

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Carla Dayana Durães Abreu

Efeitos da inulina no metabolismo de camundongos

Montes Claros

2022

Carla Dayana Durães Abreu

Efeitos da inulina no metabolismo de camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Saúde do Instituto de Ciências Agrárias- UFMG, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Alimentos e Saúde.

Área de Concentração: Efeitos dos Alimentos e suas tecnologias na Fisiopatologia e Nutrição

Orientador: Prof.^a Dr.^a. Maria Beatriz de Abreu Glória

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Sousa Santos

Montes Claros

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitora: Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-reitor: Alessandro Fernandes Moreira

Pró-reitor de Pesquisa: Mário Fernando Montenegro Campos

Pró-reitor adjunto de Pesquisa: André Ricardo Massensini

Pró-reitor de Pós-graduação: Fábio Alves da Silva Júnior

Pró-reitora adjunta de Pós-graduação: Silvia Helena Alencar

CURSO DE MESTRADO EM ALIMENTOS E SAÚDE

Coordenador: Sérgio Henrique Sousa Santos

Subcoordenadora: Bruna Mara Aparecida de Carvalho

Abreu, Carla Dayana Durães.

A162e
2022

Efeitos da inulina no metabolismo de camundongos [manuscrito] / Carla Dayana Durães Abreu. Montes Claros, 2022.

53f. il.

Dissertação (mestrado) - Área de concentração em Alimentos e Saúde. Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientadora: Maria Beatriz de Abreu Glória

Banca examinadora: Igor Viana Brandi, Lucineia de Pinho, Maria Beatriz de Abreu Glória, Sérgio Henrique Sousa Santos.

Inclui referências: 47-51

1. Inulina -- Teses. 2. Metabolismo -- Teses. 3. Tecido adiposo -- Teses. I. Glória, Maria Beatriz de Abreu. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 612.3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Agrárias
Curso de Mestrado em Alimentos e Saúde

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 21 dias do mês de fevereiro de 2022, às 14:00 horas, sob a Presidência da Professora Maria Beatriz de Abreu Glória, Dr. Sc. (Orientadora – UFMG/FaFar) e com a participação dos Professores Sérgio Henrique Sousa Santos, Dr. Sc. (Coorientador - UFMG/ICA), Igor Viana Brandi Dr. Sc. (UFMG/ICA) e Lucinéia de Pinho, Dr. Sc. (Unimontes) reuniu-se, por videoconferência, a Banca de defesa de dissertação da Discente Carla Dayana Durães Abreu, aluna do Curso de Mestrado em Alimentos e Saúde. O resultado da defesa de dissertação intitulada: “Efeitos da inulina no metabolismo de camundongos”; sendo a aluna considerada APROVADA. E, para constar, eu, Professora Maria Beatriz de Abreu Glória, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Sergio Henrique Sousa Santos, Professor do Magistério Superior**, em 08/03/2022, às 12:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Beatriz de Abreu Gloria, Professora Magistério Superior - Voluntária**, em 08/03/2022, às 14:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Igor Viana Brandi, Professor do Magistério Superior**, em 08/03/2022, às 15:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucineia de Pinho, Usuário Externo**, em 10/03/2022, às 08:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1295112** e o código CRC **A4DA970D**.

Aos meus pais, Alcides e Penha, por sempre acreditarem em mim e por terem dedicado suas vidas em prol das realizações e da felicidade de seus filhos.

À minha amada irmã Luciana, por sua preocupação, carinho e incentivo.

A todos os pesquisadores desse país que mesmo em meio a todas as dificuldades enfrentadas nos últimos anos não desistiram de dar o seu melhor para que a pesquisa acontecesse.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela coragem para mais uma conquista, por me dar entendimento e sabedoria, por ter me conduzido até aqui, e me ensinara ser persistente, e humilde. “Por que Dele, por Ele, para Ele, são todas as coisas”.

Por ter colocado no meu caminho somente pessoas maravilhosas, que tornaram meus dias melhores e me ajudaram em tantos momentos que precisei.

Agradeço a minha família, meus tios, tias, primos e primas, avô, em especial aos meus pais por toda paciência, carinho, amor, palavras de incentivo. Por me apoiarem e me encorajarem em todas as minhas decisões e me auxiliarem sempre em novas conquistas. Agradeço em especial minha irmã Luciana, sem você eu não poderia ter chegado até aqui, me apoiou de uma maneira muito linda a seguir um caminho de luz para alcançar os meus sonhos.

À minha orientadora Dr^a. Beatriz e meu coorientador Dr. Sérgio Santos, que apesar de tê-los conhecido há tão pouco tempo, se tornaram referências para mim, agregaram valor a minha existência, me ensinaram a enxergar a vida numa perspectiva madura e inteligente, agradeço pela dedicação, competência e serenidade em todos os momentos dessa caminhada. Em especial ao Sérgio, obrigada principalmente pela paciência comigo, por me receber em seu laboratório e por me fazer sentir capaz, mesmo diante de todos os obstáculos e desafios.

Ao Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da UFMG grande palco dessa realização, de um sonho que se tornou realidade e ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Saúde por todo apoio e estrutura.

Aos amigos do Laboratório de pesquisa em saúde do Hospital Universitário Clemente de Faria que me receberam de braços abertos assim que entrei no laboratório, agradeço por todo o ensinamento, confiança, disponibilidade, imprescindível ajuda, convivências diárias, companheirismo, dedicação e principalmente pelos momentos de descontração que foram fundamentais nesta caminhada. Encheram-me de alegria, mesmo nos dias mais tristes, me ensinaram e corrigiram, acrescentando muito em minha vida pessoal e acadêmica. Agradeço imensamente a Bruna por caminhar comigo com tanto companheirismo e dedicação, me auxiliando em todos os momentos desde o início ao final da pesquisa; a Victor e Bárbara por literalmente pegar na minha mão e ensinar com tanta paciência e didática; a Guilherme, Larissa,

Suely pelos momentos de trabalho em equipe, a Marileide (supermãe de todos) e a todos os outros.

A todos os amigos da turma maravilhosa do mestrado, por todo companheirismo e momentos de descontração em especial Ada e Suely.

Às minhas amigas de sempre, Juliana Andrade, Carol, Amandinha, Paty e Érica, por só quererem o meu bem e me valorizarem tanto como pessoa. Obrigada pela amizade!

Muito obrigado, amo vocês! E por todos que torceram e participaram de alguma forma deste trabalho. Toda jornada bem-sucedida começa com um simples desejo e termina com a concretização de um sonho!

RESUMO

Introdução: Mudanças no estilo de vida da sociedade, especialmente o aumento do consumo de alimentos ultra processados, alta ingestão de carne vermelha, açúcar e sal e escassez de fibras alimentares possuem implicações para a microbiota intestinal coevoluída além de aumentar a incidência de adiposidade e doenças inflamatórias crônicas. A fibra alimentar consiste em formas não digeríveis de carboidratos, geralmente como polissacarídeos que se originam de alimentos à base de plantas. Dentre as fibras, a inulina tem sido muito estudada com ênfase na regulação do peso e na melhoria de parâmetros metabólicos, e associada a efeitos positivos no metabolismo lipídico do hospedeiro proporcionando melhorias na homeostase lipídica, diminuição das taxas séricas de colesterol e triglicerídeos, redução da lipogênese hepática com impactos positivos na saciedade e no peso corporal. **Objetivos:** Avaliar a influência de uma suplementação com o prebiótico inulina no metabolismo de camundongos. **Métodos:** Camundongos machos Swiss foram alimentados por 4 semanas com 2 dietas isocalóricas diferentes: Standard (ST), Standard + Inulin (ST+I, 10%). Foram mensurados parâmetros como ingestão de alimentos/energia e composição corporal, realizou-se teste de sensibilidade a insulina e tolerância a glicose. Os tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal, mesentérico, subcutâneo e marrom, além do fígado, músculo, estômago, intestino grosso e delgado foram pesados; destes o fígado, tecido adiposo epididimal, músculo, estômago, intestino grosso e delgado foram armazenados a -80 °C para posterior análise molecular. Foram também avaliados os seguintes parâmetros bioquímicos: colesterol total (TC), lipoproteína de alta densidade (HDL), triglicerídeos (TG), transaminases alaninas (ALT/GPT) e transferência de aspartato (AST/GOT) utilizando kits enzimáticos (Wiener Laboratories, Rosario, Argentina), histologia e expressão de mRNA do tecido adiposo epididimal. **Resultados:** A suplementação dietética foi benéfica tendo em vista que promoveu um aumento nos índices bioquímicos do HDL, diminuiu as enzimas GPT relacionadas ao risco de lesão hepática e melhorou o perfil glicêmico ao aumentar a sensibilidade à insulina. Ainda, reduziu a expressão do gene da proteína transmembrana Toll-like receptor 4 (TLR4) e a interleucina 6 (IL6), na avaliação da expressão gênica de marcadores de adipócitos “bege” (Pgc1 α , Ucp1, Cidea). Foi também observada uma tendência de aumento desses genes no grupo tratado com inulina em relação ao grupo controle no tecido adiposo epididimal, e uma diminuição da hipertrofia dos adipócitos com um predomínio de pequenos adipócitos do grupo tratado com inulina em comparação ao grupo controle enquanto os adipócitos pequenos estão relacionados a um risco diminuído de distúrbios no metabolismo. Nos adipócitos hipertróficos ocorreu um aumento da secreção de citocinas inflamatórias e diminuição da secreção de adipocinas anti-inflamatórias. **Conclusão:** A suplementação com inulina pode melhorar os índices relacionados ao surgimento da obesidade como inflamação crônica, prevenir a disfunção da matriz extracelular (MEC) que induzem mudanças na funcionalidade do tecido adiposo e variações em seu perfil de secreção de adipocinas indicando a inulina como uma alternativa natural anti-obesidade.

Palavras-chave: Inulina. Metabolismo. Tecido Adiposo.

ABSTRACT

Introduction: Changes in the society's lifestyle, especially the increase in the consumption of ultra-processed foods, the high intake of red meat, sugar and salt and the scarcity of dietary fibers have implications for the gut microbiota with increasing incidence of adiposity and chronic inflammatory diseases. Dietary fiber are non-digestible forms of carbohydrates and polysaccharides that originate from plant-based foods. Among fibers inulin has been widely studied with emphasis in the area of weight regulation and improvement of metabolic parameters, and linked to positive effects on the host lipid metabolism providing improvements in lipid homeostasis, reduction of serum cholesterol and triglyceride rates, reduction of lipogenesis with positive impacts on satiety and body weight. **Objectives:** To investigate the effects of prebiotic inulin supplementation on the metabolism of mice. **Methods:** Male Swiss mice were fed for 4 weeks with 2 different isocaloric diets: Standard (ST), Standard + Inulin (ST+I, 10%). Measurements of some parameters, e.g. food/energy intake, body composition data, insulin sensitivity and glucose tolerance. Epididymal adipose, retroperitoneal, mesenteric, subcutaneous and brown tissues, in addition to the liver, muscle, stomach, large and small intestine were weighed; among them, liver, epididymal adipose tissue, muscle, stomach, and the large and small intestines were stored at -80 °C for further molecular analysis. In addition, analyses were undertaken for the evaluation of the following parameters total cholesterol (TC), high density lipoprotein (HDL), triglycerides (TG), alanine transaminases (ALT/GPT) and aspartate transfer (AST/GOT) using enzyme kits (Wiener Laboratories, Rosario, Argentina), histology and mRNA expression of epididymal adipose tissue were analyzed. **Results:** The dietary supplementation of inulin was benefic as it increased HDL biochemical indices, decreased GPT enzymes related to the risk of liver injury, improved the glycemic profile and increased insulin sensitivity. It also reduced the expression of the Toll-like receptor 4 transmembrane protein (TLR4) and interleukin 6 (IL6) in the evaluation of the gene expression of beige adipocytes markers (Pgc1 α , Ucp1, Cidea). There was also a trend in the increase in these genes of the treated group compared to the control regarding epididymal adipose tissue, and a decreased hypertrophy of adipocytes with a predominance of small adipocytes while small adipocytes are related to a decreased risk of disorders in metabolism. In hypertrophic adipocytes, there was an increased secretion of inflammatory cytokines and decreased secretion of anti-inflammatory adipocins. **Conclusion:** Inulin supplementation may improve rates related to the onset of obesity as inflammation prevents extracellular matrix dysfunction (ECM) that induce changes in adipose tissue functionality and variations in its adipokine secretion profile indicating inulin as a natural anti-obesity alternative.

Keywords: Inulina. Metabolism. Adipose tissue.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Perfil típico de distribuição bacteriana ao longo do trato gastrointestinal.....	14
FIGURA 2. Estrutura química da inulina.....	21
FIGURA 3. Características físico-químicas da inulina.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DII	-	Doenças inflamatórias do intestino
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico
FAO	-	Organização para Alimentação e Agricultura
FOS	-	Frutooligossacarídeos
GI	-	Gastrointestinal
GOS	-	Galactooligossacarídeos
GPR43	-	Receptor acoplado à proteína G 43
GSTs	-	Glutathione S-transferases
H ₂ O ₂	-	Peróxido de hidrogênio
IL-6	-	Interleucina 6
IMC	-	Índice de massa corporal
LPS	-	Lipopolissacarídeos
NA	-	Anorexia nervosa
pH	-	Potencial hidrogeniônico
PVN	-	Parto vaginal normal
ROS	-	Espécies reativas de oxigênio
SCFAs	-	Ácidos graxos de cadeia curta (do inglês short chain fatty acids)
SII	-	Síndrome do intestino irritável
SNC	-	Sistemas nervoso central
SNE	-	Sistema nervoso entérico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	09
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1	Microbiota intestinal humana.....	12
2.2	Funções da microbiota intestinal humana.....	15
2.3	Modulação da microbiota intestinal.....	16
2.4	Prebióticos.....	17
2.4.1	Inulina.....	20
3	OBJETIVOS.....	25
3.1	Objetivo geral.....	25
3.2	Objetivos específicos.....	25
4	PRODUTOS CIENTÍFICOS.....	26
5	CONCLUSÕES	43
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
	ANEXOS.....	52

1 INTRODUÇÃO

Os conceitos na área de nutrição estão passando por alterações no mundo industrializado. Houve uma mudança acerca da noção de nutrição adequada para uma nutrição ideal. O foco alimentar no passado foi destinado aos alimentos com base na sobrevivência e satisfação da fome. Agora o foco está no efeito positivo dos alimentos sobre a saúde, além da função nutricional básica. Esta tendência gerou um aumento nas expectativas em torno dos alimentos consumidos: a população não deseja apenas comer, mas comer bem e obter benefícios para a saúde (GONZÁLEZ-DÍAZ et al., 2020).

Os consumidores começaram a entender os efeitos da nutrição saudável na melhoria da saúde e na redução do risco de doenças. Portanto, a saúde se torna um motivo para a compra de determinados alimentos (GOETZKE et al., 2014). Nesse sentido surgiram os alimentos funcionais, ou seja, alimentos convencionais ou diários consumidos como parte da dieta normal/ usual, tendo um efeito positivo na(s) função(ões) alvo além do valor nutritivo/nutrição básica, capazes de promover diminuição do risco de doenças e tendo alegações de saúde autorizadas e com base científica (GONZÁLEZ-DÍAZ et al., 2020). Os efeitos de intervenções dietéticas no metabolismo são rápidos e eficazes, por exemplo mudanças perceptíveis na microbiota intestinal acontecem em apenas 24 horas (GREEN et al., 2020).

O microbioma intestinal humano teve recentemente um papel de destaque na modulação da saúde humana. Os trilhões de células microbianas que colonizam o intestino humano são conhecidos por serem um centro metabólico central, propiciando homeostase fisiológica e função imunológica por meio de uma relação simbiótica com o hospedeiro. O papel do microbioma humano se estende além do trato gastrointestinal (GI), proporcionando uma variedade de comunicações importantes entre o intestino, o sistema nervoso entérico (SNE) e o cérebro. Perturbações no microbioma intestinal, ou “disbiose”, foram relacionadas a inúmeras patologias metabólicas, gastrointestinais e cognitivas (CARABOTTI et al., 2015).

