

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

RAYANNE DE ARAÚJO TORRES

**CARBOXIMETILGLUCANA EXTRAÍDA DA *Saccharomyces cerevisiae* PREVINE
ALTERAÇÕES CORPORAIS, METABÓLICAS E CARDIOVASCULARES
INDUZIDAS PELO CONSUMO DE DIETA HIPERCALÓRICA EM RATOS**

JOÃO PESSOA
2019

RAYANNE DE ARAÚJO TORRES

**CARBOXIMETILGLUCANA EXTRAÍDA DA *Saccharomyces cerevisiae* PREVINE
ALTERAÇÕES CORPORAIS, METABÓLICAS E CARDIOVASCULARES
INDUZIDAS PELO CONSUMO DE DIETA HIPERCALÓRICA EM RATOS**

JOÃO PESSOA
2019

RAYANNE DE ARAÚJO TORRES

**CARBOXIMETILGLUCANA EXTRAÍDA DA *Saccharomyces cerevisiae* PREVINE
ALTERAÇÕES CORPORAIS, METABÓLICAS E CARDIOVASCULARES
INDUZIDAS PELO CONSUMO DE DIETA HIPERCALÓRICA EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências da Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras

JOÃO PESSOA
2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

T693c Torres, Rayanne de Araújo.

CARBOXIMETILGLUCANA EXTRAÍDA DA *Saccharomyces cerevisiae* PREVINE ALTERAÇÕES CORPORAIS, METABÓLICAS E CARDIOVASCULARES INDUZIDAS PELO CONSUMO DE DIETA HIPERCALÓRICA EM RATOS / Rayanne de Araújo Torres. - João Pessoa, 2019.

109 f. : il.

Orientação: Robson Cavalcante Veras.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Carboximetilglucana. 2. Dieta Hipercalórica. 3. Estresse oxidativo. 4. Imunomodulação. 5. Obesidade. I. Veras, Robson Cavalcante. II. Título.

UFPB/BC

RAYANNE DE ARAÚJO TORRES

**CARBOXIMETILGLUCANA EXTRAÍDA DA *Saccharomyces cerevisiae* PREVINE
ALTERAÇÕES CORPORAIS, METABÓLICAS E CARDIOVASCULARES
INDUZIDAS PELO CONSUMO DE DIETA HIPERCALÓRICA EM RATOS**

Tese de Doutorado aprovada em 17 / 10 /2019.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras – Programa de Pós-Graduação Em Ciências da
Nutrição/CCS/UFPB
Coordenador da Banca Examinadora

Profa Dra. Jailane de Souza Aquino – Programa de Pós-Graduação Em Ciências da
Nutrição/CCS/UFPB
Examinador Interno

Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves – Programa de Pós-Graduação Em Ciências da
Nutrição/CCS/UFPB
Examinador Interno



Prof. Dra. Islânia Gisélia Albuquerque Gonçalves – Programa de Pós-Graduação em Produtos
Naturais e Sintéticos Bioativos/CCS/UFPB
Examinador Externo

Prof. Dr. Thyago Moreira de Queiroz – Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade
Física e Plasticidade Fenotípica/CAV/UFPE
Examinador Externo

A **Deus**, pois tudo é permissão D'Ele;

A minha mãe, **Leni**, pelo seu amor e
dedicação incondicional e por sua batalha
de vida que me possibilitou chegar até aqui;

Ao meu avô materno (*in memoriam*), **Juvenal**,
exemplo de homem forte, justo e íntegro,
que sempre me incentivou a buscar meus
sonhos e me serve de inspiração.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao bom Deus, que me deu força e coragem para permanecer nesta caminhada que por vezes foi árdua, cansativa e extenuante, mas sua voz serena me dizia para seguir e não desistir. Graças a Ti Senhor por todo seu amor.

À minha mãe, Leni Xavier de Araújo, meu maior motivo para lutar por uma vida melhor de forma digna. Pelo seu exemplo de mulher forte, determinada e que sempre exerceu com paixão seu ofício. Agradeço-te por ser quem sou e pelo seu amor que sempre foi meu combustível.

Ao meu pai, Raimundo Soares Torres, pelo seu amor muitas vezes discreto e distante, mas sempre que externava, demonstrava alegria e orgulho das conquistas da filha.

Ao meu irmão, Raniere de Araújo Torres, por sempre acreditar e se orgulhar de mim em cada uma de minhas conquistas.

Aos meus avós maternos Juvenal Batista e Antônia Natildes (*in memoriam*), pessoas de coração generoso e dos quais guardo as memórias mais doces e felizes de minha infância e adolescência. Obrigada pelo exemplo de pessoas fortes, honestas e dedicadas que me ensinavam a seguir em frente e acreditar que tudo é possível. Vocês hoje estão em festa por mais essa conquista. Amo-os eternamente.

À minha avó paterna, Luzia Sores Torres, pelo amor e carinho, pelas orações e por podermos partilhar de momentos alegres e descontraídos sempre que nos encontramos.

A todos da minha família, que sempre torceram, acreditaram e até me tomaram como exemplo, agradeço-os pelas palavras motivadoras e por todos os momentos compartilhados.

Ao professor e orientador Dr. Robson Cavalcante Veras pela paciência e compreensão durante estes anos, pela confiança, humildade, conhecimento e amabilidade a mim dispensados. Agradeço-o pelos ensinamentos e experiências compartilhadas.

Ao professor Isac Almeida de Medeiros, pelo espaço concedido no laboratório de farmacologia cardiovascular para realização desta pesquisa. Agradeço-o pelos momentos compartilhados e incentivos que agregaram valores a esta pesquisa.

À professora Dra. Jailane de Souza Aquino que generosamente cedeu as instalações do Laboratório de Nutrição Experimental para realização de parte desta pesquisa e por sua disponibilidade e atenção sempre que a procurei, além de relevante contribuição como membro da banca avaliadora deste trabalho.

À professora Dra. Marciane Magnani pelo fornecimento da substância utilizada em toda a pesquisa, agradeço a confiança e atenção a mim dispensada.

A todos que fazem parte do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, em especial a Lorena Bezerra, Pablo Ferreira, Priscila Maciel, Tays Amanda e Fátima Azeredo pelo apoio na realização de algumas metodologias desta pesquisa e por me socorrerem sempre que estive ausente e precisei contar com alguém. Agradecer também a Bárbara Cabral, que apesar de não integrar o laboratório, o tempo em que esteve presente agregou conhecimento a minha

pesquisa e me ajudou em alguns protocolos. Deus abençoe cada um de vocês abundantemente.

Agradecer aos alunos de Iniciação Científica, Júlio e Thyffane, pelo apoio incondicional nos dias de gavagem, pela atenção e comprometimento na condução deste trabalho, além de auxílio em dias de experimento. Vocês foram fundamentais, minha eterna gratidão.

A Maria Aparecida, que esteve ao meu lado, me apoiando e incentivando nos últimos anos e acreditando em meu potencial em momentos difíceis e turbulentos. Seu amor, apoio, carinho e dedicação foram essenciais para que eu seguisse. Todo meu amor e gratidão a ti por se fazer presente neste momento.

A minha cachorrinha Melina, pelo seu amor gratuito, pelas vezes que em meio a momentos de preocupação e tristeza ela me alegrou e me fez sorrir, pelo companheirismo e lealdade.

Aos colegas de trabalho que por tantas vezes me deram cobertura e apoio para que eu pudesse cumprir o planejamento desta pesquisa. Sou extremamente grata por tudo que vocês fizeram por mim, cada um, cada detalhe feito lembrarei e serei grata, pois vocês são parte disso.

Aos amigos e amigas da vida, por fazerem meus dias mais leves, pelos momentos de descontração, lazer e risadas também essenciais para esta caminhada. Muito obrigada pela torcida e incentivo e, sobretudo, por acreditarem em mim, vocês são parte disso tudo.

Ao Professor Dr. José Luiz, por sua relevante contribuição e orientações ao longo do desenvolvimento deste trabalho e participação como membro da banca avaliadora deste trabalho.

Aos demais componentes da banca avaliadora, professora Dra. Islania Gisélia e professor Dr. Thyago Moreira, membros titulares da banca, pelas relevantes contribuições e disponibilidade em participar deste momento e aos professores Dra. Bagnólia Araújo e Dr. Hemerson, membros suplentes da banca, pelas colaborações com este trabalho.

A Ricardo Cartaxo e professor Adriano Francisco pela contribuição na execução de alguns protocolos referentes à esta pesquisa; E ao técnico do laboratório de Bromatologia da UFPB, Eduardo Vasconcelos, pela contribuição com a análise da composição da dieta experimental.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição pelos ensinamento, direcionamentos e gentileza em contribuir com nossa formação acadêmica. Deus os abençoe sempre.

Ao coordenador do PPGCN, Dr. Evandro Leite de Sousa, e ao Sr. Carlos, secretário do PPGCN, pela atenção, compreensão e orientação no cumprimento dos processos necessários à conclusão deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para execução deste trabalho e torceram para seu bom andamento e finalização. MUITÍSSIMO Obrigada!

*“Não fui eu que ordenei a você?
Seja forte e corajoso!
Não se apavore nem desanime,
pois o Senhor, o seu Deus,*

estará com você por onde você andar".

Josué 1:9

RESUMO

A obesidade é uma doença crônica multifatorial caracterizada por um elevado acúmulo de gordura corporal e um estado pró-inflamatório crônico associado a outras desordens como intolerância à glicose, dislipidemias, esteatose hepática, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e estresse oxidativo, e elevado risco cardiovascular, sobretudo, disfunções do endotélio, agregação plaquetária e hipertensão. As dietas hipercalóricas têm sido amplamente utilizadas para indução de obesidade e complicações metabólicas em estudos experimentais, e dessa forma, permitem o estudo de novas estratégias para o tratamento de inúmeras doenças crônicas. Assim, a carboximetilglucana (CMG), um derivado semissintético da $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow6)$ glucana da *Saccharomyces cerevisiae* tem despertado interesse por seus efeitos imunoestimulantes e alta capacidade antioxidante. Dessa forma, o estudo avaliou os efeitos da CMG frente a alterações metabólicas e cardiovasculares, induzidas pelo consumo de dieta hipercalórica em ratos. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPB (CEUA 074/2017). Ratos Wistar foram divididos em três grupos, NCT: normocalórico controle; HCT: hipercalórico controle; H-CMG: hipercalórico + CMG, o primeiro recebeu dieta padrão e solução salina, e os dois últimos receberam dieta hipercalórica, sendo o último grupo suplementado com CMG na dose 20 mg/kg/dia, durante 12 semanas. Os dados de peso e consumo alimentar foram avaliados ao longo do período experimental. A tolerância à glicose e os níveis de pressão arterial sistólica (PAS) foram avaliados na última semana e último dia de experimento, respectivamente. Ao final do estudo, foram analisados parâmetros de consumo alimentar e morfométricos, glicemia de jejum, perfil lipídico, inflamação e histologia, além dos níveis de agregação plaquetária, de estresse oxidativo e reatividade vascular. Testes estatísticos foram utilizados para verificar diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$). O tratamento com a CMG reduziu o consumo alimentar e o ganho de peso dos ratos, além de reduzir o acúmulo de gordura corporal, diminuindo os depósitos de gordura retroperitoneal e o índice de adiposidade. O acúmulo de gordura hepática também reduziu após o tratamento, evidenciado pelos testes histológicos e peso do fígado. Houve melhora do perfil glicêmico e lipêmico dos ratos, melhorando a sensibilidade à glicose e reduzindo os níveis de triglicerídeos, colesterol total e índice aterogênico. Quanto à inflamação, houve melhora significativa do estado pró-inflamatório observado nos animais do grupo HCT. O grupo H-CMG apresentou redução dos níveis de PCR, de IL-12 e da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), e aumento da IL-10, além disso, os testes histológicos sugeriram redução da inflamação tecidual com diminuição da infiltração de células inflamatórias. O efeito cardioprotetor também foi evidenciado pela capacidade antioxidante do composto que reduziu significativamente os níveis de ROS *in situ* e em plaquetas, melhorando a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e o vasorrelaxamento induzido pela acetilcolina (ACh). Diferenças significativas não foram observadas quanto a função contrátil, avaliada pela fenilefrina (FEN) e o vasorrelaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS), e a PAS não reduziu de forma significativa após o consumo da CMG. Por último, houve redução dos níveis de agregação plaquetária estimulada por agonistas biológicos como ADP (10 μ M) e Éster de Forbol (PMA, 100 ng/mL), favorecendo a redução do risco cardiovascular induzido pela dieta hipercalórica. O dados do estudo fornecem importantes evidências sobre o potencial biológico da CMG em reduzir os danos provocados pelo consumo de dieta hipercalórica e desponta como estratégia terapêutica para o tratamento de doenças relacionadas à obesidade e desordens cardiometabólicas.

Palavras-chave: Carboximetilglucana; Dieta Hipercalórica; Efeito cardioprotetor; Estresse oxidativo; Imunomodulação; Obesidade; Potencial antioxidante

ABSTRACT

Obesity is a multifactorial chronic disease characterized by high body fat accumulation and a chronic proinflammatory state associated with other disorders such as glucose intolerance, dyslipidemias, hepatic steatosis, increased production of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress, and high cardiovascular risk, especially endothelial dysfunction, platelet aggregation, and hypertension. Hypercaloric diets have been widely used to induce obesity and metabolic complications in experimental studies, and thus allow the study of new strategies for the treatment of numerous chronic diseases. Thus, carboxymethyl glucan (CMG), a semisynthetic derivative of *Saccharomyces cerevisiae* β (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6) glucan, has been of interest for its immunostimulant effects and high antioxidant capacity. Thus, the study evaluated the effects of CMG on metabolic and cardiovascular changes induced by the consumption of hypercaloric diet in rats. The Animal Use Ethics Committee approved all experimental protocols of UFPB (CEUA 074/2017). Wistar rats were divided into three groups, NCT: normal caloric control; HCT: hypercaloric control; H-CMG: hypercaloric + CMG, the first received standard diet and saline solution, and the last two received hypercaloric diet, the last group being supplemented with CMG at a dose of 20 mg/kg/ day for 12 weeks. Weight and food intake data were evaluated throughout the experimental period. Glucose tolerance and systolic blood pressure (SBP) levels were evaluated in the last week and last day of the experiment, respectively. At the end of the study, dietary and morphometric parameters, fasting blood glucose, lipid profile, inflammation, and histology were analyzed, as well as platelet aggregation, oxidative stress, and vascular reactivity levels. Statistical tests were used to verify significant differences between groups ($p < 0.05$). Treatment with CMG reduced the food intake and weight gain of rats, as well as reducing body fat accumulation, decreasing retroperitoneal fat deposits and adiposity index. Liver fat accumulation also decreased after treatment, as evidenced by histological tests and liver weight. There was an improvement in the glycemic and lipemic profile of rats, improving glucose sensitivity and reducing triglyceride, total cholesterol, and atherogenic index levels. Regarding inflammation, there was a significant improvement in the proinflammatory state observed in the animals of the HCT group. The H-CMG group showed a reduction in CRP, IL-12, and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) levels, and increased IL-10, and histological tests suggested a reduction in tissue inflammation with a decreased infiltration of inflammatory cells. The cardioprotective effect was also evidenced by the antioxidant capacity of the compound, which significantly reduced in situ and platelet ROS levels, improving nitric oxide (NO) bioavailability and acetylcholine-induced vasorelaxation (ACh). Significant differences were not observed in contractile function, as assessed by phenylephrine (FEN) and sodium nitroprusside-induced vasorelaxation (SPL), and SBP did not significantly decrease after CMG consumption. Finally, there was a reduction in platelet aggregation levels stimulated by biological agonists such as ADP (10 μ M) and Forbol Ester (PMA, 100 ng / mL), favoring the reduction of cardiovascular risk induced by the hypercaloric diet. The study data provide relevant evidence about the biological potential of CMG to reduce the damage caused by the consumption of high-calorie diet and emerges as a therapeutic strategy for the treatment of obesity-related diseases and cardiometabolic disorders.

Keywords: Antioxidant potential; Carboxymethyl glucan; Cardioprotective effect; Hypercaloric diet; Immunomodulation; Obesity; Oxidative stress

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TESE

- Figura 1** β -D-glucana é um dos componentes da parede celular de fungos..... 18
- Figura 2** Representação estrutural da B-D-Glucana modificada pelo processo de carboximetilação..... 26
- Figura 3** Desenho experimental do estudo..... 42

ARTIGO 01

- Figura 1** Effect of CMG on food intake (A) and caloric intake (B) in rats fed a control or hypercaloric diet for 12 weeks..... 77
- Figura 2** Effect of CMG on the initial weight normalized body weight gain curve in rats fed a control or hypercaloric diet for 12 weeks..... 79
- Figura 3** Effect of CMG on glucose after glucose overload in rats fed a control or hypercaloric diet for 12 weeks..... 80
- Figura 4** Effect of CMG on inflammatory parameters of rats fed a control or hypercaloric diet for 12 weeks..... 82
- Figura 5** Photomicrograph of cardiac tissue (A - C); liver tissue (D - F); renal tissue (G - I) and adipose tissue (J - L) of control (NCT), control hypercaloric (HCT) and treated hypercaloric (H-CMG) rats from left to right..... 83

ARTIGO 02

- Figura 1** Mean systolic blood pressure of rats from NCT, HCT, and H-CMG groups.....101
- Figura 2** Concentration-response curve for Phe (10^{-9} – 10^{-5} M) (A); ACh (10^{-10} – 10^{-5} M) and NPS (10^{-10} – 10^{-5} M) (C) in rings of mesenteric artery of rats fed a normocaloric diet, hypercaloric diet and treated with CMG.....102
- Figura 3** Effect of CMG on oxidative stress in mesenteric artery in rats fed a hypercaloric diet.....104

Figura 4 Effect of the oral administration of CMG (20 mg/kg), for 12 weeks, on the platelet aggregation induced by: 10 mM ADP (A) and 100 ng/mL PMA (B) in rats fed hypercaloric diets.....105

Figura 5 CMG effect on ROS production in platelets of rats fed a hypercaloric diet.....106

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TESE

Quadro 01 Principais efeitos da β -D-glucanas em estudos não clínicos e clínicos..... 22

Quadro 02 Principais efeitos da carboximetilglucana em estudos não clínicos e clínicos28

Quadro 03 Classificação internacional da obesidade, segundo o IMC..... 33

Quadro 04 Valores de referência indicativos de risco cardiovascular em homens e mulheres, segundo a circunferência abdominal, com base nos critérios do IDF e NCEP-ATPIII..... 34

Tabela 01 Composição centesimal (g/100 g) e valor energético (kcal/100 g) da ração hipercalórica utilizada no estudo..... 43

ARTIGO 01

Tabela 01 Metabolic parameters of rats from NCT, HCT, and H-CMG groups..... 78

Tabela 02 Biochemical parameters of rats from NCT, HCT, and H-CMG groups..... 81

ARTIGO 02

Tabela 01 Body weight gain and BMI of rats from NCT, HCT and H-CMG groups.....101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGLs	Ácidos Graxos Livres
AgRP	Agouti-Related Protein
AMPK	Proteína cinase ativada por AMP
ATP III	Adult Treatment Panel III
AUC	Cálculo da Área sob a Curva
AVE	Acidente Vascular Encefálico
CART	Cocaine and Amphetamine-regulated Transcript
CAT	Catalase
CCA	Conversão Alimentar
CCK	Colecistoquinina
CEA	Eficácia Alimentar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CMG	Carboximetilglucana
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DHE	Dihidroetídio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DS	Grau de Substituição
F2 IsoPs	F-2 isoprostanos
FEN	Fenilefrina
FSC	Forward Scatter
GLP1	Glucagon-like peptide-1
GPCC	Ganho de Peso por Consumo Calórico
GPx	Glutathione Peroxidase
H-CMG	Grupo tratado com CMG
HCT	Grupo experimental
HCT	Grupo que recebeu solução salina
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IDF	International Diabetes Federation
IDF	Federação Internacional do Diabetes
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
kDa	Quilodalton
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos
MDA	Malondialdeído
MM	Massa Molar
MRB	Modificadores de Resposta Biológica
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NCEP	National Cholesterol Education Program

NCT	Grupo controle normocalórico
NO	Óxido Nítrico
NPY	Neuropeptídeo Y
O ₂ ^{•-}	Ânions Superóxidos
OCT	Tissue Tek Compound
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução Salina Tamponada
PCR	Proteína C Reativa
PCR-us	Proteína C-reativa Ultrassensível
POMC	Pró-opiomelanocortina
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
PYY	Peptídeo YY
RCE	Relação Cintura/Estatura
RCQ	Circunferência Abdominal/Quadril
RI	Resistência à Insulina
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SOD	Superóxido Dismutase
TAB	Tecido Adiposo Branco
TG	Triglicerídeos
TNF	Fatores de Necrose Tumoral
TOTG	Teste Oral de Tolerância à Glicose
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
VCAM-1	Moléculas de Adesão Celular Vascular 1
Vigitel	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 β -D-GLUCANA	18
2.2 CARBOXIMETILGLUCANA	25
2.3 OBESIDADE	31
2.3.1 Diagnóstico e epidemiologia.....	31
2.3.2 Fisiopatologia e complicações clínicas da obesidade	34
2.3.3 Indução de obesidade em modelos animais.....	38
3 ABORDAGEM METODOLÓGICA.....	41
3.1 TIPO DE ESTUDO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	41
3.2 OBTENÇÃO DA CARBOXIMETILGLUCANA (CMG)	41
3.3 ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL	41
3.4 DIETA	42
3.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CORPORAIS E DE CONSUMO ALIMENTAR.....	43
3.6 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE.....	44
3.7 MEDIDA INDIRETA DE PRESSÃO ARTERIAL.....	44
3.8 MEDIDA DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA	45
3.9 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	45
3.10 EXPERIMENTOS <i>in vitro</i>	45
3.11 ESTUDOS DE REATIVIDADE VASCULAR	46
3.12 HISTOLOGIA DE ÓRGÃOS E TECIDOS.....	46
3.13 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÂNIONS SUPERÓXIDOS ($O_2^{\cdot-}$) EM PLAQUETAS.....	47
3.14 DETERMINAÇÃO <i>IN SITO</i> DE ROS.....	47
3.15 MEDIDA DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.....	48
3.16 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	48
REFERÊNCIAS	49
APÊNDICES.....	57
ARTIGO 01.....	59
ARTIGO 02.....	85
ANEXOS.....	107
CERTIDÃO DE APROVAÇÃO.....	108

1 INTRODUÇÃO

As β -D-glucanas são polissacarídeos que podem ser extraídos de leveduras, fungos e de alguns cereais e tem recebido especial atenção por suas propriedades bioativas. A parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* é uma importante fonte de β -D-glucana constituída por um esqueleto linear central de unidades de glicose ligadas na posição β (1-3) e cadeias laterais unidas por ligações β (1-6), que ocorrem em diferentes intervalos e têm tamanhos variados. Essas ramificações são do tipo espécie específica, uma vez que os fungos possuem cadeias laterais com ligações β (1-6) e as bactérias β (1-4) (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008; CHAN; CHAN; SZE, 2009; KAGIMURA et al., 2015).

O derivado carboximetilado (carboximetilglucana – CMG) da β -(1-3)(1-6) glucana, obtido por meio de modificações químicas que substituem parcialmente os grupos hidroxilas existentes por grupos carboxilas, tem apresentado em suas propriedades físico-químicas menor massa molar, alta solubilidade em água e elevado grau de ramificação, essas características tem conferido ao polissacarídeo um aumento da afinidade por receptores de células imunes no organismo e consequente melhora da resposta biológica (TAO; ZHANG; CHEUNG, 2006; MAGNANI et al., 2009; KAGIMURA et al., 2015).

Entre as principais atividades associadas a moléculas derivadas de glucanas, destaca-se a ação da carboximetilglucana, com destaque para os efeitos antioxidantes e cardioprotetores, como melhora do efeito vasorrelaxante mediado por NO e da sensibilidade barorreflexa e redução dos níveis de agregação plaquetária em modelos experimentais, além de efeitos hipolipemiantes (PISAREVA et al., 2014; BEZERRA et al., 2017; CARVALHO-GALVÃO et al., 2018). Em adição, importantes atividades anticarcinogênicas, antimutagênicas e imunomoduladoras estão associadas a estes derivados carboximetilados (CHEN; ZHANG; CHEUNG, 2010; MAGNANI, 2010; MAGNANI et al., 2011).

Assim, é importante investigar o potencial biológico da carboximetilglucana frente às alterações induzidas pelo consumo de dietas hipercalóricas em modelos animais, uma vez que estudos evidenciam a eficácia desses polímeros no tratamento de algumas doenças crônicas, porém, poucos estudos evidenciam o potencial de glucanas estruturalmente modificadas e extraídas de fontes não alimentares em ratos alimentados com dietas hipercalóricas e hiperlipídicas.

Alguns modelos animais que desenvolvem doenças crônicas como obesidade, diabetes, hipertensão e alterações vasculares induzidas pelo consumo de dietas com elevada

quantidades de calorias vêm sendo amplamente estudados, tanto para melhorar a compreensão da progressão dos sintomas e a gênese da doença, como para testar potenciais intervenções terapêuticas (SUMAN et al., 2016; SPEAKMAN, 2019).

A obesidade é uma doença crônica multifatorial que envolve fatores genéticos, metabólicos e comportamentais, além de um desequilíbrio persistente do balanço energético. Trata-se de um importante fator de risco para várias doenças crônicas, tais como o diabetes, doenças vasculares e cânceres, a prevenção e tratamento da obesidade vem sendo considerada fundamental em políticas públicas de saúde em todo o mundo (TIAN et al., 2013; HEYMSFIELD; WADDEN, 2017).

Dessa forma, diante das várias propriedades benéficas atribuídas às fibras do tipo glucanas e seus derivados, e tendo em vista a elevada prevalência de indivíduos acometidos por um conjunto de fatores de elevado de risco cardiovascular e alta mortalidade em todo o mundo, relacionados ao excesso de peso e obesidade, o presente estudo faz-se necessário para investigar os efeitos benéficos do derivado carboximetilado de glucanas, frente às alterações induzidas pelo consumo de dietas hipercalóricas em ratos.

O referido estudo tem como objetivo geral avaliar o potencial da carboximetilglucana, extraída da parede celular de *S. cerevisiae*, frente às alterações corporais, metabólicas e cardiovasculares induzidas pelo consumo de dieta hipercalórica em ratos. E assim, avaliou seu efeito sobre parâmetros corporais e de consumo alimentar, sobre o perfil glicêmico e lipêmico e seus efeitos sobre a função cardiovascular, como controle da pressão arterial, disfunção endotelial e agregação plaquetária, bem como sobre a capacidade antioxidante e anti-inflamatória exercida pela carboximetilglucana.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 β -D-GLUCANA

As D-glucanas são biopolímeros de carboidratos constituídos por unidades de glicose que se ligam através de ligações glicosídicas do tipo α ou β . Apesar da simplicidade da sua composição de monossacarídeos, pode-se encontrar uma grande diversidade no número e na configuração anomérica das unidades de glicose, a posição e sequência de ligações glicosídicas ao longo da cadeia polimérica, o grau de ramificação bem como a frequência dos pontos ramificados ao longo da cadeia e a conformação da mesma contribuem para a elevada variabilidade estrutural da molécula e capacidade bioativa (KAGIMURA, 2015).

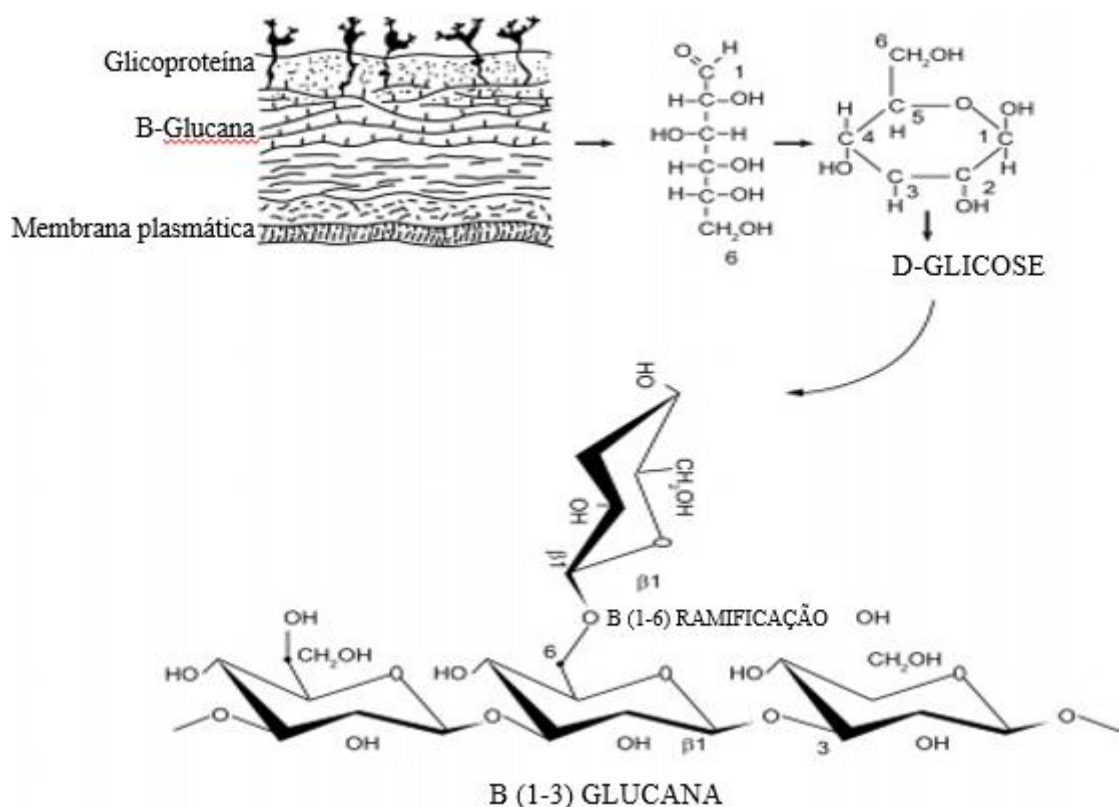
As glucanas podem ser oriundas de plantas, algas marinhas, bactérias, fungos e leveduras. Nesse último grupo, destacam-se o gênero *Saccharomyces* por serem amplamente utilizadas em processos tecnológicos e representar uma importante fonte para obtenção deste polímero. A β -D-glucana extraída da parede celular da *Saccharomyces cerevisiae* é constituída por um esqueleto linear central de unidades de glicose ligadas na posição β (1-3) com cadeias laterais unidas em β (1-6), que ocorrem em diferentes intervalos e têm tamanhos variados (Figura 1). Essas ramificações parecem ser espécie específica, uma vez que os fungos possuem cadeias laterais com ligações β (1-6) e as bactérias β (1-4) (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008; CHAN; CHAN; SZE, 2009).

