

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE SINOP
Programa de Pós-Graduação em Ciências em Saúde

**ANTILOBESOGÊNICO, HIPOCOLESTEROLÊMICO E
ANTIOXIDANTE EFEITOS DA BOTRIOSFERANA, UMA
 $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow6)$ -D-GLUCANA, EM RATAS**

ISABELLE ZANATA FABIANE

Sinop, Mato Grosso
Dezembro, 2024

ISABELLE ZANATA FABIANE

**ANTIOBESOGÊNICO, HIPOCOLESTEROLÊMICO E
ANTIOXIDANTE EFEITOS DA BOTRIOSFERANA, UMA
 $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow6)$ -D-GLUCANA, EM RATAS**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Eveline Aparecida Isquierdo Fonseca de Queiroz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências em Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus* Universitário de Sinop, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Saúde.

Sinop, Mato Grosso
Dezembro, 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

F118a Fabiane, Isabelle Zanata.

Antiobesogênico, hipocolesterolêmico e antioxidante efeitos da botriosferana, uma (13)(16)-D-glucana, em ratas [recurso eletrônico] / Isabelle Zanata Fabiane. -- Dados eletrônicos (1 arquivo : 125 f., il. color., pdf). -- 2024.

Orientadora: Eveline Aparecida Isquierdo Fonseca de Queiroz.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Saúde, Sinop, 2024.

Modo de acesso: World Wide Web: <https://ri.ufmt.br>.

Inclui bibliografia.

1. Botriosferana. 2. Obesidade. 3. Antiobesogênico. I. Queiroz, Eveline Aparecida Isquierdo Fonseca de, *orientador*. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS EM SAÚDE
FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "Antiobesogênico, hipocolesterolêmico e antioxidante efeitos da botriosferana, uma β -(1-3)(1-6)-D-Glucana, em ratas".

AUTOR (A): MESTRANDO (A): Isabelle Zanata Fabiane

Dissertação defendida e aprovada em **16 de dezembro de 2024.**

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

1.Doutor(a) EVELINE APARECIDA ISQUIERDO FONSECA DE QUEIROZ (Presidente Banca)
INSTITUIÇÃO: Universidade Federal de Mato Grosso

2.Doutor(a) EVELINE APARECIDA ISQUIERDO FONSECA DE QUEIROZ (Orientador(a))
INSTITUIÇÃO: Universidade Federal de Mato Grosso

3.Doutor(a) Márcio Alberto Torsoni (Examinador(a) Externo(a))
INSTITUIÇÃO: Universidade Estadual de Campinas

4.Doutor(a) LOYANE ALMEIDA GAMA SALES (Examinador(a) Interno(a))
INSTITUIÇÃO: Universidade Federal de Mato Grosso

5.Doutor(a) Priscila Cassolla (Examinador(a) Suplente)
INSTITUIÇÃO: Universidade Federal de Mato Grosso

6.Doutor(a) Pamela Alegranci (Examinador(a) Suplent
INSTITUIÇÃO: Universidade Federal de Mato Grosso

SINOP, 16/12/2024.



Documento assinado eletronicamente por **MARCIO ALBERTO TORSONI**, Usuário Externo, em 22/01/2025, às 16:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **LOYANE ALMEIDA GAMA SALES, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 22/01/2025, às 16:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **EVELINE APARECIDA ISQUIERDO FONSECA DE QUEIROZ, Servidores Docentes e Técnicos Administrativos do ICS - CUS/UFMT**, em 22/01/2025, às 19:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **7558961** e o código CRC **D4C6DA54**.

DEDICATÓRIA

À minha querida família, em especial aos meus pais Marlei e Ceser, por serem meu alicerce, por compreenderem minhas ausências e nunca deixarem de acreditar nos meus sonhos, dedico a vocês este trabalho como um gesto de gratidão pelo amor, apoio incondicional e pelos valores que me ensinaram, permitindo-me alcançar esta conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida que me concedeu, pela força e sabedoria que me guiaram até aqui, e por colocar no meu caminho pessoas incríveis, capazes de transformar desafios em aprendizados e momentos em memórias inesquecíveis. Obrigada por ser minha luz em cada passo e por nunca me deixar esquecer que, com fé, tudo é possível.