Os prebióticos foram bem atestados por seus efeitos positivos na saúde gastrointestinal. O termo "prebiótico" define ingredientes alimentares indigeríveis fermentados por micróbios intestinais, que servem como "um substrato que é utilizado seletivamente por microrganismos hospedeiros, viabilizando benefícios à saúde". Os alimentos que naturalmente possuem fibras prebióticas são considerados "funcionais" por si só. Contudo é possível produzir

industrialmente as fibras prebióticas por extração e síntese, e acrescentá-las ao alimento, demonstrando ser uma estratégia industrial interessante para o enriquecimento de diversos produtos alimentícios comerciais. As fibras prebióticas servem como um substrato metabólico útil para os micróbios intestinais, que os transformam por fermentação em ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) e outros metabólitos no lúmen intestinal (BROSSEAU et al., 2019; GREEN et al., 2020).

Dentre os prebióticos mais estudados e utilizados na área de regulação do peso encontramos a oligofrutose e a inulina (AMY et al., 2012). A inulina consiste em cadeias repetitivas da fração frutossil, ligadas por ligações β (2,1) em porções de terminação de glucosil. As moléculas de inulina são encontradas em diversos vegetais como aspargos, alho-poró, alcachofra, cebola e alho (MENSINK et al., 2015).

As inulinas extraídas dessas plantas são conhecidas por seus efeitos terapêuticos e fisioprotetores, como diminuição do colesterol ou do nível de glicose sanguíneos por redução da lipogênese e dos efeitos antioxidantes. Além disso, esses frutanos do tipo inulina promovem seletivamente o crescimento de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* spp. no cólon humano e, como consequência, de sua fermentação podem ser produzidos ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) (AHMED e RASHID, 2019; SALEKZAMANI et al., 2019).

Muitas evidências apoiam um papel importante para a ingestão de fibras prebióticas como contribuinte para a saúde metabólica geral, por meio de vias-chave que incluem a sensibilidade à insulina. Além disso, existem associações claras entre a ingestão de fibra alimentar e múltiplas patologias que incluem doenças cardiovasculares, saúde do cólon, motilidade intestinal e risco de síndrome metabólica. A ingestão de fibra dietética também se correlaciona com a mortalidade. A microflora intestinal funciona como um importante mediador dos efeitos benéficos da fibra alimentar, incluindo a regulação do apetite e processos metabólicos e vias inflamatórias crônicas (GREEN et al., 2020).

O estilo de vida moderno com predomínio de inatividade física e uma dieta ocidental difere radicalmente de nossos ancestrais hominídeos caçadores-coletores. Assim, nossa composição genética é mal adaptada a esse novo estilo de vida. Além disso, a microbiota intestinal, coevoluiu ao longo de milhões de anos, e da qual a saúde depende totalmente, provavelmente foi alterada devido ao estilo de vida evolutivamente incomum, sendo o componente principal a dieta consumida (GONZÁLEZ-DÍAZ et al., 2020).

Para lidar com a falta de fibra alimentar nas populações ocidentalizadas, é necessária uma abordagem multifacetada. Para incentivar o consumo in natura de alimentos fonte de fibras, recomenda-se o consumo de alimentos de origem vegetal, como cereais, frutas,

leguminosas, hortaliças e tubérculos, e, particularmente, alimentos ricos em inulina: frutas e vegetais como banana, chicória, alho, cebola, alho-poró e trigo. Além da adição de fibras prebióticas aos alimentos existentes, há um aumento no perfil de nutrientes e no valor nutricional e uma melhoria nas propriedades físico-químicas dos alimentos. Esta medida pode contribuir para a redução do teor de gordura, açúcar e energia, sem prejudicar o sabor e a textura do alimento, para o aumento do conteúdo de fibra alimentar e auxilia no crescimento de micróbios intestinais comensais. Esses efeitos são reforçados por uma experiência sensorial geral aprimorada para o consumidor, favorecendo o consumo regular do alimento e a adesão à dieta. Uma categoria de fibras dietéticas que recebeu grande atenção na última década são os frutanos do tipo inulina que está surgindo como um ingrediente em alimentos altamente processados para melhorar o valor nutricional.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Microbiota intestinal humana

O intestino é essencial para a saúde do hospedeiro por meio de comunicações com micróbios que habitam o intestino e contribuem para a instalação da barreira epitelial intestinal. As principais funções intestinais são absorção de água e nutrientes, secreção de enzimas digestivas, produção de muco, e motilidade do conteúdo luminal ao longo do trato gastrointestinal em um movimento de mistura, para garantir o contato correto com o epitélio para absorção (CARABOTTI et al., 2015).

Na saúde, o intestino está implicado na produção de vitaminas, metabolismo de nutrientes e proteção contra patógenos. Auxilia também no funcionamento do cérebro: existe um canal de comunicação direto e bidirecional entre o intestino e o cérebro, chamado de eixo intestino-cérebro, que inclui uma conexão entre os sistemas nervoso central (SNC) e sistema nervoso entérico (SNE). Micróbios que habitam o intestino regulam a função intestinal em humanos e animais (GREENWOOD-VAN et al., 2017).

Descreve-se como microbiota toda a população de microrganismos que coloniza um local definido, e abrange não apenas bactérias, mas também outros micróbios, como fungos, arqueias, vírus e protozoários (JANDHYALA et al., 2015). A microbiota intestinal é determinada por uma população rica e dinâmica de microrganismos saprofíticos, principalmente compostos por bactérias, representadas por $3,8 \times 10^{13}$ células, 2–4 milhões de genes, mais de 1000 espécies e 7000 cepas. Esta ampla comunidade microbiana se adequa ao microambiente intestinal do hospedeiro ao longo de vias filogenéticas apropriadas que levam ao estabelecimento da microbiota hospedeiro-intestinal (SENDER et al., 2016).

A microbiota intestinal de indivíduos adultos saudáveis é constituída predominantemente por seis filos bacterianos: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria e Verrucomicrobia. Além desses filos do domínio bactérias, o trato digestivo humano acolhe o metanogênio *Methanobrevibacter smithii* (*M. smithii*), que pertence ao domínio Archaea e pode estar presente em cada indivíduo, e em organismos eucarióticos, como a levedura *Candida*. Enquanto metanógenos e leveduras participam com menos de 1% de todas as células microbianas da microbiota fecal, Firmicutes e Bacteroidetes

juntos podem alcançar uma proporção de mais de 90%, ao passo que a quantidade de representantes dos outros filos varia de 2% a 10% (JANDHYALA et al., 2015; WOTING e BLAUT, 2016).

A primeira grande colonização microbiana do intestino humano acontece no nascimento, e essa composição modifica ao longo do tempo. Uma série de fatores impactam a colonização microbiana do intestino depois do nascimento, abrangendo idade gestacional, tipo de parto, índice de massa corporal materna (IMC), microbiota intestinal, práticas de alimentação infantil, uso de antibióticos, genética infantil, exposição aleatória a micróbios no ambiente e a quantidade de irmãos (GOMEZ-GALLEGO et al., 2016).

O tipo de parto (vaginal ou cesáreo) é um quesito importante na instalação dos primeiros colonizadores do intestino dos recém-nascidos. Crianças que nascem de parto vaginal normal (PVN) possuem sua microbiota intestinal primeiramente advindas de origem materna vaginal e fecal, contudo aquelas nascidas de cesariana são primeiramente colonizadas por microbiota originada da pele da mãe (CABRERA-RUBIO et al., 2012). Um estudo clínico atual sobre o efeito do tipo de parto na composição da microbiota intestinal revelou um aumento de *Bifidobacterium spp.* e uma diminuição em *Klebsiella* e *Enterococcus spp.* na microbiota intestinal de bebês nascidos por parto normal em relação a bebês nascidos por meio de cesariana (REYMAN et al., 2019).

Há um crescimento da diversidade da microbiota intestinal infantil depois dos seis (6) meses de idade, pois os alimentos complementares (com alto teor de proteínas e fibras) são adicionados na dieta, propiciando uma mudança para uma microbiota mais complexa. Em torno dos 3 anos de idade, a microbiota intestinal apresenta uma composição semelhante à de um adulto (CABRERA-RUBIO et al., 2012).

A concentração característica e o tipo de bactéria no trato gastrointestinal são impactados por modificações do micro-habitat ao longo do intestino compreendendo fatores como pH, quantidade de oxigênio e exposição à bile, secreções pancreáticas e nutrientes (KRAJMALNIK et al., 2012).

Embora o perfil geral da microbiota continue constante, a microbiota intestinal apresenta diferenças em sua distribuição ao longo do trato gastrointestinal. À medida que se adentra do esôfago distal ao reto (Figura 1), percebe-se uma mudança relevante na diversidade e número de bactérias variando de 10^1 por grama de conteúdo no esôfago e estômago a 10^{12} por grama de conteúdo no cólon e intestino distal, pois o mesmo apresenta condições favoráveis (pH 5,5- 7,0, tempo de trânsito lento e alta disponibilidade de nutrientes) sendo altamente propícios ao crescimento bacteriano (O'HARA e SHANAHAN, 2006; SENDER et al., 2016).

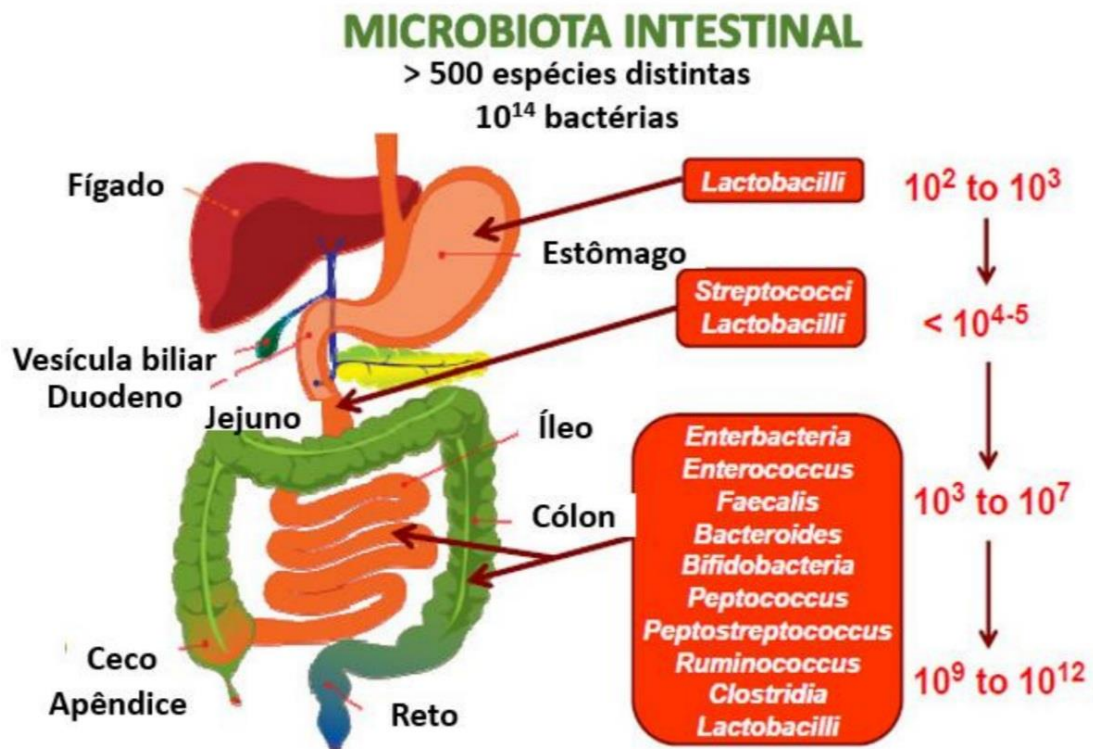


Figura 1: Perfil típico de distribuição bacteriana ao longo do trato gastrointestinal. Fonte: Sender et al. (2016).

A melhor acessibilidade ao substrato e as condições físico-químicas no trato intestinal são fatores que impactam a composição e a atividade da microbiota intestinal. A grande parte dos substratos utilizados no crescimento das bactérias intestinais advém da dieta alimentar. Além disto, o hospedeiro proporciona mucinas, células epiteliais descamadas e enzimas digestivas como substratos adicionais para as bactérias intestinais. Substratos dietéticos para bactérias intestinais abrangem carboidratos não digeridos ou parcialmente digeridos, como amido resistente e fibra alimentar (GILL et al., 2006).

A fibra alimentar possui uma enorme variedade de polímeros de carboidratos normalmente encontrados em plantas comestíveis. Celulose, hemicelulose e pectina são fibras pertencentes à estrutura da parede celular da planta, já a inulina é utilizada pelas plantas para armazenar carboidratos. As vias de degradação de carboidratos são bem desenvolvidas no microbioma intestinal humano em comparação com outros genomas microbianos. Isto ocorre, pois codificam uma vasta variedade de enzimas que catalisam a despolimerização e posterior degradação (KRAJMALNIK et al., 2012).

As atividades bacterianas subjacentes auxiliam para que o hospedeiro utilize os carboidratos indigestíveis que, de outra maneira, seriam eliminados sem utilização. As enzimas

provenientes do microbioma intestinal auxiliam na despolimerização de uma vasta variedade de carboidratos, como xilanos, α - e β -glucanos, frutanos, β -mananos e pectinas. As bactérias intestinais implicadas neste processo abrangem os membros dos Firmicutes (*espécies Ruminococcus, Butyrivibrio e Roseburia*) e Bacteroidetes (*Bacteroides spp*) (GARCÍA-MONTERO et al., 2021).

2.2 Funções da microbiota intestinal humana

A microbiota intestinal auxilia no metabolismo, estado nutricional, desenvolvimento neurocomportamental, secreta enzimas para digerir substratos inacessíveis ao hospedeiro, síntese de vitaminas, metabolismo de drogas, desenvolvimento neurocomportamental, secreta enzimas para digerir substratos inacessíveis ao hospedeiro, síntese de vitaminas, metabolismo de drogas e imunidade do hospedeiro levando a ativação de mecanismos de defesa contra patógenos, constituída de bactérias sacarolíticas, que prevalecem em condições saudáveis, atuam fermentando e degradando estruturas alimentares não digeríveis (GARCÍA-MONTERO et al., 2021). Os principais produtos resultantes do metabolismo de carboidratos são os gases (hidrogênio e dióxido de carbono), etanol e SCFAs. Estes últimos, constituídos pelos ácidos butírico, propiônico e acético, apresentam efeitos positivos no equilíbrio do metabolismo glicêmico e lipídico, aumentando a sensibilidade à insulina no fígado e nos músculos por meio do GPR43 um receptor de SCFAs na gordura branca (ZUO et al., 2018; LAY et al., 2019).

Diversos estudos atestaram as funções dos SCFAs como a diminuição do ganho de peso sendo relacionados a múltiplos mecanismos, inclusive a modulação do fluxo metabólico e sinalização de saciedade. Os SCFAs são ligantes cognatos para um grupo de receptores acoplados à proteína G, receptor de ácido graxo livre FFAR 2 e FFAR3 também conhecido como GPR43 e GPR41, respectivamente. Estes promovem a secreção de peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) das células intestinais e favorecem a gliconeogênese intestinal, vias que agem duas vezes para melhorar a sensibilidade à insulina e diminuir o apetite (VADDER et al., 2014; LAY et al., 2019). Em estudos com camundongos e humanos, os SCFAs mostraram aumentar a produção intestinal do peptídeo anorexigênico YY (PYY) e do hormônio ligado aos adipócitos leptina, responsáveis por aumentar os níveis de saciedade e proporcionar a redução da ingestão de energia (CHAMBERS et al., 2015).

As bactérias intestinais atuam no metabolismo dos xenobióticos e na transformação dos ácidos biliares. Os xenobióticos são inicialmente oxidados e depois sulfatados ou

glucuronidados, tornando-se solúveis em água e, possibilitando a excreção urinária. Após síntese no fígado, os ácidos biliares (ácido cólico e ácido quenodeoxicólico em humanos) são conjugados em glicina ou taurina e, posteriormente, secretados no trato intestinal, onde passam por desconjugação e desidroxilação parcial pelas bactérias intestinais (RIDLON et al., 2014).