Importante considerar que a β -D-glucana também está presente em alguns cereais, como aveia, cevada, trigo e centeio e apresentam estruturas com cadeias laterais unidas em β (1-4). Enquanto a aveia e cevada apresentam uma maior abundância de glucanas, o trigo e centeio as apresentam em menor quantidade, porém a determinação de tais características dependem de fatores genéticos e ambientais (CLOETENS et al., 2012). As β -glucanas ganharam especial interesse da indústria de alimentos funcionais, com destaque inicial para aquelas de origem alimentar que compõem uma ampla linha de pesquisa sobre suas funcionalidades.

Nesse sentido, os polissacarídeos como as β -D-glucanas representam, estruturalmente, uma classe diversa de macromoléculas com larga ocorrência na natureza. Estudos têm revelado que tanto a massa molar como a hidrosolubilidade desses polímeros, as quais dependem da ramificação estrutural e modificações químicas, são propriedades críticas para o uso clínico destas moléculas. A β -D-glucana, alvo desse estudo, isolada de *S. cerevisiae* possui uma massa molar em torno de 350 kDa e grau de ramificação de 3 a 6%, já sua forma

carboximetilada, possui massa molar de aproximadamente 220 kDa e grau de substituição (DS) de 0,8 (MAGNANI et al., 2009), corroborando com dados já existentes na literatura que revelam que DS entre 0,56 e 0,89 são considerados ótimos para os derivados carboximetilados de β -D-glucanas, garantindo-lhes uma alta solubilidade em água (ŠANDULA et al., 1999; MIADOKOVA et al., 2005).

Figura 1 – β -D-glucana é um dos componentes da parede celular de fungos.



Fonte: CHAN; CHAN; SZE, 2009.

Quanto a influência da massa molar sobre a eficácia da β -D-glucana existem, na literatura, relatos discordantes (BOHN; BEMILLER, 1995; EL ENSHASY; HATTI-KAUL, 2013). Algumas evidências apontam que as glucanas mais eficazes clinicamente possuem massa molar (MM) acima de 200 kDa, principalmente por sua afinidade aos receptores das células imunes (EL ENSHASY; HATTI-KAUL, 2013), porém outros estudos demonstram potenciais atividades em glucanas de menor MM, a exemplo da escleroglucana, uma fração ramificada (β 1-6), com menos de 5 kDa, que exibe uma potente atividade imunoestimulante, aumentando a produção do TNF-alfa e a proliferação linfocitária (BIMCZOK et al., 2009) e a

lentinana de baixo peso molecular que apresenta uma elevada atividade antitumoral (ZHANG et al., 2005).

Apesar de haver descrição na literatura de β -D-glucanas lineares com significativa atividade biológica (JAMOIS et al., 2005; CHEN; SEVIOUR, 2007), aquelas ramificadas geralmente apresentam uma maior variedade de efeitos biológicos, como também uma maior potência e eficácia farmacológica (EL ENSHASY; HATTI-KAUL, 2013). Tem-se sugerido que os mais ativos apresentam grau de ramificação entre 20 e 33% (KIM et al., 2000; CHEN; SEVIOUR, 2007; MAGNANI et al., 2012).

Outro ponto importante que corrobora para o aumento da eficácia é a modificação química, e como exemplo desse processo pode-se destacar a derivatização da molécula (sulfonilação, carboximetilação, fosforilação, acetilação) que contribui para o aumento da sua solubilidade que, por sua vez, pode melhorar atividades biológicas, como antioxidação e anticoagulação (KAGIMURA et al., 2015).

A literatura sugere que estes polímeros apresentam bioatividade, sobretudo no que se refere à imunomodulação. Além disso, evidências têm mostrado efeitos biológicos associados a β -D-glucana, os quais são benéficos à saúde. Dentre eles, há descrição de ação antitumoral, ativação leucocitária, antimitagênico, hipocolesterolêmico, antioxidante e hipoglicêmico (OOI; LIU, 2000; BROWN et al., 2003; KRIZKOVÁ et al., 2003; AKRAMIENE et al., 2007; CHAN; CHAN; SZE, 2009; CLOETENS et al., 2012).

Farmacologicamente, esse polímero pertence à classe dos Modificadores de Resposta Biológica (MRB) e possuem a habilidade de estimular componentes celulares do sistema imune (BOHN; BEMILLER, 1995; SALUK-JUSZCZAK; KROLEWSKA; WACHOWICZ, 2010). Assim, já bem descritos como imunomoduladores e com alvos moleculares bem estabelecidos, que estão presentes em componentes celulares do sistema imune (Tipo de Receptores: Dectin-1; Receptor do Sistema Complemento 3, CR-3; "Scavengers", grupo heterogêneo de moléculas; Lactosil – Ceramida, LacCer; Receptor "Toll-like", TLR4), o uso das β -D-glucanas possui um impacto positivo sobre cânceres e infecções bacterianas, bem como são benéficas para indivíduos de meia idade, pessoas com vida potencialmente estressante e em atletas (BROWN et al., 2003; CHEN; SEVIOUR, 2007; CHAN; CHAN; SZE, 2009).

Importantes efeitos sobre o ganho de peso e desordens associadas à obesidade são relatados na literatura, sobretudo, com glucanas de origem alimentar derivadas da aveia,

cevada e centeio. Xu; Zou; Xu (2017) e Xin-Zhong et al. (2015) relatam o potencial benéfico do consumo de glucanas em ratos alimentados com dieta hipercalórica sobre a redução do ganho de peso corporal e controle metabólico, havendo melhora do perfil glicêmico e lipídico e consequentemente redução da progressão do diabetes e doenças cardiovasculares. Outro estudo com glucanas de aveia de diferentes pesos moleculares demonstrou uma redução significativa do ganho de peso final e do coeficiente de eficiência alimentar, além de melhora dos níveis de triglicerídeos e colesterol total, não havendo diferenças significativas entre as glucanas (BAE et al., 2009).

Alguns estudos têm buscado demonstrar que o papel benéfico destes compostos associado a redução do ganho de peso e melhora do perfil metabólico é atribuído a sua capacidade em reduzir a ingestão alimentar e consumo calórico em consequência do aumento da saciedade, com redução da sensação de fome e aumento da plenitude através da participação de peptídeos intestinais, como PYY e GLP-1, que atuam no hipotálamo auxiliando no controle da fome e saciedade (VITAGLIONE et al., 2009; ZAREMBA et al., 2018).

Silva et al. (2018) em seu estudo com glucanas derivadas de fungos observou importantes atividade na redução do ganho de peso corporal e adiposidade central e melhora de parâmetros glicêmicos, perfil lipídico e diminuição da esteatose hepática induzida pelo consumo de dietas hipercalóricas em ratos. O estudo ainda demonstrou de forma inédita a capacidade deste polímero em modular a expressão da AMPK e FOXP3 em tecido adiposo de ratos obesos.

O efeito anti-inflamatório da β -D-glucana extraída de leveduras foi evidenciado em indivíduos com sobrepeso e obesidade. Neste estudo clínico, duplo-cego, controlado por placebo, 44 participantes com IMC $> 23 \text{ kg/m}^2$, randomizados em dois grupos, receberam uma cápsula com 477 mg de β -D-glucana ou placebo, durante seis semanas. Após a intervenção, os indivíduos tratados apresentaram diminuição da circunferência da cintura e da pressão arterial e elevação da interleucina 10 (IL-10) e diminuição das interleucinas pro-inflamatórias, interleucina 6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral (TNF α) demonstrando um importante efeito cardioprotetor de fatores de risco relacionados ao excesso de peso (MOSIKANON et al., 2017).

A atividade protetora de componentes fúngicos sobre o sistema cardiovascular também vem sendo estudada. Ação anti-hipercolesterolêmica em humanos (NICOLOSI et al.,

1999a; EL KHOURY et al., 2012), redução de tamanho de infarto em modelos de isquemia e reperfusão em porcos (AARSAETHER et al., 2012) vem sendo evidenciadas para as β -D-glucanas, porém a atividade sobre a pressão arterial parece não estar diretamente relacionada a estas moléculas (HAGIWARA et al., 2005). Porém, ainda são poucos os estudos que abordam sua atividade antiagregante e modulatória sobre células endoteliais (SALUK-JUSZCZAK; KROLEWSKA; WACHOWICZ, 2010) .

Neste contexto, em relação à atividade antiagregante, observa-se resultados relacionados à forma linear (β 1-3) da β -D-Glucana isolada de *S. cerevisiae*, os quais demonstram uma significativa atividade antiplaquetária e antioxidante (SALUK-JUSZCZAK; KROLEWSKA; WACHOWICZ, 2010). Estudo recente demonstrou a atividade antiagregante da β -D-Glucana e de seu derivado solúvel em ratos Wistar tratados durante oito dias, ambos tratamentos, demonstraram inibição da agregação estimulada por ADP, porém, apenas os animais tratados com β -D-glucana demonstraram influência na agregação estimulada por colágeno, além disso, o estudo demonstrou efeito positivo no vasorrelaxamento dependente de NO (BEZERRA et al., 2016). Tais efeitos dão suporte a mais estudos que busquem esclarecer os efeitos cardioprotetores dessa substância e elucidar por quais vias elas atuam.

Um estudo de revisão realizado por Bashir; Choi (2017) inclui ainda as funções antiobesidade, antialérgica e antiosteoporótica. Quando a atividade antiosteoporótica, esta justifica-se pelo aumento da densidade mineral óssea e da biodisponibilidade do cálcio. As ações relacionadas a antiobesidade mostram efetividade na intolerância à glicose, na hiperglicemia de jejum, no acúmulo de triglicérides hepáticos e hipercolesterolemia, nas nefropatias, além da melhoria ou restauração da composição e atividade da microbiota intestinal. Em relação às propriedades antitumorais, no mesmo estudo evidenciou-se a atividade antitumoral e potencial de redução da viabilidade de células cancerígenas associadas a não toxicidade nas células saudáveis.

Constata-se, portanto, que as glucanas estão entre as mais importantes moléculas dos grupos de polissacarídeos de origem alimentar e produzidos por microrganismos com importante atividade na estimulação do sistema imunológico e potencial no tratamento de doenças humanas com elevadas taxas de morbimortalidade em todo o mundo, além disso, as formas quimicamente modificadas devem ser estudadas, pois têm demonstrado relevantes e amplificados efeitos biológicos no tratamento de inúmeras doenças. Um resumo com estudos não clínicos e clínicos sobre os principais efeitos de glucanas, de origem alimentar e não

alimentar, bem como a dose utilizada e o tempo de administração da substância está apresentado no Quadro 01.

Quadro 1 – Principais efeitos da β -D-glucanas em estudos não clínicos e clínicos.

FONTE	DOSE/ TEMPO DE ADMIN.	ORIGEM	DESENHO DO ESTUDO	PRINCIPAIS CONCLUSÕES
BAE, et al. (2009)	β -Glucana de diferentes pesos moleculares (1.450.000 g/mol, 730.000 g/mol, 370.000 g/mol) adicionada a uma dieta rica em gordura, durante 6 semanas.	β -Glucana de aveia	Camundongos com quatro semanas de idade. 4 grupos (n=10)	A adição de β -Glucana reduziu significativamente o peso dos animais, porém, a glucana de maior peso molecular foi a mais eficiente na redução do ganho de peso. A β -Glucana foi eficiente em melhorar o perfil lipídico dos animais, reduzindo o colesterol e TG em relação ao controle, sem diferenças significativas entre as glucanas.
BEZERRA, et al. (2016)	20 mg/kg de peso ao dia de β -Glucana e derivado carboximetilado (CMG), durante 8 dias	β -Glucana de <i>S.cerevisae</i>	Ratos Wistar, divididos em 3 grupos (n=08)	As substâncias apresentaram efeito cardioprotetor reduzindo a agregação plaquetária e melhorando o vasorrelaxamento (CMG/NPS). Além disso, a CMG reduziu os níveis de IL-8. Sugerindo potencial ação para o tratamento

				de doenças cardiovasculares
MOSIKANON, et al. (2017)	477 mg/cápsula de β -glucana ou placebo por via oral, durante seis semanas.	β -glucana de levedura	44 participantes com sobrepeso/obesidade com índice de massa corporal $\geq 23 \text{ kg/m}^2$, randomizados para dois grupos	Redução da circunferência da cintura e pressão arterial. Aumento da interleucina-10 (IL-10), redução das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e o TNF- α
NICOLOSI, et al. (1999)	15g de fibra/dia por 8 semanas e interrompidos por 4 semanas. Níveis plasmáticos aferidos nas semanas 7, 8 e 12.	β -glucana de levedura	15 homens obesos e hipercolesterolêmicos	A fibra β -glucana derivada de levedura reduziu significativamente e as concentrações de colesterol total e LDL-c e ao final de 12 semanas observou-se um aumento do HDL-c. Não houve diferenças nos níveis de TG.
SALUK-JUSZCZAK; KROLEWSKA; WACHOWICZ, (2010)	Estudo <i>in vitro</i>	β -glucana de levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Utilizado o método de redução do citocromo c para testar a capacidade do beta-glucano para alterar a geração de ânion superóxido em plaqueta e seu efeito na cascata enzimática do ácido araquidônico.	O β -glucana reduziu a via do ácido araquidônico e a geração do radical ânion superóxido em plaquetas estimuladas por agonistas (trombina, ADP e colágeno). Sugerindo efeitos inibitórios na agregação e secreção plaquetária. O estudo também sugere atividade antioxidante.
SILVA, et al. (2018)	12 mg/kg de peso, via gavagem, por 15 dias	<i>Botryosphaera</i> n [(1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6) - β -D-glucana]	Ratos Wistar adultos com obesidade induzida por ingestão de dieta hipercalórica e água	Significativa redução de consumo de ração, de ganho de peso, de

			com sacarose (300 g/L) por 8 semanas, e ratos controle que receberam dieta padrão. O estudo foi composto por três grupos (n=08)	gordura periepídídima e mesentérica e melhorou a tolerância à glicose. Reduziu, ainda, triglicérides e VLDL, e aumentou os níveis de HDL. Além de aumentar o glicogênio e reduzir os lipídios totais, triglicérides e colesterol no fígado, e aumentar a atividade da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e a expressão da proteína do fator de transcrição (FOXO3a) no tecido adiposo.
VITAGLIONE et al. (2009)	3% de β -glucana adicionada a um pão no café da manhã e um grupo placebo.	β -glucana de cevada	14 voluntários: 7 homens e 7 mulheres (idade entre 20-29 anos; média de IMC $22.9 \pm 2.8 \text{ kg/m}^2$)	β-glucana aumentou a saciedade e reduziu a fome, com diminuição de 19% da ingestão calórica no almoço. Redução da grelina e aumento do PYY plasmático. Melhora da resposta glicêmica. A glucana de cevada demonstrou capacidade em controlar o apetite a curto

				prazo, modulando a sensação de fome e reduzindo o consumo de energia.
ZAREMBA, et al. (2018)	4 g/dia de β -glucana de aveia adicionada ao café da manhã e um grupo placebo, seguido de uma refeição livre em dois dias diferentes	β -glucana de aveia, de alto peso molecular	33 participantes, 22 do sexo feminino e 11 do sexo masculino (idade $26,9 \pm 1,0$ anos; peso $68,1 \pm 2,0$ kg; IMC $23,5 \pm 0,4$ kg / m ² ; circunferência da cintura $78,0 \pm 1,5$ cm) Delineamento cruzado duplo-cego, randomizado.	Aumento da percepção de plenitude e saciedade, porém não reduziu a ingestão calórica e quantidade da refeição livre. A β -Glucana diminuiu o apetite e modulou benéficamente a glicemia pós-prandial. No entanto, não aumentou a secreção plasmática de GLP-1

Fonte: autor, 2018.

2.2 CARBOXIMETILGLUCANA

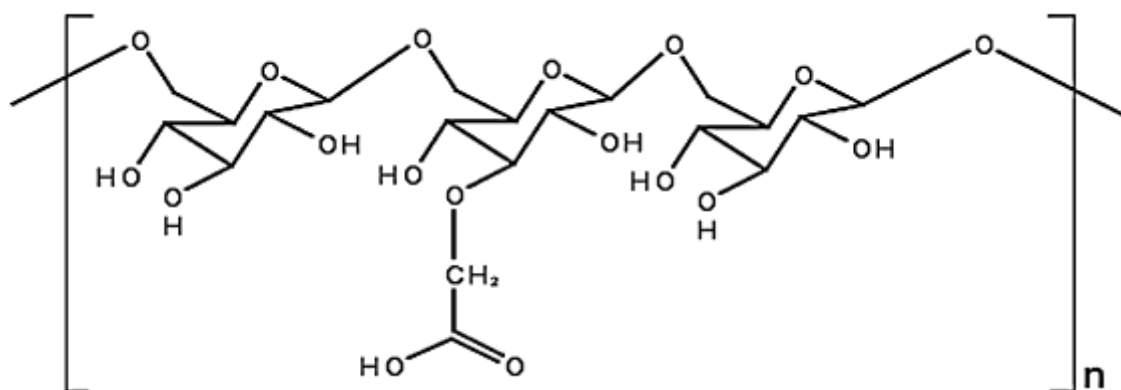
A modificação estrutural dos polissacarídeos visa potencializar os efeitos biológicos e ampliar suas aplicações, dessa forma, são produzidos os derivados carboximetilados, fosforilados, acetilados e sulfatados com o objetivo de melhorar a bioatividade e propriedades funcionais, como antioxidante, antitumoral, antiagregante e imunomodulatória. Assim, espera-se que processos como o de derivatização por carboximetilação seja uma estratégia eficiente para o desenvolvimento de glucanas como agentes terapêuticos (EL ENSHASY, HESHAM; HATTI-KAUL, 2013; KAGIMURA et al., 2015)

A forma carboximetilada (CMG), a qual é obtida através da substituição de grupos hidroxilas por grupos carboxilas (Figura 2), é normalmente realizada através da suspensão do biopolímero em ácido cloroacético sob condições alcalinas, e a derivatização é controlada por titulação potenciométrica (MAGNANI et al., 2009). No caso de formas carboximetiladas, ocorre um aumento da afinidade entre o polissacarídeo e o receptor da célula imune e

consequentemente melhora da resposta biológica (TAO; ZHANG; CHEUNG, 2006; CHEN; ZHANG; CHEUNG, 2010; EL ENSHASY; HATTI-KAUL, 2013). Porém, há pesquisadores que acreditam que este aumento da resposta é apenas devido ao aumento da solubilidade do composto em teste (TAO; ZHANG; CHEUNG, 2006).

Em relação a bioatividade tem-se demonstrado que essa modificação química, em B-D-glucanas oriunda de fungos variados, desencadeou uma melhora nas propriedades físico-químicas e biológicas. Foi observado aumento da solubilidade, da capacidade antioxidante e também atividade anticarcinogênica e imunomoduladora, tanto *in vitro* como *in vivo* (KAGIMURA et al., 2015). Em pacientes com câncer de próstata avançado, verificou-se que o tratamento com CMG resultou em proteção contra danos ao DNA, aumento da contagem total de linfócitos, das células sanguíneas vermelhas, hematócrito, hemoglobina e plaquetas (MAGNANI, 2010; MAGNANI et al., 2011).

Figura 2 – Representação estrutural da B-D-Glucana modificada pelo processo de carboximetilação



FONTE: KAGIMURA et al., 2015

Ação antitumoral e imunomodulatória atribuída a CMG também foi observada quando isolada do *Phellineus linteus* demonstrando atividade citotóxica contra células de fibrosarcoma humano HT1080, sendo efetivo na supressão do crescimento do tumor. Também se observou maior produção de óxido nítrico (NO) em células broncoalveolares em comparação com a β -D-glucana nativa. A indução da síntese de NO foi de maneira dose-dependente. Entretanto, também foi verificado uma leve redução na atividade sequestrante de radical livre (SHIN et al., 2007).

O derivado carboximetil sulfatado de β -D-glucana extraída do *Poria cocos* em ratos com sarcoma foi capaz de inibir o crescimento do tumor, sendo observado sinais de necrose e apoptose. Ainda verificou-se aumento da atividade dos fagócitos, sugerindo uma ação imunomodulatória. Os autores presumem que a modificação química melhorou o contato do polissacarídeo com os receptores das células imunes através de ligações de hidrogênio e atração eletrostática, levando a uma forte resposta imunológica que resultou na inibição da proliferação das células cancerígenas (CHEN, X.; ZHANG; CHEUNG, 2010).

Em estudo que testou a CMG, o derivado do sulfoetil isolada da *Saccharomyces cerevisiae* e o carboximetil quitina-glucana extraída do *Aspergillus niger* foi demonstrado que a CMG teve maior capacidade de diminuir a atividade genotóxica nos testes *in vitro* em células do pulmão de hamster, quando comparado com os outros derivados testados. Esse resultado indica efeito protetor contra danos oxidativos no DNA (SLAMENŇOVÁ et al., 2003).

Quanto aos potenciais efeitos antioxidantes destes compostos, estudos de Babincová et al. (2002) que propõem uma análise comparativa da CMG de *S. cerevisiae* com outros antioxidantes conhecidos como o tocoferol, destacou a ação moduladora de respostas inflamatórias, em decorrência das propriedades antioxidantes e atuação como depuradora de radicais livres, substâncias responsáveis pelo envelhecimento e comprometimento celular que, por sua vez, atua como condicionante de doenças neurodegenerativas e neoplásicas. Em outro estudo realizado com indivíduos saudáveis, a CMG reduziu os níveis de malondialdeído, demonstrando que esse polímero pode ser útil na prevenção do estresse oxidativo (ARAÚJO et al., 2015).

Chen et al. (2014) verificaram em estudos *in vitro* que a CMG extraída do *Ganoderma atrum* mostrou ação antioxidante e também melhorou a capacidade de fagocitose nos macrófagos bem como a secreção do TNF- α , demonstrando atividade imunomodulatória. Esses efeitos foram influenciados pelo grau de substituição na cadeia do polissacarídeo indicando que o grau de modificação química é relevante para a bioatividade desses derivados.

Diferentes tipos de derivados da β -D-glucana oriunda da *Poria cocos*, sendo a forma sulfatada, a carboximetil sulfatada e a carboximetilada, também apresentaram atividade antioxidante em ensaios *in vitro*. No entanto, a carboximetilglucana demonstrou ação sequestrante de radicais livres mais significativa. Em estudo anterior foi constatado efeito

antioxidante e capacidade de ligação aos ácidos biliares *in vitro* (WANG et al., 2014; WANG; YU; MAO, 2009).

Estudos realizados por Machová; Cizová; Bystrický (2014), ao procederem comparação com polissacarídios originais, ou não derivados, fazem referência a efetividade da propriedade antioxidante das glucanas após o processo de carboximetilação.

A ação da CMG sobre o sistema cardiovascular e hemostático também vem sendo evidenciados. A forma carboximetilada obtida de *S. cerevisiae* aumentou a potência da resposta vascular desencadeada por doador de óxido nítrico, exercendo assim efeito vasorrelaxante. Essa CMG também foi eficaz na inibição da agregação plaquetária induzida por ADP e colágeno, sem afetar a exposição da P-selectina e com efeito semelhante ao ácido acetilsalicílico, que é considerado um antiplaquetário clássico. Além disso, foi verificado redução nos níveis de IL-8, apontando para uma ação anti-inflamatória (BEZERRA et al., 2017). Outro estudo, em que foi constatado ação hipolipemiante em ratos submetidos a condições de hiperlipidemia, corrobora o efeito cardioprotetor da CMG (PISAREVA et al., 2014).

Ainda com base nos efeitos cardioprotetores, estudos realizados por Carvalho-Galvão et al. (2018) avaliaram a pressão arterial, sensibilidade barorreflexa e modulação vascular simpática em ratos com hipertensão renovascular. É considerável que existe uma relação direta entre a redução da sensibilidade barorreflexa arterial, a hiperatividade simpática e a hipertensão arterial, de modo que, para o experimento, os pesquisadores utilizaram carboximetilglucana com tratamento diário de 40 mg/kg por duas semanas, demonstrando melhora da hipertensão e restauração da sensibilidade barorreflexa arterial.

Dessa forma, avaliar o potencial da carboximetilglucana frente as alterações associadas ao consumo de dietas hipercalóricas, intimamente relacionadas a doenças como obesidade, intolerância à glicose, diabetes e doenças cardiovasculares de elevada prevalência e alta mortalidade em todo o mundo, torna-se fundamental a fim de fornecer dados quanto a sua eficiência e potencial biológico frente a estas doenças, bem como, elucidar os mecanismos pelos quais tais compostos exercem seus efeitos e se há superioridade em relação aos grupos, já conhecidos, de glucanas.

Abaixo, um resumo com estudos não clínicos e clínicos sobre os principais efeitos da carboximetilglucana de origem alimentar e não alimentar, bem como a dose utilizada e o tempo de administração da substância estão apresentados no Quadro 2.

Quadro 2 – Principais efeitos da carboximetilglucana em estudos não clínicos e clínicos.

FONTE	DOSE/TEMPO DE ADMIN.	ORIGEM	DESENHO DO ESTUDO	PRINCIPAIS CONCLUSÕES
ARAÚJO et al. (2015)	CMG 50 mg/kg/dia, durante 60 dias	β -glucana derivada de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52 policiais militares saudáveis, entre 26 e 37 anos.	Os resultados demonstraram a capacidade da CMG em reduzir o estresse oxidativo em humanos, diminuindo significativamente os níveis de MDA.
BABINCOVÁ, et al. (2002)	<i>In vitro</i>	CMG de β -glucana (1 $\rightarrow$ 3) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Medir a capacidade de reduzir os radicais produzidos com o reagente de Fenton (H ₂ O ₂ / Fe ²⁺) foram estudados usando espectrofotometria de absorção visível no ultravioleta	Verificou-se que o carboximetilado o (1 $\rightarrow$ 3) β -glucana é um antioxidante com a capacidade de eliminação entre a do α -tocoferol, que é conhecido por ser incorporado na bicamada lipídica, e o antioxidante solúvel em água, o manitol.
CARVALHO-GALVÃO et al. (2018)	CMG de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 40 mg/kg/dia, por via oral, durante duas semanas	CMG de β -glucana (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6) da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ratos Wistar foram divididos em quatro grupos: Sham (n = 10); 2K1C (hipertensão renovascular, n = 10); Sham + CM-G (tratado com CM-G, n = 7) e 2K1C + CM-G (tratado com CM-G, n = 7).	A administração da CMG reduziu a hipertensão renovascular induzida por clip na artéria renal e melhorou o barorreflexo. Os efeitos parecem estar associados a uma redução na atividade simpática. Demonstrou, pela primeira vez, que a CMG reduz a hipertensão e restaura a sensibilidade barorreflexa.