À minha família, que representa minha base e minha maior inspiração. Aos meus pais, Marlei e Ceser, por sempre acreditarem em mim, mesmo nos momentos em que eu duvidei de mim mesma. Vocês são meu porto seguro, meu suporte emocional e a razão de tantas das minhas conquistas. Ao meu irmão Marcos à minha cunhada Nayara e aos meus sobrinhos Inácio e Geovanna, pela torcida, amor e apoio constantes, que sempre me motivaram a continuar.

À minha prima Elizangela e seu marido Neco, pelo apoio, pelos momentos que passamos juntos, pelas palavras encorajadoras e por estarem sempre prontos a ajudar de alguma forma. Vocês foram uma parte essencial desse percurso e sou grata por tê-los ao meu lado. À minha prima Elana, minha companheira de casa durante esse período, pela amizade, paciência e por tornar os dias mais leves com sua presença. Compartilhar esse tempo com você é um presente que levarei para a vida.

À minha orientadora, Dra. Eveline Queiroz, pela paciência, incentivo e comprometimento em me ajudar a crescer como pessoa e profissional. Sua dedicação e exemplo foram fundamentais para a realização deste trabalho. Obrigada por confiar em mim e por me guiar com tanto cuidado e sabedoria.

Aos colegas de mestrado e de laboratório, que tornaram o dia a dia mais leve e acolhedor. Estar ao lado de vocês foi construir uma parceria que levarei para a vida. Agradeço em especial a Thiara, Aline, Luanne, Natasha, Maíra e Anna, por sua amizade, companheirismo e contribuições essenciais para o desenvolvimento deste projeto.

Aos professores que, direta ou indiretamente, me orientaram, incentivaram e abriram portas para o meu crescimento acadêmico e profissional. Cada ensinamento, conversa e gesto foram valiosos.

Aos professores e pesquisadores, Aneli de Melo Barbosa-Dekker e Robert Dekker pela produção da botriosferana, que foi utilizada na pesquisa, e também por todos os seus ensinamentos e sugestões durante a realização do trabalho e elaboração do artigo científico.

Àqueles que cruzaram meu caminho e, de alguma forma, deixaram um impacto positivo, saibam que cada gesto, por menor que parecesse, fez a diferença. Vocês são parte importante desta conquista.

À CAPES, pelo apoio financeiro que possibilitou este trabalho e pela oportunidade de contribuir com a ciência e a sociedade.

Por fim, deixo aqui meu profundo agradecimento a todos que fizeram parte dessa jornada, direta ou indiretamente. Este trabalho não é apenas resultado do meu esforço, mas de uma rede de apoio que me sustentou, incentivou e me ajudou a chegar até aqui.

EPÍGRAFE

“A finalidade das ciências naturais não é apenas aceitar as afirmações de outros, mas investigar as causas que existem na natureza”.