Outra função da microbiota intestinal é a transformação de metabólitos vegetais secundários, como glucosinolatos de vegetais de família Brassica ou polifenóis de frutas, hortaliças, cereais, chocolate, chá, café ou vinho. Alguns produtos da conversão formados por bactérias intestinais parecem possuir propriedades de promoção da saúde mostrando ser um tema relevante na pesquisa nutricional (BRAUNE e BLAUT, 2016).

Embora a microbiota apresente certa resiliência a condições ambientais desfavoráveis que possam acontecer, por exemplo, resultante das alterações na dieta ou tratamento com antibióticos de curto prazo, a junção de inúmeras condições, como consumo de alimentos ricos em gordura, drogas quimioterápicas e idade, impactam a saúde da microbiota. Desses aspectos, os hábitos alimentares parecem ser o mais significativo, pois os tipos de carboidratos da dieta fornecem a base para a composição em termos de diversidade e riqueza, modulação e atividade da microbiota, e a genética pode modificar a composição e função da microbiota, impossibilitando uma relação adequada com o hospedeiro (DINAN e CRYAN, 2017; ZUO et al., 2018).

Em geral, uma dieta rica em frutas, vegetais e fibras está ligado a uma maior riqueza e diversidade da microbiota intestinal. Em comparação com a dieta ocidental, o consumo de uma dieta paleolítica mostrou uma diversidade significativamente maior da microbiota intestinal. Uma dieta ocidental está associada a uma proporção diminuída de Bacteroides em comparação aos Firmicutes (FERREIRA et al., 2014; OBREGON-TITO et al., 2015).

2.3 Modulação da microbiota intestinal

A composição da microbiota intestinal pode ser modulada por intermédio de inúmeras ferramentas, por exemplo, bactérias vivas (probióticos), nutrientes específicos que atuam como fertilizantes para bactérias (prebióticos), ou transferência da microbiota fecal (KRAJMALNIK et al., 2012; GREEN et al., 2020).

Além de melhorar o estado nutricional ao diminuir os impactos da diarreia, há evidências crescentes de que probióticos e prebióticos podem favorecer a absorção de micronutrientes (como cálcio e ferro) dos alimentos consumidos. Os micronutrientes são

compostos orgânicos ou inorgânicos contidos nos alimentos em pequenas quantidades, como vitaminas ou minerais, não possuem a função de fornecer energia, mas são imprescindíveis no funcionamento do organismo (RAMIREZ-FARIAS et al., 2009; SHERIDAN et al., 2014).

Probióticos são formulações de organismos vivos que produzem efeitos benéficos ao receptor quando formulados em quantidades adequadas; compreendem bactérias e leveduras. Os mecanismos pelos quais os probióticos melhoram a saúde do hospedeiro constituem-se em diminuição da permeabilidade intestinal pela regulação positiva das proteínas de junção apertada, crescimento da secreção de mucina pelas células caliciformes, reforço na secreção de defensas que previnem a colonização do patógeno, produção de SCFAs, estimulação da secreção de IgA, redução do pH luminal contribuindo para o aumento e encaminhamento das células imunes para viabilizar a tolerância aos comensais, ao passo que mantém a proteção contra patógenos (BAGCHI et al., 2014; GREEN et al., 2020).

A grande parte dos probióticos abrangem espécies de *Lactobacillus*, espécies de *Bifidobacterium*, *Escherichia coli* (*E. coli*), espécies de *Streptococcus*, *Lactococcus lactis* e algumas espécies de *Enterococcus*. A levedura mais utilizada é a *Saccharomyces boulardii*. Os probióticos devem suportar a acidez do ácido gástrico e à bile, a fim de produzir seu efeito no intestino delgado e grosso. Os probióticos colonizam o intestino provisoriamente e atuam alterando o ambiente colônico em concordância com a funcionalidade fecal das cepas ingeridas (SHERIDAN et al., 2014; PLAZA-DIAZ et al., 2019).

As bactérias probióticas auxiliam na produção de vitaminas do grupo B. Essa produção endógena é importante, pois apesar das vitaminas do grupo B estarem presentes em inúmeros alimentos, são amplamente retiradas ou destruídas pela forma de processamento e cozimento dos alimentos, ocasionando uma absorção diminuída da dieta. O sequenciamento do genoma revelou que as cepas de *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475 e ATCC 55730 possuem vias biossintéticas para a produção de vitamina B12 e folato, e a cepa de *L. reuteri* ATCC 55730 também apresenta vias para a síntese de tiamina (SAULNIER et al., 2011; SILVA et al., 2015).

2.4 Prebióticos

Os prebióticos são uma das alternativas para modular positivamente as funções intestinais. Os prebióticos demonstram possuir estabilidade de longo prazo durante a vida de prateleira de alimentos, bebidas e rações, aumentam a resistência ao processamento e

propriedades físicas e químicas, exibem um efeito positivo no sabor e na consistência dos produtos. Além disso, a resistência a ácidos, proteases e sais biliares contidos no trato gastrointestinal pode ser caracterizada como o principal benefício dos prebióticos (SIVIERI et al., 2014; MARKOWIAK e ŚLIŻEWSKA, 2017).

Os prebióticos são substâncias naturais ou sintéticas não digeríveis, compostas de carboidratos que melhoram a proliferação de micróbios benéficos, promovendo a saúde (VIEIRA et al., 2013; SHERIDAN et al., 2014). As definições de prebióticos divergem de acordo as diferentes áreas científicas e políticas em todo o mundo. A grande parte dos prebióticos podem ser classificados como fibra alimentar, contudo nem todas as fibras são apontadas como prebióticos. A definição mais comumente completa e usada na contemporaneidade apresenta um prebiótico como “um substrato que é utilizado seletivamente por micro-organismos hospedeiros, proporcionando benefícios à saúde” (GENTON et al., 2015; CARLSON et al., 2017; VALLIANOU et al., 2019).

Além disso, essas substâncias precisam possuir aspectos específicos, que necessitam ser testados por experimentos *in vitro* e *in vivo* em diferentes alvos (animais ou humanos): (1) resistência à acidez gástrica, hidrólise por enzimas digestivas e gastrointestinais (GD); (2) fermentação pela microbiota intestinal, que pode ser analisada *in vitro* por meio do acréscimo dos respectivos carboidratos a suspensões de conteúdo de cólon, ou culturas de bactérias puras ou mistas em um lote anaeróbio ou sistema de fermentação de cultura contínua; e (3) promoção do crescimento de bactérias intestinais positivamente associada à saúde e ao bem-estar (GIBSON et al., 2017).

Ademais, conforme determinou a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO /WHO) e, juntamente com o Ministério da Saúde italiano, os prebióticos também devem atender aos seguintes quesitos: (1) serem seguros para homens e mulheres, em conformidade com sua utilização comum, a fim de que não sejam caracterizados como novos alimentos, nos termos do regulamento UE 2015/2283 (EU, 2015); e (2) necessitam ser consumidos em uma quantidade diária considerável para exercer sua ação “prebiótica”, conforme encontrado nas evidências científicas (PINEIRO et al., 2008). Contudo, entre os prebióticos, apenas oligossacarídeos bifidogênicos não digeríveis (particularmente inulina, seu produto de hidrólise oligofrutose e trans-galacto-oligossacarídeos (GOS), cumprem todos os requisitos para classificação prebiótica (MARKOWIAK e ŚLIŻEWSKA, 2017).

Algumas das principais classes de fibras prebióticas, são geralmente distinguidas com base na fonte, grau de polimerização e porções constituintes. Os prebióticos são compostos por inulina, polissacarídeos sem amido em alguns grãos de cereais e algas marinhas ou algas,

dissacarídeos (lactulose) e polissacarídeos incluindo frutooligossacarídeos (FOS) e galactooligossacarídeos (VIEIRA et al., 2013; CLERCQ et al., 2016). Outras substâncias como xilooligossacarídeos, oligossacarídeos de soja, isomaltoligossacarídeos, ácido lactobiônico, amido resistente e polifenóis demonstram possuir funções prebióticas (GARCÍA-MONTERO et al., 2021).

Algumas das fontes de prebióticos abrangem: leite materno, soja, fontes de inulina (como alcachofra de Jerusalém, raízes de chicória etc.), aveia crua, trigo não refinado, cevada não refinada, yacon, carboidratos não digeríveis e, em especial, oligossacarídeos não digeríveis (VANDEPUTTE et al., 2017).

Os prebióticos também são produzidos industrialmente como suplementos pela hidrólise de polissacarídeos ou reações enzimáticas de açúcares de baixo peso molecular. Devido à sua baixa proporção nos alimentos, são comumente sintetizados em grande quantidade nas indústrias. Alguns dos prebióticos são sintetizados utilizando lactose, sacarose e amido como matéria-prima (GIBSON et al., 2017; BROSSEAU et al., 2019).

Os efeitos positivos dos prebióticos não são apenas no intestino, mas demonstram impactar todo o organismo de maneira geral. Recentes estudos mostram que os prebióticos facilitam inúmeros processos biológicos, desde a prevenção de infecções, até a melhora do humor e da memória. Os resultados da degradação dos prebióticos são principalmente os SCFAs. Essas moléculas diminutas conseguem se espalhar entre os enterócitos intestinais e adentrar na circulação sanguínea promovendo seletivamente o crescimento e/ou atividade de alguns gêneros de microrganismos no cólon, considerados “benéficos” como *Bifidobacterium* e *Bacteroides* (KACZMARCZYK et al., 2013; VIEIRA et al., 2013). A administração de prebióticos em idosos fragilizados elevou a prevalência de bifidobactérias, além de diminuir a quantidade de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, e otimizou o estado imunológico, mesmo depois de terminar o tratamento (SCHIFFRIN et al., 2007).

Os SCFAs proporcionam nutrientes fundamentais para o epitélio entérico. A estrutura dos prebióticos e a composição bacteriana do intestino definem os produtos da fermentação. Estes compostos induzem T_{regs} anti-inflamatórios e diminuem o pH luminal. A ativação do T_{regs} predispõe um ambiente anti-inflamatório, e o pH ácido protege contra a ação de patógenos específicos evitando que se instalem. Os prebióticos cooperam para uma efetiva integridade da barreira intestinal, auxiliam na absorção de água, motilidade gastrointestinal, protegem o epitélio intestinal intensificando a camada de muco, alongando as microvilosidades, reforçando o número de células epiteliais e impedindo a aderência de cepas patogênicas junto das células

epiteliais. Desta forma, os prebióticos produzem inúmeros resultados na homeostase energética (WONG et al., 2006; BROSSEAU et al., 2019).

A ingestão de prebióticos impacta a morfologia do tecido, melhorando a densidade celular e a solubilidade mineral, expandindo a proliferação de colonócitos e a produção de energia metabólica, a profundidade da cripta intestinal e o fluxo sanguíneo no intestino grosso. Esse mecanismo aumenta a área da superfície intestinal e acarreta uma melhor absorção de minerais. A capacidade dos prebióticos de melhorar a absorção de micronutrientes foi investigada em estudos humanos e animais e tiveram resultados positivos de oligossacarídeos não digeríveis no metabolismo mineral, composição óssea e arquitetura óssea, entretanto para perpetuação dos resultados é necessária uma ingestão contínua de prebióticos (RASCHKA e DANIEL, 2005; CAUDWELL et al., 2013; WHISNER et al., 2013).

Estudos que fizeram a análise da toxicidade de prebióticos em animais e humanos mostraram nenhum ou apenas efeitos adversos leves, incluindo inchaço infrequente, flatulência e fezes moles após o consumo de grandes quantidades. Ademais, existe a hipótese de que o crescimento de bactérias bifidobactérias advindas dos prebióticos consigam diminuir os efeitos adversos, uma vez que, esse gênero não produz gases como resultado do seu metabolismo (AMY et al., 2012). Na prática, a proporção de prebióticos consumida pela população (normalmente 2–4 g) estão muito inferiores em relação às quantidades em que pode ocorrer um desconforto intestinal.

2.4.1 Inulina

Os prebióticos mais amplamente encontrados naturalmente em nossos alimentos são o FOS e a inulina. Estes são encontrados em alimentos de origem vegetal, hortaliças (alho-poró, cebola, alho, alcachofra, chicória e aspargos), frutas (banana) e cereais (centeio, milho). Com uma dieta equilibrada, podem ser ingeridos 3–11 g de prebióticos naturais por dia. Entretanto, apenas 1–4 g é geralmente consumido diariamente pela população (GIBSON et al., 2017; BROSSEAU et al., 2019).

A inulina apresenta sabor neutro, raros efeitos colaterais e favorece o crescimento de bactérias sacarolíticas. As propriedades sensoriais da inulina auxiliam na obtenção de uma qualidade geral dos alimentos por intermédio da alteração da textura, age melhorando o sabor,

odor e aceitabilidade geral durante todo o tempo de armazenamento. Também foi comprovada que aumenta a vida de prateleira dos alimentos (ESGALHADO et al., 2017).

Alguns aspectos influenciam sua ação como a dosagem prebiótica, além dos diferentes graus de polimerização (DP), pois afetam o grau de comunidade microbiana e mudanças metabólicas que demonstram ser baseadas em diferenças na fermentabilidade em segmentos específicos do cólon (KRAJMALNIK et al., 2012). A inulina (Figura 2) consiste em cadeias repetitivas da fração frutossil, ligadas por ligações β -2,1 em porções de terminação glucosil. Cadeias mais longas são inulina (grau de polimerização, 2-60), e cadeias mais curtas são oligofrutose/frutooligossacarídeos (FOS) (grau de polimerização, 2-8) (AMY et al., 2012).

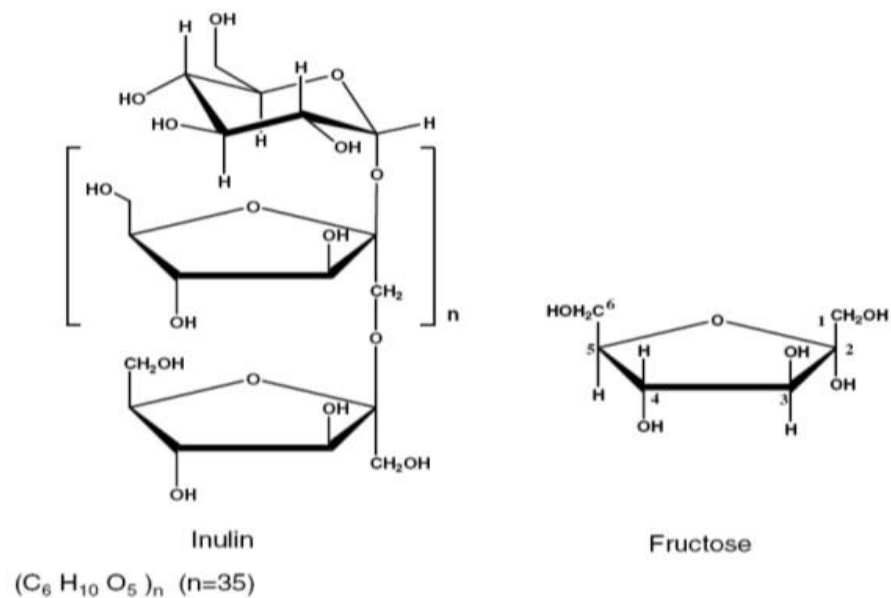


Figura 2: Estrutura química da inulina. Fonte: Vandeputte et al. (2017)

Os frutanos do tipo inulina podem ser extraídos de plantas, produzidos a partir da hidrólise parcial da inulina (oligofrutose) ou sintetizados enzimaticamente a partir da sacarose (FOS). Inúmeros estudos mostraram que os frutanos aumentam o crescimento de bifidobactérias, bacteroides e lactobacilos (ROBERFROID et al., 2010). Foi evidenciado que a ingestão de inulina expande especificamente e significativamente a abundância de Bifidobactérias e Lactobacilos (VANDEPUTTE et al., 2017).

Recentemente, uma grande análise da composição da microbiota intestinal depois de alimentar ratos obesos com inulina de cadeia curta mostrou que o tratamento prebiótico

decreceu a quantidade de Firmicutes e aumentou Bacteroidetes, e modificou mais de 100 táxons de bactérias. Além disto, proporcionou uma melhora no metabolismo da glicose e dos lipídios e considerável diminuição dos lipopolissacarídeos (LPS) plasmáticos (EVERARD et al., 2011).