CHEN, et al. (2014)	<i>In vitro</i>	Polissacarídeo solúvel em água extraído de <i>Ganoderma atrum</i>	O composto foi quimicamente modificado para obter seus derivados acetilados e carboximetilados a fim de medir suas capacidades antioxidantes e imunomoduladoras para determinar a relação estrutura-bioatividade.	O derivado acetilado com grau de substituição adequado e menor peso molecular exibiu capacidades antioxidantes mais fortes na eliminação do radical DPPH, e efeitos inibitórios nos sistemas de β -caroteno-ácido linoléico em comparação com o polissacarídeo nativo. Aumentou, ainda, a capacidade de fagocitose dos macrófagos e a secreção do TNF- α , enquanto o derivado carboximetilado mostrou ser um pouco menos efetivo.
PISAREVA, et al. (2014)	O (1-3) - β -D-glicano (β -glicano, Instituto de Química, Academia Eslovaca de Ciências, Bratislava) carboxilmetilado solúvel em água foi injetado intraperitonealmente numa dose única de 25 mg/100 g de peso corporal, em administração combinada, 24 h antes da P-407.	(1-3) - β -D-glicano (β -glicano, Instituto de Química, Academia Eslovaca de Ciências, Bratislava) carboxilmetilado solúvel em água	Foram utilizados Camundongos CBA machos com 2,5 a 3 meses de idade, pesando 22-25 g. O P-407 (Pluronic F-127, Sigma) foi administrado por via intraperitoneal em dose única de 300 mg/kg, induzindo lipemia moderada correspondente àquela observada em	Administração preliminar de (1-3) - β - D-glicano impediu o aumento na atividade de quitotriosidase induzida por P 407, provavelmente devido à ação hipolipidêmica da (1-3) - β - D-glicano.

			humanos com aterosclerose.	
SLAMENŇOV Á, et al. (2003)	150, 750 1500 mg/ml por 24h <i>In vitro</i>	β -glucana da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e do fungo filamentoso <i>Aspergillus niger</i> , fôrmulas solúveis: carboximetil glucana (CMG) e sulfoetil glucana (SEG).	Investigação do efeito protetor dos derivados de glucana preparados contra o dano oxidativo ao DNA induzido por H ₂ O ₂ e azul de metileno em células de pulmão de hamster V79. O nível de dano no DNA (quebras de fita de DNA) foi medido usando a eletroforese em gel de célula única, o chamado ensaio cometa.	Sugere-se que as glucanas analisados exibem efeitos protetores contra o dano oxidativo ao DNA como consequência da eliminação de ambos radicais livres *OH e superóxido.
WANG, et al. (2014)	<i>In vitro</i>	(1 → 3) β -glucana derivada de <i>Poria cocos</i>	Foram sintetizados três tipos de derivados (1 → 3) β -glucana: sulfatados (SP), carboximetil glucano (CMP) e carboximetil glucano sulfato (S-CMP). Potenciais atividades antioxidantes de S-P, CMP e S-CMP foram avaliadas <i>in vitro</i> . Foram realizados experimentos de eliminação de radicais livres, tais como 1,1-difenil-2-picrilhidrazil	Foram estudados os efeitos inibitórios para peroxidação lipídica, dano oxidativo ao DNA, hemólise eritrocitária e produção de MDA. E S-CMP aumentou significativamente a atividade antioxidante da β -glucana. Os resultados mostraram que múltiplas modificações de polissacarídeos podem trazer aos derivados excelentes propriedades e várias aplicações.

			(DPPH), ânion superóxido e hidroxila.	
--	--	--	---	--

Fonte: autor, 2018.

2.3 OBESIDADE

2.3.1 Diagnóstico e epidemiologia da obesidade

A obesidade é uma doença crônica multifatorial que envolve fatores genéticos, metabólicos e comportamentais, além de um desequilíbrio persistente do balanço energético. Trata-se de um importante fator de risco para várias doenças crônicas, tais como o diabetes, doenças vasculares e cânceres, a prevenção e tratamento da obesidade vêm sendo considerado fundamental em políticas públicas de saúde (HEYNE et al., 2009; TIAN et al., 2013).

Importante considerar que, dentre os fatores metabólicos, um dos determinantes é constituído da microbiota intestinal, que está envolvida na imunomodulação quanto a maturação celular e toxicidade de determinadas substâncias, além da colonização por bactérias, de modo que o intestino humano pode ser considerado como metabolicamente adaptável, flexível e renovável, atuando como importante fator de obtenção energética e nutricional (CORNEJO-PAREJA et al., 2018).

Nas últimas décadas, as mudanças no estilo de vida que favorecem o balanço energético positivo e ganho de peso, principalmente o consumo excessivo de alimentos calóricos, altamente palatáveis e em grandes porções, associados ao sedentarismo, alguns medicamentos que têm como efeito colateral o ganho de peso e sono inadequado são fatores relacionados à gênese da obesidade e estabelecem as bases para as epidemias conjuntas de obesidade e outras doenças crônicas (HEYMSFIELD; WADDEN, 2017).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2014, mais de 1,9 bilhões de adultos apresentavam excesso de peso, e destes, aproximadamente 600 milhões eram obesos. Além disso, observa-se aumento do número de crianças obesas chegando a um total de 41 milhões. No Brasil, segundo os mesmos dados, as mulheres apresentavam prevalência de 24% e os homens de 17,1% de obesidade (OMS, 2016). Em 2025 a projeção mundial é de 2,3 bilhões de adultos com excesso de peso e cerca de 700 milhões de indivíduos obesos (ABESO, 2016).

A Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), realizada entre fevereiro e dezembro de 2016, fornece dados

relacionados ao excesso de peso e obesidade no Brasil. Destaca-se informações sobre o excesso de peso que passou de 42,6% em 2006 para 53,8% em 2016 com maior prevalência nos homens. Entre as capitais nordestinas, João Pessoa superou a média nacional de 18,9%, com um percentual de 21,7% de indivíduos obesos (BRASIL, 2017).

Para classificação de sobrepeso e obesidade em adultos tem-se considerado o Índice de Massa Corporal (IMC), representado pela razão entre o peso (g) e o quadrado da estatura (m). No entanto, o IMC não se correlaciona totalmente com a gordura corporal e possui limitações por não distinguir massa magra de massa gorda e não refletir a distribuição de gordura corporal, que tem sido apontada como mais preditiva de saúde em indivíduos com excesso de peso. No Brasil, utiliza-se a classificação proposta pela OMS para classificar o sobrepeso (IMC: 25 a 29.9 kg/m²) e obesidade (IMC $\geq$ 30 kg/m²) (Quadro 03). Baseia-se em padrões internacionais para pessoas adultas descendentes de europeus e associa o risco entre IMC e doenças crônicas ou mortalidade (ABESO, 2016).

Quadro 3 – Classificação internacional da obesidade, segundo o IMC.

IMC (kg/m ²)	CLASSIFICAÇÃO	GRAU/CLASSE	RISCO
<18,5	Magro ou baixo peso	0	Normal ou elevado
18,5-24,9	Normal ou eutrófico	0	Normal
25-29,9	Sobrepeso ou pré-obeso	0	Pouco elevado
30-34,9	Obesidade	I	Elevado
35-39,9	Obesidade	II	Muito elevado
$\geq$ 40,0	Obesidade grave	III	Muitíssimo elevado

FONTE: ABESO, 2016.

A combinação do IMC com medidas de distribuição de gordura corporal pode ajudar a solucionar alguns problemas do uso do IMC isolado. Entre os principais parâmetros utilizados para inferir padrão de distribuição de gordura corporal e massa gordurosa destacam-se a circunferência abdominal, relação circunferência abdominal/quadril (RCQ) e relação cintura/estatura (RCE). A medida de circunferência abdominal reflete melhor o conteúdo de gordura corporal visceral que a RCQ e também se associa à gordura corporal total, segundo o National Cholesterol Education Program (NCEP) – Adult Treatment Panel III (ATP-III), o ponto de corte deve ser de 102 cm para homens e 88 cm para mulheres. Já segundo os critérios da Federação Internacional do Diabetes (IDF) estabelece os pontos de corte de risco

cardiovascular aumentado uma circunferência abdominal igual ou superior a 94 cm para homens e 80 cm para mulheres, conforme demonstrado no Quadro 04.

A RCE vem demonstrando superioridade sobre a circunferência abdominal e IMC para detecção de risco cardiovascular em ambos sexos, devendo-se considerar o ponto de corte 0,5, indicando que a cintura deve ser menor que a metade da altura, tal ponto de corte é utilizado e para os diferentes ciclos de vida, servindo de base para classificação em crianças, adolescentes, adultos e idosos (ABESO, 2016). É importante ressaltar que não há avaliação perfeita ou parâmetro isolado mais indicado para diagnóstico de sobrepeso ou obesidade, devendo-se sempre associar diferentes indicadores.

Quadro 4 – Valores de referência indicativos de risco cardiovascular em homens e mulheres, segundo a circunferência abdominal, com base nos critérios do IDF e NCEP-ATPIII.

Circunferência Abdominal	IDF	NCEP-ATPIII
HOMENS	94 cm	102 cm
MULHERES	80 cm	88 cm

FONTE: ABESO, 2016.

2.3.2 Fisiopatologia e complicações clínicas da obesidade

O peso corporal é regulado por uma complexa rede de hormônios e neuropeptídeos, que atuam sob o controle dos núcleos hipotalâmicos. Essa rede de informações neuroquímicas se comunicam pelas interconexões do hipotálamo, do núcleo do trato solitário e sinais periféricos emitidos pelo tecido adiposo e pelo trato gastrointestinal, é responsável pelo controle da ingestão alimentar e do peso corporal e parece estar diretamente relacionada a base genética da obesidade (VALASSI; SCACCHI; CAVAGNINI, 2008; THALER et al., 2013).

O núcleo arqueado é a região que mais expressa receptores para leptina e insulina, hormônios-chave no controle da fome e manutenção do peso. Além disso, nessa mesma região, foram identificadas zonas orexígenas e anorexígenas, constituídas por subpopulações de neurônios (neuropeptídeo Y – NPY e *agouti-related protein* AgRP) e (α -MSH e *cocaine and amphetamine-regulated transcript* – CART), respectivamente. A ativação de neurônios

orexígenos promove aumento da ingestão alimentar e diminuição do gasto energético, enquanto a ativação dos neurônios anorexígenos promove o efeito contrário reduzindo o apetite e ingestão alimentar (VALASSI; SCACCHI; CAVAGNINI, 2008; CROWLEY, 2008, NAVES, 2014).

Após início da refeição e chegada de proteína ou gordura no intestino delgado ocorre um estímulo para liberação de colecistoquinina (CCK) e peptídeo YY (PYY) que são recebidos no sistema nervoso central e inibem neurônios produtores de NPY/AgRP determinando o fim da refeição. Em situações normais, o aumento dos níveis de leptina e insulina, que aumentam proporcionalmente a gordura corporal e em situações de balanço energético positivo, estimulam a POMC (pró-opiomelanocortina)/CART e inibe os neurônios NPY/AgRP no hipotálamo. A POMC estimula a liberação de α -MSH, que agindo sobre os receptores MCR4, leva a redução da ingestão alimentar (CROWLEY, 2008, NAVES, 2014). No entanto, em indivíduos obesos observa-se uma combinação de hiperleptinemia e hiperfagia, caracterizando o quadro de resistência central a leptina, associada a alterações no receptor e/ou dificuldades em atravessar a barreira hematoencefálica (CONSIDINE et al., 1996; MUNZBERG; FLIER; BJORBAEK, 2004).

No cérebro, a sinalização de insulina prejudicada e a baixa detecção de nutrientes contribuem para obesidade por não suprimir o apetite e contribuir para o aumento da glicemia, associada a perda de controle de produção de glicose hepática pelo sistema nervoso (RASK-MADSEN; KAHN, 2012). A obesidade resulta em uma diminuição na capacidade dos adipócitos em armazenar os ácidos graxos na forma de triglicerídeos, fazendo com que haja um maior número de ácidos graxos livres (AGLs) circulantes, ocasionando o armazenamento de gordura em tecidos periféricos, incluindo, principalmente, o músculo esquelético e o fígado. O acúmulo de AGLs causa resistência à insulina (RI) nesses tecidos e concomitantemente o tecido adiposo é invadido por macrófagos e outras células imunitárias. As citocinas circulantes liberadas pelos macrófagos nessa situação contribuem não só para o processo inflamatório, mas reforçam o quadro de RI no músculo, fígado e outros tecidos (MOLLER; KAUFMAN, 2005; RASK-MADSEN; KAHN, 2012).

A obesidade, principalmente o acúmulo de gordura abdominal e o estado inflamatório crônico, vem sendo apontados como ponto chave para o desencadeamento da Síndrome Metabólica (SM), porém, nem todos os indivíduos obesos a desenvolvem, assim como, nem todos os indivíduos com a síndrome estão obesos (BRUCE; HANSON, 2010). Provavelmente, o desenvolvimento da SM esteja relacionado a um grau de predisposição genética, através de uma complexa interação entre genes múltiplos, em associação com

disfunções hormonais, aliados a um estilo de vida sedentário e o excesso de ingestão calórica (CAMPION; MILAGRO; MARTINEZ, 2009).

Embora a obesidade por si só não seja suficiente para o diagnóstico da SM, há evidências consideráveis de que a gordura intra-abdominal visceral, que aumenta com a idade, esteja intimamente ligada à RI, responsável por provocar alterações importantes no metabolismo glicídico e sendo um ponto chave para o desenvolvimento de uma série de complicações relacionadas à SM. A diminuição da sensibilidade à insulina e consequente perda da sua regulação hormonal no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, juntamente a um estado de compensação de células beta ativado e hiperinsulinemia eleva o risco de desenvolver diabetes do tipo 2 em indivíduos com SM (MOLLER; KAUFMAN, 2005; GUILHERME et al., 2008).

Por algum tempo, pensou-se que o Tecido Adiposo Branco (TAB) funcionava apenas como um depósito de gordura, hoje, sabe-se de sua capacidade em produzir substâncias bioativas chamadas de adipocinas. Essas adipocinas exercem inúmeras funções como inflamatórias, a exemplo da interleucina-6 (IL-6) e funções de regular a ingestão de alimentos exercendo um efeito direto no controle do peso, a exemplo da leptina que atua no sistema límbico aumentando a captação de dopamina, criando uma sensação de plenitude (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011). O aumento de TAB também é considerado um fator de risco independente para a produção do estresse oxidativo, uma vez que, a produção irregular de adipocinas, associa-se a uma elevada produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), gerando um processo de estresse oxidativo sistêmico, que pode causar danos diretos e indiretos em diferentes órgãos (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011; GALASSETTI, 2012).

Essa expansão do TAB ocorre através do aumento no tamanho dos adipócitos pelo acúmulo de lipídeos, em sua maioria, decorrente da oferta excessiva de nutrientes ou pelo aumento no número de adipócitos por meio do recrutamento de pré-adipócitos, processo chamado de hiperplasia (GRAY; VIDAL-PUIG, 2007). O aumento progressivo dos adipócitos reduz o suprimento sanguíneo no tecido adiposo, levando à hipóxia e início do processo de infiltração de macrófagos e necrose tecidual que, por conseguinte, exacerba a produção de mediadores inflamatórios favorecendo a inflamação sistêmica, além de elevar a produção de ROS e o estresse oxidativo (ELLULU et al., 2017).

Depósitos de gordura são vulneráveis a sofrer reações de oxidação, se a produção de ROS excede a capacidade antioxidante da célula, o estresse oxidativo resulta em peroxidação lipídica podendo contribuir para o desenvolvimento de aterosclerose (KHAN; NAZ;

YASMEEN, 2006). Biomarcadores do estresse oxidativo, como o malondialdeído (MDA) e F-2 isoprostanos (F2 IsoPs), produtos da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, tem mostrado relação significativa com IMC, além disso, estudos demonstram relação positiva entre o nível de peroxidação lipídica e concentração de colesterol plasmático (BLOCK et al., 2002; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011).

Alguns mecanismos de produção de radicais livres ocorrem, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. A mitocôndria é a principal fonte geradora de ROS, por meio da cadeia de transporte de elétrons, onde há um excesso do consumo de oxigênio e através de reações de oxidação de ácidos graxos. Dietas ricas em lipídios, principalmente ácidos graxos saturados, e hidratos de carbono, também são capazes de gerar ROS porque podem alterar metabolismo do oxigênio (BARBOSA et al., 2010; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011).

Outra importante fonte geradora de radicais livres são as enzimas NADPH oxidases (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases*). Essas se referem a proteínas transmembrana que tem a função de transferir os elétrons através das membranas celulares. Geralmente, o aceptor de elétrons é o oxigênio e, dessa forma, em decorrência desse processo, gera-se o radical $O_2\bullet$. O tecido adiposo secreta angiotensina II, a qual estimula a NADPH oxidase, que compreende a principal via para a produção de ROS em adipócitos (MORROW, 2003; BARBOSA et al., 2010). O TNF- α também aumenta a interação de elétrons com o oxigênio para gerar ânions superóxido, através da inibição da atividade da proteína-C reativa (PCR) (FONSECA-ALANIZ et al., 2007).

A sensibilidade da PCR e outros biomarcadores de dano oxidativo é maior nos indivíduos com obesidade e se correlacionam diretamente com o IMC e o percentual de gordura corporal, a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), e os níveis de triglicerídeos (TG) (PIHL et al., 2006; STÉPIEN et al., 2014). Em contraposição, marcadores de defesa antioxidantes, como as enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e glutathione peroxidase (GPx), são mais baixos de acordo com a quantidade de gordura corporal e obesidade central (CHRYSOHOOU et al., 2007; HARTWICH et al., 2007).

Finalmente, a alta produção de ROS e a diminuição da capacidade antioxidante leva a várias anormalidades, entre as quais encontramos disfunção endotelial, que é caracterizada por uma redução na disponibilidade de vasodilatadores, particularmente o óxido nítrico (NO), e um aumento de fatores contráteis derivados do endotélio, consequentemente o relaxamento dependente do endotélio se encontra prejudicado, quando em resposta a agonistas como

acetilcolina, bradicinina, ou tensão de cisalhamento, além disso, a disfunção endotelial inclui um estado específico de ativação endotelial caracteristicamente pró-inflamatório, proliferativo e pró-coagulante, favorecendo a doença aterosclerótica e hipertensão arterial sistêmica (HADI; CARR; AL SUWAIDI, 2005; GONZALEZ et al., 2014).

O NO apresenta papel fundamental no desenvolvimento da disfunção endotelial, pois atua opondo-se aos efeitos vasoconstritores derivados do endotélio tais como a angiotensina II e a endotelina 1, e ainda protege as células endoteliais contra danos induzidos por citocinas, tais como o TNF- α . Assim, alterações na produção ou na biodisponibilidade de NO promovem as características principais de disfunção endotelial, como a vasoconstrição, agregação de plaquetas, proliferação de células de músculo liso, migração e adesão de leucócitos e estresse oxidativo (BADAL; DANESH, 2012).

A lesão endotelial está intimamente relacionada ao processo inflamatório e aumenta os monócitos no sangue, que por sua vez, ativam moléculas de adesão como moléculas de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) que facilitam a adesão de células inflamatórias às camadas endoteliais. Quimiocinas e proteínas quimiotáticas recrutam células inflamatórias para a camada íntima e os monócitos convertem-se em macrófagos e que internalizam partículas de lipoproteínas que formam as células espumosas, que por sua vez exacerbam ainda mais a secreção de células inflamatórias, ROS e outros mediadores. Dessa forma, o processo inflamatório impulsiona a aterosclerose e, em última instância, desencadeia complicações na placa trombótica que podem resultar em Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), Acidente Vascular Encefálico (AVE) e morte (GEOVANINI; LIBBY, 2018).

Alguns modelos animais têm sido amplamente utilizados para estudo de alterações metabólicas características de humanos, uma vez que há uma grande similaridade e homologia entre os genomas dos roedores e dos humanos, tornando esses modelos animais importantes para o estudo de condições que afetam os humanos e que podem ser simuladas em ratos a fim de se obter respostas em um curto espaço de tempo.

2.3.3 Indução de obesidade em modelos animais

A obesidade pode ser induzida em animais por alterações neuroendócrinas, dietéticas ou genéticas. Em sua maioria, em animais de laboratório, sua gênese está relacionada com mutações genéticas, porém, esse modelo é muito distante do encontrado na realidade nos humanos. A adoção de dietas hipercalóricas vem sendo utilizadas como modelo de indução da obesidade e suas complicações em animais, devido à sua semelhança com a gênese e às

respostas metabólicas decorrentes da obesidade em seres humanos (ROSINI; SILVA; MORAES, 2012; AUBERVAL, et al., 2014).

A indução de alterações metabólicas por meio do consumo de dieta é o modelo mais simples e possivelmente aquele que mais se assemelha a realidade observada em seres humanos. Existem vários tipos de dietas que podem ser utilizadas para indução de obesidade e síndrome metabólica que se revelam eficazes, entre os principais modelos destacam-se aquelas nas quais as calorias adicionais derivam da adição de gorduras ou hidratos de carbonos (VON DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006; PANCHAL; BROWN, 2011; HIGA et al., 2014).

Tradicionalmente, algumas dietas consistem em uma simples troca de calorias derivadas de carboidratos por calorias derivadas de gorduras, quando comparadas com dietas de baixo teor de gordura ou dietas padrão. Além dessas, existem modelos de dietas com oferta de alimentos altamente palatáveis e de elevada densidade energética, que predominam no cardápio da sociedade ocidental e estão intimamente ligados a pandemia de obesidade e síndrome metabólica são denominadas de “dietas de cafeteria” (KENNEDY et al., 2010; SAMPEY et al., 2011; HIGA et al., 2014).

Modelos animais que desenvolvem doenças crônicas como obesidade, diabetes, hipertensão e alterações vasculares vem sendo estudados, tanto para melhorar a compreensão da progressão dos sintomas e as causas da doença, como para testar potenciais intervenções terapêuticas (SUMAN et al., 2016). Estudos com diferentes tipos de dietas têm proporcionado importante crescimento e desenvolvimento de pesquisas em nutrição, porém a composição da dieta tem relação direta com o tipo de alteração a ser induzida nos modelos animais, dietas modernas, ricas em carboidratos como frutose e sacarose e gorduras Trans, saturadas e colesterol, tem sido associadas a complicações como síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e hepáticas de origem não alcoólica (PANCHAL; BROWN, 2011; PANCHAL; WARD; BROWN, 2013; LOZANO et al., 2016).

Entre as principais dificuldades encontradas nos modelos experimentais de indução de obesidade encontra-se a determinação de parâmetros que caracterizem a obesidade em roedores, tendo em vista que, tanto humanos como roedores tendem a ganhar peso com aumento da ingestão calórica, mas nem todos ganham peso na mesma proporção. Assim, Novelli et al. (2007) em seu estudo buscaram estabelecer parâmetros antropométricos e marcadores de obesidade em ratos e encontrou correlação positiva entre o IMC e a quantidade de gordura nas carcaças dos animais, hidroperóxidos lipídicos e triglicerídeos séricos e concluíram que o IMC para ratos Wistar adultos variou entre 0.45 e 0.68 g/cm².

Alguns modelos de dietas têm buscado mimetizar alterações metabólicas semelhantes aquelas encontradas em humanos a fim de fornecer modelos experimentais consistentes que possam dar suporte ao estudo de terapias para inúmeras patologias que sofrem influência da alimentação e hábitos alimentares, como é o caso da síndrome metabólica. Panchal et al. (2011) desenvolveram um modelo animal de síndrome metabólica induzida pelo consumo de dieta hipercalórica, a base de leite condensado, sebo bovino e frutose, a ingestão dessa dieta durante 8 semanas demonstrou alterações importantes no metabolismo glicídico, no sistema cardiovascular, renal e hepático de ratos Wistar.

Uma linha de estudo bastante relevante refere-se àquela que compara modelos experimentais de obesidade e síndrome metabólica, alimentados com dietas tradicionalmente utilizadas, ricas em gorduras, com dietas de alta palatabilidade, composta por alimentos processados geralmente consumidos pela população, as chamadas dietas de cafeteria, com alto teor de sódio, de gordura, pobre em fibras e rica em alimentos altamente energéticos como biscoitos, batatas fritas e carnes processadas (HIGA et al., 2014). Nesse modelo de dietas de alta palatabilidade, ou cafeteria, os animais têm livre acesso a água e ração padrão enquanto simultaneamente são oferecidos alimentos de elevada densidade energética e altamente palatáveis *ad libitum*. Esse tipo de dieta promove hiperfagia involuntária que resulta em ganho de peso rápido, aumento de massa gorda e de parâmetros pré-diabéticos, como intolerância à glicose e RI (HEYNE et al., 2009; LEWIS; SINGH; YOUSSEF, 2019).

Nesse contexto, algumas pesquisas tem apontado o modelo animal, de ratos machos, alimentados com dietas ricas em calorias como principal modelo capaz de mimetizar as alterações características da síndrome metabólica em humanos (PANCHAL; BROWN, 2010). Para tal, os modelos experimentais caracterizados e clinicamente relevantes são utilizados como ferramentas essenciais para o teste de novas preparações farmacêuticas e nutracêuticas, a fim de compreender a base molecular, a patogênese e os mecanismos de ação desses agentes terapêuticos.

3 ABORDAGEM METODOLÓGICA

3.1 TIPO DE ESTUDO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular localizado no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I, João Pessoa. Tratou-se de um estudo experimental com ensaios farmacológicos e moleculares utilizando técnicas *in vivo* e *in vitro*. Para execução da referida pesquisa, o projeto foi submetido à análise e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da UFPB, sob protocolo nº 074/2017 (Anexo 1).

3.2 OBTENÇÃO DA CARBOXIMETILGLUCANA (CMG)

A Carboximetilglucana (CMG) derivada da *Saccharomyces cerevisiae* foi obtida a partir de creme de levedura por um processo de obtenção do polímero puro, utilizando sonicação e tratamento enzimático após extração com água quente, conforme descrito por Magnani et al. (2009). A derivatização foi realizada usando ácido monocloroacético para atingir grau de substituição (DS) de 0.8, conforme solubilidade e bioatividade identificada em estudos anteriores (MAGNANI et al., 2010; ARAUJO et al., 2015). A DS foi controlada por titulação potenciométrica com solução de hidróxido de potássio (ŠANDULA et al., 1999). A identidade química e modificações estruturais foram confirmadas por ressonância magnética (RMN) e análise de infravermelho (MAGNANI et al., 2009). O material foi fornecido pelo laboratório de Processos Microbianos em Alimentos e de Bioquímica de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba – UFPB.

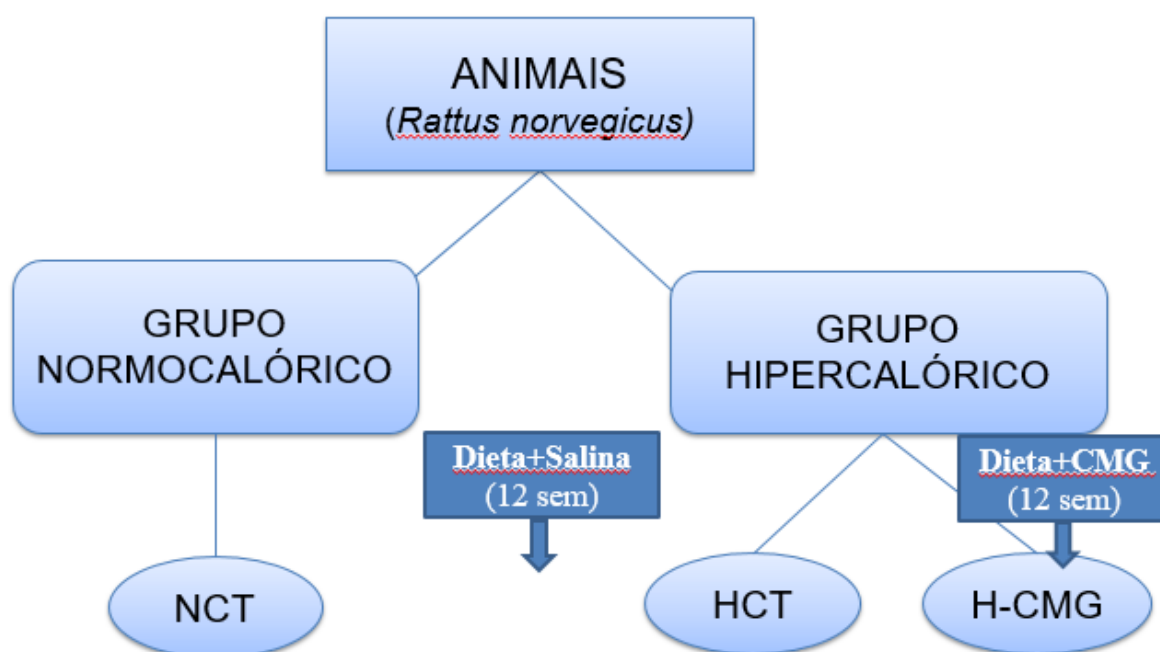
3.3 ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 24 ratos da linhagem Wistar e espécie *Rattus norvegicus*, com aproximadamente 12 semanas de idade, pesando entre 270 – 320g. Todos os animais foram provenientes do biotério Prof. George Thomas da UFPB. Os animais foram mantidos sob uma condição controlada de temperatura (21 ± 1 °C), em um ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e alimentação e acomodados em gaiolas plásticas micro isoladoras de dimensão 49x34x16 (CxLxA, em cm), cada uma com no máximo 4 animais. Os procedimentos adotados obedeceram aos princípios de manuseio e cuidado com animais de

laboratório preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Os animais inicialmente foram divididos em dois grupos, referentes ao grupo controle que recebeu dieta padrão (ração-Presence®, Paulínea, SP.) (NCT) e o grupo experimental (HCT) que recebeu dieta hipercalórica e hiperlipídica, durante 12 semanas de experimento. Concomitante ao início da administração da dieta, os animais do grupo HCT foram subdivididos em dois grupos: tratados com CMG (H-CMG), e um grupo controle que recebeu solução salina (HCT). Os animais do grupo dieta normocalórica receberam solução salina (NCT) durante todo o estudo. A administração da substância se deu por via oral, realizada por gavagem (i.g.), uma vez ao dia, sempre nos mesmos horários, durante 12 semanas. A dose utilizada foi de 20 mg/kg de peso ao dia. O desenho do estudo com a divisão dos grupos está representado na Figura 3.