Santo Alberto Magno

Resumo

Botriosferana é uma β -(1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana produzida pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. Estudos tem demonstrado a eficácia da botriosferana ao reduzir a obesidade, esteatose hepática, corrigir a dislipidemia, a resistência à insulina e a intolerância à glicose em ratos obesos machos, bem como demonstraram os efeitos antitumorais tanto *in vitro* (células do câncer de mama MCF-7) como *in vivo* (ratos *Wistar* machos). Porém, até o momento são escassos os estudos realizados com ratas. Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da botriosferana em ratas obesas e não obesas, avaliando os seus efeitos metabólicos e antioxidantes. Para isso, foram utilizadas ratas *Wistar* fêmeas (n=32), divididas em quatro grupos: controle (C), controle botriosferana (CB), obesas (O) e obesas botriosferana (OB). por um período de 8 semanas, sendo a obesidade induzida por uma dieta rica em lipídeos e carboidratos. Da 6ª à 8ª semana as ratas CB e OB receberam tratamento com botriosferana (12 mg/kg/dia via *gavage*), por 15 dias, as ratas C e O receberam água também via *gavage*. Ao fim deste período foram realizadas análises antropométricas, de consumo alimentar, tolerância à glicose, tolerância à insulina, dosagens bioquímicas e avaliação de marcadores pró e antioxidantes. O trabalho foi aprovado pelo CEUA (nº protocolo 23108.072920/2023-21). Observou-se que as ratas obesas apresentaram acúmulo de tecido adiposo, hepatomegalia, dislipidemia, resistência à insulina, intolerância à glicose e estresse oxidativo, caracterizando bem o modelo de obesidade induzida por dieta rica em lipídeos e carboidratos. A botriosferana reduziu significativamente o peso corporal das ratas, tanto controle como obesas, e reduziu expressivamente a quantidade de tecido adiposo retroperitoneal das ratas obesas. Ainda, a botriosferana corrigiu a intolerância à glicose a resistência à insulina e a dislipidemia das ratas OB, melhorando a resposta pancreática frente à sobrecarga de glicose e reduzindo significativamente os níveis de triglicerídeos, colesterol total, LDL- e VLDL-colesterol. Botriosferana também apresentou efeito antioxidante em diversos tecidos como o fígado, os músculos e os rins, reduzindo os níveis de TBARS e aumentando os níveis de ácido ascórbico. Assim, pode-se concluir que a botriosferana apresenta um importante e expressivo efeito antiobesogênico, hipocolesterolêmico, sensibilizador da insulina e antioxidante, sendo um potencial fármaco para o tratamento da obesidade e de suas comorbidades.

Palavras-chave: Botriosferana; obesidade; antiobesogênico.

Abstract

Botryosphaeran is a β -(1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan produced by the ascomycete fungus *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. Studies have demonstrated the efficacy of botryosphaeran in reducing obesity, hepatic steatosis, correcting dyslipidemia, insulin resistance, and glucose intolerance in obese male rats, as well as showing antitumor effects both *in vitro* (MCF-7 breast cancer cells) and *in vivo* (male *Wistar* rats). However, studies conducted with female rats are still scarce. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of botryosphaeran in obese and non-obese female rats, assessing its metabolic and antioxidant effects. For this purpose, female *Wistar* rats (n=32) were divided into four groups: control (C), control botryosphaeran (CB), obese (O), and obese botryosphaeran (OB), over an 8-week period, with obesity induced by a high-fat, high-carbohydrate diet. From the 6th to the 8th week, the CB and OB rats received treatment with botryosphaeran (12 mg/kg/day via gavage), while the C and O rats received water also via gavage. At the end of this period, anthropometric analyses, food intake, glucose tolerance, insulin tolerance, biochemical assays, and evaluation of pro- and antioxidant markers were performed. The study was approved by the CEUA (protocol N°. 23108.072920/2023-21). It was observed that obese rats exhibited fat accumulation, hepatomegaly, dyslipidemia, insulin resistance, glucose intolerance, and oxidative stress, well characterizing the model of obesity induced by a high-fat, high-carbohydrate diet. Botryosphaeran significantly reduced the body weight of both control and obese rats and markedly reduced the amount of retroperitoneal fat in obese rats. Additionally, botryosphaeran corrected glucose intolerance and dyslipidemia in OB rats, improving pancreatic response to glucose overload and significantly reducing triglyceride, total cholesterol, LDL-, and VLDL-cholesterol levels. Botryosphaeran also exhibited antioxidant effects in various tissues such as the liver, muscles, and kidneys, reducing TBARS levels and increasing vitamin C levels. Thus, it can be concluded that botryosphaeran presents an important and significant anti-obesogenic, hypocholesterolemic, insulin-sensitizing, and antioxidant effect, being a potential drug for the treatment of obesity and its comorbidities.