A inulina possui efeitos terapêuticos, preventivos e fisioprotetores. A dosagem terapêutica indicada em alguns estudos proferidos teve variação de 3 a 10 g/dia. A fermentação dos prebióticos no intestino proporciona ácidos graxos de cadeia curta aos colonócitos, propiciando um intestino saudável, equilibrando a função intestinal, viabilizando a integridade do cólon, a resistência à colonização e, assim, auxiliando na saúde do indivíduo. Age como um agente de volume, diminui diarreia, propicia uma microflora colônica saudável, promove a redução na massa gorda, melhora a absorção de cálcio e magnésio no trato gastrointestinal. Parece existir um efeito de imunoestimulação pela inulina por intermédio do direcionamento de tecidos linfóides ligados ao intestino, protegendo o organismo de uma invasão microbiana procedente do intestino (YOUSAF et al., 2010; LIU et al., 2017).

Estrutura química	GFn (2≤n≤60)	GFn (10≤n≤60)
Grau médio de polimerização	12	25
Matéria-seca (%)	95	95
Conteúdo de inulina (% em m.s.)	92	99,5
Conteúdo de açúcar (% em m.s.)	8	0,5
pH (10% peso/peso)	5-7	5-7
Cinzas sulfatadas (% em m.s.)	< 0,2	< 0,2
Aparência	Pó branco	Pó branco
Sabor	Neutro	Neutro
Doçura (v. sacarose = 100 %)	10 %	Nenhuma
Solubilidade em água a 25°C (g/l)	120	25
Viscosidade em água (5 %) a 10°C (mPa.s)	1.6	2.4
Funcionalidade em alimentos	Substituto de gordura	Substituto de gordura
Sinergismo	Sinergia com gelificantes	Sinergia com gelificantes

G = unidade glicosil; F = unidade frutossil; m.s = matéria seca.

Figura 3: Características físico-químicas da inulina. Fonte: Roberfroid et al. (2010).

Em um estudo com 244 participantes saudáveis que iam viajar para ambientes de alto ou médio risco para diarreia do viajante, 10 g/dia de inulina foram administradas 2 semanas

antes da viagem e 2 semanas durante a viagem, diminuiu a prevalência e repercutiu em episódios menos graves de diarreia (CUMMINGS et al., 2001).

A inulina e outros frutanos do tipo inulina são resistentes à digestão no intestino delgado e passam por fermentação no intestino grosso, elevando a produção de SCFA. Inúmeros estudos em animais demonstraram que a acidificação do ambiente intestinal ocasionada pela fermentação bacteriana melhorou a absorção de cálcio e magnésio e a mineralização óssea (COUDRAY et al., 2005). Os frutanos do tipo inulina podem melhorar a absorção de cálcio. Um estudo de 12 meses com 100 adolescentes consumindo 8 g/dia de frutanos de inulina de cadeia curta e longa resultou em uma melhora significativa na absorção de cálcio promovendo uma maior densidade mineral óssea (ABRAMS et al., 2005).

A inulina é frequentemente a mais estudada na área de regulação do peso (AMY et al., 2012), sendo associada a efeitos positivos no metabolismo lipídico do hospedeiro impactando na melhoria da homeostase lipídica, redução dos níveis circulantes de colesterol e triglicérides, diminui a lipogênese hepática e possui efeitos na saciedade e no peso corporal (REIS et al., 2014). Promoveu a diminuição da adiposidade e aumento da sensibilidade à glicose (SALAZAR et al., 2015).

Além disso, recentemente foi mostrado que a administração de inulina exerce efeito contra a esteatose hepática por meio de múltiplos mecanismos (CHAMBERS et al., 2018). É relevante ressaltar que em meta-análise descobriu-se que o efeito mais notável do consumo de frutanos do tipo inulina foi a redução dos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL), um desfecho bem descrito para diminuir o risco de eventos cardiovasculares adversos (HOFFMAN et al., 2020).

Em humanos, a suplementação com prebióticos do tipo frutanos (16 g/d) aumentou o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e o peptídeo YY (PYY) plasmático. O GLP-1 é um importante hormônio mobilizador de insulina dependente de glicose. Além de estimular a proliferação de células β e a expressão do gene pró-insulina, inibe a expressão de glucagon. Promove também uma redução dos níveis de fome e melhora da resposta glicêmica (CANI et al., 2009). Da mesma maneira, um regime de suplementação na dieta de indivíduos obesos com doses de 21 g/d de frutanos do tipo inulina ocasionou um aumento do PYY no plasma e a produção suprimida de marcadores de grelina, que coincidiram com a redução da ingestão de alimentos, massa gorda e ganho de peso corporal (PARNELL e REIMER, 2009).

A suplementação dietética com frutanos do tipo inulina foi relacionada à redução do risco de doença cardiovascular em ensaios clínicos (LIU et al., 2017). A suplementação

dietética de inulina ou oligofrutose auxilia na proteção do estresse oxidativo, prevenindo reações inflamatórias ligadas ao estresse oxidativo (WELTERS et al., 2002).

Evidencia-se a característica mais marcante dos frutanos - ação antioxidante. Considera-se que os frutanos do tipo inulina possam agir indiretamente como necrófagos de espécies reativas de oxigênio (ROS), bloqueando o crescimento e o desenvolvimento de patógenos que podem ser estimulados pelos ROS oriundos de respostas anti-inflamatórias gastrointestinais, devido à ação dos AGCCs, originados de sua fermentação no cólon. Ademais, os AGCCs atuam promovendo a atividade das enzimas antioxidantes glutaciona S-transferases (GSTs) (CAROTTI et al., 2015).

Foi comprovado o efeito protetor que a inulina exerce na lesão causada por lipopolissacarídeo (LPS) do músculo liso do cólon em um modelo experimental *ex vivo*, que parece manifestar relacionado a presença de estresse oxidativo (STOYANOVA et al., 2011). O efeito positivo da inulina no envolvimento das células musculares estimuladas por LPS resulta da habilidade desse frutano em combater o estresse oxidativo causado por LPS na mucosa do cólon humano. Corroborando essa tese, um estudo comprovou que o teor de oxidação de proteínas estimuladas pelo contato com a LPS foi notadamente diminuído pelo tratamento com inulina (VAN DEN ENDE e VALLURU, 2009).

Ademais conseguiu-se observar que a capacidade antioxidante foi consideravelmente aumentada quando a mucosa colônica foi submetida ao contato com o LPS e a inulina, em comparação a exposição apenas ao LPS. Este achado consolida o entendimento de que a inulina interfere na liberação de radicais livres (H_2O_2) e parece preservar a mucosa do cólon humano de lesões ocasionadas por LPS (PASQUALETTI et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da inulina no metabolismo de camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- Mensurar os efeitos das dietas na evolução do peso corporal;
- Avaliar os efeitos das dietas sobre os níveis bioquímicos séricos de lipídeos e transaminases hepáticas;
- Avaliar a regulação glicêmica sobre os níveis bioquímicos nos testes de sensibilidade à insulina e tolerância a glicose;
- Avaliar o padrão de expressão dos marcadores inflamatórios no tecido adiposo epididimal;
- Avaliar o tamanho e área dos adipócitos no tecido adiposo epididimal.

4 PRODUTO

Inulin prebiotic dietary supplementation reduces Toll-like receptor 4 transmembrane protein gene (TLR4) and interleukin 6 (IL6) expression in adipose tissue improving metabolic parameters.

4.1 Produto (Artigo submetido a publicação)

Inulin prebiotic dietary supplementation reduces Toll-like receptor 4 transmembrane protein gene (TLR4) and interleukin 6 (IL6) expression in adipose tissue improving metabolic parameters.

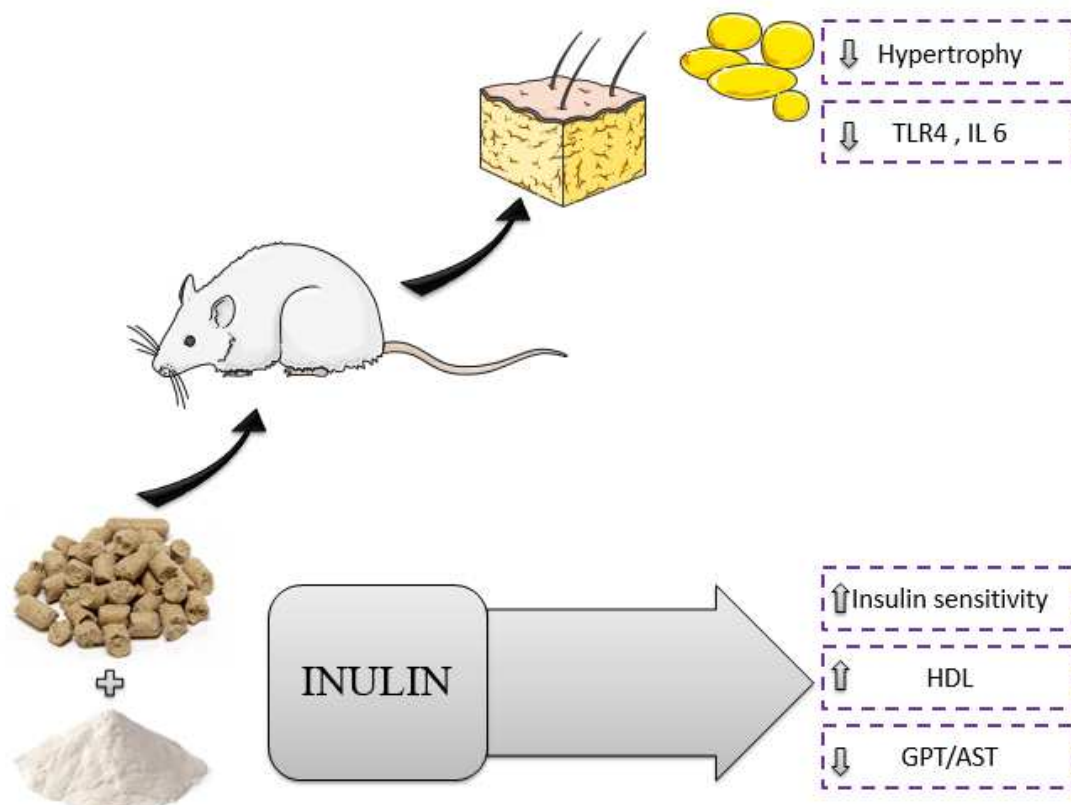
Carla Dayana Durães Abreu ¹, Bruna Viana Caldas ¹, Lucyana Conceição Farias ², André Luiz Sena Guimarães ², Alfredo Batista de Paula ², Maria Beatriz Abreu Glória ¹, Sérgio Henrique Sousa Santos ^{1,2*}

¹ Institute of Agricultural Sciences, Mestrado em Alimentos e Saúde (CMAS) and Food Engineering College, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

² Laboratory of Health Science, Postgraduate Program in Health Sciences, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

* Correspondence to: Sérgio Henrique Sousa Santos. Institute of Agricultural Sciences Food Engineering College, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) Avenida Universitária, 1000, Universitário, Montes Claros, MG 39404-547 (Brazil). E- mail sergiosousas@hotmail.com

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

Mundial lifestyle society modifications have increased ultra-processed foods consumption which increases fat, sugar and salt intake reducing dietary fiber since legumes, grains and vegetables have been reduced. The modern food intake profile increased the incidence of obesity and inflammatory chronic diseases. Probiotic dietary supplementation has been a viable health option. In this context the aim of the present study was to evaluate inulin prebiotic supplementation effects on the mice metabolism, focusing on the inflammation related genes expression in adipose tissue. Male Swiss mice were fed for 4 weeks with 2 diets: Standard (ST) and Standard + Inulin (ST+I). The serum biochemistry data, histology and inflammatory related genes mRNA expression in adipose tissue were analyzed. The main results showed that dietary supplementation decreased the Toll-like receptor 4 transmembrane protein gene (TLR4) expression and also the interleukin 6 (IL6) in the epididymal adipose tissue, decreasing adipocytes hypertrophy. The HDL was increased and TGP enzymes (related to liver injury risk) was decreased also improving insulin sensitivity. In conclusion, the present study revealed that inulin supplementation may improve the onset chronic inflammation related markers in adipose tissue indicating inulin as a natural anti-inflammatory alternative.

Keywords: Prebiotic, Nutrition, Adipose tissue, inflammation, Metabolic syndrome

INTRODUCTION

Considering the theory of epidemiological transition several indications showed how non-communicable diseases were surpassing communicable (infectious) diseases as the main relative burden of populational morbidity and mortality ^[1].

The nutritional transition, directly linked to the epidemiological transition, which occurred in the last three decades, represents a process of changes in eating patterns and physical activity, determined by socio-economic, demographic and socio-cultural phenomena. The phases change from an initial stage defined by a diet based on food collection, an active lifestyle and the predominance of infection based-diseases, to an advanced stage with a "Western" diet (characterized by a high content of saturated fats, sugars and industrialized foods), growth of sedentary lifestyle and prevalence of chronic-degenerative diseases and obesity ^[2, 3].

Current increases in the chronic diseases prevalence rates associated with rapid increases in the populations aging have caused a great demand for foods with health-improving functionalities, given that there was an increase in the development and characterization of food products with complementary effects in addition to the supply of energy, minerals or vitamins, the so-called functional foods. These foods can positively modulate the activities of the organism improving physiological responses or decreasing the risk of certain diseases ^[4]. It is stated that functional foods have beneficial results on respiratory diseases, such as asthma, many viral and parasitic diseases, infectious diseases, inflammatory diseases and psychotic disorders ^[5].

Functional foods consist of natural or processed foods covering known or unknown biologically active compounds that are effective and non-toxic. These foods are not drugs or any dietary supplements; however, they may be part of the common dietary/nutritional population pattern. Carotenoids, n-3 fatty acids, isoflavones, flavonoids, isocyanates, phenolic acids, phytoestrogens, polyphenols, soluble dietary fibers, sterols, polyols, probiotics, prebiotics and symbiotics are defined as functional food components ^[6]. Probiotics are "living strains of rigorously selected microorganisms that, when administered in adequate amounts, provide benefits to host

health". Prebiotics comprise non-digestible natural or synthetic substances, composed of carbohydrates that improve the proliferation of beneficial microbes in the intestine, benefiting health ^[7].

Prebiotics have some advantages compared to probiotics such as greater long-term stability during shelf life of food, beverages and rations; present a resistance to acids, proteases and bile salts present in the gastrointestinal tract; resistance to processing and physical/chemical properties that exhibit a positive effect on the products taste and consistency ^[8]. Prebiotics cooperate for an effective integrity of the intestinal barrier, assist in water absorption, gastrointestinal motility, protect intestinal epithelium by intensifying the mucus layer, lengthening microvilli, strengthening the number of epithelial cells and preventing the adhesion of pathogenic strains to epithelial cells, in addition produces effects on energy homeostasis ^[9, 10]. Prebiotics are composed of starchless polysaccharides present in some cereal and algae grains, disaccharides (lactulose) and polysaccharides including fructooligosaccharides (FOS), galactooligosaccharides and inulin ^[11]. The prebiotics that most widely lie naturally in our foods are FOS and inulin. They are found in foods of vegetable origin, such as in some vegetables (leeks, onions, garlic, artichoke, chicory and asparagus), fruits (banana) and cereals (rye, corn). With a balanced diet, 3–11 g of natural prebiotics per day can be ingested ^[10, 12]. Prebiotics promote effects, from the prevention of infections to the improvement of mood and memory. The results of prebiotic degradation are mainly short-chain fatty acids (SCFAs). These small molecules can spread among intestinal enterocytes and enter the bloodstream by selectively stimulating the growth of some genera of microorganisms in the colon, considered "beneficial" such as *Bifidobacterium*, *Bacteroides* and *Lactobacillus* ^[13].