Figura 3 – Desenho experimental do estudo.



FONTE: AUTOR, 2018.

3.4 DIETA

As dietas utilizadas no estudo foram constituídas pela dieta comercial padrão (Presence®), contendo 23% de proteína, 63% de carboidrato e 4% de lipídio, fornecendo um total de 3,8 kcal/g de ração. A dieta experimental, adaptada de Panchal (2011) era composta

de 17,5 g de frutose, 39,5 g de leite condensado, 20 g de sebo bovino, 15,5 g de ração em pó padrão (Presence®), 2,5 g de mistura salina, para cada 100 g de ração. Para o preparo da dieta modificada a ração padrão foi triturada, peneirada e pesada, em seguida a frutose, leite condensado, sebo bovino e mistura salina foram pesados e misturados manualmente ao pó da ração padrão sob baixa intensidade de luz por aproximadamente 5 minutos. Uma pequena quantidade de água quente (± 100 °C) foi adicionada até se atingir a consistência ideal para a granulação. Após isso, a dieta era peletizada e disposta em formas para secagem realizada em estufa com circulação de ar (AL 102/250, America Lab, São Paulo, Brasil), à aproximadamente 60 °C, por 48 h. As dietas eram preparadas a cada 15 dias, armazenadas em sacos plásticos sob temperatura de refrigeração (± 5 °C) até serem administradas aos animais. A determinação da composição centesimal da dieta modificada foi realizada no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição da UFPB, segundo o acordo com o *Official Methods of Analysis of AOAC International* (2016). Para determinação da quantidade de lipídeos da dieta hipercalórica foi utilizado o método de Soxhlet e o método de Kjeldahl para determinar a quantidade de nitrogênio, a quantidade de carboidratos foi calculada pela diferença. A partir da composição de macronutrientes determinou-se o valor energético total da dieta por 100g, conforme Tabela 1. A umidade foi determinada pela diferença de pesos de amostras de ração secas em estufa a 105 °C, durante 24h e as cinzas foram obtidas em forno mufla a 550 °C.

Tabela 01 – Composição centesimal (g/100 g) e valor energético (kcal/100 g) da ração hipercalórica utilizada no estudo.

PARÂMETROS	VALORES
Umidade	5,2
Cinzas	2,0
Carboidratos	54,8
Proteínas	11,2
Lipídeos	26,8
Valor energético (kcal)	505,2

FONTE: AUTOR, 2018.

3.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CORPORAIS E DE CONSUMO ALIMENTAR

Os animais eram monitorados a cada três dias para verificação do peso corporal utilizando balança AND (São Paulo, Brasil); a circunferência abdominal e o comprimento corporal (nariz a base da cauda) foram aferidos ao final do protocolo experimental utilizando

uma fita inelástica, com os animais anestesiados com cetamina (70 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) via intraperitoneal. O Índice de Massa Corporal (IMC) foi calculado pelo peso corporal (em gramas)/[comprimento do corpo (em centímetros)]² (NOVELLI et al., 2007; NERY et al., 2011). A ingestão de água e consumo de ração foi monitorado diariamente. Para avaliação dos coeficientes de eficácia alimentar (CEA) e ganho de peso por consumo calórico (GPCC) foram considerados os dados referentes ao ganho de massa corporal (g), consumo alimentar total (g) e consumo energético total (kcal), após o período experimental de 12 semanas (NERY et al., 2011).

3.6 TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

Na última semana de tratamento, os animais foram submetidos à jejum para realização do teste oral de tolerância à glicose (TOTG). A glicemia de jejum foi determinada a partir de alíquotas de sangue da veia caudal, com auxílio de um glicosímetro (On Call Plus, MedLevensohn[®], Espírito Santo, Brasil). Em seguida, uma solução de glicose a 40%, na dose de 2g/kg de peso corporal, foi administrada por gavagem (i.g.) e então concentrações de glicose sanguínea foram aferidas após 30, 60 e 120 minutos, e utilizadas para cálculo da área sob a curva (AUC) (MOURA et al., 2012).

3.7 MEDIDA INDIRETA DE PRESSÃO ARTERIAL

Na última semana do estudo, os animais eram aclimatados, por sete dias, a fim de aumentar a fidedignidade das medidas de pressão arterial. No último dia de experimento, os ratos eram mantidos em um contensor de acrílico, por aproximadamente 10 min, ficando apenas a cauda exposta acoplada ao *tail cuff* (ADInstruments, Australia) que se conectava a uma pêra de borracha através de um arranjo de válvulas de admissão e de escape que permitem a inflação e deflação de uma membrana de látex a uma taxa constante. O transdutor de pulso piezoelétrico MLT 1010 (ADInstruments, Australia) captava os estímulos mecânicos, e os transformava em um estímulo elétrico, tendo a medida do pulso. Ao observar que o sinal do pulso se apresentava estável a medida era então realizada. Ao inflar a bomba, uma interrupção do fluxo sanguíneo na artéria caudal ocorria e o sinal de pulso era captado pelo sensor, quando o pulso do animal retornava, dessa forma, a pressão arterial era caracterizada, através da pressão sistólica e o posterior retorno do pulso a sua amplitude total caracterizava a pressão diastólica (FRITZ; RINALDI, 2008). Os sinais captados pelo sensor

de pulso conectado a um transdutor de pressão fisiológico MLT 844 (ADInstruments, Australia) eram amplificados e digitalizados por um sistema de aquisição de dados (PowerLab) e através do software Labchart7 (ADInstruments, Australia) eram visualizadas as medidas de pulso, pressão arterial sistólica.

3.8 MEDIDA DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Ao final do período experimental, após jejum noturno, a fim de avaliar o efeito da CMG sobre a função plaquetária, amostras de sangue foram coletadas da veia cava inferior dos animais anestesiados. O plasma rico em plaquetas (PRP) dos animais tratados foi obtido por meio de centrifugação, durante 15 minutos a 120 g e ajustado para 2×10^7 plaquetas/mL, após isso as mostras eram incubadas no agregômetro a 37 °C e estimuladas com ADP (10 μ M) e Éster de Forbol (PMA, 100 ng/mL) por 5 minutos (YONEDA et al., 2004; HUANG et al., 2007). Mudanças na transmissão da luz foram registradas durante 5 minutos para estimar a agregação máxima em cada amostra. O grau de agregação era expresso como uma porcentagem da transmissão máxima de luz obtida na amostra. Os valores basais de agregação foram determinados usando uma amostra de plasma pobre em plaquetas (PPP) obtida por meio de centrifugação a 2300 g por 10 min (YONEDA et al., 2004). A agregação plaquetária era determinada utilizando um agregômetro AgreGO (São Paulo, Brasil).

3.9 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Amostras de sangue, dos animais submetidos à jejum noturno, retiradas da veia cava inferior eram coletadas em tubos heparinizados e, em seguida, centrifugadas (2300 g por 10 min) para obtenção do plasma. As amostras foram utilizadas para determinar as concentrações plasmáticas de glicemia de jejum, colesterol total, triglicerídeos (TG), HDL-C, LDL-C, por meio de leituras espectroscópicas automatizadas (Labtest, Belo Horizonte, Brasil) por meio de reações com Kits comerciais (PANCHAL et al., 2011). Medidas de inflamação sistêmica (Proteína C-Reativa Ultrassensível- PCR-us) também foram realizadas. O índice aterogênico (IA) foi calculado pela transformação logarítima do resultado da divisão do TG total pelo valor do HDL nas amostras (WU et al., 2018).

3.10 EXPERIMENTOS *in vitro*

Imediatamente após a coleta sanguínea, a artéria mesentérica superior era removida e preparada para os testes de reatividade vascular. A gordura abdominal retroperitoneal e epididimal era dissecada e pesada separadamente para cálculo do índice de adiposidade (FREIRE et al., 2014). Os órgãos coração, fígado e rins foram retirados e pesados separadamente em seguida partes destes órgãos eram congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80 °C. As artérias aorta e mesentérica também foram removidas e cortadas em anéis de 2-3 mm de comprimento e incluídas em meio de inclusão para amostras frescas, *Tissue Tek Compound* (OCT) e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80 °C para análise da produção de ROS, por meio de microscopia de fluorescência (WOJTALA, et al., 2013).

3.11 ESTUDOS DE REATIVIDADE VASCULAR

Para medidas de tensão isométrica, anéis de artéria mesentérica superior isolada dos ratos tratados foram suspensos em cubas de órgãos isolados contendo solução de Tyrode (pH 7.4) a 37°C e aeradas com carbogênio (95 % O₂: 5 % CO₂), como previamente reportado (VERAS et al., 2013). Os anéis foram estabilizados por uma hora a uma tensão de 0,75g, previamente determinada por experimentos de relação comprimento vs tensão. A presença funcional do endotélio foi confirmada pela presença de relaxamento superior a 80% após a adição de Acetilcolina (ACh, 10 µM) em anéis pré-contraídos com fenilefrina (FEN, 10 µM). Anéis com relaxamento inferior a 80% eram submetidos à remoção mecânica do endotélio e novamente submetidos ao teste de funcionalidade endotelial citado previamente. Após a verificação da integridade do órgão e da funcionalidade endotelial, conforme descrito. Curvas concentração-resposta para FEN (10⁻⁹ to 10⁻⁵ M), para ACh (10⁻¹⁰ to 10⁻⁵M) ou para nitroprussiato de sódio (NPS; 10⁻¹⁰ to 10⁻⁵M) foram construídas. A potência e eficácia do vasorrelaxamento dos agonistas foram avaliadas por meio dos valores de pD₂ e E_{max}, respectivamente.

3.12 HISTOLOGIA DE ÓRGÃOS E TECIDOS

Para os estudos histológicos a gordura, o coração e o fígado foram perfundidos em solução de formol neutro tamponada 10% e mantidos nesta mesma solução durante 3 dias e, em seguida, desidratados e embebidos em cera de parafina. Seções finas (7 µm) do ventrículo

esquerdo, fígado e tecido adiposo foram cortados e corados com hematoxilina e eosina para a determinação da infiltração de células inflamatórias (POUDYAL et al., 2012).

3.13 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÂNIONS SUPERÓXIDOS ($O_2^{\bullet-}$) EM PLAQUETAS

O plasma rico em plaquetas, ajustado para 5×10^6 plaquetas/mL, foi incubado com dihidroetídio (DHE) ($10 \mu M$) durante 30 minutos a $37^\circ C$ (VARA; CAMPANELLA; PULA, 2013). Depois as amostras eram adquiridas no citômetro FACS Canto-II (BD Biosciences®, Santa Mônica, EUA) equipado com laser de argônio com 15mW e $\lambda=488nm$ para realização da leitura, seguido da análise no software DIVA 6.0 (BD Biosciences®, Santa Mônica, EUA). O citômetro, configurado para adquirir 10.000 eventos, e excluir restos celulares, definidos pelo *threshold* do FSC (Forward scatter), captava os sinais de fluorescência nas seguintes faixas de comprimento de onda: 515-545 para o canal 1 (FL1). Mudanças na fluorescência (F_1) foram normalizadas com a fluorescência obtida na amostra tratada apenas com HEPES (F_0) e expressas como F_1/F_0 .

3.14 DETERMINAÇÃO *IN SITO* DE ROS

Para avaliar a produção tecidual de ânions $O_2^{\bullet-}$ em artéria mesentérica foi utilizada a sonda dihidroetídio (DHE) empregando a técnica de microscopia de fluorescência. O DHE é amplamente utilizado para a medida dos níveis citosólicos de ânions $O_2^{\bullet-}$ devido à sua capacidade de penetração na célula e alta reatividade. No interior da célula, o DHE é oxidado pelos ânions $O_2^{\bullet-}$ formando um produto intermediário, o 2-hidroetídio ($2-OHEt^+$) que intercala com o DNA, que ao ser excitado a um comprimento de onda de 500 nm exibe uma fluorescência de cor vermelha (580 nm) (WOJTALA et al., 2014). Nas artérias isoladas e previamente congeladas, dos diferentes grupos experimentais, foram realizados cortes transversais com espessura de $10 \mu m$ em criostato (Cryostat Leica, Nussloc, Alemanha) a temperatura de $-20^\circ C$.

Para a realização da medida dos ânions $O_2^{\bullet-}$, os cortes transversais de artéria mesentérica foram lavados com solução salina tamponada (PBS), em seguida, incubadas com o DHE $10 \mu M$ durante 30 min à temperatura de $37^\circ C$ em câmara úmida, ao abrigo da luz (WOJTALA, A. et al., 2014). Após o período de incubação, os cortes foram novamente lavados com PBS para remoção do excesso da sonda fluorescente, e levadas imediatamente ao

microscópio de fluorescência (NIKON Eclipse Ti-E, NIKON, Japão) para análise. O processamento das amostras e obtenção das imagens dos grupos foi realizado em paralelo utilizando as mesmas configurações do laser. A intensidade de fluorescência foi determinada utilizando o software NIS Elements versão 4.02. Os níveis de ânions superóxidos nos diferentes grupos foram expressos na forma de Δ de porcentagem de fluorescência, normalizados pela fluorescência emitida pelo DHE do grupo controle. A fluorescência obtida para os diferentes grupos de tratamento foi determinada de acordo com a seguinte equação: $\Delta\% \text{ Fluorescência} = (\text{TRATADA} - \text{CONTROLE}) \times 100 / \text{CONTROLE}$.

3.15 MEDIDA DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

Com o plasma coletado dos animais, os marcadores inflamatórios:, interleucina-10 (IL-10), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e os níveis de interleucina-12p70 (IL-12p70) foram medidos através da técnica de CBA (“Cytometric Bead Array”, BD nº cat 552364) seguindo as instruções do fabricante (CHESSELL et al., 2005). As amostras foram levadas ao citômetro FACS Canto-II equipado com laser de argônio com 15 mW e $\lambda = 488$ nm para leitura das amostras e análise no software DIVA 6.0 (BD, Santa Mônica, EUA).

3.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As comparações estatísticas foram feitas utilizando o teste t de Student para comparações de dois grupos ou a análise de variância (ANOVA) para comparações entre os três grupos, seguidos do pós-teste de Tukey. Curvas concentração-resposta foram construídas por regressão não-linear para análise dos resultados de reatividade vascular, como parâmetro de potência foi utilizado o pD2 e como parâmetro de eficácia o $E_{\text{máx}}$. Os valores foram considerados significantes quando $p < 0.05$. Para as análises foram utilizados os programas estatísticos GraphPad Prism versão 6.0[®] (San Diego, EUA), DIVA 6.0 (BD, Santa Mônica, EUA) e para a análise da quantificação de citocinas foi utilizado o FCAP 3.0.

REFERÊNCIAS

- ABESO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **Diretrizes brasileiras de obesidade**. 4º ed. São Paulo-SP, 2016.
- AARSAETHER, E. et al. Oral beta-glucan reduces infarction size and improves regional contractile function in a porcine ischaemia/reperfusion model. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 41, n. 4, p. 919-25, 2012.
- ARAÚJO, V. B. et al. Oral Intake of Carboxymethyl-Glucan (CM-G) from Yeast (*Saccharomyces uvarum*) Reduces Malondialdehyde Levels in Healthy Men. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 14950-8, 2015.
- AKRAMIENE, D. et al. Effects of beta-glucans on the immune system. **Medicina-Lithuania**, v. 43, n. 8, p. 597-606, 2007.
- AUBERVAL, N. et al. Metabolic and oxidative stress markers in Wistar rats after 2 months on a high-fat diet. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 6, n. 1, p. 130, 2014.
- BABINCOVÁ, K.B.F. et al. Antioxidant Properties of Carboxymethyl Glucan: comparative analysis. **Journal of medicinal food**. v.5, n.2, p.79-83, 2002.
- BADAL, S. S.; DANESH, F. R. Strategies to reverse endothelial dysfunction in diabetic nephropathy. **Kidney International**, v. 82, n. 11, p. 1151-4, 2012.
- BAE, I. Y. et al. Effect of partially hydrolyzed oat β -glucan on the weight gain and lipid profile of mice. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 2016-2021, 2009.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BASHIR, K.M.I.; CHOI, J-S. Clinical and Physiological Perspectives of β -Glucans: The Past, Present, and Future. **International Journal of Molecular Sciences**., v.18, p.1-48, 2017.
- BEZERRA, L.S. **Ação antiagregante e moduladora da função vascular da β -Glucana extraída de *Saccharomyces cerevisiae* e da forma carboximetilada derivada**. Dissertação de Mestrado em Ciências da Nutrição. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2016.
- BEZERRA, L. S. et al. Modulation of vascular function and anti-aggregation effect induced by (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6)-beta-d-glucan of *Saccharomyces cerevisiae* and its carboxymethylated derivative in rats. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 3, p. 448-455, 2017.
- BIMCZOK, D. et al. Short chain regioselectively hydrolyzed scleroglucans induce maturation of porcine dendritic cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 2, p. 321-331, 2009.
- BLOCK, G. et al. Factors associated with oxidative stress in human populations. **American Journal of Epidemiology**, v. 156, n. 3, p. 274-85, 2002.

BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1→3)-β-d-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, n. 1, p. 3-14, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças e Agravos não transmissíveis e Promoção da Saúde. **Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, (Vigitel)**. Brasília, 2017.

BROWN, G. D. et al. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 9, p. 1119-24, 2003.

BRUCE, K. D.; HANSON, M. A. The developmental origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome. **Journal of Nutrition**, v. 140, n. 3, p. 648-52, 2010.

CARVALHO-GALVÃO, A. et al. A Newly Isolated Carboxymethyl-Glucan (CM-G) Restores Depressed Baroreflex Sensitivity in Renovascular Hypertensive Rats. **Frontiers in Physiology**, v.9, n.607, p.1-8, 2018.

CAMPION, J.; MILAGRO, F. I.; MARTINEZ, J. A. Individuality and epigenetics in obesity. **Obesity Reviews**, v. 10, n. 4, p. 383-92, 2009.

CHAN, G. C.-F.; CHAN, W. K.; SZE, D. M.-Y. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 2, 2009.

CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal beta-(1→3), (1→6)-glucans. **Mycological Research - Journal**, v. 111, n. Pt 6, p. 635-52, 2007.

CHEN, X.; ZHANG, L.; CHEUNG, P. C. K. Immunopotential and anti-tumor activity of carboxymethylated-sulfated β-(1→3)-d-glucan from *Poria cocos*. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 4, p. 398-405, 2010.

CHEN, Y. et al. Acetylation and carboxymethylation of the polysaccharide from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities. **Food chemistry**, v. 156, p. 279-288, 2014.

CHESSELL, I. P. et al. Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. **Pain**, v. 114, n. 3, p. 386-396, 2005.

CHRYSOHOOU, C. et al. The implication of obesity on total antioxidant capacity in apparently healthy men and women: the ATTICA study. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 17, n. 8, p. 590-7, 2007.

CLOETENS, L. et al. Role of dietary beta-glucans in the prevention of the metabolic syndrome. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 8, p. 444-458, 2012.

CONSIDINE, R. V. et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. **New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 5, p. 292-5, 1996.

CORNEJO-PAREJA, I. et al. Importance of gut microbiota in obesity. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.35, p.1-18, 2018.

CROWLEY, V. E. Overview of human obesity and central mechanisms regulating energy homeostasis. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 245-55, 2008.

EL ENSHASY, H. A.; HATTI-KAUL, R. Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. **Trends Biotechnol**, v. 31, n. 12, p. 668-77, 2013.

EL KHOURY, D. et al. Beta glucan: health benefits in obesity and metabolic syndrome. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2012, p. 851362, 2012.

ELLULU, M. S. et al. Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. **Archives of medical science: AMS**, v. 13, n. 4, p. 851, 2017.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A. et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 5, p. 3117-3132, 2011.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de Pediatria** v. 83, n. 5 Suppl, p. S192-203, 2007.

FREIRE, P. P. et al. Obesity does not Lead to Imbalance Between Myocardial Phospholamban Phosphorylation and Dephosphorylation. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 103, n. 1, p. 41-50, 2014.

FRITZ, M.; RINALDI, G. Blood pressure measurement with the tail-cuff method in Wistar and spontaneously hypertensive rats: influence of adrenergic- and nitric oxide-mediated vasomotion. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 58, n. 3, p. 215-21, 2008.

GALASSETTI, P. Inflammation and oxidative stress in obesity, metabolic syndrome, and diabetes. **Experimental diabetes research**, v. 2012, p. 132-134, 2012.

GEOVANINI, G. R.; LIBBY, P. Atherosclerosis and inflammation: overview and updates. **Clinical Science**, v. 132, n. 12, p. 1243-1252, 2018.

GONZALEZ, J. et al. Essential hypertension and oxidative stress: New insights. **The World Journal of Cardiology** v. 6, n. 6, p. 353-66, 2014.

GRAY, S. L.; VIDAL-PUIG, A. J. Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. **Nutrition Reviews**, v. 65, n. 6, p. 7-12, 2007.

GUILHERME, A. et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 367-77, May 2008.

HADI, H. A.; CARR, C. S.; AL SUWAIDI, J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. **Vascular Health and Risk Management**, v. 1, n. 3, p. 183-98, 2005.

HAGIWARA, S. et al. A phytochemical in the edible Tamogi-take mushroom (*Pleurotus cornucopiae*), D-mannitol, inhibits ACE activity and lowers the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 69, p. 1603-1605, 2005.

HARTWICH, J. et al. Effect of supplementation with vitamin E and C on plasma hsCRP level and cobalt-albumin binding score as markers of plasma oxidative stress in obesity. **Genes and Nutrition**, v. 2, n. 1, p. 151-4, 2007.

- HEYMSFIELD, S. B.; WADDEN, T. A. Mechanisms, pathophysiology, and management of obesity. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 3, p. 254-266, 2017.
- HEYNE, A. et al. An animal model of compulsive food-taking behaviour. **Addiction Biology**, v. 14, n. 4, p. 373-83, 2009.
- HIGA, T. S. et al. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 47-54, 2014.
- HUANG, J. et al. Cinnamaldehyde reduction of platelet aggregation and thrombosis in rodents. **Thromb.Res.**, v. 119, p. 337-342, 2007.
- JAMOIS, F. et al. Glucan-like synthetic oligosaccharides: interactive synthesis of linear oligo-b-(1,3)-glucans and immunostimulatory effects. **Glycobiology**, v. 15, p. 393-407, 2005.
- KAGIMURA, F. Y. et al. Biological activities of derivatized d-glucans: A review. **International Journal of Biology Macromolecules**, v. 72c, p. 588-598, 2015.
- KAGIMURA, F.Y. et al. Biological activities of derivatized D-glucans: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 588-98, 2015.
- KENNEDY, A. J. et al. Mouse models of the metabolic syndrome. **Disease Models & Mechanisms**, v. 3, n. 3-4, p. 156-66, 2010.
- KHAN, N. I.; NAZ, L.; YASMEEN, G. Obesity: an independent risk factor for systemic oxidative stress. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 19, n. 1, p. 62-5, 2006.
- KIM, Y. T. et al. Structural characterization of beta-D-(1 --> 3, 1 --> 6)-linked glucans using NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 328, n. 3, p. 331-41, 2000.
- KRIZKOVÁ, L. et al. Fungal beta-(1-3)-D-glucan derivatives exhibit high antioxidative and antimutagenic activity in vitro. **Anticancer Research**, v. 23, n. 3B, p. 2751-2756, 2003.
- LEWIS, A. R.; SINGH, S.; YOUSSEF, F. F. Cafeteria-diet induced obesity results in impaired cognitive functioning in a rodent model. **Heliyon**, v. 5, n. 3, p. 01-23, 2019.
- LOZANO, I. et al. High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. **Nutrition & Metabolism**, v. 13, p. 15, 2016.
- MACHOVÁ, E.; CÍZOVÁ, A.; BYSTRICK, P. Effect of carboxymethylation on antioxidant properties and radicaldegradation of mannans and glucans. **Carbohydrate Polymers**, v.112, p.603-607, 2014.
- MAGNANI, M. et al. Effects of carboxymethyl-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* on the peripheral blood cells of patients with advanced prostate cancer. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 1, n. 5, p. 859-862, 2010.
- MAGNANI, M. et al. Optimized methodology for extraction of (1-3)(1-6)- β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the

corresponding carboxymethyl derivative. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 658-665, 2009.

MAGNANI, M. et al. Analysis of peripheral T cells and the CC chemokine receptor (CCR5) delta32 polymorphism in prostate cancer patients treated with carboxymethyl-glucan (CM-G). **Natural Product Research**, v. 26, n. 10, p. 945-51, 2012.

MAGNANI, M. et al. Protective effect of carboxymethyl-glucan (CM-G) against DNA damage in patients with advanced prostate cancer. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 1, p. 131-5, Jan 2011.

MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. Beta-glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 3, p. 631-650, 2008.

MIADOKOVA, E. et al. The role of natural biopolymers in genotoxicity of mutagens/carcinogens elimination. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the Univesity Palacky**, v. 149, n. 2, p. 493-6, 2005.

MOLLER, D. E.; KAUFMAN, K. D. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. **Annual Review of Medicine**, v. 56, p. 45-62, 2005.

MORRIS, M. J. et al. Brain neuropeptide Y and CCK and peripheral adipokine receptors: temporal response in obesity induced by palatable diet. **International Journal of Obesity**, v. 32, n. 2, p. 249-58, 2008.

MORROW, J. D. Is oxidant stress a connection between obesity and atherosclerosis? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 3, p. 368-70, Mar 1 2003.

MOSIKANON, K. ET AL. Yeast β -Glucan Modulates Inflammation and Waist Circumference in Overweight and Obese Subjects. **Journal of Dietary Supplements**, v.4, n.14, p.173-185, 2017.

MOURA, L. P. et al. Spirulina, exercício e controle da glicemia em ratos diabéticos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 56, n. 1, p. 25-32, 2012.

MUNZBERG, H.; FLIER, J. S.; BJORBAEK, C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 4880-9, 2004.

NAVES, A. **Nutrição Clínica Funcional**: obesidade. 2º ed, São Paulo: VP Editora, 2014.

NERY, C. D. S. et al. Murinometric evaluations and feed efficiency in rats from reduced litter during lactation and submitted or not to swimming exercise. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, n. 1, p. 49-55, 2011.

NICOLOSI, R. et al. Plasma lipid changes after supplementation with b-glucan fiber from yeast. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 208-2012, 1999.

NOVELLI, E. L. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, n. 1, p. 111-9, 2007.

OOI, V. E. C.; LIU, F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 7, p. 715-729, 2000.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **Global Healt Observatory Data Repository - Obesity**. 2016.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Sistemas alimentares e nutrição: a experiência brasileira para enfrentar todas as formas de má nutrição**. Brasília: OPAS, 2017.

PANCHAL, S. K.; BROWN, L. Rodent models for metabolic syndrome research. **Journal Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-14, 2011.

PANCHAL, S. K. et al. High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 57, n. 1, p. 51-64, 2011.

PANCHAL, S. K.; WARD, L.; BROWN, L. Ellagic acid attenuates high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. **European Journal of Nutrition**, v. 52, n. 2, p. 559-68, 2013.

PIHL, E. et al. Atherogenic inflammatory and oxidative stress markers in relation to overweight values in male former athletes. **International Journal of Obesity**, v. 30, n. 1, p. 141-6, 2006.

PISAREVA, E. et al. Role of Changes in Serum Chitotriosidase Activity in Mice under Conditions of Hyperlipidemia and Lipid-Lowering Effect of Carboxymethylated (1-3)-[beta]-D-Glycan. **Bulletin of experimental biology and medicine**, v. 157, n. 5, p. 555, 2014.

POUDYAL, H. et al. Lipid redistribution by alpha-linolenic acid-rich chia seed inhibits stearoyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 2, p. 153-62, 2012.

RASK-MADSEN, C.; KAHN, C. R. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 9, p. 2052-9, 2012.

ROSINI, T. C.; SILVA, A. S. R. D.; MORAES, C. D. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, p. 383-387, 2012.

SALUK-JUSZCZAK, J.; KROLEWSKA, K.; WACHOWICZ, B. Response of blood platelets to beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*. **Platelets**, v. 21, n. 1, p. 37-43, 2010.

SAMPEY, B. P. et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity (Silver Spring)**, v. 19, n. 6, p. 1109-17, 2011.

ŠANDULA, J. et al. Microbial (1→3)-β-d-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, n. 3, p. 247-253, 1999.

SHIN, J.-Y. et al. Structural and biological study of carboxymethylated *Phellinus linteus* polysaccharides. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3368-3372, 2007.