Keywords: Botryosphaeran; obesity; anti-obesogenic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tecido adiposo inflamado em expansão. Adipócitos hipertróficos e células imunes sofrem mudanças no fenótipo, interrompendo a secreção de citocinas anti-inflamatórias, passando a secretar adipocinas e	20
Figura 2. Ação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. A SOD converte ânions radicais superóxido em peróxido de hidrogênio. O nível fisiológico de peróxido de hidrogênio é mantido pela catalase.....	23
Figura 3. Representação esquemática do protocolo experimental do tratamento com botriosferana. C = Grupo Controle, CB = Grupo Controle Botriosferana, O = Grupo Obeso e OB = Grupo Obeso Botriosferana	29
Figura 4. Evolução ponderal dos animais dos grupos: Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB) entre a 1ª e a 8ª semana do protocolo experimental.	39
Figura 5. Comparação da ingestão alimentar (A) e do consumo de ração cumulativo em gramas (B) entre a 1ª e a 8ª semanas do protocolo experimental (A). Grupos: Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB).....	40
Figura 6. Comparação do consumo de água (A) e do consumo de água cumulativo em mL (B) entre a 1ª e a 8ª semana do protocolo experimental. Grupos: Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB).....	41
Figura 7. Comparação do consumo de ração em calorias (A) e alimentar cumulativo em calorias (kcal) (B) entre a 1ª e a 8ª semanas do protocolo experimental. Grupos: Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB).....	42
Figura 8. Peso inicial (6ª semana) (A) e peso final (8ª semana) (B) dos animais dos grupos Controle (C) Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB).	45
Figura 9. Ganho de peso entre 6ª e 8ª semana (A), e gordura retroperitoneal (B) dos animais dos grupos Controle (C) Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB).	45
Figura 10. Curva glicêmica (A) e constante de decaimento da glicose (KiTT) (B), obtidas por meio do teste de sensibilidade à insulina intraperitoneal (IPITT) dos grupos Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB). Resultados foram apresentados como média ± desvio padrão.	47
Figura 11. Curva glicêmica (A) e área sobre a curva (B), obtidas por meio do teste de tolerância à glicose oral (OGTT) dos grupos Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB). Resultados foram apresentados como média ± desvio padrão.	48
Figura 12. Representação esquemática dos efeitos da botriosferana.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição nutricional das rações.	28
Tabela 2. Parâmetros biológicos dos animais.	44
Tabela 3. Peso dos tecidos e consumo alimentar dos animais.	44
Tabela 4. Parâmetros analisados no teste do labirinto em cruz elevado.	46
Tabela 5. Parâmetros bioquímicos.	49
Tabela 6. Parâmetros hematológicos dos animais.	50
Tabela 7. Parâmetros bioquímicos do estresse oxidativo no fígado.	53
Tabela 8. Parâmetros bioquímicos do estresse oxidativo no músculo.	54
Tabela 9. Parâmetros bioquímicos do estresse oxidativo no tecido adiposo.	55
Tabela 10. Parâmetros bioquímicos do estresse oxidativo nos rins.	56
Tabela 11. Parâmetros bioquímicos do estresse oxidativo no coração.	57
Tabela 12. Parâmetros bioquímicos do estresse oxidativo no cérebro.	58
Tabela 13. Parâmetros bioquímicos do estresse oxidativo no baço.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
ATM	Macrófago do tecido adiposo
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
CAT	Catalase
CB	Controle botriosferana
CD301	<i>MGL-Macrophage Galactose-type Lectin</i>
CDNB	1-cloro-2,4 dinitrobenzeno
CHCM	Hemoglobina corpuscular média
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EDTA	Sal dissódico dihidratado
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
GLUT4	Transportador de glicose 4
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GS-DNB	2,4-dinitrofenil-Sglutathione
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
GST	Glutathione-S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HNO ₃	Ácido nítrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-1	Interleucina – 1
IL-10	Interleucina – 10
IL-23	Interleucina – 23
IL-6	Interleucina – 6
IMC	Índice de Massa Corporal
IPITT	Teste de tolerância à insulina intraperitoneal
Kitt	Constante de decaimento da glicose