Inulin is commonly the most studied prebiotic in weight regulation and improvement of metabolic parameters, commonly linked to positive effects on the lipid metabolism of the host providing improvements in lipid homeostasis, decreasing serum cholesterol and triglyceride rates, reducing hepatic lipogenesis and encompasses effects on satiety and body weight ^[14]. Inulin promotes the reduction of adiposity and improvement of glucose sensitivity ^[15]. Moreover, it has recently been shown that inulin administration performs results against hepatic steatosis through numerous mechanisms ^[16]. It is important to highlight that one study showed that the most interesting effect of inulin fruit consumption was the decrease in low density lipoprotein (LDL) rates, a relevant result to decrease the risk of adverse cardiovascular events ^[17]. Dietary supplement on with inulin was linked to reduced risk of cardiovascular disease in clinical trials ^[18].

To date, it is under discussion whether inulin influences the results directly through its intervention in intestinal bacteria and consequently interleukin-22 production ^[19] or indirectly through the production of SCFAs and action on their corresponding receptors, GPR41 and / or GPR43 ^[20]. Numerous studies have highlighted the role of SCFAs in the regulation of appetite ^[21], in the development of obesity ^[22] and in the fatty liver ^[23] including insulin sensitivity and energy expenditure ^[24]. The preset study hypothesis is that inulin dietary supplementation can modulate adipose tissue inflammatory responses by altering related gene expression. For this we have supplemented the mice diet with 10% inulin (amount known to promote metabolic and cognitive benefits) ^[25, 26].

MATERIAL AND METHODS

Animals

The *in vivo* study was performed with 18 Swiss male mice aged 4–6 weeks old), and body mass of approximately 35g acquired from the bioterium of the Center for Biological and Health Sciences of Unimontes and kept in the same locality.

The animals were housed in groups of 9 individuals in autoclavable polypropylene boxes of dimensions of 414 x 344 x 168 mm, with galvanized steel lid and containing stainless steel separators (Zootech, model ZT 375). All boxes were lined with shaving, this being changed 2 times a week. With adequate temperature [$22 \pm 2^\circ\text{C}$], relative air humidity of $60 \pm 5\%$, controlled luminosity (12h of light/dark cycles) and low sound level < 40 dB and free access to filtered water. All procedures were in accordance with the Ethics Committee on Animal Experimentation and Welfare from the Unimontes, under the protocol number 217/2020.

Experimental diets

The experimental design was composed of two groups and inulin with groups of $N=9$ animals per group, in a total of 18 mice, with the respective diets ST (Standard) and ST+I (Standard + Inulin).

We used the balanced diet (Purina-Labina®) containing 50.3% carbohydrates, 41.9% protein and 7.8% fat with a total of 2.18 kcal per 1g of the diet as standard diet.

To study the impact of a prebiotic treatment, the animals were supplemented with 10% of the prebiotic inulin type fruit added to the animal feed [25,26].

Food intake, water intake and body weight

During this period, the animals received the specific diets for each group. Body weight, food intake and water consumption of the animals were measured daily throughout the treatment, at the same time. The diet weight of each cage was measured on a semi-analytical scale, subtracting from the value obtained the initial weight of the diet offered. The diet mass ingested was corrected by the body weight of the animals in the respective cage.

Fasting glycemia, glucose tolerance test and insulin tolerance test

To evaluate the glycemic profile, on the 25th day of treatment, before sacrifice, the capillary glucose test of the animals was performed. The test was performed in the morning, with the animals fasting for 12 hours, through a small cut on the tip of the tail of the animal where a drop of blood was collected to check the fasting glucose, using a portable glucometer. Glucose levels were measured at 0, 15, 30, 60 and 120 min after glucose (2 g/kg) administration. Insulin profile was evaluated on the 27th day of treatment, the insulin sensitivity test was performed after insulin administration (0.75 U/Kg) by intraperitoneal injection in 0, 15, 30 and 60 min after administration. Glucose levels were measured using reactive tapes of Alere TM G2 glucometer (São Paulo, SP, Brazil), from the blood obtained from the capillaries of the tail of mice [27].

Tissues collection

After the 4-week treatment, the animals were fasted overnight and killed by decapitation. Blood samples were collected for biochemical analysis. The epididymal, subcutaneous, mesenteric and retroperitoneal adipose tissues and liver were weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at 80°C super freezer for later analysis.

Biochemical Dosages

Serum was obtained after centrifugation (3200 rpm for 10 min at 4°C). The following parameters were assessed: total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL), triglycerides (TG), alanine transaminases (ALT/GPT), and aspartate transferase (AST/GOT) using enzymatic kits (Wiener Laboratories, Rosario, Argentina). The measurements were performed on a Wiener BT-3000 plus Chemistry Analyser (Wiener Laboratories, Rosario, Argentina).

Histopathological evaluation of tissues

The samples of epididymal adipose tissue were dehydrated in increasing solution of Alcohol (70° to 100° GL), clarified with xylol and included in paraffin blocks. From these blocks, tissue sections of 3 µm were obtained with the aid of a microtome and stained with hematoxylin and eosin (H&E) to evaluate the architecture of adipose tissue. Hematoxylin is a base that preferably decorates acidic components of cells in a dark bluish tone. As the most abundant acid components are DNA and RNA, both the nucleus and certain parts of the cytoplasm become bluish. Eosin, on the contrary, is an acid that decorates the basic structures of the rose cell, which in turn are quite abundant in the cytoplasm. The technique consists of deparaffination (xylol), moisturization (alcohols 100° to 70° GL) and bathe of the cuts in hematoxylin solution for 45 seconds. After washing 2 minutes under running water, the tissue cuts were dipped in eosin for 1:30 minutes and subsequently dehydrated (alcohols 70° to 100° GL), diaphanized (xylol) and the slides assembled. Qualitative analyses were performed by visualization of mucosal integrity, presence of inflammatory infiltrate, and analysis of adipocyte size. All images were captured under an Evolution LC optical microscope with color light camera (Media Cybernetics ®, USA). Adipocyte area counts were obtained using image-j software (NIH, USA).

Quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from the Epididymal adipose tissue with Trizol reagent (Invitrogen Corp.VR, San Diego, California, USA). The RNA was treated with DNase and using MMLV (Invitrogen Corp.VR) was reverse transcribed using random hexamer primers. The endogenous glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as housekeeping control, and TLR4, IL6, Pgc1α, Ucp1, Cidea as the target genes. The cDNA samples were amplified using specific primers and SYBR Green reagent (Applied BiosystemsVR, USA) in a PlusOne platform (Applied BiosystemsVR). Relative gene expression was expressed as relative mRNA level compared with a control, was calculated after normalisation to Gapdh following the 2DDCT method. CT value was presented as mean of duplicate measurements ^[28]. The endogenous GAPDH primer sequence was Forward primer 5'AAGAAGGTGGTGAAGCAGGCATC3' and Reverse primer: 5'CGAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG3', TLR4 Forward primer 5'-GGGCCTAAACCCAGTCTGTTTG-3' and Reverse primer: 5'-CTTCTGCCCGGTAAGGTCCA-3', IL 6 Forward primer 5'-CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA-3' and Reverse primer: CCAGTTTGGTAGCATCCATCATTTC-3' , Pgc1α Forward primer 5'-CTACAGACACCGCACACACC-3' and Reverse primer: 5'-GCGCTCTTCAATTGCTTTCT-3', Ucp1 Forward primer 5'-AGTACCCAAGCGTACCAAGC-3' and Reverse

primer: 5'-AGAAGCCACAAACCCTTTGA-3', Cidea Forward primer 5'-TGCTCTTCTGTATCGCCCAGT-3' and Reverse primer: 5'-GCCGTGTTAAGGAATCTGCTG-3'.

Statistical Analyses

Data were analyzed using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) and expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). Comparison between two groups was performed using Student's t-test. A 95% confidence interval was considered for statistical significance and the p value was set at $p < 0.05$.

RESULTS

After a period of 4 weeks of treatment, no differences in body weight were observed between the standard diet group and the inulin-treated group (Fig 1 a). No differences were found between the groups of mice fed an ST and ST+I diet in relation to energy intake (Fig 1 b). The weights of adipose tissues were not decreased by inulin supplementation as well as total adiposity (Fig c, d). Histological examination of epididymal adipose tissue suggested a reduced adipocyte hypertrophy and decreased size of the area of this tissue in the inulin-treated group. An important decrease in the area of adipocytes was also observed (Fig 3 e). The determination of adipocyte size revealed a greater abundance of small adipocytes and, correspondingly, a lower abundance of large adipocytes in mice supplemented with inulin (Fig 3 f).

The glycemic parameters are summarized in Fig 2. There was an increase in insulin sensitivity in the ST+I group (Fig 2 a), however, on the tolerance to glucose and fasting glucose, inulin did not interfere with these parameters (Fig 2 b, c). The biochemical and hepatic transaminases parameters are summarized in Fig 3. Inulin did not influence plasma levels of total cholesterol and triglycerides (Fig 3 a, c), however there was a significant increase in HDL level (Fig 3 b). In relation to hepatic transaminases, GPT was higher in the ST group and inulin supplementation decreased this parameter (Fig 3 d) no differences were observed between the groups for GOT (Fig 3 e) and GOT/GPT (Fig 3 f).

The toll-like receptor transmembrane protein 4 (TLR4) and interleukin 6 (IL6) are highly important pro-inflammatory indicators, as its abnormal activity is one of the main characteristics of inflammation. The expression of mRNA of pro-inflammatory cytokines in the adipose tissue of the epididymis was evaluated. Compared to the inulin-treated group, TLR4 and IL6 levels in the control group were higher. The two pro-inflammatory cytokines evaluated in this study were inhibited to different degrees by inulin treatment (Fig 4 a, b).

Gene expression of "beige" adipocytes markers (Pgc1 α , Ucp1, Cidea) was evaluated and although there was no significant difference, there can be increases of 247.54%, 453.16% and 981.05%, respectively, in the expression of these genes in the group treated with inulin in relation to the control group (Fig 4 c, d, e).

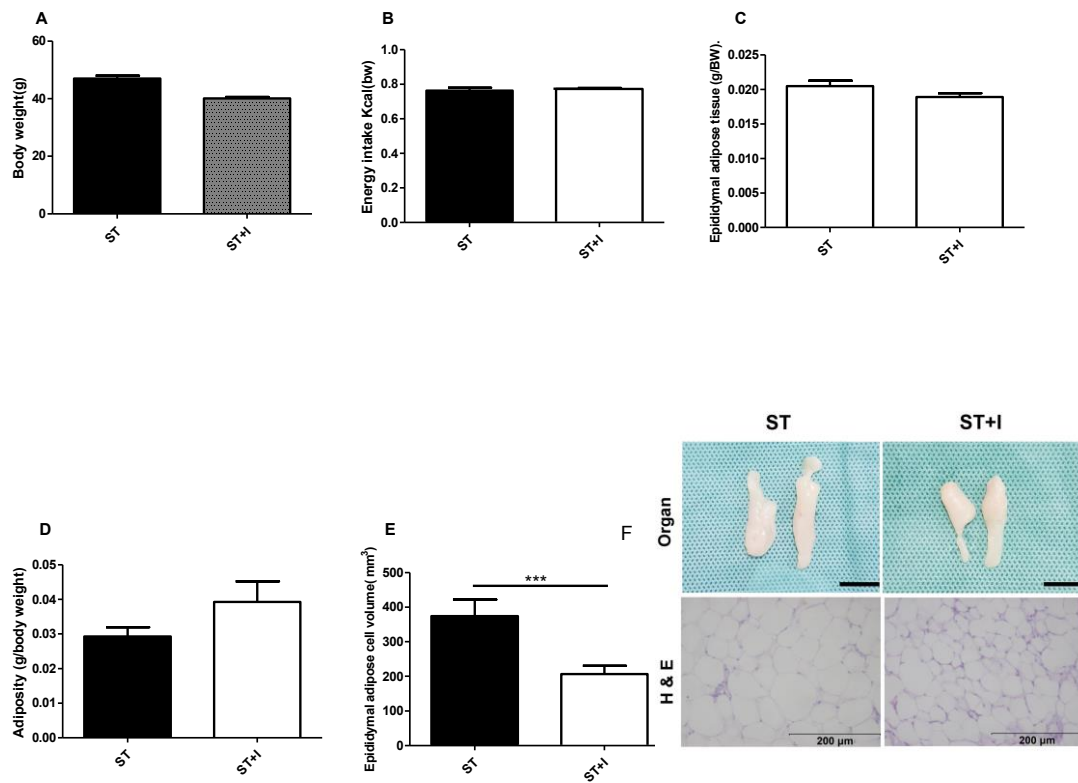


Fig 1 Energy consumption and body composition of mice fed standard and experimental diet: (a) Body weight; (b) Energy intake; (c) Epididymal adipose tissue weight; (d) Total adiposity; (e) Epididymal adipose tissue adipocyte area; (f) Epididymal adipose tissue echogenicity and H&E staining of mice fed standard and experimental diets. Asterisk indicates significance by the one-way analysis of variance (ANOVA). Data presented as mean \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus indicated group.

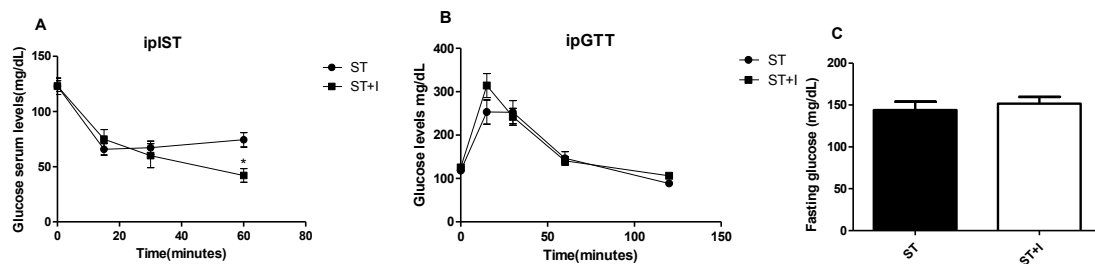


Fig 2 Biochemical profile of mice fed standard and experimental diet: (a) Intra-peritoneal insulin sensitivity test (ipIST); (b) Intra-peritoneal glucose tolerance test (ipGTT); (c) Fasting glucose levels. Asterisk indicates significance by the one-way analysis of variance (ANOVA). Data presented as mean \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus indicated group.

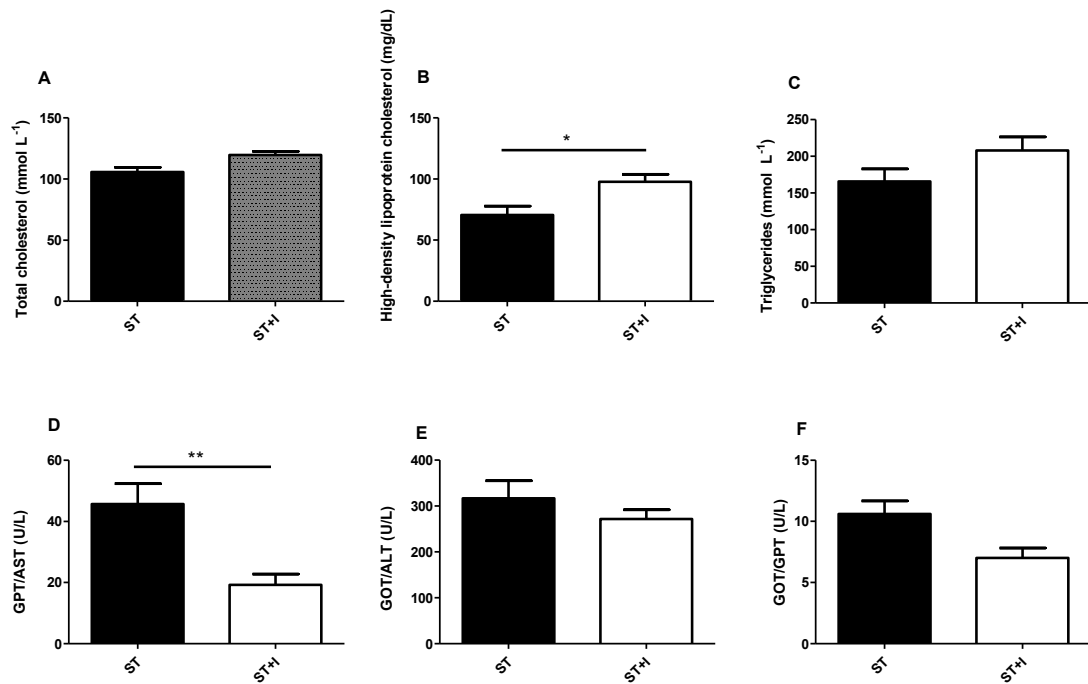


Fig 3 (a) Serum total cholesterol; (b) Serum HDL-cholesterol; (c) Serum triglycerides; (d) GPT/AST levels (U/L); (e); GOT/ALT levels; e (f) GOT/GPT ratio (U/L). Asterisk indicates significance by the one-way analysis of variance (ANOVA). Data presented as mean \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus indicated group.