- SILVA, A. Z. et al. Botryosphaeran reduces obesity, hepatic steatosis, dyslipidaemia, insulin resistance and glucose intolerance in diet-induced obese rats. **Life Sciences**, v. 211, p. 147-156, 2018.
- SLAMENŇOVÁ, D. et al. Protective effects of fungal (1→3)-β-D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. **Cancer letters**, v. 198, n. 2, p. 153-160, 2003.
- SPEAKMAN, J. R. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. **International Journal of Obesity**, v. 43, n. 8, p. 1491-1492, 2019.
- SUMAN, R. K. et al. Development of an experimental model of diabetes co-existing with metabolic syndrome in rats. **Advances in pharmacological sciences**, v. 2016, 2016.
- TAO, Y.; ZHANG, L.; CHEUNG, P. C. K. Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 13, p. 2261-2269, 2006.
- THALER, J. P. et al. Hypothalamic inflammation: marker or mechanism of obesity pathogenesis? **Diabetes**, v. 62, n. 8, p. 2629-34, Aug 2013.
- TIAN, C. et al. Green tea polyphenols reduced fat deposits in high fat-fed rats via erk1/2-PPARgamma-adiponectin pathway. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. 267-275, 2013.
- VARA, D.; CAMPANELLA, M.; PULA, G. The novel NOX inhibitor 2-acetylphenothiazine impairs collagen- dependent thrombus formation in a GPVI- dependent manner. **British journal of pharmacology**, v. 168, n. 1, p. 212-224, 2013.
- VALASSI, E.; SCACCHI, M.; CAVAGNINI, F. Neuroendocrine control of food intake. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 18, n. 2, p. 158-68, 2008.
- VERAS, R. C. et al. Participation of nitric oxide pathway in the relaxation response induced by E-cinnamaldehyde oxime in superior mesenteric artery isolated from rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 58-66, Jul 2013.
- VITAGLIONE, P. et al. β-Glucan-enriched bread reduces energy intake and modifies plasma ghrelin and peptide YY concentrations in the short term. **Appetite**, v. 53, n. 3, p. 338-344, 2009.
- VON DIEMEN, V.; TRINDADE, E. N.; TRINDADE, M. R. M. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 21, n. 6, p. 425-429, 2006.
- WANG, Q. et al. Antioxidant activity of carboxymethyl (1→3)-β-D-glucan (from the sclerotium of *Poria cocos*) sulfate (in vitro). **International journal of biological macromolecules**, v. 69, p. 229-235, 2014.
- WANG, Y.; YU, Y.; MAO, J. Carboxymethylated β-glucan derived from *Poria cocos* with biological activities. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 22, p. 10913-10915, 2009.
- WOJTALA, A. et al. Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry. **Methods in enzymology**, v. 542, p. 243-262, 2013.

WOJTALA, A. et al. Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. **Methods Enzymology**, v. 542, p. 243-62, 2014.

WU, T.-T. et al. Atherogenic index of plasma (AIP): a novel predictive indicator for the coronary artery disease in postmenopausal women. **Lipids in Health and Disease**, v. 17, n. 1, p. 197, 2018.

XIN-ZHOUNG, H.U. Structure and Characteristic of β -Glucan in Cereal: A Review. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.39, n.6, 2014.

XU, H.; ZOU, S.; XU, X. The β -glucan from *Lentinus edodes* suppresses cell proliferation and promotes apoptosis in estrogen receptor positive breast cancers. **Oncotarget**, v.8, n.49, p. 86693-86709, 2017.

YONEDA, K. et al. Identification of the active metabolite of ticlopidine from rat in vitro metabolites. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 3, p. 551-557, 2004.

ZAREMBA, S. M. M. et al. Effects of oat beta-glucan consumption at breakfast on ad libitum eating, appetite, glycemia, insulinemia and GLP-1 concentrations in healthy subjects. **Appetite**, v. 128, p. 197-204, 2018.

ZHANG, L. et al. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1515-1521, 2005.

APÊNDICES

ARTIGO 01: ARTIGO ORIGINAL

CARBOXYMETHYL GLUCAN REDUCES FOOD CONSUMPTION, WEIGHT GAIN
AND IMPROVES GLYCEMIC PROFILE, DYSLIPIDEMIA AND INFLAMMATION IN
RATS FED A HYPERCALORIC DIET

Periódico: MOLECULES

ISSN: 1420-3049

FI: 3.060

QUALIS: B1 na área de Nutrição
(2013-2016)

CARBOXYMETHYL GLUCAN REDUCES FOOD CONSUMPTION, WEIGHT GAIN AND IMPROVES GLYCEMIC PROFILE, DYSLIPIDEMIA AND INFLAMMATION IN RATS FED A HYPERCALORIC DIET

Rayanne de Araújo Torres^{a*}, Marciane Magnani^a, Ricardo Cartaxo Ramalho^c, Adriano Francisco Alves^c, Islânia Giselia Albuquerque Gonçalves^c, Isac Almeida de Medeiros^b, Robson Cavalcante Veras^a

^a Graduate Program in Nutritional Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, Campus I, 58059-900, João Pessoa, Paraíba – Brazil

^b Graduate Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Health Sciences Center, UFPB, Campus I, 58059-900, João Pessoa, Paraíba - Brazil

^c Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, UFPB, Campus I, 58059-900, João Pessoa, Paraíba - Brazil

* Corresponding author: Rayanne de Araújo Torres

Universidade Federal da Paraíba – Campus I, 58059-900

Centro de Ciências da Saúde

Pós-Graduação em Ciências da Nutrição

João Pessoa, Paraíba, Brasil

Tel.: +55 (83) 3216-7417

E-mail: rayanne2901.nutri@gmail.com

ABSTRACT

Carboxymethyl glucan (CMG) is a semi-synthetic derivative of β (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6) glucan obtained by replacing hydroxyl groups with carboxyl groups to improve solubility and enhance effects such as immunostimulant and antioxidant. Obesity is a multifactorial chronic disease characterized by a high accumulation of body fat and a chronic pro-inflammatory state associated with other diseases such as diabetes, cardiovascular disease, and some cancers. This study aimed to investigate the effect of oral administration of CMG in rats for twelve weeks, regarding changes related to the consumption of hypercaloric diets, such as for overweight, glucose intolerance, dyslipidemia, and hepatic steatosis, as well as the pro-inflammatory state. The administration of CMG reduced food intake and caloric intake in these animals and resulted in lower weight gain and body fat accumulation, improving glycemic, lipemic profile, and hepatic lipid accumulation. Also, the substance had an essential effect in reducing cardiovascular risk, significantly modulating ($p < 0.05$) IL-12, MCP-1, and CRP levels, as well as increasing IL-10 levels, reducing the pro-active state. -Inflammatory and the progression of atherosclerotic disease. The results demonstrate significant effects of CMG in the prevention of weight gain and consequent improvement of the metabolic profile, acting mainly in the control of food intake and reducing fat accumulation and inflammation induced by the consumption of hypercaloric diet.

Keywords: carboxymethyl glucan; glucan derivatives; obesity; inflammation; hypercaloric diets

1. INTRODUCTION

The β -D-glucans are polysaccharides that can be extracted from yeast, fungi and some cereals and have received special attention for their bioactive properties and aroused interest in the field of functional foods as they are considered a potential health-promoting food ingredient [1]. This polysaccharide is well recognized for its immunomodulatory properties and its other activities as hypolipidemic, hypoglycemic, antioxidant, antimutagenic and sacietogenic [1-4].

The carboxymethylated (carboxymethyl glucan - CMG) derivative of *Saccharomyces cerevisiae* β - (1-3) (1-6) glucan has been shown to improve physicochemical and biological properties, which ensures increased solubility and greater affinity for cell receptors. Immunological agents with the potential improvement of their effects [5, 6]. Some properties of this compound have been reported as antioxidants, antiaggregants and modulator of vascular function and blood pressure [7-10].

Several studies address the consumption of β -D-glucans as beneficial to health and evidence about the effect on blood glucose, body weight control, and blood pressure control has been increasing in recent years [9, 11-13]. Thus, investigating the biological potential of β -D-glucan-derived molecules in the face of obesity and its complications makes it possible to expand therapeutic interventions and their benefits.

Obesity is a chronic disease characterized by a high accumulation of body fat associated with several diseases such as type 2 diabetes, cardiovascular disease, chronic kidney disease, sleep apnea and some cancers [14]. Obese individuals are also at risk of premature deaths and psychosocial problems that affect the quality of life of this population group in all age groups. Thus, it is considered an essential public health problem and one of the leading causes of death and disability worldwide [15].

Excessive caloric intake causes increased adipose tissue and stimulates the release of inflammatory mediators such as TNF- α and IL-6, and reduces adiponectin production, favoring a pro-inflammatory state and increased oxidative stress. Also, the inflammatory state stimulates the synthesis and secretion of C-reactive protein by the liver, and this set of associated factors increase the risk of developing cardiovascular disease, atherosclerosis, insulin resistance and diabetes [16].

Hence, this study aims to evaluate the potential of carboxymethyl glucan extracted from the cell wall of *S. cerevisiae* against changes induced by the consumption of hypercaloric diet in rats such as obesity, glucose intolerance, dyslipidemia, and inflammation.

2. RESULTS

2.1 Caloric Intake and Food Efficiency

Food intake was higher in animals fed normal caloric diet, but the high energy density of the hypercaloric diet promoted higher caloric consumption in the HCT and H-CMG groups. The H-CMG group showed a reduction in food intake and caloric intake compared to the HCT group (Figure 1A and 1B). Feed efficiency was evaluated by the coefficients of feed efficiency (CFE) and weight gain by caloric intake (CWGCC), as shown in table 1. A significant difference can be observed in the coefficients of the HCT group and compared to the NCT group, demonstrating an efficiency of the hypercaloric diet to induce a higher weight gain, even though there is a lower consumption in grams (CFE) and a high-calorie conversion efficiency of the hypercaloric diet in body weight gain (CWGCC). The carboxymethyl glucan treated group showed food coefficients similar to those of the NCT group.

2.2 Weight gain, body parameters and adiposity index

From the 4th week on, the HCT group showed more significant weight gain when compared to the NCT group. The H-CMG group showed a lower weight gain after 05 weeks of treatment (Figure 2). At the end of the experimental period, a significant weight gain was observed in the animals of the HCT group concerning the NCT and H-CMG groups, with the last group showing the lowest weight gain.

Weight, adiposity index, body parameters, and organ weight data can be seen in Table 1. Body Mass Index (BMI) was higher in the HCT group, and treatment reduced BMI with values similar to those in the NCT group. Abdominal circumference was significantly higher in the HCT group, with no differences between the NCT and H-CMG groups. There were no differences between length in the animals of the three groups. Regarding the adiposity index, it is possible to observe an accumulation of abdominal fat in the HCT group and that the hypercaloric diet was efficient in increasing the deposits of retroperitoneal and epididymal tissue in both groups fed the hypercaloric diet concerning the norm caloric group. However, CMG treatment was sufficient to significantly reduce adiposity index and retroperitoneal fat deposits, with no differences in epididymal tissue, from the HCT group ($p < 0.05$).

Regarding organ weight, there was no significant difference between groups, except for liver weight, which was higher in the HCT group, with no difference between the group treated with CMG and NCT (Table 1).

2.3 Glucose Tolerance Analysis

In the glucose tolerance test, basal glucose levels did not differ between groups (T0). After 30 min administration of a glucose load of 2 g / kg, there was an increase in glycemic levels that peaked at 60 min. Blood glucose from the control and CMG-treated groups returned to baseline after 120 minutes, while the hypercaloric group maintained elevated blood glucose levels, demonstrating glucose intolerance in these animals (Figure 3A). The area under the curve was significantly more significant in the HCT and H-CMG group when compared to the control group; however, between them were lower values of the H-CMG group (Figure 3B).

2.4 Analysis of metabolic parameters

The biochemical parameters analyzed in the study groups are shown in Table 2. Fasting blood glucose was higher in the HCT group. However, treatment with CMG significantly reduced blood glucose compared to the HCT group. As for lipid profile, a significant increase in total cholesterol, triglycerides, and LDL-c were observed in the HCT group and improvement of these parameters in the H-CMG group, except for LDL-c which did not significantly decrease. HDL-c values were similar in all groups. The atherogenic index was significantly higher in the HCT group when compared to the NCT and H-CMG. Hs-CRP levels were lower in the H-CMG group when compared to the NCT and HCT groups.

2.5 Inflammatory analysis

The inflammatory parameters evaluated by the flow cytometry technique were IL12-p70, MCP-1, and IL-10, as shown in Figure 4. A significant increase in the HCT group of IL12-p70 and MCP inflammatory markers was observed (Figure 4A and 4), and reduction of IL-10 (Figure 4C). The H-CMG group showed a significant reduction in these inflammatory parameters, showing lower levels of IL12-p70 and MCP-1 and a significant increase in the anti-inflammatory marker IL-10 compared to the HCT and NCT groups ($p < 0.05$).

2.6 Histology of organs and tissues

Histological analysis of the heart, liver, kidney and adipose tissue revealed an increase in the inflammatory process and accumulation of fat vacuoles in the HCT group, as lymphocyte infiltration between the cardiac muscle bundles and the kidneys showed the process of lymphocyte-rich interstitial nephritis. Perivascular and tubulointerstitial with the presence of hypocellularized glomeruli with slight enlargement of the mesangial matrix. In the liver is the presence of severe hepatic microvesicular steatosis. In adipose tissue vessel dilation is a suggestive finding of the increased inflammatory process (Figure 5B; 5E; 5H; 5K). In the H-CMG group, there were no signs of inflammation or accumulation of fat vacuoles in the liver (Figure 5C; 5F; 5I; 5L).

3. DISCUSSION

The results observed in this study demonstrate the ability of carboxymethyl glucan, derived from *S. cerevisiae* β -glucans, to prevent weight gain induced by the consumption of hypercaloric diets in rats and consequently attenuate the effects of obesity, reducing fat tissue deposits, improved glucose intolerance and dyslipidemia, decreased liver fat accumulation, and inflammation. It is possible to relate the lower weight gain in animals treated with CMG, the decrease in food intake and total caloric intake when compared to the control group of the hypercaloric diet, indicating satiating action of CMG.

Among the most accepted mechanisms is the ability of these compounds to reduce energy intake by increasing satiety [17, 18]. Vetaglione et al. [19] observed a decrease in appetite after administering barley glucans in humans, modulated by decreased ghrelin release and increased intestinal PYY, resulting in increased satiety and reduced caloric intake. Some studies have shown reduced weight gain and body adiposity in similar animal models after glucan consumption [12, 20, 21].

Besides, the weight control, CMG was able to improve glucose sensitivity after 120 min of oral glucose tolerance test and to reduce the area under the glycemic curve of treated animals, in addition to a reduction in fasting glucose when compared. To the control group of the hypercaloric diet. Consumption of soluble fibers has long been associated with reduced fasting and postprandial glycemia, already well reported in the literature for food-borne glucans [1, 22, 23]. Evidence shows that these polysaccharides increase viscosity and prolong

intestinal transit time and nutrient absorption rate, which influences both the satiety process and the glycemic and lipemic profile. In addition, increased contact time with enteroendocrine cells stimulates the release of satiety-related peptides, enhancing their satiating effect [24, 25].

Some studies have shown that the consumption of dietary fiber that increases viscosity, such as guar gum, psyllium, and β -glucans from cherries and fungi, has been strongly associated with reduced hunger and appetite when compared with low or low diets without fiber addition [12, 26, 27].

Given these findings, it can be observed that the CMG has an important potential in the control of body weight, acting in the regulation of the appetite and inducing increase of satiety and less food consumption contributing to the reduction of the accumulation of adipose tissue and the improvement of metabolic parameters such as blood glucose. In addition, the reduction in BMI and adiposity index reinforces the importance of this substance as a strategy to assist in the treatment of obesity and complications such as glucose intolerance, diabetes, and cardiovascular disease.

The glycemic control and maintenance of adequate lipid profile are very healthy to maintain the integrity of biological systems and reduce the risks related to overweight and cardiovascular diseases. It is well accepted that the high concentration of FFA present in obesity contributes to the synthesis of hepatic triglycerides, increasing the risk for dyslipidemia and hepatic steatosis [28, 29]. In the present study, an increase in triglycerides, total cholesterol, and LDL cholesterol was observed in animals fed a high-calorie diet, while treatment with CMG improved the lipid profile of the animals, significantly reducing triglyceride levels, total cholesterol, and atherogenic index.

The reduction of fat tissue reserve in treated animals directly impacts the improvement of lipid profile, in addition to improving glucose sensitivity and reducing the amount of FFA and consequently the hepatic lipid accumulation. Retroperitoneal and epididymal tissues are the major energy deposits, so their increase implies the release of factors that contribute to insulin resistance, increases the release of FFA and proinflammatory cytokines [15]. Thus, the reduction in body fat, evidenced in our studies by the lower adiposity index and retroperitoneal adipose tissue, after treatment with CMG, contributed to the improvement of these metabolic parameters.

The treatment and prevention of atherosclerotic disease has gained considerable attention and encouraged changes in clinical practice, as inflammation is considered a key point for atherogenesis and contributes to the residual risk of the disease, arousing interest in new strategies that help not only in the treatment of dyslipidemia but also in inflammation

[30]. Increased adipose tissue is associated with a chronic inflammatory state, and excess macronutrients in adipose tissue stimulate the release of inflammatory mediators that further exacerbates the inflammatory process and favors atherosclerotic disease [16]. This association increases residual risk and increases the number of cardiovascular events, including in individuals with treated dyslipidemia.

In the present study, a pro-inflammatory state was observed in the animals of the high-calorie diet group, with a significant increase in the expression of inflammatory cytokines such as IL-12p70 and MCP-1, as well as a decrease in IL-10. We also highlight a higher concentration of CRP in obese animals compared to the treated group, reinforcing the pro-inflammatory state associated with excess adipose tissue, also highlighting the ability of the diet to induce obesity and its complications. On the other hand, the immunomodulatory potential of CMG in reducing pro-inflammatory cytokine expression and CRP levels in animals receiving treatment during the twelve weeks is observed.

Although it is well accepted that inflammation occurs in obese individuals by elevating a set of cytokines and chemokines, studies seek to identify inflammatory mediators that contribute to the inflammation and progression of chronic diseases such as diabetes, in this context, IL-12 has been associated. Obesity and low-grade inflammation, and pathological conditions such as diabetes and metabolic syndrome [31-33]. In addition, some studies have shown that chemokine and cytokine levels are increased during obesity and the removal of these molecules improves insulin signaling in vitro and in vivo [34].

Thus, considering the stages of the pathophysiological process of atherogenesis, initiated by endothelial lesion and recruitment of inflammatory cells and the role of chemokines in the migration of monocytes to the intima, specifically by the interaction of MCP-1 with the CCR-2 receptor, favoring the formation of foam cells by internalization of lipoprotein particles by macrophages [30]. It is essential to highlight the important role of CMG in reducing MCP-1 levels and, consequently, to undermine the progression of atherosclerotic disease, which associated with occasional improvement of lipid profile and inflammatory mediators directly involved in the atherogenic process and increased cardiovascular risk, makes CMG an important substance in the prevention and reduction of cardiometabolic risk.

The anti-inflammatory effect was also evident after treatment with CMG. IL-10 is considered anti-inflammatory for its immunosuppressive and protective role in obesity-induced metabolic changes and insulin resistance. In addition, there is a significant reduction in IL-10 levels after weight loss and, coincidentally, a significant increase in its production by

white adipose tissue and a reduction in gene expression of proinflammatory cytokines [35]. The results that corroborate with those found in this study, in which the lower weight gain in the treated group animals is associated with increased IL-10 expression and improved anti-inflammatory potential.

C-reactive protein is an inflammation-sensitive marker with expression and release by liver cells, stimulated by increased inflammatory cytokines. CRP levels are directly related to body parameters of obesity, such as BMI, and central obesity, such as adiposity index and waist circumference [16, 36]. Thus, the consumption of CMG caused a lower plasma CRP concentration in the treated animals, which may be related to the reduction of body weight and fat and lower BMI, besides the improvement of the inflammatory profile in these animals after the consumption of CMG during the twelve weeks.

The hypercaloric diet was also efficient in increasing the hepatocyte cytoplasmic vacuolization of control animals, presenting histological evidence of hepatic steatosis, closely related to obesity. Meanwhile, treatment with CMG prevented the accumulation of these liver lipids, as already mentioned, by their ability to reduce body fat and improve hepatic triglyceride synthesis. In addition, an increase in liver weight was observed in the HCT group relative to the H-CMG and NCT group. Previous studies have shown that the consumption of glucans by animals fed a high-calorie diet significantly reduced the accumulation of liver fat associated with overweight [37, 38].

4. MATERIALS AND METHODS

4.1 Materials

Glucose and sodium chloride (NaCl) were obtained from Sigma-Aldrich. Xylazine and ketamine were acquired from Syntec and heparin from Blau. The Cytometric Bead Array (CBA) kit was obtained from BD Bioscience. Commercial Biochemical Test Kits were purchased from Labtest, Belo Horizonte, Brazil.

4.2 Obtention of the Carboxymethyl Glucan (CMG)

Saccharomyces cerevisiae-derived Carboxymethyl Glucan (CMG) was obtained from yeast cream by process of collecting pure polymer using sonication and enzymatic treatment after extraction with hot water, as described by Magnani et al. [6]. Derivatization was

performed using mono chloroacetic acid to achieve a degree of substitution (DS) of 0.8, as solubility and bioactivity identified in previous studies [39, 40]. DS was controlled by potentiometric titration with potassium hydroxide solution [41]. Chemical identity and structural modifications were confirmed by NMR and infrared analysis [6]. The material was supplied by the Food Microbial Processes and Food Biochemistry laboratory of the Department of Food Engineering of the Federal University of Paraíba - UFPB.

4.3 Animals and Diet

The experiments were conducted according to Brazilian Federal Law No. 11794/08, which establishes procedures for the scientific use of laboratory animals and all experimental procedures were approved by the Animal Use Ethics Committees of the Federal University of Paraíba (CEUA 074 / 2017). The animals were kept under controlled conditions at room temperature, subjected to a 12: 12-hour light-dark cycle and constant relative humidity with free access to food and water.- Male rats (12 weeks old; 270-320 g) were randomly divided into three groups (n = 8): norm caloric diet + saline (NCT); Hypercaloric diet + saline (HCT); Hypercaloric diet + CMG, (H-CMG; 20 mg / kg body weight). The substance was administered orally by gavage (i.e.); Control animals received saline (i.e.) as placebo throughout the study. The treatment lasted twelve weeks, and the administration of the substance and diet were started simultaneously.

The norm caloric group received a standard commercial diet (Presence®), containing 23% protein, 63% carbohydrate and 4% lipid, providing a total of 3.8 kcal/g of feed. The hypercaloric diet was adapted from Panchal et al. [42] and consisted of 155g of commercial feed, 155g of fructose, 200g of beef tallow, 395g of condensed milk and 25g of a saline mixture, providing 5.1 kcal / g of feed. All components were weighed, mixed, pelleted, and air-oven dried (AL 102/250, America Lab, São Paulo, Brazil) for approximately 48 hours.

4.4 Food Consuming and Body Parameters

Water and food intake were monitored daily. Bodyweight was measured weekly. Abdominal circumference and body length (nose to anus) were measured at the end of the experimental protocol using an inelastic tape, with animals anesthetized with ketamine (60 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg), intraperitoneally. Body Mass Index (BMI) was calculated by body weight (in grams) / [body length (in centimeters)]² [43].

Caloric intake was calculated based on the average daily intake of each animal, in grams, multiplied by the corresponding calorie from the norm caloric or hypercaloric diet. In order to evaluate the coefficients of food efficiency (CFE) and weight gain by caloric consumption (CWGCC), the data regarding mass body gain (g), total food intake (g) and total energy consumption (kcal) were considered. 12-week experimental period [44].

4.5 Oral Glucose Tolerance Test

In the last week of treatment, the animals underwent nocturnal fasting to perform the glucose tolerance test (GTT). Fasting blood glucose was determined from aliquots of caudal vein blood using a glucometer (On Call Plus, MedLevensohn®, Espírito Santo, Brazil). Then, a 40% glucose solution, at a dose of 2 g / kg animal weight, was administered by gavage and then blood glucose concentrations were measured after 30, 60 and 120 minutes and used to calculate blood glucose — the area under the curve (AUC) [45].

4.6 Euthanasia and Biological Material Collection

At the end of the experimental period, after a 12-hour nocturnal fast with anesthetized animals, blood samples were collected in heparinized tubes and centrifuged (3000 rpm / 15 min) to obtain plasma and subsequent biochemical analysis and plasma cytokines. The animals were euthanized, and the retroperitoneal and epididymal adipose tissues were dissected and weighed to calculate the adiposity index [(retroperitoneal + epididymal) / final weight x 100] [46]. The heart, liver, and kidney organs were also removed and weighed separately.

4.7 Evaluation of Biochemical Parameters and Measures of Inflammatory Cytokines

The parameters analyzed were fasting glucose, total cholesterol, triglycerides (TG), LDL cholesterol (LDL-c), VLDL cholesterol (VLDL-c) and HDL cholesterol (HDL-c); C-reactive protein (CRP); aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and creatinine. All analyzes were obtained using automated spectroscopic readings through reactions using commercial kits [47]. The atherogenic index was calculated as $\log (TG / HDL-C)$ [48]. With plasma collected from the animals, the inflammatory markers: interleukin-10 (IL-10), monocyte chemotactic protein (MCP-1) and interleukin-12p70 (IL-

12p70) levels were measured in a single sample by the Cytometric Bead Array (CBA) cat no. 552364, following the manufacturer's instructions [49]. The samples were taken to the FACS Canto-II cytometer equipped with 15 mW argon laser and $\lambda = 488$ nm for sample reading and analysis using the DIVA 6.0 software (BD, Santa Monica, CA, USA).

4.8 Histology of Organs and Tissues

For histological studies, the fat, heart, and liver were perfused in 10% buffered neutral formalin solution and kept in this same solution for three days and then dehydrated and embedded in paraffin wax. Thin sections (7 μ m) of the left ventricle, liver, and adipose tissue were cut and stained with hematoxylin and eosin for determination of inflammatory cell infiltration [50].

4.9 Statistical Analysis

Results were expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons. Values were considered significant when $p < 0.05$. GraphPad Prism version 6.0® and DIVA 6.0 (BD, Santa Monica, CA, USA) were used for the analysis.

5. CONCLUSION

In conclusion, our results demonstrate the biological potential of carboxymethyl glucan against obesity-related changes such as excess body fat, glucose intolerance, dyslipidemia, hepatic steatosis, and inflammation, highlighting its beneficial effects and use as an alternative for prevention of these conditions. It is suggested that CMG has an important effect on appetite control, favoring the reduction of caloric intake and consequently weight gain, which is reflected in the improvement of the metabolic and inflammatory profile of obese animals, being eminently efficient in reducing risk. Finally, there is a need for further studies to clarify the mechanisms by which CMG acts in order to demonstrate the potential of these carboxymethylated polymers in relation to the effects of β -glucans of cherries and fungi and thus contribute to the evidence that may improve disease prognosis by improving the efficacy of these semi-synthetic compounds.

Acknowledgments

We thank the Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior – CAPES), the National Council for Scientific and Technologic Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq) and the Paraíba Development Institute (Instituto de Desenvolvimento da Paraíba – IDEP-PB) for the financial, technical and infrastructure support needed to conduct this study.

Author Contributions

Formal analysis, R. A. T.; R. C. R. and A. F. A.; implementation of experimental part and data collection, and analysis and interpretation of data investigation, R. A. T.; M. M., R. C. V.; drafting of the manuscript, done the critical revision of the content and interpretation of data, R. A. T.; R. C. V.; I. A. de M.; I. G. A. G. All authors contributed to and have approved the final manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Cloetens, L.; Ulmius, M.; Johansson-Persson, A.; Åkesson, B.; Önning, G., Role of dietary beta-glucans in the prevention of the metabolic syndrome. *Nutrition reviews* **2012**, 70, (8), 444-458.
2. Vaclav, V.; Petr, S.; Luca, V., Beta glucan as therapeutic food. In *Therapeutic Foods*, Elsevier: 2018; pp 239-256.
3. Akramiene, D.; Kondrotas, A.; Didziapetriene, J.; Kevelaitis, E., Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* **2007**, 43, (8), 597-606.
4. Vitaglione, P.; Lumaga, R. B.; Stanzone, A.; Scalfi, L.; Fogliano, V., β -Glucan-enriched bread reduces energy intake and modifies plasma ghrelin and peptide YY concentrations in the short term. *Appetite* **2009**, 53, (3), 338-344.
5. Kagimura, F. Y.; da Cunha, M. A.; Barbosa, A. M.; Dekker, R. F.; Malfatti, C. R., Biological activities of derivatized D-glucans: a review. *International journal of biological macromolecules* **2015**, 72, 588-98.
6. Magnani, M.; Calliari, C. M.; de Macedo Jr, F. C.; Mori, M. P.; de Syllos Cólus, I. M.; Castro-Gomez, R. J., Optimized methodology for extraction of (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative. *Carbohydrate Polymers* **2009**, 78, (4), 658-665.
7. Machová, E.; Bystrický, S., Antioxidant capacities of mannans and glucans are related to their susceptibility of free radical degradation. *International journal of biological macromolecules* **2013**, 61, 308-311.
8. Araújo, V.; de Melo, A.; de Souza, N.; da Silva, V.; Castro-Gomez, R.; Silva, A.; de Souza, E.; Magnani, M., Oral intake of Carboxymethyl-Glucan (CM-G) from yeast (*Saccharomyces uvarum*) reduces malondialdehyde levels in healthy men. *Molecules* **2015**, 20, (8), 14950-14958.
9. Bezerra, L. S.; Magnani, M.; Castro-Gomez, R. J. H.; Cavalcante, H. C.; Silva, T.; Vieira, R. L. P.; Medeiros, I. A.; Veras, R. C., Modulation of vascular function and anti-aggregation effect induced by (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)-beta-d-glucan of *Saccharomyces cerevisiae* and its carboxymethylated derivative in rats. *Pharmacological reports : PR* **2017**, 69, (3), 448-455.
10. Carvalho-Galvao, A.; Gadelha, D. D. A.; de Brito Alves, J. L.; Khan, B. A.; Castro-Gomez, R. J. H.; Cruz, J. C.; Magnani, M.; Braga, V. A., A Newly Isolated Carboxymethyl-Glucan (CM-G) Restores Depressed Baroreflex Sensitivity in Renovascular Hypertensive Rats. *Frontiers in physiology* **2018**, 9, 607.
11. De Oliva-Neto, P.; Oliveira, S. S.; Zilioli, E.; Bellini, M. Z., Yeasts as Potential Source for Prebiotic β -Glucan: Role in Human Nutrition and Health. *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health* **2016**, 331.

