/elena/titles/fruit_vegetables_ncds/en/ (accessed on 24 July 2019).

WHO, World Health Organization. The World Health Report 2004. **Global strategy on diet, physical activity, and health.** Geneva: World Health Organization, 2004.

WHO, World Health Organization. **World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals.** Geneva: World Health Organization; 2018.

WOLFENSOHN, S; LLOYD, M. **Laboratory animal: management and welfare.** Blackwell Publishing, 3 ed., 2003.

WOODIE, L.; BLYTHE, S. The differential effects of high-fat and high- fructose diets on physiology and behavior in male rats. **Nutritional Neuroscience**, fev, p. 1-9, 2017.

XIAO, J.; METZLER-ZEBELI, B. Z; ZEBELI, Q. Gut Function-Enhancing Properties and Metabolic Effects of Dietary Indigestible Sugars in Rodents and Rabbits. **Nutrients**, n. 7, p. 8348–8365, 2015.

YANG, Y.; JINGA, B. L.; CONGA, W. B.; YINGA, B. B.; YIXINA, B. C., YONGMINA, B. C. Z.; WENJIA, B. Z.; BOLINGA, B. Q.; JIAOA, H. Amelioration of nonalcoholic fatty liver disease by swertiamarin in fructosefed mice. **Phytomedicine**, n. 59, p. 1-12, 2019.

YANG, Z. H.; MIYAHARA, H.; TAKEO, J.; KATAYAMA, M. Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 4, n. 32, p. 1-10, 2012.

YEH, S. L.; WU, T. C.; CHAN, S. T.; HONG, M. J.; CHEN, H. L. Fructo-oligosaccharide attenuates the production of pro-inflammatory cytokines and the activation of JNK/Jun pathway in the lungs of D-galactose-treated Balb/cJ mice. **Eur. J. Nutr.**, n. 53, p. 449–456, 2014.

YOUNOSSI, Z. M.; KOENIG, A. B.; ABDELATIF, D.; FAZEL, Y.; HENRY, L.; WYMER, M. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease-meta-analytic assessment of prevalence, incidence and outcomes. **Hepatology**, n. 64, p. 73–84, 2016.

YUDKIN, J. S.; JUHAN-VAGUE, I.; HAWE, E.; HUMPHRIES, S. E.; DI MINNO, G.; MARGAGLIONE, M.; et al. The hifmech study group. Low-grade inflammation may play a role in the etiology of the metabolic syndrome in patients with coronary heart disease: the hifmech study. **Metabolism**, n. 53, p. 852-7, 2004.

ZAGRODZKI, P.; JONIEC, A.; GAWLIK, M.; GAWLIK, M.; KROS´NIAK, M.; FOLTA, M.; BARTON´, H.; PAS´KO, P.; CHŁOPICKA, J.; ZACHWIEJA, Z. High fructose model of oxidative stress and metabolic disturbances in rats. Part I. Antioxidant status of rats' tissues. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**, n. 51, p. 407–412, 2007.

ZEENI, N.; HAMALIAN, C. D.; DIMASSI, H.; FAOUR, W. H. Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation. **Inflamm. Res.**, n. 64, p. 501–512, 2015.

ZHAO, X. J., YU, H. W., YANG, Y. Z., WU, W. Y., CHEN, T. Y., JIA, K. K., et al. Polydatin prevents fructose-induced liver inflammation and lipid deposition through increasing miR-200a to regulate Keap1/Nrf2 pathway. **Redox Biol.**, n. 18, p. 124–137. 2018.

ZULET, M. A.; PUCHAU, B.; NAVARRO, C.; MARTÍ, A.; MARTÍNEZ, J. A. Biomarcadores del estado inflamatorio: nexo de unión con la obesidad y complicaciones asociadas. **Nutr Hosp.**, n. 22, p. 511-27, 2007.

9 ANEXOS

Anexo 1 – Protocolo de aprovação CEUA



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos de diferentes dietas sobre metabolismo e inflamação em ratos", registrada com o nº 813/2016, sob a responsabilidade de **Andreia Conceição Milan Brochado Antonioli Silva** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 11ª reunião ordinária do dia 09/12/2016.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Fevereiro/2016 a Agosto/2019
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Nº de animais	32
Peso/Idade	220 - 250g/60 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central/CCBS/UFMS

Maria Araújo Teixeira
Maria Araújo Teixeira
Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 09 de dezembro de 2016.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.2000@gmail.com
fone (67) 3345-7925

Anexo 2 – Comprovante de Treinamento Biotério Central/UFMS



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



DECLARAÇÃO

Declaramos que **Cacilda Rocha Hildebrand** realizou treinamento no Biotério Central-UT do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul no(s) dia(s) **05/09/2016** e **13/10/2016**, totalizando uma carga horária de 8 (oito) horas, tendo desenvolvido as seguintes atividades:

1. *Área de Criação*
 - Participação na rotina de troca de roedores.
 - Contenção.
 - Sexagem.
 - Participação na rotina de higienização/desinfecção de materiais.
2. *Área de Experimentação*
 - Normas e rotinas.

Por ser verdade, firmo a presente declaração.

Campo Grande-MS, 13 de outubro de 2016.


Cacilda Rocha Hildebrand
BIAPE 0433246
Centro BIOTÉRIO-UT/CCBS/UFMS

Biotério - UT / CCBS
Avenida Senador Filinto Müller 1555, Vila Ipiranga Fone: 067 3345-3540 / 3345-3541
CEP 79074-460 Campo Grande (MS)
e-mail: bioterio.ccbs@ufms.br

10 APÊNDICE

Apêndice 1 – Planilha de acompanhamento dos animais.

CONTROLE SEMANAL LOTE 3

Pesquisas: Inflamação por diferentes dietas e estresse oxidativo com campomanésia em camundongos
 Pesq. Responsáveis: Cacilda R. Hildebrand e Amarielles R. Diniz
 Orientadora: Andréia C. B. M. Antontolli

PESQUISADORA	RAÇÃO	N. CAIXA	RAÇSOBR	RAÇCONS	RAÇOFER	Pesquisador:			PESO	OBSERVAÇÕES
						N. Animal	INICIO	PESO		
AMARILES	AIN	6A				I	43			
						II	42			
						III	45			
CACILDA	AIN	8B				I	40			
						II	39			
						III	38			
AMARILES	AMIDO	7B				I	39			
						II	38			
						III	38			
CACILDA	AMIDO	10A				I	37			
						II	39			
						III	40			
AMARILES	AMIDO G1	11				I	36			
						II	44			
						III	33			
AMARILES	AMIDO G2	8A				I	41			
						II	39			
						III	36			
AMARILES	AMIDO F	12A				I	37			
						II	38			
						III	41			
CACILDA	FRUTOSE	6B				I	39			
						II	42			
						III	35			
CACILDA	FRUTOSE F	2B				I	35			
						II	40			
						III	36			