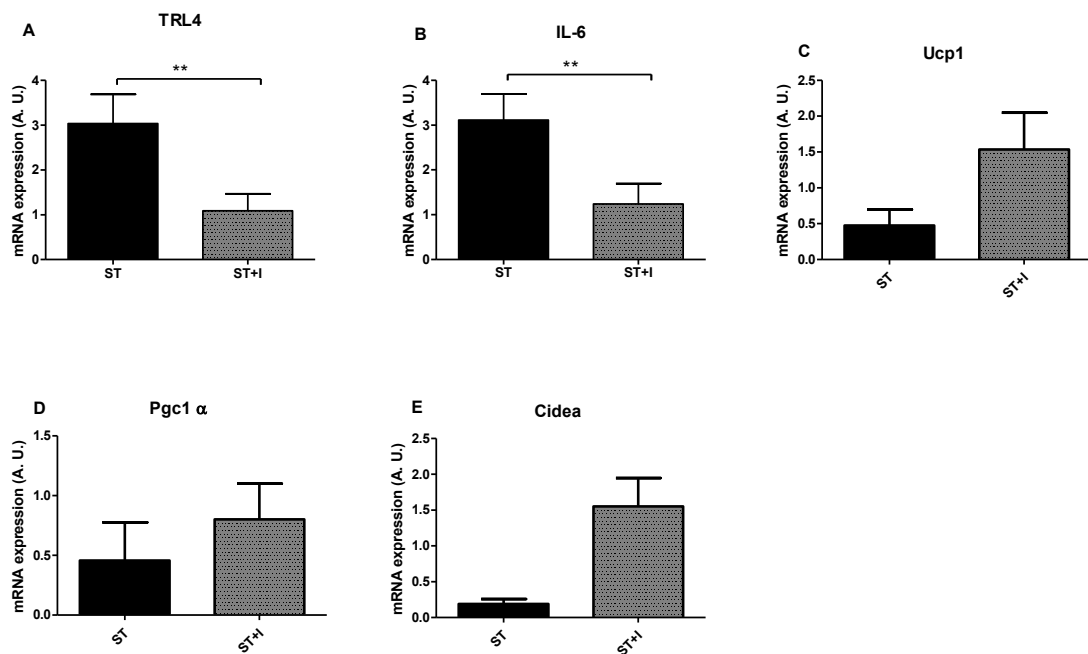


Fig 4 Epididymal adipose tissue gene Mrna expression in mice fed standard and experimental diet: (a) TLR4 mRNA expression; (b) IL-6 mRNA expression; (c) Ucp1 mRNA expression; (d) Pgc1 α mRNA expression; (e) Cidea mRNA expression. Asterisk indicates significance by the one-way analysis of variance (ANOVA). Data presented as mean \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus indicated group.

DISCUSSION

The social and nutritional transition introduced a few decades ago caused an increase in the overweight and obesity rate as a result of lifestyle changes. It is already characterized that although some individuals have normal weight, they exhibit increased metabolic and cardiovascular risk because they are hyperinsulinemic, insulin resistant, hypertriglyceridemic strains and susceptible to the subsequent onset of type 2 diabetes and metabolic syndrome (DM2) [29]. The present study shows that inulin dietary supplementation may be a functional strategy to improve metabolism and adipose tissue inflammatory-related genes profile.

The primary mechanism of the metabolic syndrome emergence is insulin resistance that originates from white adipose tissue (WAT), liver and/or skeletal muscle, combined with decreased insulin secretion by β cells. This resistance commonly occurs when fat accumulates in intra-abdominal deposits [30]. One of the first hypotheses for a link between obesity and insulin resistance and the emergence of diabetes mellitus (DM2) is due to the high flow of free fatty acids (FFA) from expanded adipose tissue to the liver and muscle, as it directly impacts insulin sensitivity in these tissues as a consequence of acute lipotoxicity and/or storage of ectopic fat. FFA exert lipotoxicity in pancreatic β cells, and continuous high concentrations of FFA, as in obesity, may promote β cell dysfunction [31].

Adipose tissue modifications also alter adipocytes shape and growth, the differentiation of pre-adipocytes into adipocytes and inflammatory cells aggregation. These changes are linked to extracellular matrix transformations (ECM) that induce changes in adipose tissue functionality and variations in its adipokine secretion profile. During the chronic inflammatory state related to obesity, the ECM can provide the structure for cell infiltration, and act as a reservoir of adipokines and growth factors [29]. Adipocyte area reduction is commonly associated with improved insulin sensitivity as showed in the present study.

An important stimulus of inflammation are saturated fatty acids, by their inclination to bind to the receptor transmembrane protein Toll-like receptor 4 (TLR4). Excessive nutrients and adiposity are linked with high circulating levels of fatty acids, which can be recognized by TLR-4 and cause the activation of nuclear factor κ B (NF κ B), modulating the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines. These cytokines, especially the chemokines, attract monocytes from circulation to adipose tissue, which become macrophages, increasing the synthesis of cytokines such as TNF- α and IL-6, an important factor for the development of tissue resistance to insulin [32,33].

Therefore, we evaluated the mRNA expression of two highly important pro-inflammatory indicators: TLR4 and interleukin 6 (IL6) in epididymal adipose tissue, because its abnormal activity is one of the main characteristic of inflammation. Our main findings revealed an important decrease in the levels of these 2 markers in the group of mice treated with inulin, indicating that this prebiotic induces anti-inflammatory activity. Similar findings in the literature were obtained when evaluating inulin treatment with elevation of the glucagon-like peptide-1 level (GLP-1), decreasing the IL-6 level and expression in epididymal adipose tissue, PEPCK expression and G6pc in the liver of diabetic rats [34]. The previous analysis by LI et al (2020) found similar results when they examined the metabolic effects of inulin with different degrees of polymerization in C57BL/6 J mice fed a high-

fat diet in which TLR4 levels, IL-6, IL1 β , CD11c and IKK ϵ in the high- fat diet group had the five pro-inflammatory cytokines analyzed and were all inhibited to different degrees by treatment with inulin [35].

Another finding on the impact of inulin on adiposity was the decrease in the area of adipocytes in epididymal adipose tissue by histological analysis. We observed a predominance of small adipocytes in the inulin treated group compared to the control group. The balance of hypertrophic expansion of existing adipocytes and adipogenesis within an individual directly impacts metabolic health. This process is mainly due to hypoxia and mechanical stress, large adipocytes are linked to impaired metabolic health, while small adipocytes are related to a decreased risk of metabolic disorders. In hypertrophic adipocytes there is an increase in lipolysis and secretion of inflammatory cytokines and decreased secretion of anti-inflammatory adipokines [36].

Adipose tissue can be subdivided by white, brown, or beige morphology. In individuals, there are two main types of adipose tissue, white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT) [30]. BAT tissue has the particularity of absorbing circulating fatty acids; this tissue can generate heat by decoupling chemical energy production (ATP) via oxidative phosphorylation in heat production (thermogenesis without tremors), contributing to the purification of plasma triglycerides and reducing ectopic lipid storage. Although originally an exclusive deposit for hibernation of small mammals, and present to some degree in infants, adults recently showed to have functional and inducible levels of BAT that respond to cold and sympathetic nervous system activation. Brown adipose tissue has 1 and 2% of the total fat stock in humans and is located mostly in the cervical, axillary and paravertebral regions [37,38].

The thermogenesis provided by BAT can be an efficient strategy to combat obesity by inducing an increase in the mass or activity of this tissue. While the primary function of WAT is to manage the energy deposit, brown adipocytes efficiently burn the fatty acids released from WAT during adaptive thermogenesis [39,40]. Human brown adipogenesis occurs in response to chronic or repeated cold stimulation, or in response to pharmacological compounds such as beta-adrenergic receptor agonists (β -AR) [41].

However, these browning induction strategies mediated by the sympathetic nervous system are not practical as weight loss methods because the darkening impacts of cold exposure are slightly reversible and in addition to β -ARs providing adverse cardiometabolic events. Therefore, browning mechanisms that are durable and act independently of the sympathetic nervous system are highly requested [40].

In an analysis WEITKUNAT et al (2017) [42] studied how various types of dietary fiber and different proportions of SCFA influence disorders related to metabolic syndrome (cellulose, inulin or guar gum) or different ac:pr (high acetate (HAc) or propionate (HPr) ratios for 30 weeks. For a more accurate examination of the possible "darkening", mitochondrial respiratory capacity was analyzed by measuring the activity of cytochrome c oxidase (COX), as well as the gene expression of "darkening" markers (Pgc1 α , Ucp1, Cidea). Inulin had no effect on COX activity, but increased gene expression of all three "darkening" markers. Inulin and (HAc) increased body temperature, probably by inducing beige/brown markers in WAT [42]. In the evaluation of gene expression of markers of "beige" adipocytes (Pgc1 α , Ucp1, Cidea) a tendency to increase these genes was found in the group treated with inulin in relation to the control group.

One of the classic solutions of treating diseases, including metabolic syndrome, is the use of medications, however they have side effects and affect organs responsible for metabolization especially by the use incorrectly or irrationally [43]. The intake of functional foods is revealed as an accessible and natural option to reduce the risk of developing several diseases mainly those departing from the deregulation of metabolism [44,45]. These foods

have a large amount of dietary fiber that reduces the energy density of food and/or impairs the absorption of amino acids and small peptides in the upper digestive tract, subsequently, the reduced supply of amino acids could prevent the amino acid-induced increase in the expression of the ribosomal protein S6 beta-1 kinase in subcutaneous adipose tissue, which otherwise, insulin resistance [41]. Inulin a common prebiotic, demonstrated effective protection in chronic metabolic diseases [46,47]. A recent analysis showed that inulin consumption can lead to reduced body mass index and improve hepatic steatosis by enriching the abundance of *Akkermanisa* and *Butyricococcus* in obese mice [48].

High dietary fiber intake is related to lower body weight in humans, which presupposes to be a result of reduced appetite. However, a systematic review showed that dietary fiber intake increased satiety in only 39% of published studies. Thus, in addition to the benefits in gastric filling and intestinal motility, there should be additional metabolic effects. A proposed mechanism refers to the production of short-chain fatty acids (SCFA), especially acetate (Ac) and propionate (Pr). These SCFA are produced from dietary fiber as a result of intestinal fermentation. They interfere in a variety of biological processes in various organs/tissues. Whereas propionate is primarily a precursor to glyconeogenesis (intestinal) and an inhibitor of lipid liver synthesis, acetate presupposes increasing energy expenditure by activating amp-activated protein kinase (AMPK) in the liver and muscle. In addition, recent data from the literature ensure that acetate increases the activity of brown fat and induce the formation of "beige adipocytes" [42,49].

Although this study is not mice that initially received a high-fat diet (HFD) for the induction of metabolic syndrome and diabetes, our aim was to investigate the process prior to the emergence of the syndrome in order to provide an alternative treatment as a way of preventing the conditions that lead to the installation of low-grade inflammation, which is an important process that precedes the onset of obesity. The main findings revealed that the diet supplemented with prebiotic inulin was not able to decrease body weight during the 4 weeks of treatment. Similarly, the weights of adipose tissues were not decreased by supplementation.

According to HIEL et al (2018) [50] who analyzed the impact of inulin on postprandial hypertriglyceridemia and lipid metabolism in a diet-induced mouse model, inulin did not influence body weight, adipose tissue and liver weight. The mice received a western control or diet for a period of 4 weeks and were supplemented or not with inulin for 2 weeks (0.2 g/day per mouse). However, inulin reduced the concentration of postprandial serum triglycerides, Cd36 (fatty acid receptor involved in lipid uptake and detection) and apolipoprotein C3 (ApoC3), lipoprotein lipase inhibitor) in the jejunum and increases fecal lipid excretion [50].

The results obtained here showed that inulin induced several biochemical changes such as improvement in glycemic profile increasing insulin sensitivity, increased HDL lipoprotein that removes a percentage of cholesterol from the arteries improving blood flow and decreased TGP enzyme related to the risk of liver injury. The liver is commonly linked to important functions of the body, such as the regulation of the metabolism of various nutrients (proteins, carbohydrates and lipids), production of proteins and other molecules, elimination of hormones, storage of substances such as glycogen, and excretion of toxic substances being the most sensitive organ by changes in food. However, studies have demonstrated the hepatoprotective capacity of some foods and nutrients, which have antioxidants, antifibrogenic, anti-inflammatory and lipotropic properties, capable of promoting the recovery of the function of this organ [51,52].

CONCLUSION

In conclusion, our study revealed that inulin supplementation may improve metabolism and adipose tissue inflammatory-related genes by decreasing the toll-like receptor transmembrane protein 4 (TLR4) and interleukin 6 (IL- 6) expression in epididymal adipose tissue, also decreased adipocyte area and increased biochemical HDL indices decreasing GPT enzymes (related to the risk of liver injury), and improved insulin sensitivity.

Disclosure statement

The authors declare no conflict of interest.

Funding

This work was partially supported by the Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPQ) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

REFERENCES

1. Scruzzi, GF, Tumas, T, Pou AS (2021) Perfiles de transición epidemiológica-nutricional y carga de morbi-mortalidad por COVID-19 en Argentina: um estudio ecológico. Public Health Notebooks 37, 7. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00345920>
2. Tumas N, Rodríguez Junyent C, Aballay LR, Scruzzi GF, Pou SA et al (2019) Nutritional transition profiles and obesity burden in Argentina. Public Health Nutri 22(12). 2237-2247. <https://doi.org/10.1017/S1368980019000429>
3. Popkin BM (2011) Contemporary nutritional transition: determinants of diet and its impact on body composition. ProNutr Soc 70(1): 82-91. <https://doi.org/10.1017/S0029665110003903>
4. Nicoletti M (2012) Nutraceuticals and botanicals: overview and perspectives. Int J FoodSci Nutr 63(1): 2–6. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.628012>
5. Green M, Arora K, Prakash S (2020) Medicina microbiana: alimentos funcionais prebióticos e probióticos para obesidade e síndrome metabólica. Int J Mol Sei 21(8):2890. <https://doi.org/10.3390/ijms21082890>
6. Markowiak P ,Slizewska K (2017) Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. Nutrients 9, 1021. <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
7. Robles Alonso V, Guarner F (2013) Linking the gut microbiota to human health. Br J Nutr 109.2, 21–26. <https://doi.org/10.1017/S0007114512005235>
8. Sivieri, K, Morales MLV, Saad SMI, Adornment MAT, Sakamoto IK et al. (2014) Prebiotic effect of fructooligosaccharide in simulating the human intestinal microbial

ecosystem (SHIME (R) model). *J. Med. Food* 17; 894–901. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0092>