12. Silva, A. Z.; Costa, F. P. L.; Souza, I. L.; Ribeiro, M. C.; Giordani, M. A.; Queiroz, D. A.; Luvizotto, R. A. M.; Nascimento, A. F.; Bomfim, G. F.; Sugizaki, M. M.; Dekker, R. F. H.; Barbosa-Dekker, A. M.; Queiroz, E., Botryosphaeran reduces obesity, hepatic steatosis, dyslipidaemia, insulin resistance and glucose intolerance in diet-induced obese rats. *Life sciences* **2018**, 211, 147-156.
13. Zaremba, S. M. M.; Gow, I. F.; Drummond, S.; McCluskey, J. T.; Steinert, R. E., Effects of oat beta-glucan consumption at breakfast on ad libitum eating, appetite, glycemia, insulinemia and GLP-1 concentrations in healthy subjects. *Appetite* **2018**, 128, 197-204.
14. Esteghamati, A.; Mazaheri, T.; Vahidi Rad, M.; Noshad, S., Complementary and alternative medicine for the treatment of obesity: a critical review. *International journal of endocrinology and metabolism* **2015**, 13, (2), e19678.
15. Heymsfield, S. B.; Wadden, T. A., Mechanisms, pathophysiology, and management of obesity. *New England Journal of Medicine* **2017**, 376, (3), 254-266.
16. Ellulu, M. S.; Patimah, I.; Khaza'ai, H.; Rahmat, A.; Abed, Y., Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Archives of medical science: AMS* **2017**, 13, (4), 851.
17. Zhang, P. P.; Hu, X. Z.; Zhen, H. M.; Xu, C.; Fan, M. T., Oat beta-glucan increased ATPases activity and energy charge in small intestine of rats. *Journal of agricultural and food chemistry* **2012**, 60, (39), 9822-7.
18. Frost, G.; Sleeth, M. L.; Sahuri-Arisoylu, M.; Lizarbe, B.; Cerdan, S.; Brody, L.; Anastasovska, J.; Ghourab, S.; Hankir, M.; Zhang, S.; Carling, D.; Swann, J. R.; Gibson, G.; Viardot, A.; Morrison, D.; Louise Thomas, E.; Bell, J. D., The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature communications* **2014**, 5, 3611.
19. Vitaglione, P.; Lumaga, R. B.; Stanzione, A.; Scalfi, L.; Fogliano, V., beta-Glucan-enriched bread reduces energy intake and modifies plasma ghrelin and peptide YY concentrations in the short term. *Appetite* **2009**, 53, (3), 338-44.
20. Bae, I. Y.; Lee, S.; Kim, S. M.; Lee, H. G., Effect of partially hydrolyzed oat β -glucan on the weight gain and lipid profile of mice. *Food Hydrocolloids* **2009**, 23, (7), 2016-2021.
21. Xin-Zhong, H.; Xia-lu, S.; Xiao-ping, L.; Liu, L.; Jian-mei, Z.; Xing-yun, C., Effect of dietary oat β -glucan on high-fat diet induced obesity in HFA mice. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* **2015**, 5, (1), 79-85.
22. Brennan, C. S., Dietary fibre, glycaemic response, and diabetes. *Molecular nutrition & food research* **2005**, 49, (6), 560-570.
23. Kim, H.; Stote, K. S.; Behall, K. M.; Spears, K.; Vinyard, B.; Conway, J. M., Glucose and insulin responses to whole grain breakfasts varying in soluble fiber, β -glucan. *European journal of nutrition* **2009**, 48, (3), 170.
24. Kristensen, M.; Jensen, M. G., Dietary fibres in the regulation of appetite and food intake. Importance of viscosity. *Appetite* **2011**, 56, (1), 65-70.

25. Rebello, C. J.; O'Neil, C. E.; Greenway, F. L., Dietary fiber and satiety: the effects of oats on satiety. *Nutrition reviews* **2016**, 74, (2), 131-47.
26. Dikeman, C. L.; Fahey, G. C., Viscosity as related to dietary fiber: a review. *Critical reviews in food science and nutrition* **2006**, 46, (8), 649-63.
27. El Khoury, D.; Cuda, C.; Luhovyy, B.; Anderson, G., Beta glucan: health benefits in obesity and metabolic syndrome. *Journal of nutrition and metabolism* **2011**, 2012.
28. Rask-Madsen, C.; Kahn, C. R., Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2012**, 32, (9), 2052-9.
29. Heymsfield, S. B.; Wadden, T. A., Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *The New England journal of medicine* **2017**, 376, (15), 1492.
30. Geovanini, G. R.; Libby, P., Atherosclerosis and inflammation: overview and updates. *Clinical science (London, England : 1979)* **2018**, 132, (12), 1243-1252.
31. Suarez-Alvarez, K.; Solis-Lozano, L.; Leon-Cabrera, S.; Gonzalez-Chavez, A.; Gomez-Hernandez, G.; Quinones-Alvarez, M. S.; Serralde-Zuniga, A. E.; Hernandez-Ruiz, J.; Ramirez-Velasquez, J.; Galindo-Gonzalez, F. J.; Zavala-Castillo, J. C.; De Leon-Nava, M. A.; Robles-Diaz, G.; Escobedo, G., Serum IL-12 is increased in Mexican obese subjects and associated with low-grade inflammation and obesity-related parameters. *Mediators of inflammation* **2013**, 2013, 967067.
32. Surendar, J.; Mohan, V.; Rao, M. M.; Babu, S.; Aravindhan, V., Increased levels of both Th1 and Th2 cytokines in subjects with metabolic syndrome (CURES-103). *Diabetes technology & therapeutics* **2011**, 13, (4), 477-82.
33. Wegner, M.; Winiarska, H.; Bobkiewicz-Kozłowska, T.; Dworacka, M., IL-12 serum levels in patients with type 2 diabetes treated with sulphonylureas. *Cytokine* **2008**, 42, (3), 312-6.
34. Nam, H.; Ferguson, B. S.; Stephens, J. M.; Morrison, R. F., Impact of obesity on IL-12 family gene expression in insulin responsive tissues. *Biochimica et biophysica acta* **2013**, 1832, (1), 11-9.
35. McArdle, M. A.; Finucane, O. M.; Connaughton, R. M.; McMorrow, A. M.; Roche, H. M., Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Frontiers in endocrinology* **2013**, 4, 52.
36. Stępień, M.; Stępień, A.; Wlazeł, R. N.; Paradowski, M.; Banach, M.; Rysz, J., Obesity indices and inflammatory markers in obese non-diabetic normo-and hypertensive patients: a comparative pilot study. *Lipids in health and disease* **2014**, 13, (1), 29.
37. Choi, J. S.; Kim, H.; Jung, M. H.; Hong, S.; Song, J., Consumption of barley beta-glucan ameliorates fatty liver and insulin resistance in mice fed a high-fat diet. *Molecular nutrition & food research* **2010**, 54, (7), 1004-13.
38. Xu, J.; Wang, X.; Cao, K.; Dong, Z.; Feng, Z.; Liu, J., Combination of beta-glucan and Morus alba L. Leaf Extract Promotes Metabolic Benefits in Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients* **2017**, 9, (10).

39. Magnani, M.; Castro-Gomez, R. H.; Nobrega Aoki, M.; Pereira Gregório, E.; Libos, F.; Ehara Watanabe, M. A., Effects of carboxymethyl-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* on the peripheral blood cells of patients with advanced prostate cancer. *ExpErimEntal and thErapEutic mEdicinE* **2010**, 1, (5), 859-862.
40. Araujo, V. B.; de Melo, A. N.; de Souza, N. T.; da Silva, V. M.; Castro-Gomez, R. H.; Silva, A. S.; de Souza, E. L.; Magnani, M., Oral Intake of Carboxymethyl-Glucan (CM-G) from Yeast (*Saccharomyces uvarum*) Reduces Malondialdehyde Levels in Healthy Men. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2015**, 20, (8), 14950-8.
41. Šandula, J.; Kogan, G.; Kačuráková, M.; Machová, E., Microbial (1→3)- β -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydrate polymers* **1999**, 38, (3), 247-253.
42. Panchal, S. K.; Brown, L., Rodent models for metabolic syndrome research. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2011**, 2011, 351982.
43. Novelli, E. L.; Diniz, Y. S.; Galhardi, C. M.; Ebaid, G. M.; Rodrigues, H. G.; Mani, F.; Fernandes, A. A.; Cicogna, A. C.; Novelli Filho, J. L., Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory animals* **2007**, 41, (1), 111-9.
44. Nery, C. d. S.; Pinheiro, I. L.; Muniz, G. d. S.; Vasconcelos, D. A. A. d.; França, S. P. d.; Nascimento, E. d., Murinometric evaluations and feed efficiency in rats from reduced litter during lactation and submitted or not to swimming exercise. *Revista Brasileira de medicina do esporte* **2011**, 17, (1), 49-55.
45. de Moura, L. P.; Gurjão, A. L. D.; Claudio, J.; Filho, J.; Mizuno, J.; Suemi, C.; de Mello, M. A. R., Spirulina, exercício e controle da glicemia em ratos diabéticos. *Arq Bras Endocrinol Metab* **2012**, 56, 1.
46. Freire, P. P.; Alves, C. A. B.; Deus, A. F. d.; Leopoldo, A. P. L.; Leopoldo, A. S.; Silva, D. C. T. d.; Tomasi, L. C. d.; Campos, D. H. S.; Cicogna, A. C., Obesity does not Lead to Imbalance Between Myocardial Phospholamban Phosphorylation and Dephosphorylation. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **2014**.
47. Panchal, S. K.; Poudyal, H.; Iyer, A.; Nazer, R.; Alam, A.; Diwan, V.; Kauter, K.; Sernia, C.; Campbell, F.; Ward, L.; Gobe, G.; Fenning, A.; Brown, L., High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **2011**, 57, (1), 51-64.
48. Nwagha, U.; Ikekpeazu, E.; Ejezie, F.; Neboh, E.; Maduka, I., Atherogenic index of plasma as useful predictor of cardiovascular risk among postmenopausal women in Enugu, Nigeria. *African health sciences* **2010**, 10, (3).
49. Chessell, I. P.; Hatcher, J. P.; Bountra, C.; Michel, A. D.; Hughes, J. P.; Green, P.; Egerton, J.; Murfin, M.; Richardson, J.; Peck, W. L.; Grahames, C. B. A.; Casula, M. A.; Yiangou, Y.; Birch, R.; Anand, P.; Buell, G. N., Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* **2005**, 114, (3), 386-396.
50. Poudyal, H.; Panchal, S. K.; Waanders, J.; Ward, L.; Brown, L., Lipid redistribution by alpha-linolenic acid-rich chia seed inhibits stearoyl-CoA desaturase-1 and induces

cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. *The Journal of nutritional biochemistry* **2012**, 23, (2), 153-62.

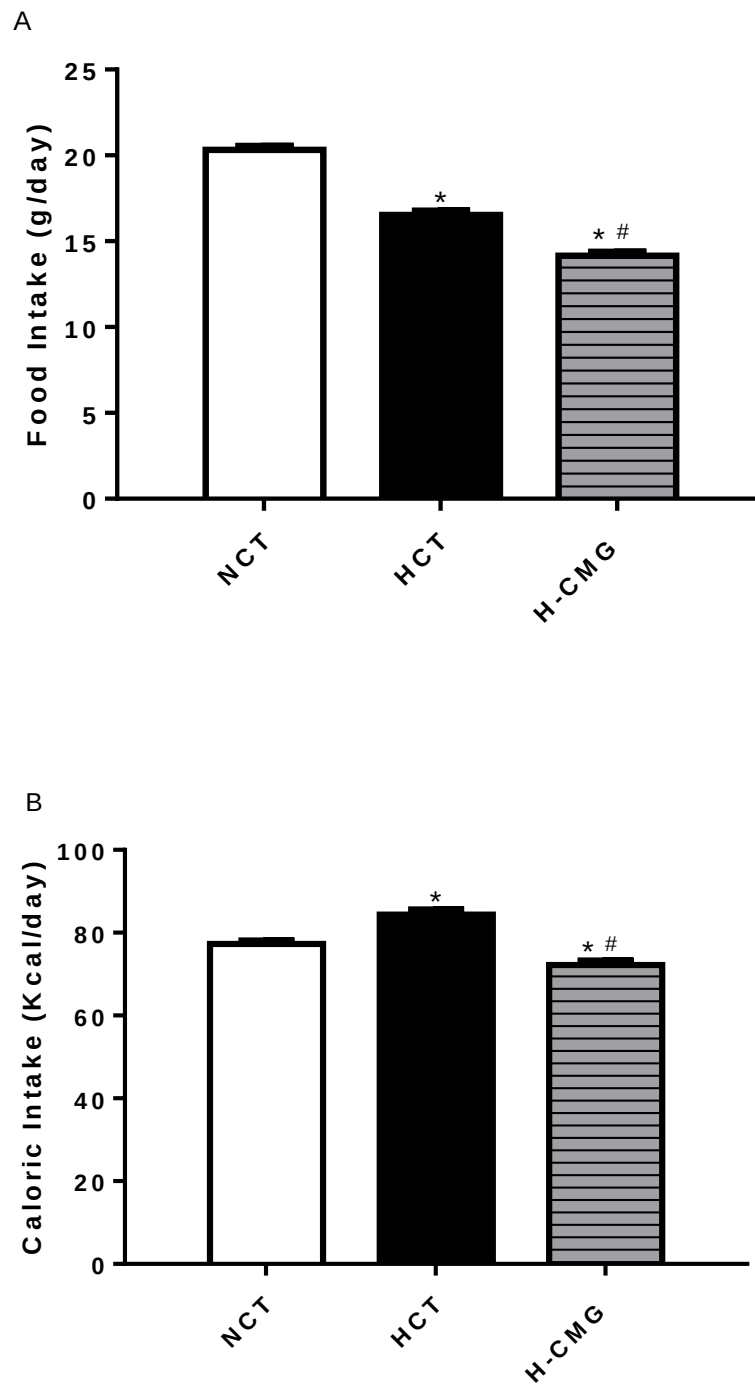


Figure 1: Effect of CMG on food intake (A) and caloric intake (B) in rats fed a control or hypercaloric diet for 12 weeks. NCT: Normocaloric Control; HCT: Hypercaloric Control; H-CMG: Hypercaloric + CMG (20 mg / kg). Data are expressed as mean $\pm$ SEM, (n = 08). * p < 0.05 vs NCT; #p < 0.05 vs HCT.

Table 1 - Metabolic parameters of rats from NCT, HCT, and H-CMG groups.

PARAMETER	NCT	HCT	H-CMG
CFE	4.1 ± 0.2	6.7 ± 0.2*	4.6 ± 0.3 [#]
CWGCC	1.09 ± 0.05	1.31 ± 0.04*	0.90 ± 0.06 [#]
Initial weight (g)	294.0 ± 6.7	308.3 ± 2.5	285.8 ± 3.0
Final weight (g)	378.0 ± 8.9	419.4 ± 4.5*	351.5 ± 4.7 [#]
Weight gain (g)	84.0 ± 4.1	111.1 ± 3.8*	68.3 ± 4.9* [#]
BMI (g/cm ²)	0.55 ± 0.01	0.62 ± 0.01*	0.54 ± 0.01 [#]
Abdominal circumference (cm)	16.0 ± 0.3	18.0 ± 0.2*	16.5 ± 0.2
Length (cm)	26.0 ± 0.3	25.5 ± 0.4	24.5 ± 0.5
Índex of adiposity (%)	3.0 ± 0.3	7.2 ± 0.4*	5.3 ± 0.4* [#]
Retroperitoneal tissue (%)	1.6 ± 0.2	4.8 ± 0.3*	3.2 ± 0.3* [#]
Epididymal tissue (%)	1.4 ± 0.1	2.4 ± 0.1*	2.0 ± 0.1*
Liver (g)	9.8 ± 0.4	11.2 ± 0.3*	9.0 ± 0.2 [#]
Heart (g)	1.14 ± 0.06	1.18 ± 0.09	1.03 ± 0.04
Left Kidney (g)	1.21 ± 0.04	1.16 ± 0.05	1.08 ± 0.03
Right Kidney (g)	1.21 ± 0.03	1.14 ± 0.05	1.08 ± 0.03

NCT: Normocaloric Control; HCT: Hypercaloric Control; H-CMG: Hypercaloric + CMG (20 mg / kg). CFE: coefficient of food efficiency; CWGCC: coefficient of weight gain by caloric consumption. BMI: body mass index. Data are expressed as mean ± SEM, n = 08. * p <0.05 vs NCT; [#]p <0.05 vs HCT.

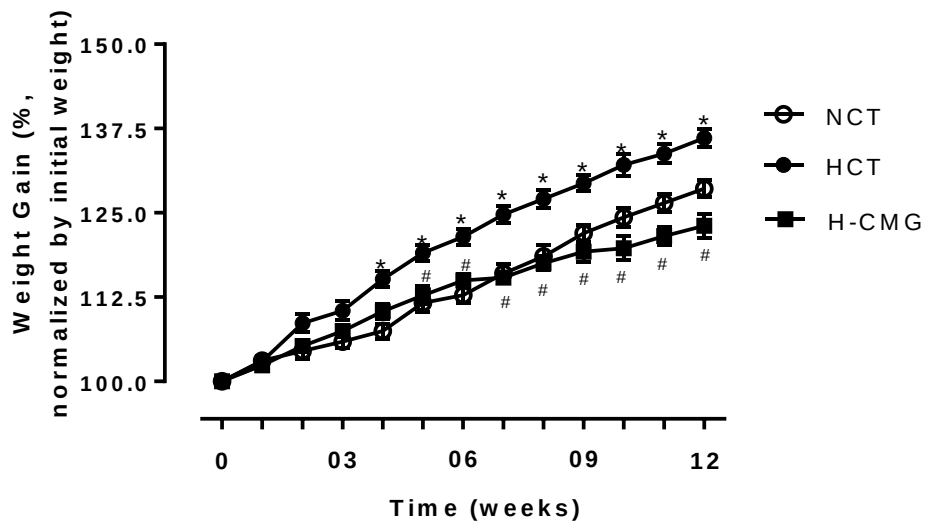


Figure 2: Effect of CMG on the initial weight normalized body weight gain curve in rats fed a control or hypercaloric diet for 12 weeks. NCT: Normocaloric Control; HCT: Hypercaloric Control; H-CMG: Hypercaloric + CMG (20 mg / kg). Data are expressed as mean $\pm$ SEM, (n = 08). * p < 0.05 vs NCT; #p < 0.05 vs HCT.

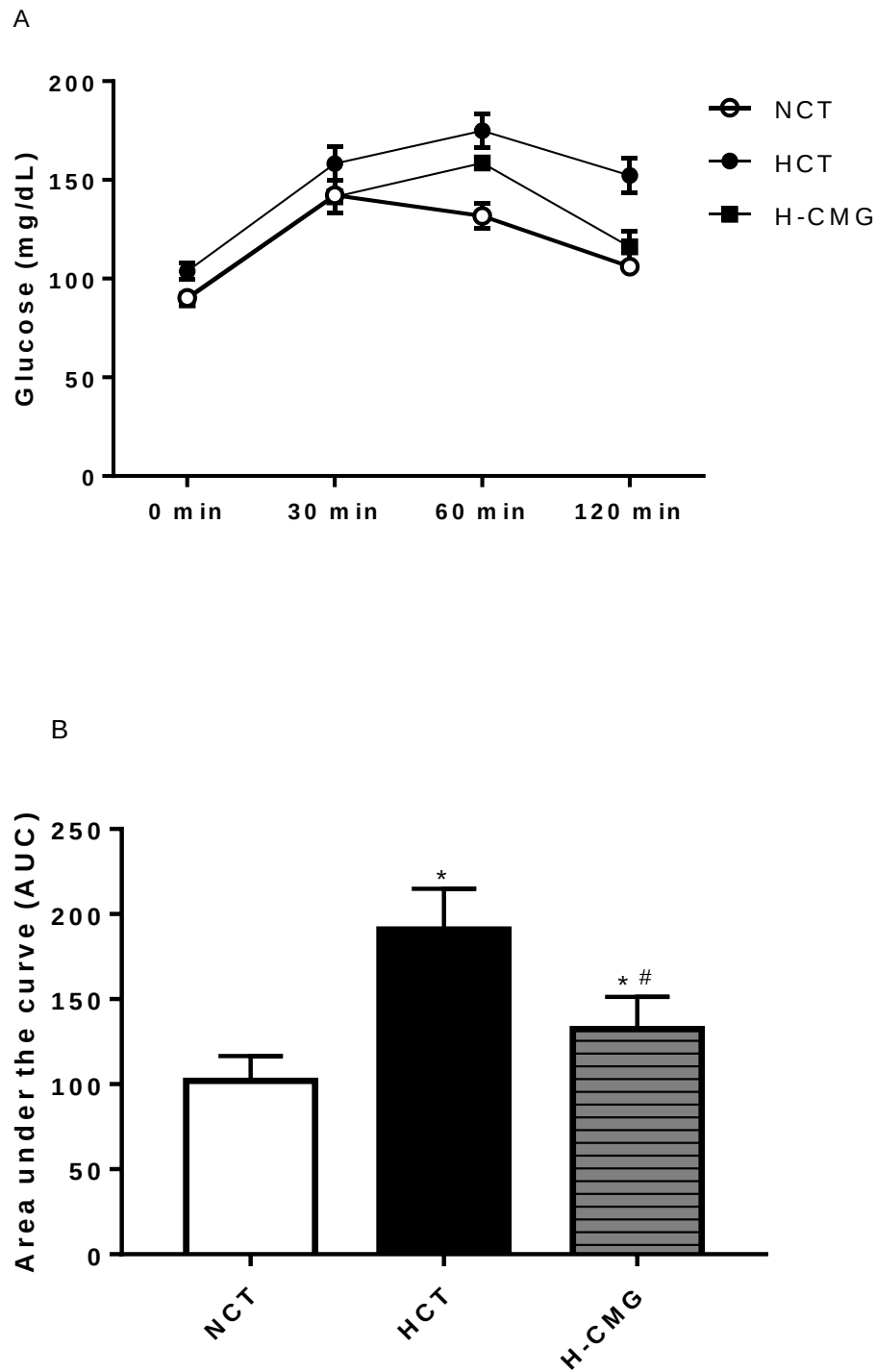


Figure 3: Effect of CMG on glucose after glucose overload in rats fed a control or hypercaloric diet for 12 weeks. Glycemic curve (A) and Area under the curve (AUC) (B). NCT: Normocaloric Control; HCT: Hypercaloric Control; H-CMG: Hypercaloric + CMG (20 mg / kg). Data are expressed as mean $\pm$ SEM, n = 08. * p < 0.05 vs NCT; #p < 0.05 vs HCT.

Table 2 - Biochemical parameters of rats from NCT, HCT, and H-CMG groups.

PARÂMETRO	NCT	HCT	H-CMG
Glucose (mg/dL)	150.1 ± 13.1	310.6 ± 16.8*	174.5 ± 17.7 [#]
Triglycerides (mg/dL)	61.7 ± 6.8	151.7 ± 16.1*	88.9 ± 6.7 [#]
Total Cholesterol (mg/dL)	46.2 ± 5.1	65.5 ± 3.6*	48.5 ± 3.5 [#]
HDL – Cholesterol (mg/dL)	23.1 ± 1.7	23.2 ± 2.0	21.5 ± 2.2
LDL – Cholesterol (mg/dL)	23.6 ± 2.0	34.3 ± 1.8*	31.1 ± 2.3
Atherogenic Index	0.40 ± 0.05	0.78 ± 0.03*	0.60 ± 0.05* [#]
CRP (mg/L)	0.55 ± 0.04	0.66 ± 0.08	0.35 ± 0.04 [#]

NCT: Normocaloric Control; HCT: Hypercaloric Control; H-CMG: Hypercaloric + CMG (20 mg / kg). HDL: High Density Lipoproteins; LDL: Low Density Lipoproteins. PCR: C-reactive protein. Data are expressed as mean ± SEM, n = 08. * p <0.05 vs NCT; #p <0.05 vs HCT.

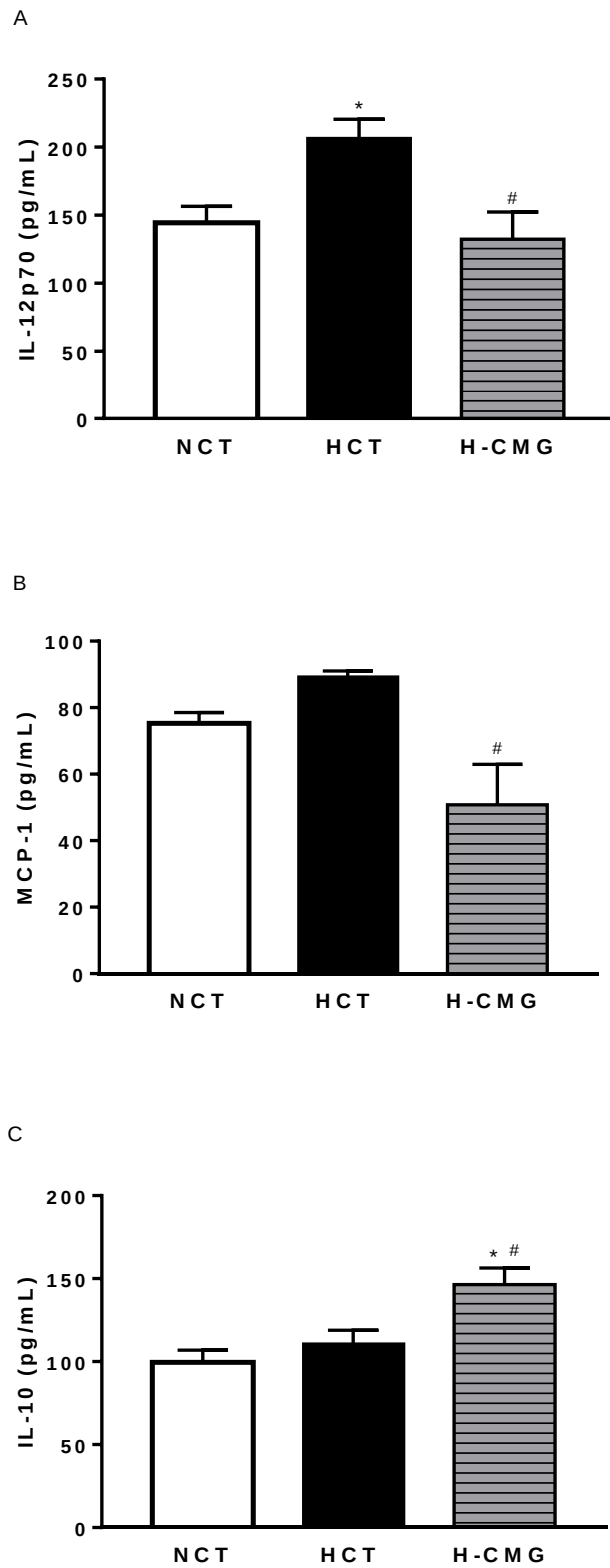


Figure 4: Effect of CMG on inflammatory parameters of rats fed a control or hypercaloric diet for 12 weeks. Interleukin-12p70 Levels (A); Monocyte chemotactic protein levels-1 (B); and Interleukin-10 (C) Levels. NCT: Normocaloric Control; HCT: Hypercaloric Control; H-

CMG: Hypercaloric + CMG (20 mg / kg). Data are expressed as mean $\pm$ SEM, n = 08. * p < 0.05 vs NCT; #p < 0.05 vs HCT.