MDA	Malondialdeído
mRNA	RNA mensageiro
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Hidreto
O ₂ ⁻	Radical ânion superóxido
OB	Obeso botriosferana
OGTT	Teste de tolerância oral à glicose
OH ⁻	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO ⁻	Radical peroxinitrito
PCR	Proteína C reativa
PGC1 α	Coativador gama 1-alfa do receptor ativado pelo proliferador peroxissomo
SM	Síndrome metabólica
SOD	Superóxido dismutase
TA	Tecido adiposo
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TFK	Tampão fosfato de potássio
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UCP-1	Proteína desacopladora mitocondrial 1
VCM	Volume corpuscular médio
Wnt	<i>Wingless</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVO	26
2.1. OBJETIVO GERAL	26
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. ANIMAIS E MODELO EXPERIMENTAL	27
3.2. PREPARO DA SOLUÇÃO DE BOTRIOSFERANA	29
3.3. TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	30
3.4. CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE E ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	31
3.5. ANÁLISE DO CONSUMO DIÁRIO DE RAÇÃO, ÁGUA E CALORIAS	32
3.6. TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE ORAL (OGTT)	32
3.7. TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA INTRAPERITONEAL (IPITT)	33
3.8. HEMOGRAMA	33
3.9. AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO DE NEUTRÓFILOS	34
3.10. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO	34
3.10.1. Peroxidação lipídica	35
3.10.2. Determinação de proteínas carboniladas	35
3.10.3. Catalase	36
3.10.4. Superóxido dismutase	36
3.10.5. Glutathione reduzida	37
3.10.6. Glutathione-S-transferase	37
3.10.7. Glutathione peroxidase	37
3.10.8. Ácido ascórbico	38
3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4. RESULTADOS	39
4.1. CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE E COMPORTAMENTO ALIMENTAR DOS ANIMAIS	39
4.2. TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	46
4.3. PERFIL GLICÊMICO, LIPÍDICO E HEMATOLÓGICO	46
4.4. AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO DE NEUTRÓFILOS	50
4.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS DOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO	52
4.5.1. Fígado	52
4.5.2. Músculo	54

4.5.3. Tecido adiposo	55
4.5.4. Rins	56
4.5.5. Coração	57
4.5.6. Cérebro.....	58
4.5.7. Baço	59
5. DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÃO.....	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
8. ARTIGO	79
ANEXO.....	

1. INTRODUÇÃO

A obesidade se caracteriza pelo acúmulo anormal de gordura, levando a um aumento do peso corporal em relação à altura, apresentando um risco à saúde (WHO, 2024). O crescimento da população obesa em todo mundo é um fator preocupante tanto para países desenvolvidos quanto para países em desenvolvimento independentemente do sexo e da idade, trazendo consequências de forma individual, social, familiar e financeira (PERAL-SANCHEZ; HOJEIJ; OJEDA; STEEGERS-THEUNISSEN *et al.*, 2021).

Dados de 2019 do IBGE apresentaram uma prevalência da obesidade de 21,8% para homens e de 29,5% para as mulheres, ocorrendo um aumento progressivo da obesidade com a idade tanto em homens quanto em mulheres (OLIVEIRA; BRANT; POLANCZYK; MALTA *et al.*, 2022). Já uma pesquisa realizada pela VIGITEL (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico) no ano de 2021 apresentou uma frequência de adultos obesos de 22,4%, semelhante entre as mulheres (22,6%) e os homens (22,0%), também apresentando um aumento do número de casos conforme a idade aumenta (VIGITEL, 2022).

Desde a infância a obesidade aumenta os riscos de doenças psicológicas, neurológicas, pulmonares, gastrointestinais, renais e endócrinas sendo causada por diversos fatores como dietas ricas em gordura, sedentarismo, estresse e fatores genéticos e epigenéticos. Ela afeta diretamente a expectativa de vida, podendo haver uma diminuição de 5 até 20 anos dependendo de fatores associados à esta (MULLER; BLUHER; TSCHOP; DIMARCHI, 2022).