9. Wong JM, Souza R, Kendall CW (2006) Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids. *J Clin Gastroenterol* 40:235–243. <https://doi.org/10.1097/00004836-200603000-00015>.
10. Brosseau C, Selle A, Palmer DJ, Prescott SL, Barbarot S et al. (2019) Prebiotics: mechanisms and preventive effects in allergy. *Nutrients* 11(8): 1841. <https://doi.org/10.3390/nu11081841>
11. Vieira AT, Teixeira MM, Martins FS (2013) The role of probiotics and prebiotics in inducing intestinal immunity. *Front Immunol* 44. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00445>
12. Gibson G, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA et al (2017) Expert consensus document: The international Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol* 14: 491-502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
13. Kaczmarczyk MM, Miller MJ, Freund GG (2013) The health benefits of dietary fiber: beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and colon cancer. *Metabolism* 61: 1058-1066. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.01.017>
14. Reis SA, Conceição LL, Rosa DD, Dias MM, Peluzio MdoC et al. (2014) Mechanisms used by inulin-type fructans to improve the lipid profile. *Nutri. Hospital* 31: 528-534. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.2.7706>
15. Salazar N, Dewulf EM, Neyrinck AM, Bindels LB, Cani PD et al. (2015) Inulin-type fructans modulate intestinal Bifidobacterium species populations and decrease fecal short-chain fatty acids in obese women. *Clin Nutr* 34(3):501-7. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2014.06.001>
16. Chambers ES, Byrne CS, Ruyendo A, Morrison DJ, Preston T et al. (2018) The effects of dietary supplementation with inulin and inulin-propionate ester on hepatic steatosis in adults with non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab* 64: 1744. <https://doi.org/10.1111/dom.13500>
17. Hoffman JB, Petriello MC, Morris AJ (2020) Prebiotic inulin consumption reduces dioxin-like PCB 126-mediated hepatotoxicity and gut dysbiosis in hyperlipidemic Ldlr deficient mice. *Environ Pollut.* 261: 114183. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114183>
18. Liu F, Prabhakar M, Ju J, Long H, Zhou HW et al (2017) Effect of inulin-type fructans on blood lipid profile and glucose level: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *EUR J. Clin Nutri.* 71:9–20. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2016.156>
19. Zou J., Chassaing B (2018) Fiber-mediated nourishment of gut microbiota protects against diet-induced obesity by restoring IL-22-mediated colonic health. *Cell Host Microbe*; 23(1): 41-53.4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.11.003>

20. Brooks L., Viardot A (2017) Fermentable carbohydrate stimulates FFAR2-dependent colonic PYY cell expansion to increase satiety. *Metab. Mo* 6: 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.10.011>
21. Li Z, Yi CX (2017) Butyrate reduces appetite and activates brown adipose tissue via the gut-brain neural circuit. *intestine* 67: 1269–1279. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314050>
22. Den Besten G., Bleeker A (2015) Short-Chain Fatty Acids Protect Against High-Fat Diet-Induced Obesity via PPAR gamma-Dependent Switch From Lipogenesis to Fat Oxidation. *Diabetes* 64: 2398-2408. <https://doi.org/10.2337/db14-1213>
23. Jin CJ, Sellmann C, Engstler AJ, Ziegenhardt D, Bergheim I et al (2015) Supplementation of sodium butyrate protects mice from the development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Br J Nutr* 114(11):1745-55. <https://doi.org/10.1017/S0007114515003621>
24. Gao Z, Yin J (2009) Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* 58: 1509–1517. <https://doi.org/10.2337/db08-1637>
25. Delzenne NM, Neyrinck AM, Cani PD (2013) Gut microbiota and metabolic disorders: how can the prebiotic work? *J. Nutri* 109 (suppl. 2): S81-S85. <https://doi.org/10.1017/S0007114512004047>
26. Hoving LR, de Vries MR, de Jong RCM (2018) The Prebiotic Inulin Aggravates Accelerated Atherosclerosis in Hypercholesterolemic APOE*3-Leiden Mice. *Nutrients* 10 (2): 172. <https://doi.org/10.3390/nu10020172>
27. Santos SH, Fernandes LR, Pereira CS, Guimarães AL, de Paula AM et al. (2012) Increased circulating angiotensin-(1–7) protects white adipose tissue against development of a proinflammatory state stimulated by a high-fat diet. *Regul Pept.* 178(1-3): 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2012.06.009>
28. Guimarães VHD, Lelis DF, Oliveira LP, Borém LMA, Guimarães FAD et al. (2020) Comparative study of dietary fat: lard and sugar as a better obesity and metabolic syndrome mice model. *Arch Physiol Biochem.* 1-11. <https://doi.org/10.1080/13813455.2020>
29. Ruiz-Ojeda FJ, Méndez-Gutiérrez A, Aguilera CM, Plaza-Díaz J (2019) Extracellular Matrix Remodeling of Adipose Tissue in Obesity and Metabolic Diseases. *Int J Mol Sci* 20 (19): 4888. <https://doi.org/10.3390/ijms20194888>
30. Flint AJ, Hu FB, Glynn RJ, Caspard H, Manson JE et al. (2010) Excess Weight and the Risk of Incident Coronary Heart Disease Among Men and Women. *Obesity* 18: 377- 83. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.223>
31. Burhans MS, Hagman DK, Kuzma JN, Schmidt KA, Kratz M et al (2018) Contribution of adipose tissue inflammation to the development of type 2 diabetes Mellitus. *Physiol* 9(1):1-58. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170040>
32. Benomar Y, Taouis M (2019) Molecular mechanisms underlying Obesity-induced hypothalamic inflammation and insulin resistance: Pivotal role of resistin/TLR4 pathways. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10:140. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00140>

33. Ormazabal V, Nair S, Elfeky O, Aguayo C, Salomon C et al. (2018) Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetology*, 17(1): 122. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0762-4>
34. Zhang Q, Yu H, Xiao X, Hu L, Xin F et al. (2018) Inulin-typefructan improves diabetic phenotype and gut microbiota profiles in rats. *PeerJ* 6: e4446. <https://doi.org/10.7717/peerj.4446>
35. Li LL, Wang YT, Zhu LM, Liu ZY, Ye CQ et al.(2020) Inulin with different degrees of polymerization protects against diet-induced endotoxemia and inflammation in association with gut microbiota regulation in mice. *Rep. Sci*; 10 (1): 978. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58048-w>
36. Ghaben AL, Scherer PE (2019) Adipogenesis and metabolic health. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 20: 242–258. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0093-z>
37. Kahn CR, Wang G, Lee KY (2019) Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. *J Clin Invest* 129:3990–4000. <https://doi.org/10.1172/JCI129187>
38. Cohen P, Spiegelman BM (2015) Brown and Beige Fat: Molecular Parts of a Thermogenic Machine. *Diabetes* 64: 2346–51. <https://doi.org/10.2337/db15-0318>
39. Paraíso AF, Sousa JN, Andrade JMO, Mangabeira ES, Lelis DF et al. (2019) Oral gallic acid improves metabolic profile by modulating SIRT1 expression in obese mice brown adipose tissue: A molecular and bioinformatic approach. *Life Sci* 237: 116914. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116914>
40. Chondronikola M, Volpi E, Børsheim E, Chao T, Porter C et al. (2016) Brown adipose tissue is linked to a distinct thermoregulatory response to mild cold in people. *Physiol frontal* 7: 129. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00129>
41. Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Kayahara T, Kameya T et al. (2013) Recruited brown adipose tissue as an anti-obesity agent in humans. *J Clin Invest* 123: 3404-8. <https://doi.org/10.1172/JCI67803>
42. Weitkunat K, Stuhlmann C, Postel A et al. (2017) Short-chain fatty acids and inulin, but not guar gum, prevent diet-induced obesity and insulin resistance through differential mechanisms in mice. *Rep. Sci* 7 (1):6109. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06447-x>
43. Plasek B, Lakner Z, Kasza G, Temesi A (2019) Consumer evaluation of the role of functional food products in disease prevention and the characteristics of target groups. *Nutrients* 12 (1): 69. <https://doi.org/10.3390/nu12010069>
44. Batista-Jorge GC, Barcala-Jorge AS, Silveira MF, Lelis DF, Andrade JMO et al (2020) Oral resveratrol supplementation improves Metabolic Syndrome features in obese patients submitted to a lifestyle-changing program. *Life Sci* 256:117962. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117962>

45. Woting A, Blaut M. The intestinal microbiota in metabolic diseases (2016) *Nutrient* 8 (4): 202. <https://doi.org/10.3390/nu8040202>
46. Li K., Zhang L., Xue J., Yang X., Dong X., Sha L et al. (2019) Dietary inulin alleviates diverse stages of type 2 diabetes mellitus via anti-inflammation and modulating gut microbiota in db/ db mice. *Food Funct* 10 (4), 1915–1927. <https://doi.org/10.1039/c8fo02265h>
47. Xue J., Li X., Liu P., Li K., Sha L et al. (2019) Inulin and metformina meliorate polycysticovary syndrome via anti- inflammation and modulating gut microbiota in mice. *Endocr. J.* 66 (10), 859– 870. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ18-0567>
48. Rodriguez J., Hiel S., Neyrinck AM, Le Roy T., Pötgens SA et al. (2020) Discovery of the gut microbial signature driving the efficacy of prebiotic intervention in obese patients. *Gut* 69, 1975 <https://doi.10.1136/gutjnl-2019-319726>
49. Hu J, Kyrou I, Tan BK, Dimitriadis GK, Ramanjaneya M et al (2016) short-chain fatty acid acetate stimulates adipogenesis and mitochondrial biogenesis via GPR43 in brown adipocytes. *Endocrinology* 157(5): 1881- 94. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1944>
50. Hiel S, Neyrinck AM, Rodriguez J, et al. (2018) Inulin improves postprandial hypertriglyceridemia by modulating gene expression in the small intestine. *Nutrients*. 10(5):532. <https://doi.org/10.3390/nu10050532>
51. Fardet A, Chardigny JM (2013) Plant-based foods as a source of lipo-tropes for human nutrition: a survey of in vivo studies. *Crit See Food SciNutr* 53(6): 535 90. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.549596>
52. Santos FR, Machado AS, Lelis DF, Guimaraes ALS, Paula AMB et al. (2020) Oral Kefir Grains Supplementation Improves Metabolism and Liver Antioxidant Enzymes Expression in Malnourished Mice. *Austin J Nutri Food Sci* 8(3): 1148. <https://doi.org/10.26420/austinjnutrifoodsci.2020.1148>

5 CONCLUSÕES

- A dieta suplementada com inulina apresentou melhora no perfil glicêmico, aumentando a sensibilidade à insulina;
- Diminuição da área dos adipócitos pela análise histológica;
- Melhora do perfil lipídico pelo aumento do HDL;
- Diminuição dos marcadores de risco de lesão hepática TGP;
- Tendência de aumento da expressão dos genes (Pgc1 α , Ucp1, Cidea) marcadores de adipócitos “bege” ;
- Diminuição da expressão do gene da proteína transmembrana Toll-like receptor 4 (TLR4) e a interleucina 6 (IL6) no tecido adiposo epididimal no grupo tratado.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como proposta inicial investigar os efeitos da espermidina e inulina no metabolismo de camundongos desnutridos. No estudo *in vivo* foram utilizados 72 camundongos machos da linhagem swiss desmamados, com aproximadamente 6 semanas de idade e massa corporal de aproximadamente 35g adquiridos do biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros-UNIMONTES e mantidos na mesma localidade. Os animais foram alojados em grupos de 9 indivíduos em caixas de polipropileno autoclaváveis de dimensões de 414 x 344 x 168 mm, com tampa em aço galvanizado e contendo separadores em aço inox (Zotech, modelo ZT 375). Todas as caixas foram forradas com maravalha trocada 2 vezes por semana, com adequadas condições de temperatura (22 ± 2 °C), umidade relativa do ar de $60 \pm 5\%$, luminosidade controladas (12 h de ciclos de claro/escuro) e baixo nível sonoro <40 dB e livre acesso à água filtrada. O presente estudo seguiu os preceitos nacionais e internacionais que regem o desenvolvimento de pesquisa em animais. Foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo animais da Universidade Estadual de Montes Claros aprovado pelo protocolo nº 217. Foi utilizada a dieta balanceada (Purina-Labina[®]) contendo 50,3% de carboidratos, 41,9% de proteínas e 7,8% de gordura com um total de 2,18 kcal por cada 1 g da ração como dieta padrão.

Após o período de adaptação, os animais foram submetidos a duas fases: (i) a fase de restrição alimentar; a fim de induzir a desnutrição e a fase de renutrição. Uma dieta com restrição de 20% em relação ao grupo controle foi mantida até o momento em que os animais dos grupos desnutridos atingiram um déficit de peso de cerca de 20% em relação aos seus pesos iniciais. Para estudar o impacto de um tratamento prebiótico, os animais foram suplementados com 10% de frutanos do tipo inulina, adicionados a ração. A espermidina foi adicionada à água potável a 3 mM concentração final. A espermidina na água potável foi substituída a cada 2 a 3 dias e preparado a partir de espermidina aquosa 1 M soluções de reserva. As soluções estoque foram ajustadas para pH 7,4 com HCl e luz armazenada protegida a 20 °C por não mais de um mês, o grupo controle recebeu água potável pura.

Após a eutanásia os tecidos adiposos: epididimal, marrom, mesentérico e retroperitoneal, intestino delgado, intestino grosso, fígado, músculo, estômago, foram retirados, lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS), pesados e o peso de cada tecido foi corrigido pelo peso corporal do animal. Posteriormente congelados os seguintes tecidos:

intestino delgado, intestino grosso, tecido adiposo epididimal, fígado, músculo, fezes e estômago foram imediatamente armazenados em nitrogênio líquido, posteriormente metade dos tecidos foram congelados em ultrafreezer a -80°C e a outra parte destinada a histologia. As fezes de cada camundongo foram coletadas no dia anterior a eutanásia estocados a -20°C e posteriormente armazenado em ultrafreezer a -80°C .

Os grupos com suas respectivas dietas foram: DP (Dieta padrão); DP+E (Dieta padrão + Espermidina); DP+I (Dieta padrão + inulina); DP+E+I (Dieta padrão + Espermidina +Inulina); RA (Restrição alimentar); RA+E (Restrição alimentar + Espermidina); RA+I (Restrição alimentar + Inulina); RA+E+I (Restrição alimentar + Espermidina + Inulina). O processo de recuperação nutricional (renutrição) foi mantido por um período de 30 dias. Nesse período os animais receberam as dietas específicas para cada grupo e água com e sem a suplementação de espermidina, os animais, a água e a ração foram pesados diariamente no período do tratamento. Contudo, devido a indução prolongada da desnutrição os animais ficaram estressados(uma observação: os animais dos grupos RA+E e RA+E+I que receberam a suplementação de espermidina estavam menos estressados, apesar que não foram realizados testes somatossensoriais e motores que avaliam a ansiedade e o comportamento exploratório, foi uma percepção pessoal que tive ao trabalhar com esses grupos), além disso os animais não se adaptaram a introdução da dieta de renutrição o que interferiu nos resultados, houve a decisão de utilizar os dados dos grupos DP e DP+I pois apresentaram resultados mais satisfatórios.

Em conclusão, a dieta padrão suplementada com inulina DP+I apresentou melhora no perfil glicêmico, aumentando a sensibilidade à insulina, diminuição da área dos adipócitos e redução da hipertrofia pela análise histológica, diminuição dos marcadores de risco de lesão hepática TGP, aumento do HDL lipoproteína que retira uma porcentagem do colesterol das artérias melhorando o fluxo sanguíneo. Na avaliação da expressão gênica no tecido adiposo epididimal de marcadores de adipócitos “bege” ($Pgc1\alpha$, $Ucp1$, $Cidea$) foi encontrada uma tendência de aumento desses genes no grupo tratado com inulina em relação ao grupo controle. Além disso foi avaliada a expressão mRNA de dois indicadores pró-inflamatórios altamente importantes a TLR4 e interleucina 6 (IL6), pois sua atividade anormal é um dos principais característica da inflamação, revelando uma importante diminuição dos níveis desses 2 marcadores no grupo de camundongos tratados com inulina, indicando que este prebiótico induz uma atividade antioxidante.