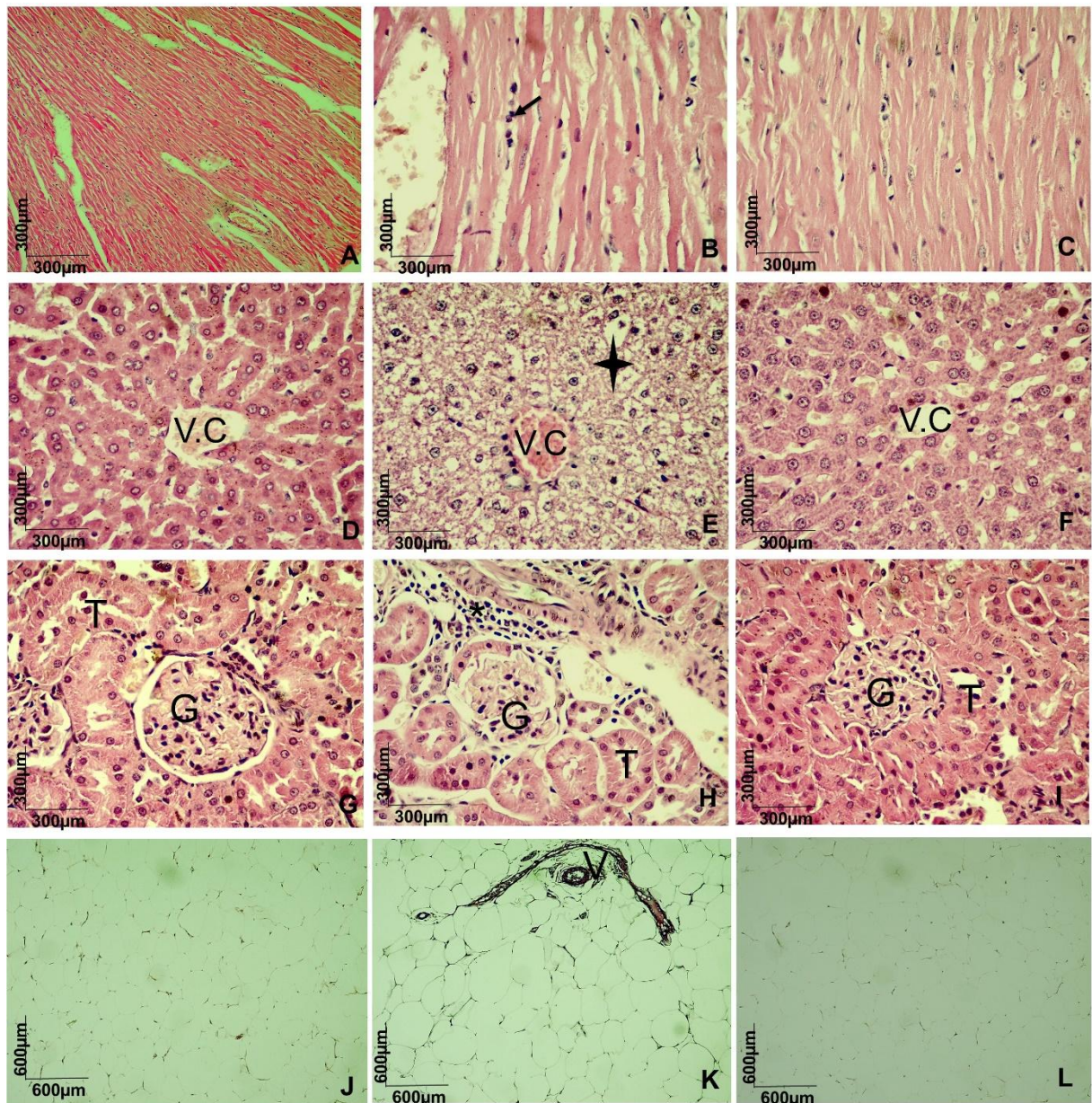


Figure 5: Photomicrograph of cardiac tissue (A - C); liver tissue (D - F); renal tissue (G - I) and adipose tissue (J - L) of control (NCT), control hypercaloric (HCT) and treated hypercaloric (H-CMG) rats, from left to right. Hematoxylin and eosin staining. Images were analyzed using a 40x objective. The arrow indicates a slight inflammatory process (B). The star indicates the intense presence of hepatic steatosis (E). The asterisk indicates lymphocyte-rich interstitial nephritis (H). The 'V' indicates the presence of a dilated vessel, suggesting an inflammatory process in adipose tissue (K).

ARTIGO 02: ARTIGO ORIGINAL

CARBOXYMETHYL GLUCAN REDUCES OXIDATIVE STRESS, ENDOTHELIAL
DYSFUNCTION AND PLATELET AGGREGATION IN RATS FED A HYPERCALORIC
DIET

Periódico: FOOD & FUNCTION

ISSN: 2042-6496

FI: 3.241

QUALIS: A2 na área de Nutrição
(2013-2016)

CARBOXYMETHYL GLUCAN REDUCES OXIDATIVE STRESS, ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AND PLATELET AGGREGATION IN RATS FED A HYPERCALORIC DIET.

Rayanne de Araújo Torres^{a*}, Lorena Soares Bezerra^a, Júlio César Pinheiro Lúcio de Oliveira^c, Priscila Maria Pereira Maciel^b, Pablo Ferreira dos Santos^c, Marciane Magnani^a, Isac Almeida de Medeiros^{b,c}, Robson Cavalcante Veras^{a,c}

^a Graduate Program in Nutritional Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba (Universidade Federal da Paraíba - UFPB), Campus I, 58059-900, João Pessoa, Paraíba - Brazil

^b Graduate Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Health Sciences Center, UFPB, Campus I, 58059-900, João Pessoa, Paraíba - Brazil

^c Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, UFPB, Campus I, 58059-900, João Pessoa, Paraíba - Brazil

* Corresponding author: Rayanne de Araújo Torres

Universidade Federal da Paraíba – Campus I, 58059-900

Centro de Ciências da Saúde

Pós-Graduação em Ciências da Nutrição

João Pessoa, Paraíba, Brasil

Tel.: +55 (83) 3216-7417

E-mail: rayanne2901.nutri@gmail.com

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are among the leading causes of death worldwide and are often associated with overweight and inadequate lifestyle, and food is a crucial factor for both progression and prevention and treatment of these diseases. Thus, strategies that reduce factors associated with such conditions should be investigated and in this context, carboxymethyl glucan (CMG), obtained from *Saccharomyces cerevisiae* β -glucans through chemical modifications, has been highlighted for its beneficial potential, especially its high antioxidant capacity in the face of changes that increase cardiovascular risk. The present study evaluated the ability of CMG to reduce cardiovascular damage induced by the consumption of hypercaloric diets. Wistar rats were divided into three groups: NCT - normal caloric control; HCT - hypercaloric control; H-CMG - hypercaloric + CMG, fed standard or hypercaloric diet and concomitantly the treated group received a dose of 20 mg/kg/ day CMG for 12 weeks. At the end of the experimental period, systolic blood pressure (SBP), vasorelaxation, platelet aggregation, and reactive oxygen species (ROS) production in the animals were measured. The data demonstrated a high capacity of the hypercaloric diet to induce weight gain, increase oxidative stress, and reduce endothelium-dependent vasorelaxation, as well as increase SBP and platelet aggregation levels. On the other hand, there was an essential activity of CMG in reducing weight gain and tissue and platelet ROS production, leading to improved vasorelaxation, associated with increased nitric oxide (NO) bioavailability and reduced platelet aggregation. However, treatment with CMG did not cause significant reductions in SBP levels. Our findings demonstrate the ability of CMG to reduce the damage caused by the intake of hypercaloric diets and related to overweight and oxidative stress, emerging as an essential nutritional strategy to help control cardiometabolic changes.

Keywords: Antioxidant effect; Carboxymethyl glucan; Cardiovascular disease; Hypercaloric diet; β -glucans

1. INTRODUCTION

Consumption of high energy density diets is associated with increased overweight and obesity in humans, which in turn is strongly related to the higher risk and incidence of morbidity and mortality from cardiovascular disease directly and indirectly (AUBERVAL et al., 2014). Directly, obesity induces structural and functional adaptations of the cardiovascular system to accommodate overweight, as well as stimulating adipokine effects on inflammation and vascular homeostasis. Indirect effects are mediated by coexisting cardiovascular risk factors such as insulin resistance, hyperglycemia, hypertension, and dyslipidemia (MATHEW et al., 2008; KRATZ; BAARS; GUYENET, 2013).

Evidence has linked obesity to a significant number of coronary heart disease, heart failure, hypertension, stroke, atrial fibrillation, and sudden death. Some cardiac adaptations in obese individuals, such as increased blood volume, cardiac output and heart rate, as well as increased systemic vascular resistance associated with increased inflammation, hyperinsulinemia, and sympathetic hyperactivity, contribute to the increase in systemic blood pressure. Meet the metabolic demands of adipose tissue augmentation (KOLIAKI; LIATIS; KOKKINOS, 2019).

The progressive increase in adipose tissue also causes a reduction in blood oxygen supply leading to hypoxia and increases the production of reactive oxygen species (ROS) which significantly reduce the availability and supply of nitric oxide (NO) and consequently vasodilation (GALILI et al., 2007; ENGIN, 2017). Besides, vascular damage, especially endothelial damage, and excess platelet aggregation are central events in the development of cardiovascular complications (KIM et al., 2016).

Epidemiological studies have shown a strong association between fiber consumption and reduced cardiovascular risk. Among the polysaccharide classes, β -glucans, extracted mainly from fungi, yeast and cereals, have been highlighted for their beneficial effects against various diseases and studies show their cardioprotective action and potential in reducing morbidity and mortality from heart disease (PINS; KAUR, 2006; BASHIR; CHOI, 2017; SIMA; VANNUCCI; VETVICKA, 2018).

Moreover, it has been demonstrated that antioxidant supplementation could reduce oxidative stress and ROS, decrease the risk of complications related to obesity, and cardiovascular disease (FURUKAWA et al., 2004; MARSEGLIA et al., 2014). In this context, the carboxymethylated (carboxymethyl glucan - CMG) derivative of *Saccharomyces cerevisiae* β - (1-3) (1-6) glucan has shown significant antioxidant effects (MACHOVA;

CIZOVA; BYSTRICKY, 2014) and some anti aggregating and function-modulating properties. Vascular and blood pressure have been attributed to this compound (BEZERRA et al., 2017; CARVALHO-GALVAO et al., 2018). Carboxymethylation consists of the exchange of hydroxyl groups by carboxyl groups, and such chemical modification seeks to improve the physicochemical and biological properties of the derivative, such as increased solubility and increased affinity for immune cell receptors with potential improvement in their effects (MAGNANI et al., 2009; KAGIMURA et al., 2015).

Given the potential effect of β -D-glucans and their derivatives on obesity-related changes, this study seeks to highlight the effect of fungal carboxymethyl glucan on cardiovascular changes such as consumption-induced hypertension, endothelial dysfunction, oxidative stress, and platelet aggregation of hypercaloric diet in rats.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 MATERIALS

Xylazine and ketamine were acquired from Syntec and heparin from Blau. Sodium bicarbonate (NaHCO_3), sodium chloride (NaCl), calcium chloride (CaCl_2), potassium chloride (KCl), magnesium sulfate (MgSO_4), monopotassium phosphate (KH_2PO_4), glucose, phenylephrine hydrochloride (PHE), acetylcholine hydrochloride (ACH), sodium nitroprusside (SPN), adenosine diphosphate (ADP), phorbol ester (PMA) and dihydroetidium (DHE) were obtained from Sigma-Aldrich. The carbogenic mixture (95% O_2 and 5% CO_2) was obtained from the company White Martins (Brazil).

2.2 OBTAINING CARBOXIMETHYLGLUCAN (CMG)

Carboxymethyl glucan (CMG) was obtained from *Saccharomyces cerevisiae* yeast cream. Derivatization was performed using mono chloroacetic acid to achieve a degree of substitution (SD) of 0.8, as solubility and bioactivity identified in previous studies (MAGNANI et al., 2010; ARAUJO et al., 2015). Chemical identity and structural modifications were confirmed by NMR and infrared analysis (MAGNANI et al., 2009). The material was supplied by the Food Microbial Processes and Food Biochemistry laboratory of the Department of Food Engineering of the Federal University of Paraíba - UFPB.

2.3 ANIMALS AND DIET

The experiments were conducted under Brazilian Federal Law nº 11794/08, in which establishes procedures for scientific usage of laboratory animals; the Animal Use Ethics Committees approved all experimental procedures of the Federal University of Paraíba (CEUA 074/2017). All animals were kept under controlled conditions at room temperature, subjected to a 12:12-hour light-dark cycle and constant relative humidity with free access to food and water. Male rats (12 weeks old; 270-320 g) were randomly divided into three groups (n=8): Normal caloric diet + saline (NCT); Hypercaloric diet + saline (HCT); Hypercaloric diet + CMG, (H-CMG; 20 mg/kg of body weight). The substance was administered orally by gavage (i.g.); the control groups received saline (i.g.) as a placebo throughout the experiment. The duration of the treatment was twelve weeks, and administrations of the substance and diet were started simultaneously.

The normal caloric group received a standard commercial diet (Presence®), containing 23% protein, 63% carbohydrate and 4% lipid, providing a total of 3.8 kcal / g of feed. The hypercaloric diet was adapted from Panchal et al. (2011) and consisted of 155g of commercial feed, 155g of fructose, 200g of beef tallow, 395g of condensed milk and 25g of the saline mixture, providing 5.1 kcal / g of feed. All components were weighed, mixed, pelleted, and oven-dried for approximately 48 hours.

2.4 INDIRECT MEASUREMENT OF ARTERIAL BLOOD PRESSURE

The effect of the treatment on blood pressure levels was assessed by indirect measurement of arterial blood pressure. The systolic blood pressure (SBP) levels were recorded on the last day of the experiment. The measurements were taken using an MLT 1010 piezoelectric pulse transducer (ADInstruments, Australia) that captured the mechanical stimuli and converted them into an electrical stimulus, an inflatable tail-cuff connected to an MLT 844 physiological pressure transducer (ADInstruments, Australia), and a PowerLab data acquisition unit (ADInstruments, Australia). The signals from the pressure and pulse sensors were amplified and digitized using the software Labchart7 (ADInstruments, Australia) (FRITZ, RINALDI, 2008).

2.5 *In vitro* EXPERIMENTS

At the end of the experimental period, after nocturnal fasting, the animals were anesthetized with ketamine and xylazine (70 mg/kg; 10 mg/kg, respectively, intraperitoneally). Blood samples were collected from the inferior vena cava for platelet function tests. Immediately after blood collection, the animals were euthanized, and the superior mesenteric artery removed and prepared for vascular reactivity tests. The mesenteric artery was sectioned, and some rings (2 - 3 mm) were included in inclusion medium for fresh Tissue Tek Compound (OCT) samples, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 ° C for analysis of ROS production by fluorescence microscopy (WOJTALA, ALEKSANDRA et al., 2013).

2.6 EVALUATION OF THE CMG TREATMENT EFFECT ON VASCULAR REACTIVITY

The superior mesenteric artery rings (2 - 3 mm) were mounted in isolated organ bath containing Tyrode's solution (NaCl; KCl; CaCl₂·2H₂O; MgCl₂·6H₂O; C₆H₁₂O₆; NaHCO₃ e NaH₂PO₄·H₂O; pH 7.4, at 37°C) gassed with 95% O₂: 5 % CO₂ mixture, as previously described (VERAS et al., 2013). Rings were stabilized for 60 minutes with an optimal resting tension of 0.75g, which had been previously determined by length-tension relationship experiments. The isometric contraction was recorded by a force transducer (MLT020, ADInstruments, Australia) coupled to an amplifier recorder (PowerLab, ADInstruments, Australia) and a personal computer equipped with an analog-to-digital converter board (LabChart 7.0, ADInstruments, Australia). Functional endothelium was confirmed by the ability of acetylcholine (Ach, 10 µM) to induce more than 90% relaxation in rings pre-contracted with phenylephrine (Phe, 10 µM). In rings with a lower degree of relaxation, the endothelium was mechanically removed, and when relaxations were above 10%, the ring was considered without functional endothelium (VERAS et al., 2018). After checking the integrity and endothelial function of the ring, the dose-response curves were plotted for Phe (10⁻⁹ to 10⁻⁵ M), Ach (10⁻¹⁰ to 10⁻⁵M) or sodium nitroprusside (SNP; 10⁻¹⁰ to 10⁻⁵M). The potency and efficacy of agonist were evaluated using the pD₂ and E_{max}, respectively.

2.7 FLUORESCENCE MICROSCOPY OXIDATIVE STRESS ANALYSIS

In the isolated and previously frozen arteries of the different experimental groups, 10 µm thick cross-sections were made in a cryostat (Cryostat Leica, Nussloc, Germany) at a

temperature of -20°C. To measure $O_2^{\bullet -}$ anions, the mesenteric artery cross-sections were washed with buffered saline (PBS), then incubated with 10 μ M DHE for 30 min at 37 ° C in a humid chamber under cover of light (WOJTALA, A. et al., 2014). After the incubation period, the sections were again washed with PBS to remove the excess fluorescent probe and immediately taken to the fluorescence microscope (NIKON Eclipse Ti-E, NIKON, Japan) for analysis. Sample processing and group images were performed in parallel using the same laser settings. Fluorescence intensity was determined using NIS Elements version 4.02 software. The levels of superoxide anions in the different groups were expressed as fluorescence percentage Δ , normalized by the fluorescence emitted by DHE in the control group. The fluorescence obtained for the different treatment groups was determined according to the following equation: $\Delta\%$ Fluorescence = (TREATE - CONTROL) x 100 / CONTROL.

2.8 MEASUREMENT OF PLATELET AGGREGATION AND PRODUCTION OF SUPEROXIDE ANIONS ($O_2^{\bullet -}$) ON PLATELETS

Platelet-rich plasma (PRP) from treated animals was obtained by centrifugation for 15 minutes at 120g and adjusted to 2×10^7 platelets / mL, after which the samples were incubated in the 37 oC aggregometer and stimulated with ADP (10 μ M) and Forbol Ester (PMA, 100 ng / mL) for 5 minutes (YONEDA et al., 2004; HUANG et al., 2007). Changes in light transmission were recorded for 5 minutes to estimate the maximum aggregation in each sample. The degree of aggregation was expressed as a percentage of the maximum light transmission obtained in the sample. Baseline aggregation values were determined using a platelet-poor plasma (PPP) sample obtained by centrifugation at 2300g for 10 min (YONEDA et al., 2004). Platelet aggregation was determined using an AgreGO aggregometer (São Paulo, Brazil).

2.9 STATISTICAL ANALYSIS

The results were expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM), and statistical comparisons were made using Student's t-test for comparisons of two groups and the ordinary analysis of variance for comparisons of three groups, followed by Tukey's post-test. The dose-response curves were plotted using nonlinear regression to analyze the vascular reactivity. The negative logarithm (Log) of these concentrations (pD_2) versus the corresponding response was plotted for a variable slope sigmoidal model. Values were

considered significant when $p < 0.05$. GraphPad Prism version 6.0® (San Diego, EUA) and DIVA 6.0 (BD, Santa Mônica, EUA) were used for the analysis.

3. RESULTS

3.1 Body parameters

The diet was able to induce obesity in the animals of the HCT group when compared to the NCT. Body Mass Index (BMI) data also showed a higher weight gain in the HCT group animals. CMG treatment significantly ($p < 0.05$) reduced body weight gain and BMI over the HCT group at the end of the experimental period (Table 1).

3.2 Measurement of Systolic Blood Pressure

Systolic blood pressure (SBP) values were significantly higher in the HCT group than in the NCT group. The H-CMG group showed no significant reduction in SBP at the end of the experimental period (Figure 1).

3.3 Effect of CMG on Vascular Reactivity

In mesenteric artery rings of rats of the NCT, HCT and H-CMG groups, they are increasing and cumulative doses of Phe (10^{-9} to 10^{-5} M), Ach (10^{-10} - 10^{-5} M) and NPS (10^{-10} - 10^{-5} M). There was no significant difference in Phe-induced contracting for power and E_{max} values between groups. Regarding ACh-induced vasorelaxation, a reduction in E_{max} values was observed for the HCT group when compared to the NCT group. The H-CMG group presented E_{max} similar to the normocaloric diet control group, demonstrating treatment efficiency in the prevention of endothelial dysfunction induced by the consumption of hypercaloric diet during the twelve weeks of study (E_{max} : NCT = $100.0 \pm 4.8\%$; HCT = $68.9 \pm 2.2\%$; H-CMG = $95.8 \pm 3.4\%$, $p < 0.05$). There were no significant differences in pD_2 values between groups. In Phe pre-contracted mesenteric artery rings, increasing and cumulative doses of SPN induced a vasorelaxation with similar E_{max} and pD_2 values between the groups (Figures 2A, 2B, and 3C).

3.4 Analysis of ROS production in rat mesenteric artery

Fluorescence levels, measured by DHE-labeled ROS production, in the mesenteric artery vessels of the HCT, H-CMG, and NCT groups can be seen in Figure 3A and B. A significant increase in fluorescence is observed in the HCT group animals compared to the control group (NCT) ($p < 0.05$). Meanwhile, treatment with CMG for 12 weeks significantly reduced ROS production in the mesenteric artery of H-CMG group animals compared to the HCT group and showed values similar to those observed in the NCT group.

3.5 Platelet aggregation and ROS production in rat platelets

Platelet aggregation levels were measured using the light transmission technique, and there was a reduction in the percentage of ADP-stimulated platelet aggregation in the H-CMG group relative to the HCT and NCT groups. However, no significant changes in aggregation levels were observed between groups when PRP was stimulated with PMA (Figure 4A and 4B). Regarding the detection of superoxide anions in platelets of standard and hypercaloric diets, a significant reduction was observed in the group treated with CMG after twelve weeks of treatment (Figure 5).

4. DISCUSSION

Numerous evidence shows that oxidative stress is an important feature related to obesity and other metabolic comorbidities that induce vascular damage and increase the number of deaths from cardiovascular disease. Besides, experimental studies have shown an essential relationship between hypercaloric diet consumption and increased cardiovascular risks (HOPPS et al., 2010; AUBERVAL et al., 2014). In the present study, it is possible to observe the ability of the hypercaloric diet to induce increased weight gain and increase the production of ROS, and cardiovascular changes such as endothelial dysfunction increased platelet aggregation and blood pressure in HCT rats. On the other hand, it is possible to observe the beneficial effect of CMG in improving such parameters in H-CMG rats.

Clinical and experimental trials have tested numerous substances with the antioxidant potential to offer strategies to combat the damage caused by excess calorie diets and their effects on body weight gain and cardiovascular disease (ABETE et al., 2011; ILKUN; BOUDINA, 2013). Increasingly, a balanced diet is the key to preventing obesity and its risks.

However, the current lifestyle has shown that the majority of the population resists or has difficulty maintaining this appropriate lifestyle. Supplementation of antioxidant strategy draws attention for its potential effect on obesity and cardiovascular risk control (ILKUN; BOUDINA, 2013; WIDMER et al., 2015).

Some studies point to oxidative stress as the first risk factor to emerge during the development of obesity and that this change precedes the development of other important risk factors for cardiovascular diseases such as hypertension and that the use of hypercaloric diets has been efficient for the development of obesity. The increase of ROS production and oxidative stress in animal models allowing to investigate the effects of these alterations, as well as to test substances with beneficial potential (VARGAS-ROBLES et al., 2015). In our study, a significant association was observed between the consumption of the high-calorie diet and the increased oxidative stress in animals fed the high-calorie diet, evidenced by the increased production of tissue and systemic ROS.

Among the main techniques used to determine increased production of reactive oxygen species, dihydroethide (DHE) is widely used to measure cytosolic levels of O₂ anions - due to its cell penetration capacity and high reactivity. Inside the cell, DHE is oxidized by O₂ anions - forming an intermediate product, 2-hydroxyethylide (2-OHEt⁺) that intercalates with DNA and when excited at a wavelength of 500 nm exhibits a color fluorescence red (580 nm) (WOJTALA, A. et al., 2014). DHE was used to evaluate the production of ROS in rat superior mesenteric artery vessels and platelets, making it possible to highlight the deleterious effects of the hypercaloric diet, inducing increased oxidative stress, and in contrast, to show the antioxidant capacity of CMG at the end of the study. Trial period. The data from this study demonstrate the antioxidant activity of CMG by significantly reducing the levels of tissue and platelet ROS in treated animals, proving to be an essential therapeutic strategy to prevent damage associated with increased oxidative stress.

For some time the antioxidant effect of the carboxymethylated *S. cerevisiae* β -glucan derivative has been tested for its ability to reduce the amount of ROS in vitro and in vivo (BABINCOVA et al., 2002; MACHOVA et al., 2014; ARAUJO et al., 2015; KAGIMURA et al., 2015) and has shown promising effects, especially chemically modified compounds, such as carboxymethylates which have potential antioxidant effect. Possibly, this ability relates to CMG's ability to eliminate free radicals and reduce the oxidative process (BABINCOVA et al., 2002). A human study demonstrated a significant reduction in MDA levels in healthy men who consumed CMG (50 mg/day) for 60 days, reinforcing the antioxidant potential of this substance (ARAUJO et al., 2015). Reduced levels of malondialdehyde (MDA) have also been

associated with yeast glucan consumption in animal models of burn-induced oxidative organ damage (TOKLU et al., 2006) and gastric damage induction (OZKAN et al., 2010).

In situ oxidative stress reduction has been observed in previous studies using substances with antioxidant potential, resulting in essential effects related to their ability to minimize the progression of disorders such as hypertension, closely related to increased ROS production and reduced bioavailability of NO, significantly improving cardiovascular health and reducing risks associated with oxidative status (IDRIS-KHODJA et al., 2013; ALBUQUERQUE et al., 2017). Thus, given the pieces of evidence that prove the antioxidant action of CMG, this study provides relevant data regarding the beneficial action of this compound in minimizing oxidative damage, closely associated with the progression of vascular lesions and metabolic dysfunctions that favor the increase of blood pressure.

At the end of treatment, no significant reduction in blood pressure was observed in animals treated with CMG. However, it is possible to observe a reduction in SBP values in these animals concerning the HCT group, inferring a possible beneficial action of CMG in pressure control it is possibly associated with longer treatments or at higher doses, since blood pressure control depends on several factors and some of them have already shown considerable improvement after supplementation with CMG, such as endothelial dysfunction and blood pressure levels. Platelet aggregation in animals of the H-CMG group.

Increased oxidative stress and reactive species have a strong influence on the function of the vascular endothelium, once, when attacked by risk factors, it gradually loses its physiological protective function, becoming a source of elements that participate in disease progression. Cardiovascular These damages alter the vasodilating response, reducing antithrombotic activity, causing structural changes, and causing vascular damage and increased blood pressure (ENDEMANN; SCHIFFRIN, 2004; KONUKOGLU; UZUN, 2017).

Excess fatty tissue characteristic of obesity is associated with increased chronic inflammation, which causes an imbalance in the function of adipocytokines produced by adipose tissue, contributing to endothelial dysfunction and increased blood pressure. Also, other factors are closely related to endothelial dysfunction in obese subjects such as decreased NO bioavailability, insulin resistance, and increased oxidized LDL (ENGIN, 2017). Thus, overweight in HCT group animals, also evidenced by BMI, contributes to the increase of inflammation and oxidative stress induction, influenced by the increase of adipose tissue, which in turn impacts the reduction of NO bioavailability — causing endothelial dysfunction evidenced by acetylcholine-induced vasorelaxation reduction in rat mesenteric artery rings.

CMG treatment significantly improved acetylcholine-induced vasorelaxation in the mesenteric artery rings of H-CMG group rats, demonstrating a vital effect on endothelium-dependent vascular activity, reducing endothelial damage. These effects are directly related to the antioxidant activity of CMG that reduces ROS production and oxidative stress, as evidenced above, and furthermore, the reduction in body weight gain caused by the consumption of CMG exerts a beneficial influence on vascular function. Favoring the availability of NO and reducing platelet aggregation.

Carboxymethylglucan showed promising effects in studies by Bezerra et al. (2017). This study showed the vasorelaxant effect of β -glucan and *S. cerevisiae* CMG and the in vitro effect at high concentrations on rat platelet function, demonstrating a critical anti-aggregating action of CMG. In another in vitro study, the anti-aggregating activity of yeast β -glucan was investigated and demonstrated inhibitory effects on platelet aggregation stimulated by biological agonists such as ADP, thrombin, and collagen (SALUK-JUSZCZAK; KROLEWSKA; WACHOWICZ, 2010). However, the effects on platelet function of long-term consumption of CMG have not been demonstrated in the literature, and the present study provides evidence that chronic consumption favors a reduction in platelet aggregation and thus, CMG can be used as a therapeutic strategy in clinical studies on prevention and treatment of cardiovascular risks.

5. CONCLUSION

In conclusion, we can observe an essential cardioprotective effect of CMG, derived from *S. cerevisiae*, given the changes induced by the consumption of hypercaloric diet in rats such as increased oxidative stress, endothelial dysfunction, and increased platelet aggregation. These effects are mainly related to the antioxidant activity of this compound that reduces the number of reactive oxygen species and also the ability to induce lower weight gain, and consequently, improve endothelial dysfunction and other parameters associated with excess body fat, and cardiovascular risk. Thus, it can be stated that the consumption of CMG favors the reduction of significant changes related to overweight and increased oxidative stress, and should be considered as a strategy for the treatment and prevention of morbidities with the high mortality rate in the population. Regarding the influence on the blood pressure of this compound, more studies should be performed with different blood pressure measurement methods and new treatment protocols that can elucidate and provide evidence on the influence

of this compound on blood pressure levels, since in this study the main factors associated with hypertension showed significant improvement at the end of the experimental period.