Muitos fatores contribuem para o aumento de peso da população sendo elas genéticas e ambientais. Entre as principais causas ambientais está o aumento da ingestão de alimentos ultraprocessados hipercalóricos (*fast food*, alimentos ricos em carboidratos e lipídeos, etc), a desregulação do ciclo de sono, o estresse e a diminuição da frequência de atividade física (LIN; LI, 2021; LIU; DU; WU; SNETSELAAR *et al.*, 2021; MULLER; BLUHER; TSCHOP; DIMARCHI, 2022).

A obesidade, como citado anteriormente, é caracterizada por um aumento do peso corporal, e este aumento é decorrente de um acúmulo significativo de tecido adiposo (TA), em especial, TA branco visceral (gordura visceral) e diminuição ou nenhuma alteração da massa magra (tecido muscular esquelético) (VECCHIÉ; DALLEGRI; CARBONE; BONAVENTURA *et al.*, 2018).

A gordura visceral representa a gordura armazenada na região abdominal, envolvendo órgãos internos como fígado, pâncreas e intestino, e está relacionada com as consequências

metabólicas da obesidade (DE SOUZA; BRAY; CAREY; HALL *et al.*, 2012). Por outro lado, a massa magra refere-se ao tecido muscular presente no corpo e quanto maior a massa muscular maior é a capacidade do corpo de queimar calorias por se tratar de um tecido metabolicamente ativo que precisa de energia para se manter (LEE; LEE, 2021). Embora a gordura visceral e a massa magra sejam dois componentes diferentes do corpo, eles podem afetar um ao outro por meio de diversos fatores como genética, níveis de atividade física, dieta e idade. Uma quantidade adequada de massa muscular pode ajudar a reduzir o acúmulo de gordura visceral melhorando a saúde metabólica (LEE; LEE, 2021).

A prática de exercícios físicos e uma alimentação equilibrada são essenciais para manter uma boa proporção entre a gordura visceral e a massa magra, sendo que em estudos recentes onde foi utilizada uma dieta com um maior teor de proteínas e um baixo teor de carboidratos, ou o uso de fármacos para perda de peso, resultaram em uma diminuição significativa da gordura visceral (LEE; LEE, 2021; STEFAN, 2020).

O aumento do TA ocorre tanto pela hiperplasia (aumento do número) quanto pela hipertrofia (aumento do tamanho) dos adipócitos, o que leva ao aumento da secreção de quimiocinas, desregulação do fluxo de ácidos graxos, morte celular e hipóxia. Nos primeiros anos de vida há um aumento no número e no tamanho dos adipócitos, condição que se estabiliza, e ocorre novamente na adolescência. Estudos demonstram que o número de adipócitos permanece constante em adultos magros e obesos, onde nem a obesidade nem a perda de peso alteram este número, sugerindo que a hipertrofia é o principal fator na obesidade adulta (DONG; QIN; WANG; LI *et al.*, 2023; MANIYADATH; ZHANG; GUPTA; MANDRUP, 2023).

O TA é encontrado abaixo da pele (TA subcutâneo) e/ou em órgãos e tecidos circundantes (TA visceral), formado por adipócitos maduros, pré-adipócitos, células estromais mesenquimais, células endoteliais vasculares e contráteis, nervos e por células do sistema imune. O TA é um reservatório calórico que regula o fornecimento de energia do organismo, além disso, também apresenta uma função endócrina, atuando na manutenção da atividade de células e órgãos secretando adipocinas, como citocinas, hormônios, fatores de crescimento e proteínas (AMBELE; DHANRAJ; GILES; PEPPER, 2020). Entre as adipocinas, a leptina e a adiponectina desempenham papéis importantes: a leptina atua no controle da saciedade e no gasto energético, enquanto a adiponectina possui propriedades anti-inflamatórias e sensibilizadoras de insulina (FUNCKE; SCHERER, 2019). Estudos revelam que a distribuição do TA afeta o metabolismo, e que um aumento na quantidade de TA visceral está associada à

desregulação metabólica, podendo levar à intolerância à glicose e resistência à insulina (REYES-FARIAS; FOS-DOMENECH; SERRA; HERRERO *et al.*, 2021).