À luz desses resultados, os alimentos funcionais prebióticos devem ser considerados como um coadjuvante para uma melhor qualidade de vida e melhoria de situações metabólicas adversas, através do aumento do consumo de alimentos fontes de prebióticos e pela modificação da dieta por meio da suplementação de prebióticos que podem ser incorporados aos alimentos básicos existentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, S. A. et al. A combination of short- and long-chain inulin-type fructan prebiotics increases calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. **Am J Clin Nutr.** 2005; 82: 471-6.
- AHMED, W.; RASHID, S. Functional and therapeutic potential of inulin: a comprehensive review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.** 2019; 59 (1): 1–13.
- AMY, M. B. et al. Prebiotics and the health benefits of fiber: current regulatory status, future research, and goals. **The Journal of Nutrition.** 2012; 142(5): 962-974.
- BAGCHI, T. Traditional food and modern lifestyle: Impact of probiotics. **Indian J Med Res.** 2014; 140: 333–335.
- BARBOSA, S. M. J. et al. The multifaceted role of commensal microbiota in homeostasis and gastrointestinal diseases. **Journal of Immunology Research.** 2015; 5: 1-14.
- BRAUNE, A.; BLAUT, M. Bacteria species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human intestine. **Intestinal microbes.** 2016; 7(3): 216-34.
- BROSSEAU, C. et al. Prebiotics: mechanisms and preventive effects in allergy. **Nutrients.** 2019; 11 (8): 1841.
- CABRERA-RUBIO, R. et al. The human milk microbiome changes during lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. **I am. J. Clin. Nutrition** 2012; 96: 544-551.
- CANI, P. D, et al. Intestinal microbiota fermentation of prebiotics increases the production of satiety peptide and incretin with consequences for health feeling of appetite and glucose response after a meal. **I am. J. Clin. Nutrition** .2009; 90: 1236–1243.
- CARABOTTI, M. et al. The gut-brain axis: Interactions between the enteric microbiota, the central and enteric nervous systems. **Ann. gastroenterol.** 2015; 28: 203– 209.
- CARLSON, J. L. et al. Prebiotic Dietary Fiber and Gut Health: Comparing in Vitro Fermentations of Beta- Glucan, Inulin and Xylooligosaccharide. **Nutrients.** 2017; 9 (12): 1361.
- CAROTTI, S. et al. Starring the role of toll-like receptor 4 activation in the intestine-liver axis. **World J. Gastrointest. Pathophysiol.** 2015; 6: 99 –109
- CAUDWELL, P. et al. Resting metabolic rate is associated with hunger, self-determined meal size and daily energy intake and may represent a marker of appetite. **Am J Clin Nutr** 2013; 97 : 7– 14.

CHAMBERS, E. S. et al. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. **Intestine**.2015; 64: 1744.

CHAMBERS, E. S. et al. The effects of dietary supplementation with inulin and inulin propionate ester on hepatic steatosis in adults with non-alcoholic fatty liver disease. **Diabetes, Obesity and Metabolism**. 2019; 21 (2): 372-376.

CLERCQ, N. C. et al. Gut microbiota in obesity and malnutrition. **Adv Nutr** .2016; 7(6): 1080-1089.

COUDRAY, C.; RAMBEAU, M.; FEILLET-COUDRAY, C. Dietary inulin intake and age can significantly affect intestinal calcium and magnesium absorption in rats: a stable isotopic approach. **J Nutr** .2005; 4: 29.

CUMMINGS, J. H.; CHRISTIE, S.; COLE, T. J. A study of fruit oligosaccharides in preventing diarrhea in travelers. **Aliment Pharmacol Ther**. 2001; 15: 1139- 1145.

DINAN, T. G; CRYAN, J. F. Brain- intestine- microbiota axis - Mood, metabolism and behavior. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol**. 2017; 14: 69– 70.

EGALHADO, M. et al. Short-chain fatty acids: A link between prebiotics and the microbiota in chronic kidney disease. **Future Microbiol**. 2017; 12: 1413–1425.

EVERARD, A.; LAZAREVIC, V.; DERRIEN, M. Intestinal microbiota and glucose and lipid metabolism responses to prebiotics in genetically obese and leptin-resistant mice diet-induced. **Diabetes**. 2011; 60(11): 2775-2786.

FERREIRA, C. M. et al. The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases. **J Immunol Res**. 2014: 689492

GARCÍA-MONTERO, C.; FRAILE-MARTÍNEZ, O.; GÓMEZ-LAHOZ, A. M. Nutritional components in the Western versus Mediterranean diet in the intestinal microbiota-immune interaction. Implications for health and illness. **Nutrients** . 2021;13(2):699.

GENTON, L.; CANI, P. D.; SCHRENZEL, J. Changes in the intestinal barrier and intestinal microbiota in food restriction, food deprivation and protein-energy waste. **Clin Nutr** .2015; 34: 341–349.

GIBSON, G. et al. Expert consensus document: International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol**. 2017; 14: 491– 502.

GILL, S. R. et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. **Science**. 2006; 312: 1355– 1359.

GOETZKE, B.; NITZKO, S.; SPILLER, A. Consumption of organic and functional foods. A matter of well-being and health? **Appetite**. 2014; 77: 96– 105.

GOMEZ-GALLEGO, C. et al. The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. **Semin Fetal Neonatal Med.** 2016; 21: 400–405.

GONZÁLEZ-DÍAZ, C.; VILAPLANA-APARICIO, M. J.; IGLESIAS-GARCÍA, M. How is functional food advertising understood? An approach to college students. **Nutrients** . 2020; 12 (11): 3312.

GREEN, M.; ARORA, K.; PRAKASH, S. Microbial Medicine: Microbial Medicine: Prebiotic Foods and Functional Probiotics for Obesity and Metabolic Syndrome. **Int J Mol Sci** .2020; 21(8): 2890.

GREENWOOD-VAN, M. B.; JOHNSON, A. C.; GRUNDY, D. Gastrointestinal physiology and function. **Handbook of Experimental Pharmacology.** 2017; 239: 1- 16.

HOFFMAN, J. B.; PETRIELLO, M. C.; MORRIS, A. J. Prebiotic inulin consumption reduces dioxin-like 126 PCB-mediated hepatotoxicity and intestinal dysbiosis in mice with hyperlipidemic Ldlr deficiency. **Environ Poll.** 2020; 261: 114- 183.

HOVING, L. R. et al. Prebiotic Inulin Aggravates Accelerated Atherosclerosis in APOE * 3-Leiden Hypercholesterolemic Mice. **Nutrients.** 2018; 10 (2): 172.

IBRAHIM, M. K. et al. Impact of child malnutrition on host defense and infection. **Clin Microbiol Rev.** 2017; 30: 919– 971.

JANDHYALA, S. M. et al. Role of the normal intestinal microbiota. **J World Gastroenterol.** 2015; 21: 8787– 8803.

KACZMARCZYK, M. M.; MILLER, M. J.; FREUND, G. G. The Health Benefits of Dietary Fiber: Beyond the Usual Suspects of Type 2 Diabetes, Cardiovascular Disease, and Colon Cancer. **Metabolism.** 2013; 61: 1058-1066.

KRAJMALNIK, B. R. et al. Effects of intestinal microbes on nutrient absorption and energy regulation. **Nutr Clin Pract.** 2012; 27(2): 201-214.

LAI, S. et al. Effect of low protein and inulin diet on microbiota and clinical parameters in patients with chronic kidney disease. **Nutrients.** 2019; 11 : 3006.

LIU, F. et al. Effect of inulin-type fructans on lipid profile and blood glucose level: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials **.J. Nutrition Clin** .2017; 71: 9-20

MARKOWIAK, P.; ŚLIŻEWSKA, K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. **Nutrients.** 2017; 15;9 (9): 1021

MENSINK, M. A. et al. Inulin, a flexible oligosaccharide. II: Review of its pharmaceutical applications. **Carbohydr Polym** .2015; 134: 418– 428.

OBREGON-TITO, A. J. et al. Livelihood strategies in traditional societies distinguish intestinal microbiomes. **Common Nat.**2015; 6: 6505.

O'HARA, A. M.; SHANAHAN, F. Intestinal flora as a forgotten organ. **EMBO Rep.** 2006; 7 (7): 688-93.

PARNELL, J. A.; REIMER, R. A. Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults. **I am. J. Clin. Nutrition.** 2009; 89: 1751–1759.

PASQUALETTI, V. et al. Antioxidant activity of inulin and its role in preventing impairment of human colon muscle cells induced by mucosal exposure to lipopolysaccharide. **PLoS ONE.** 2014; 9: 98031.

PINEIRO, M. et al. FAO technical meeting on superprebiotics. **J. Clin. Gastroenterol.** 2008; 42: 156 - 159.

PLAZA-DIAZ, J. et al. Mechanisms of action of probiotics. **Adv. Nutrition.** 2019; 10: 49 - 66.

RAMIREZ-FARIAS, C. et al. Effect of inulin in human intestinal microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecali bacterium prausnitzii*. **Br J Nutr.** 2009; **101**: 541-550.

RASCHKA, L.; DANIEL, H. Mechanisms underlying the effects of inulin-like fructans on calcium absorption in the large intestine of rats. **Bone.** 2005; 37: 728– 735.

REIS, A.S. et al. Mechanisms used by inulin-type fructans to improve the lipid profile. **Nutrition Hospital.** 2014; 31:528–534.

REYMAN, M. et al. Impact of gut microbiota dynamics associated with mode of delivery on health in the first year of life. **Common Nat.** 2019; 10: 4997.

RIDLON, J. M. et al. Bile acids and the gutmicrobiome. **Curr. Reviews Gastroenterol.** 2014; 30: 332– 338.

ROBERFROID, M. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits . **Br. J. Nutr.** 2010; 104 : 1 - 63 .

SALAZAR, N. et al . Intestinal bifidobacterium and decrease fecal short-chain fatty acids in obese women. **Clin Nutr.** 2015; 34 :501–507.

SALEKZAMANI, S.; EBRAHIMI-MAMEGHANI, M.; REZAZADEH, K. The antioxidant activity of artichoke (*Cynarascolymus*): a systematic review and meta-analysis of animal studies. **Phytotherapy Research.** 2019; 33 (1): 55– 71.

SAULNIER, D. M. et al. Exploring the metabolic pathway reconstruction and genome-wide expression profile in *Lactobacillus reuteri* to define functional probiotic traits. **PLoS one.** 2011; 6: 183-187.

SCHIFFRIN, E. J. et al. Systemic inflammatory markers in the elderly: the effect of oral nutritional supplementation with prebiotics. **J Nutr Health Aging.** 2007; 11(6): 475-9.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised estimates for the number of human and bacterial cells in the body. **Plos Biol.** 2016; 14: 1002533.

SHERIDAN, P. O.; BINDELS, L. B.; SAULNIER, D. M. Can prebiotics and probiotics improve therapeutic outcomes for malnourished individuals?. **Intestinal microbes.** 2014; 5 (1): 74– 82.

SIVIERI, K. et al. Prebiotic effect of fructooligosaccharide in simulating the human intestinal microbial ecosystem (SHIME (R) model). **J. Med. Food** .2014.17; 894–901.

STOYANOVA, S. et al. The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress. **Int. J. FoodSci. Nutrition** .2011; 62: 207–214.

VADDER, F. et al. Metabolites generated by the microbiota promote metabolic benefits through the neural circuits of the gut brain . **Cell.** 2014; 156: 84–96.

VALLIANOU, N. et al. Understanding the role of the gut microbiome and microbial metabolites in obesity and obesity-associated metabolic disorders: current evidence and perspectives. **Curr Obes.** 2019; 8 (3): 317–32.

VAN DENENDE, W.; VALLURU, R. Sucrose, sucrosyloligosaccharides and oxidative stress: elimination and recovery? **J. Exp. Robot.** 2009; 60: 9– 18.

VANDEPUTTE, D. et al. Prebiotic inulin-like fructans induce specific alterations in the human gut microbiota. **Intestine.** 2017; 66: 1968–1974.

VIEIRA, A. T.; TEIXEIRA, M. M.; MARTINS, F. S. The role of probiotics and prebiotics in inducing intestinal immunity. **Front Immunol.** 2013; 4: 445.

WELTERS, C. F. M. et al. Effect of dietary inulin supplementation on pouch mucosal inflammation in patients with ileal pouch-anal anastomosis. **Dis. ColonRec.** 2002; 45: 621–627.

WHISNER, C. M. et al. Galactooligosaccharides increase the absorption of calcium and intestinal bifidobacteria in girls: a double-blind crossover study. **Br J Nutr.** 2013; 110: 1292–303.

WONG, J. M.; SOUZA, R.; KENDALL, C. W. Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids. **J Clin Gastroenterol.** 2006; 40: 235–243.

WOTING, A.; BLAUT, M. The gut microbiota in metabolic disease. **Nutrients.** 2016; 8 (4): 202.

YOUSAF, M. S. et al. Storage stability of clarified banana juice fortified with inulin and oligofructose. **J Food Process Preserv.** 2010; 34 (2): 599– 610.

ZUO, T. et al. Urbanization and the gut microbiota in inflammatory bowel disease and health. *Nat. Rev. Gastroenterol Hepatol.* 2018; 15: 440-452.

ANEXO

ANEXO A – Parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Estadual de Montes Claros
Comissão de Ética em Experimentação e Bem-Estar
Animal da Unimontes
CEEBEA



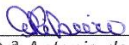
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 217, relativo ao projeto intitulado “Efeitos da espermidina e inulina no perfil inflamatório e metabolismo de camundongos desnutridos” sob coordenação do Prof^o. Sérgio Henrique Sousa Santos está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pela Comissão de Ética em Experimentação e Bem-Estar Animal da Unimontes, e encontra-se APROVADO referente à reunião de 06/10/2020.

A quantidade total de animais aprovados pelo CEEBEA para este projeto foi de 64 animais.

Este certificado é válido por cinco anos após sua aprovação.

Montes Claros, 23 de Abril de 2021.


Profª Drª Antonia de Maria Filha Ribeiro
Coordenadora do CEEBEA/UNIMONTES
Profª Antonia de Maria F. Ribeiro
Coordenadora da
CEEBEA da Unimontes

Buscando dar continuidade aos trabalhos da UNIMONTES em virtude do Coronavírus e atendendo as Portarias 072/Reitor/2020 de 15 de 2020 que dispõe sob medidas de prevenção ao contágio e de enfrentamento e contingenciamento, no âmbito do poder executivo, da epidemia de doença infecciosa viral respiratória causada pelo agente Coronavírus (COVID-19) no âmbito da UNIMONTES e seguindo orientação da consulta ao CONCEA a reunião foi por Videoconferência.

ANEXO B- Comprovante de submissão do artigo:

The screenshot shows a Gmail interface with a manuscript draft open. The draft title is "Probiotics and Antimicrobial Proteins" and the subtitle is "Inulin prebiotic dietary supplementation reduces Toll-like receptor 4 transmembrane protein gene (TLR4) and interleukin 6 (IL6) expression in adipose tissue improving metabolic parameters. --Manuscript Draft--".

Manuscript Number:	
Full Title:	Inulin prebiotic dietary supplementation reduces Toll-like receptor 4 transmembrane protein gene (TLR4) and interleukin 6 (IL6) expression in adipose tissue improving metabolic parameters.
Article Type:	Original Research
Keywords:	Prebiotic; Nutrition; Adipose tissue; Inflammation; Metabolic syndrome
Corresponding Author:	Sérgio Henrique Sousa Santos, PhD UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais Montes Claros, Minas Gerais BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Carla Dayana Durães Abreu
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Carla Dayana Durães Abreu Bruna Viana Caldas Lucyana Conceição Farias, PhD André Luiz Sena Guimarães Alfredo Batista de Paula Maria Beatriz Abreu Glória Sérgio Henrique Sousa Santos, PhD
Order of Authors Secondary Information:	

The screenshot shows a Gmail interface with a submission confirmation email open. The email subject is "ENC: PAAP-D-22-00056 - Submission Confirmation". The sender is Sergio Santos.

De: em.paap.0.794a8b.284485f1@editorialmanager.com <em.paap.0.794a8b.284485f1@editorialmanager.com> em nome de Probiotics and Antimicrobial Proteins Editorial Office <em@editorialmanager.com>

Enviado: sexta-feira, 11 de fevereiro de 2022 13:48

Para: Sérgio Henrique Sousa Santos <sergiosousas@hotmail.com>

Assunto: PAAP-D-22-00056 - Submission Confirmation

Dear Dr Santos,

Thank you for submitting your manuscript, Inulin prebiotic dietary supplementation reduces Toll-like receptor 4 transmembrane protein gene (TLR4) and interleukin 6 (IL6) expression in adipose tissue improving metabolic parameters., to Probiotics and Antimicrobial Proteins.

The submission id is: PAAP-D-22-00056
Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript.