Acknowledgments

We thank the Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior – CAPES), the National Council for Scientific and Technologic Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq) and the Paraíba Development Institute (Instituto de Desenvolvimento da Paraíba – IDEP-PB) for the financial, technical and infrastructure support needed to conduct this study.

Conflict of interest

All authors declare that this study was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

ABETE, I. et al. Obesity and metabolic syndrome: potential benefit from specific nutritional components. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 21 Suppl 2, p. B1-15, Sep 2011.

ALBUQUERQUE, J. G. F. et al. Antioxidant and vasorelaxant activities induced by northeastern Brazilian fermented grape skins. **BMC Complement Altern Med**, v. 17, n. 1, p. 376, Jul 28 2017.

ARAÚJO, V. B. et al. Oral Intake of Carboxymethyl-Glucan (CM-G) from Yeast (*Saccharomyces uvarum*) Reduces Malondialdehyde Levels in Healthy Men. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 14950-8, Aug 14 2015.

AUBERVAL, N. et al. Metabolic and oxidative stress markers in Wistar rats after 2 months on a high-fat diet. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 6, n. 1, p. 130, 2014.

BABINCOVA, M. et al. Antioxidant properties of carboxymethyl glucan: comparative analysis. **J Med Food**, v. 5, n. 2, p. 79-83, Summer 2002.

BASHIR, K. M.; CHOI, J.-S. Clinical and physiological perspectives of β -glucans: the past, present, and future. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 9, p. 1906, 2017.

BEZERRA, L. S. et al. Modulation of vascular function and anti-aggregation effect induced by (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6)-beta-d-glucan of *Saccharomyces cerevisiae* and its carboxymethylated derivative in rats. **Pharmacol Rep**, v. 69, n. 3, p. 448-455, Jun 2017.

CARVALHO-GALVAO, A. et al. A Newly Isolated Carboxymethyl-Glucan (CM-G) Restores Depressed Baroreflex Sensitivity in Renovascular Hypertensive Rats. **Front Physiol**, v. 9, p. 607, 2018.

ENDEMANN, D. H.; SCHIFFRIN, E. L. Endothelial dysfunction. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, n. 8, p. 1983-92, Aug 2004.

ENGİN, A. Endothelial Dysfunction in Obesity. **Adv Exp Med Biol**, v. 960, p. 345-379, 2017.

FRITZ, M.; RINALDI, G. Blood pressure measurement with the tail-cuff method in Wistar and spontaneously hypertensive rats: influence of adrenergic- and nitric oxide-mediated vasomotion. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 58, n. 3, p. 215-21, 2008.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J Clin Invest**, v. 114, n. 12, p. 1752-61, Dec 2004.

GALILI, O. et al. Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 292, n. 2, p. H904-11, Feb 2007.

HOPPS, E. et al. A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 20, n. 1, p. 72-7, Jan 2010.

HUANG, J. et al. Cinnamaldehyde reduction of platelet aggregation and thrombosis in rodents. **Thromb.Res.**, v. 119, p. 337-342, 2007.

IDRIS-KHODJA, N. et al. Grape-Derived Polyphenols Prevent Doxorubicin-Induced Blunted EDH-Mediated Relaxations in the Rat Mesenteric Artery: Role of ROS and Angiotensin II. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 516017, 2013.

ILKUN, O.; BOUDINA, S. Cardiac dysfunction and oxidative stress in the metabolic syndrome: an update on antioxidant therapies. **Curr Pharm Des**, v. 19, n. 27, p. 4806-17, 2013.

KAGIMURA, F. Y. et al. Biological activities of derivatized D-glucans: a review. **Int J Biol Macromol**, v. 72, p. 588-98, Jan 2015.

KIM, T. H. et al. Anti-platelet and anti-thrombotic effect of a traditional herbal medicine Kyung-Ok-Ko. **J Ethnopharmacol**, v. 178, p. 172-9, Feb 3 2016.

KOLIAKI, C.; LIATIS, S.; KOKKINOS, A. Obesity and cardiovascular disease: revisiting an old relationship. **Metabolism**, v. 92, p. 98-107, Mar 2019.

KONUKOGLU, D.; UZUN, H. Endothelial Dysfunction and Hypertension. **Adv Exp Med Biol**, v. 956, p. 511-540, 2017.

KRATZ, M.; BAARS, T.; GUYENET, S. The relationship between high-fat dairy consumption and obesity, cardiovascular, and metabolic disease. **Eur J Nutr**, v. 52, n. 1, p. 1-24, Feb 2013.

MACHOVA, E.; CIZOVA, A.; BYSTRICKY, P. Effect of carboxymethylation on antioxidant properties and radical degradation of mannans and glucans. **Carbohydr Polym**, v. 112, p. 603-7, Nov 4 2014.

MAGNANI, M. et al. Effects of carboxymethyl-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* on the peripheral blood cells of patients with advanced prostate cancer. **ExpErimEntal and thErapEutic mEdicinE**, v. 1, n. 5, p. 859-862, 2010.

MARSEGLIA, L. et al. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 1, p. 378-400, Dec 26 2014.

MATHEW, B. et al. Obesity: effects on cardiovascular disease and its diagnosis. **J Am Board Fam Med**, v. 21, n. 6, p. 562-8, Nov-Dec 2008.

OZKAN, O. V. et al. Effects of beta-glucan pretreatment on acetylsalicylic acid-induced gastric damage: An experimental study in rats. **Curr Ther Res Clin Exp**, v. 71, n. 6, p. 369-83, Dec 2010.

PINS, J.; KAUR, H. A review of the effects of barley beta-glucan on cardiovascular and diabetic risk. 2006.

SALUK-JUSZCZAK, J.; KROLEWSKA, K.; WACHOWICZ, B. Response of blood platelets to beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*. **Platelets**, v. 21, n. 1, p. 37-43, 2010.
SIMA, P.; VANNUCCI, L.; VETVICKA, V. β -glucans and cholesterol. **International journal of molecular medicine**, v. 41, n. 4, p. 1799-1808, 2018.

TOKLU, H. Z. et al. beta-glucan protects against burn-induced oxidative organ damage in rats. **Int Immunopharmacol**, v. 6, n. 2, p. 156-69, Feb 2006.

VARA, D.; CAMPANELLA, M.; PULA, G. The novel NOX inhibitor 2-acetylphenothiazine impairs collagen- dependent thrombus formation in a GPVI- dependent manner. **British journal of pharmacology**, v. 168, n. 1, p. 212-224, 2013.

VARGAS-ROBLES, H. et al. Antioxidative diet supplementation reverses high-fat diet-induced increases of cardiovascular risk factors in mice. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2015, p. 467471, 2015.

VERAS, R. C. et al. Participation of Nitric Oxide Pathway in the Relaxation Response Induced by E-cinnamaldehyde Oxime in Superior Mesenteric Artery Isolated From Rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 58-66, 2013.

VERAS, R. C. et al. N-Salicyloyltryptamine, an N-Benzoyltryptamine Analogue, Induces Vasorelaxation through Activation of the NO/sGC Pathway and Reduction of Calcium Influx. **Molecules**, v. 23, n. 2, Jan 28 2018.

WIDMER, R. J. et al. The Mediterranean diet, its components, and cardiovascular disease. **The American journal of medicine**, v. 128, n. 3, p. 229-238, 2015.

WOJTALA, A. et al. Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry. **Methods in enzymology**, v. 542, p. 243-262, 2013.

WOJTALA, A. et al. Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. **Methods Enzymol**, v. 542, p. 243-62, 2014.

YONEDA, K. et al. Identification of the active metabolite of ticlopidine from rat in vitro metabolites. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 3, p. 551-557, 2004.

Table 1 – Body weight gain and BMI of rats from NCT, HCT and H-CMG groups.

PARAMETER	NCT	HCT	H-CMG
Initial weight (g)	294.0 ± 6.7	308.3 ± 2.5	285.8 ± 3.0
Final weight (g)	378.0 ± 8.9	419.4 ± 4.5*	351.5 ± 4.7 [#]
Weight Gain (g)	84.0 ± 4.1	111.1 ± 3.8*	68.3 ± 4.9* [#]
BMI (g/cm²)	0.55 ± 0.01	0.62 ± 0.01*	0.54 ± 0.01 [#]

NCT: Normocaloric control; HCT: Hypercaloric control; H-CMG: Hypercaloric + CMG (20 mg / kg). Data are expressed as mean ± SEM, n = 08. * p <0.05 vs NCT; [#]p <0.05 vs HCT.

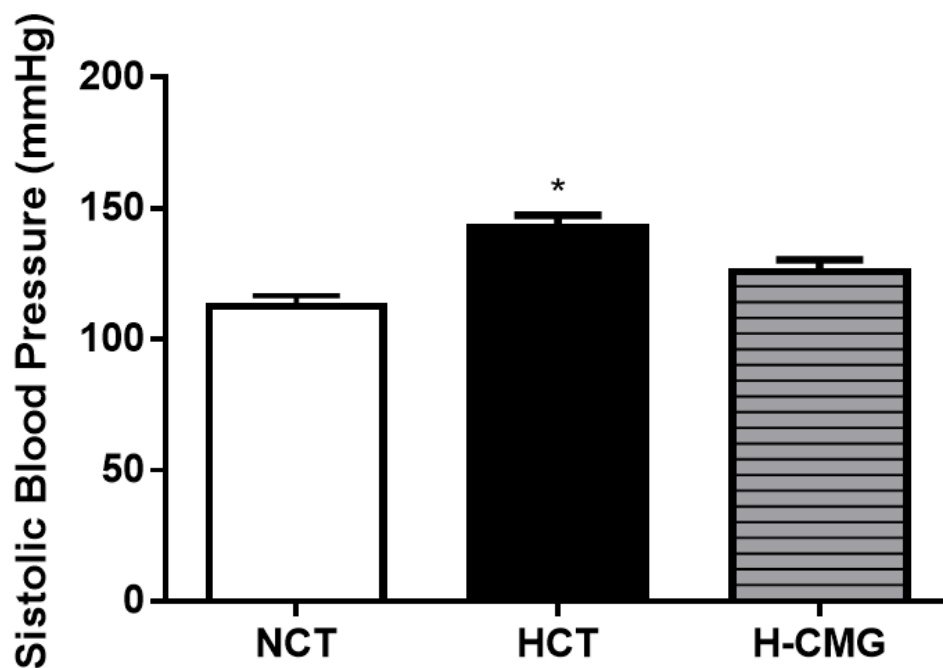
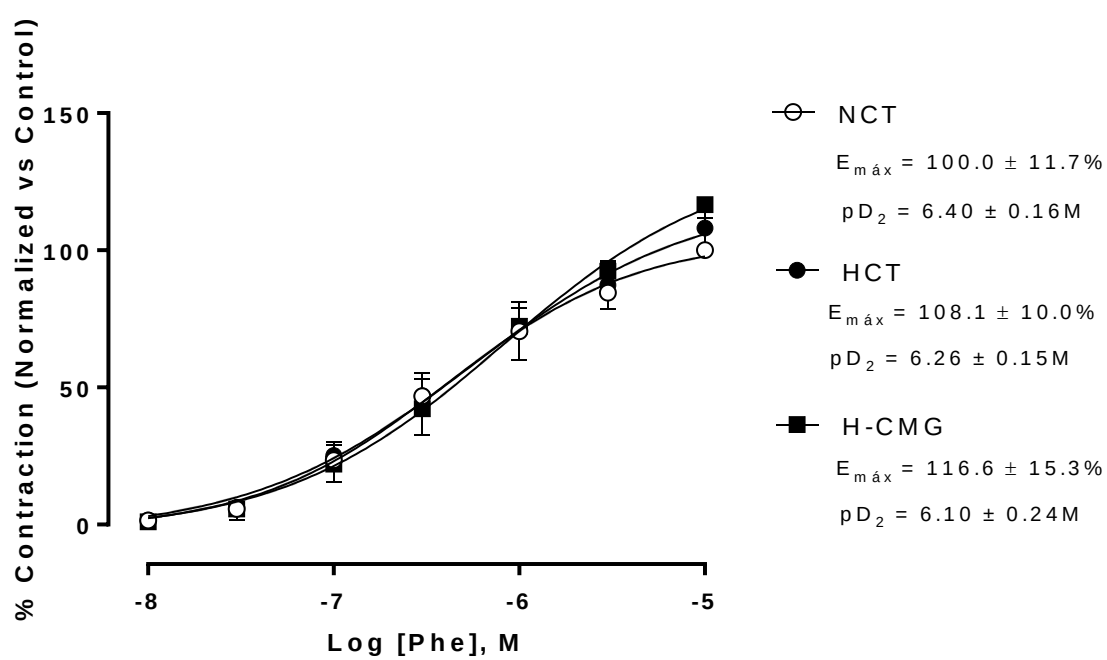
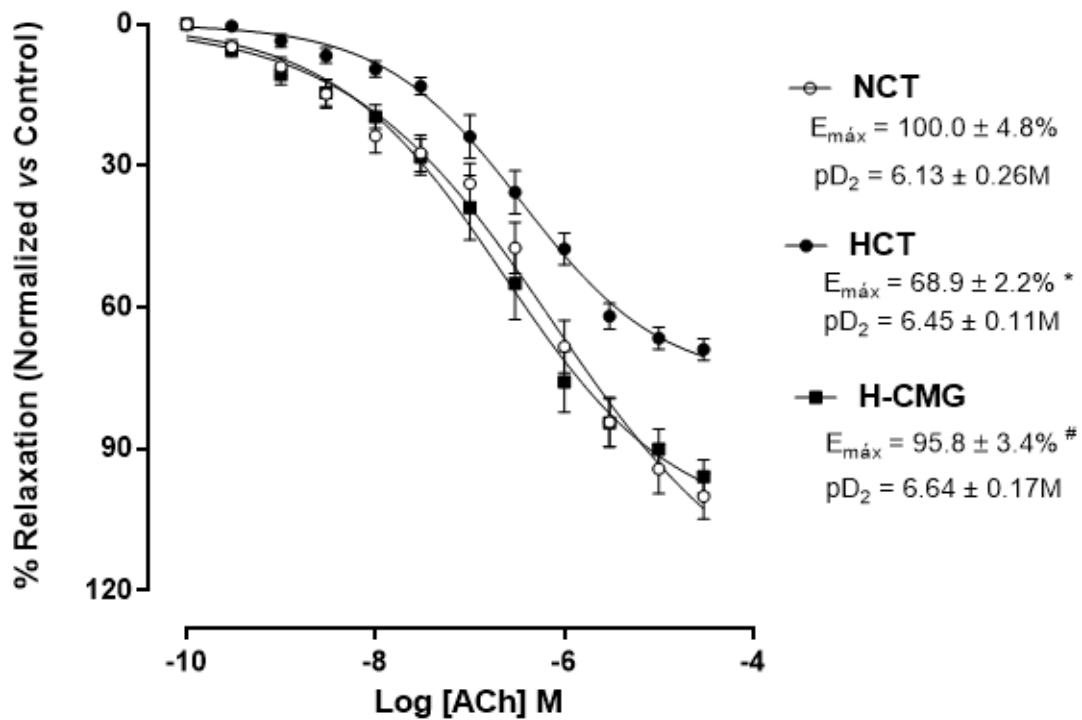


Figura 1: Mean systolic blood pressure of rats from NCT, HCT, and H-CMG groups. NCT: Normocaloric Control; HCT: Hypercaloric Control; H-CMG: Hypercaloric + CMG (20 mg/kg). Data are expressed as mean ± SEM, n = 08. *p <0.05 vs NCT.

A



B



C

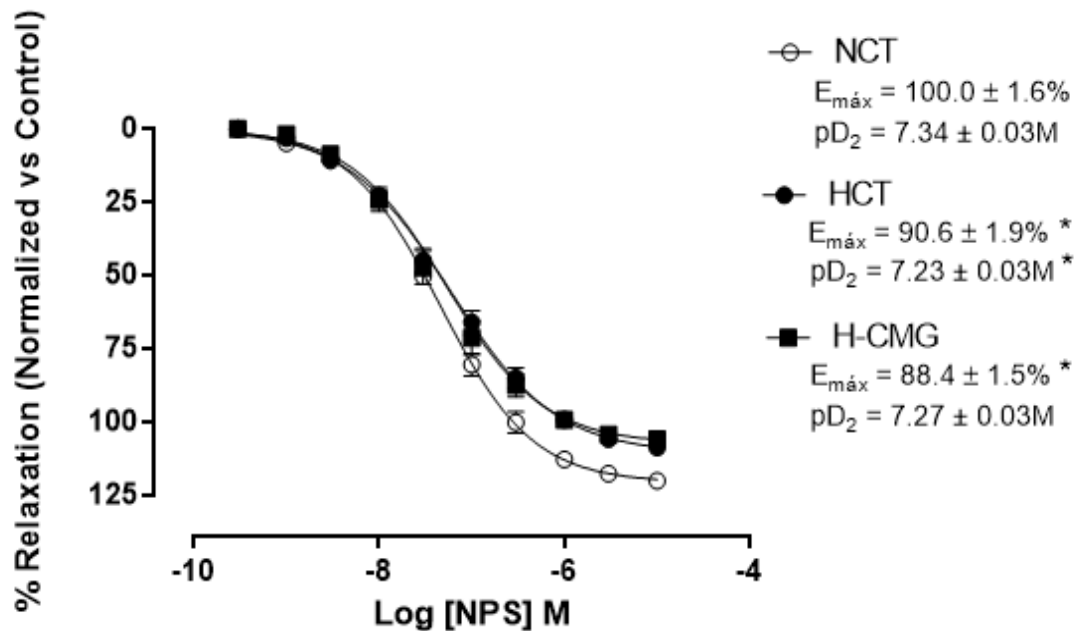
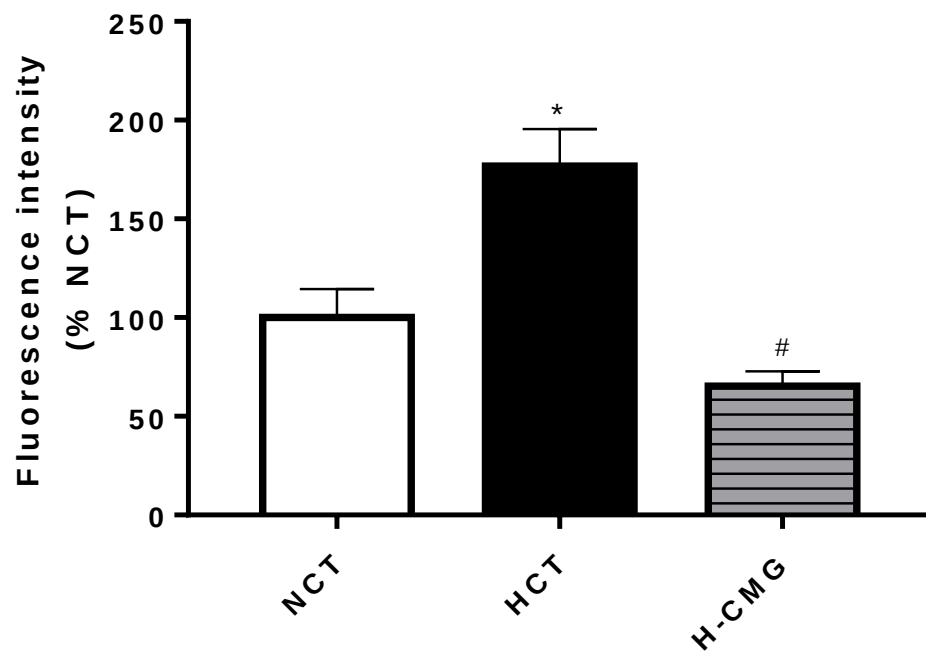


Figure 2: Concentration-response curve for Phe ($10^{-9} - 10^{-5}$ M) (A); ACh ($10^{-10} - 10^{-5}$ M) and NPS ($10^{-10} - 10^{-5}$ M) (C) in rings of mesenteric artery of rats fed a normocaloric diet, hipercaloric diet and treated with CMG. NCT: Normocaloric control; HCT: Hypercaloric control; H-CMG: Hypercaloric + CMG (20 mg / kg). The dose-response curves were plotted using nonlinear regression to analyze the vascular reactivity. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM, $n = 08$. * $p < 0.05$ vs NCT; # $p < 0.05$ vs HCT.

A



B

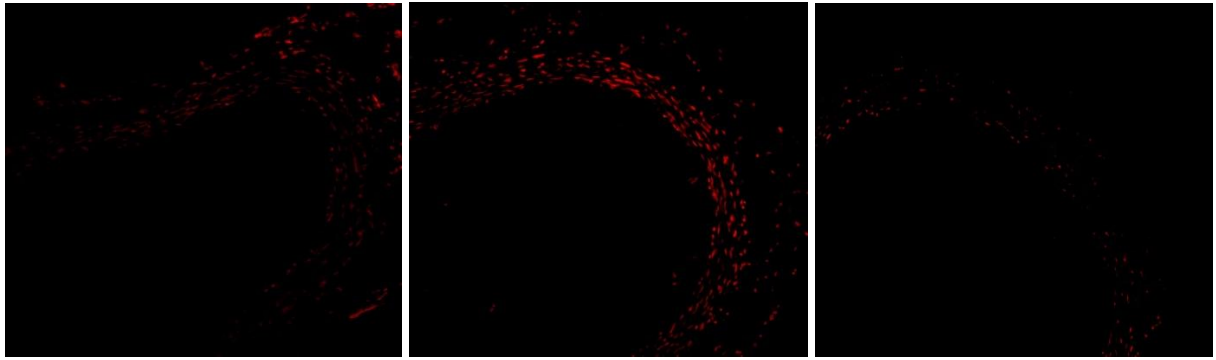
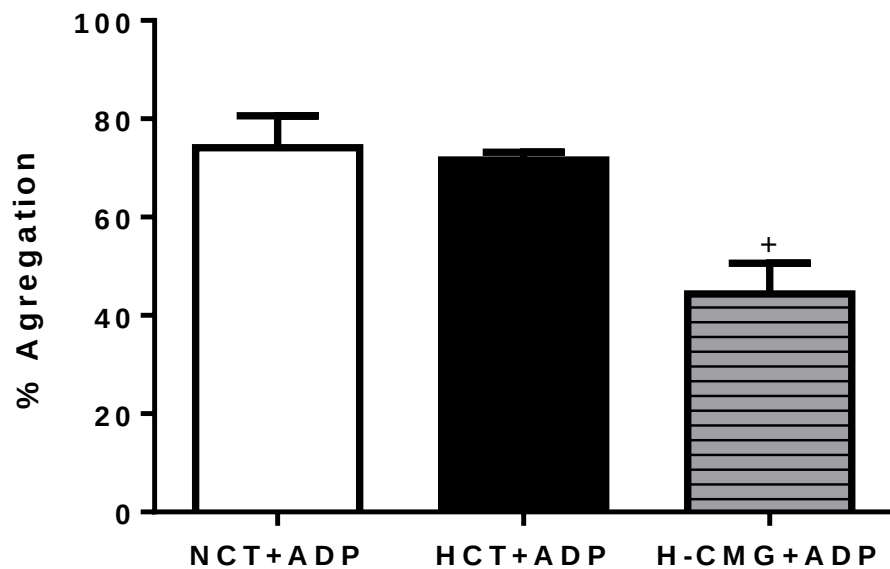


Figure 3: Effect of CMG on oxidative stress in mesenteric artery in rats fed a hypercaloric diet. A) Basal fluorescence percentage (%) in cross sections of the mesenteric artery of the different groups. B) Representative images of basal fluorescence intensity emitted by DHE probe in mesenteric artery cross sections (10 μ m) at the end of treatment (10x objective). NCT: Normocaloric control; HCT: Hypercaloric control; H-CMG: Hypercaloric + CMG (20 mg / kg). Data are expressed as mean values of percentage of basal fluorescence in relation to CT $\pm$ SEM, n = 05. Data were analyzed using the one-way ANOVA test followed by Tukey post-test. *p < 0.05 vs NCT; #p < 0.05 vs HCT.

A



B

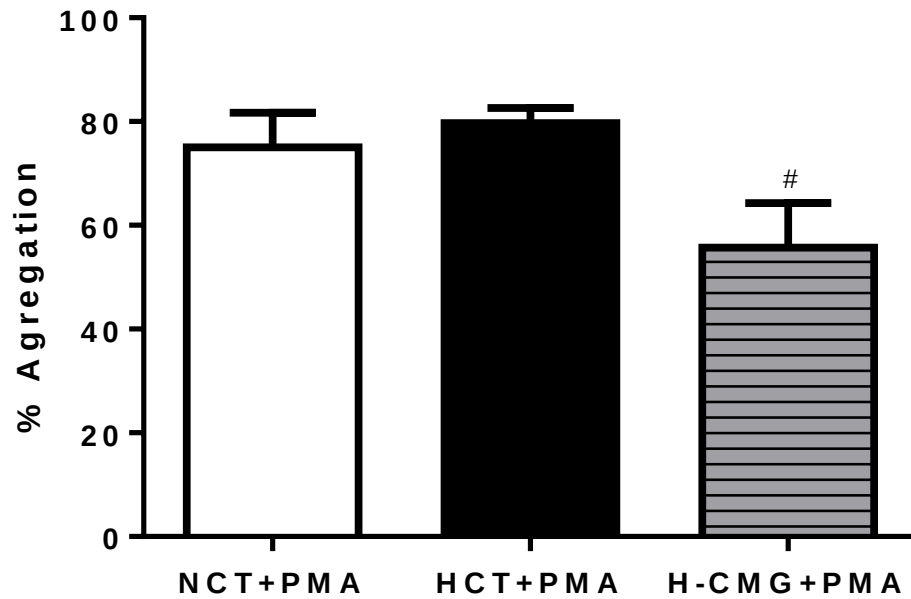


Figure 4: Effect of the oral administration of CMG (20 mg/kg), for 12 weeks, on the platelet aggregation induced by: 10 mM ADP (A) and 100 ng/mL PMA (B) in rats fed hypercaloric diets. NCT: Normocaloric Control; HCT: Hypercaloric Control; H-CMG: Hypercaloric + CMG (20 mg / kg). Data are expressed as the mean $\pm$ SEM (n = 8). [#]p < 0.05 vs HCT; +p < 0.05 vs HCT and NCT.

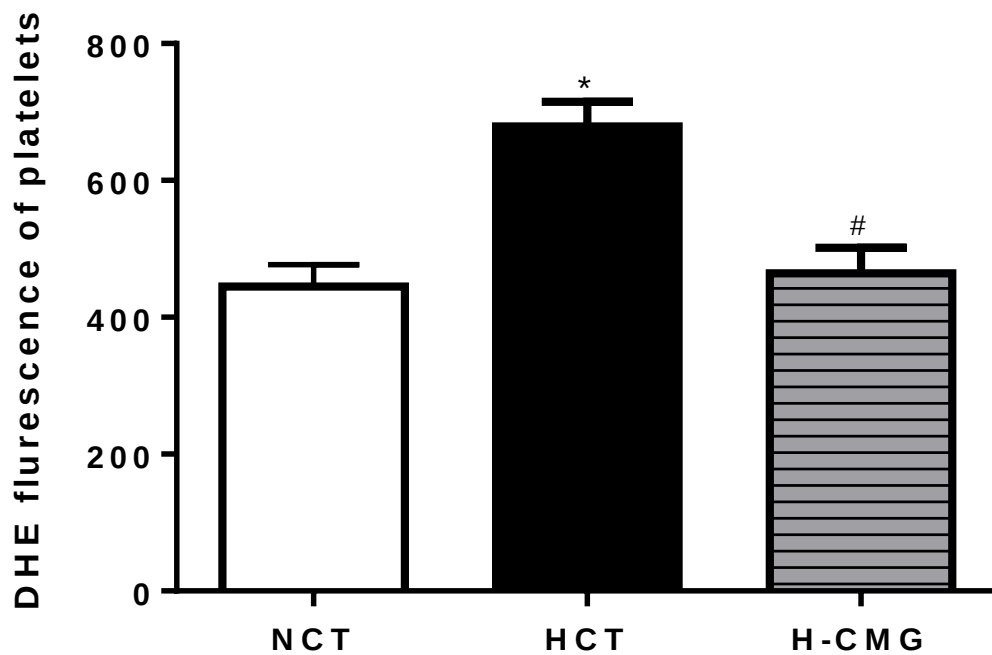


Figure 5: CMG effect on ROS production in platelets of rats fed a hypercaloric diet. NCT: Normocaloric Control; HCT: Hypercaloric Control; H-CMG: Hypercaloric + CMG (20 mg / kg). Data are expressed as mean $\pm$ SEM, n = 08. *p <0.05 vs NCT; #p <0.05 vs HCT

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "EFEITO PREVENTIVO DA B-D-GLUCANA EXTRAÍDA DA *Saccharomyces cerevisiae* E DO SEU DERIVADO SOLÚVEL SOBRE ALTERAÇÕES RELACIONADAS À SÍNDROME METABÓLICA EM RATOS" protocolo nº 074/2017 sob a responsabilidade do pesquisador Dr. Robson Cavalcante Veras – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) em reunião de 17/05/2017.

Vigência do Projeto	2017
Espécie/linhagem	Ratos Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)
Número de animais	72 animais para experimentação 12 animais para treinamento
Idade/peso	12 semanas (250 g)
Sexo	Machos
Origem	Biotério Prof. Thomas George / IPerFarM - UFPB

Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da CEUA-UFPB