O TA é formado pelo tecido adiposo marrom (TAM), TAB e tecido adiposo bege. O TAM é formado por adipócitos com características específicas, contendo muitas mitocôndrias, grande quantidade de gotículas lipídicas, e altos níveis de expressão da proteína desacopladora mitocondrial 1 (UCP1). Quando ativado, o TAM, capta ácidos graxos e glicose para fornecer energia para a termogênese, sendo o principal regulador da termogênese (AMBELE; DHANRAJ; GILES; PEPPER, 2020; FRIGOLET; GUTIÉRREZ-AGUILAR, 2020).

O TAB é o tipo mais abundante, formado por adipócitos com uma grande gotícula lipídica, tendo como principal função o armazenamento de energia. O TAB é também o responsável por secretar adipocinas, como leptina e adiponectina. Depósitos do TAB se classificam de acordo com sua distribuição em dois depósitos principais: o visceral, que inclui o TAB omental, gonadal, mesentérico, retroperitoneal e pericárdico; e subcutâneo, localizado sob a pele (REYES-FARIAS; FOS-DOMENECH; SERRA; HERRERO *et al.*, 2021).

Em humanos com IMC normal o TAB constitui cerca de 20% do peso corporal em homens e 30% em mulheres, já em indivíduos obesos esse percentual pode chegar a 50% devido à expansão do tecido adiposo visceral e subcutâneo (MANIYADATH; ZHANG; GUPTA; MANDRUP, 2023).

O ganho de peso e a obesidade causam mudanças no tecido adiposo branco (TAB), promovendo infiltração de células imunes e inflamação, caracterizando a obesidade como uma doença inflamatória de baixo grau (KAWAI; AUTIERI; SCALIA, 2021; SUN; KUSMINSKI; SCHERER, 2011).

O processo de formação de adipócitos, adipogênese, envolve a diferenciação de células tronco mesenquimais em adipócitos maduros. Esse processo é regulado por duas fases, a determinação, onde células tronco são convertidas em pré-adipócitos, e a diferenciação terminal (AMBELE; DHANRAJ; GILES; PEPPER, 2020).

Adipócitos hipertróficos levam a diversas disfunções celulares e metabólicas, podendo interferir na função do tecido adiposo, aumentando a expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias e induzir a inflamação por meio do recrutamento de células do sistema imune, como os macrófagos. A hipertrofia dos adipócitos também interfere na captação de glicose, interferindo nas estruturas de actina, prejudicando assim o deslocamento do GLUT4 (transportador de glicose 4), levando à resistência à insulina (CHOE; HUH; HWANG; KIM *et al.*, 2016).

Na obesidade, o acúmulo de TAB, leva a um aumento dos níveis de ácidos graxos livres e dos níveis de adipocitocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e a interleucina 6 (IL-6), o que contribui para o desenvolvimento de resistência à ação da insulina no próprio tecido adiposo, no tecido muscular esquelético e no fígado, aumentando o risco de diabetes *mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares e outras comorbidades. A resistência à insulina é definida como um estado de resposta reduzida em tecidos alvos à insulina (LEE; PARK; CHOI, 2022; REGUERO; GÓMEZ DE CEDRÓN; WAGNER; REGLERO *et al.*, 2021).

Assim o acúmulo de tecido adiposo leva à um aumento nos ácidos graxos livres que podem ser direcionados e acumulados em outros tecidos como o fígado, o músculo e o tecido cardíaco, causando lipotoxicidade e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), contribuindo para o desenvolvimento de resistência à insulina, esteatose hepática e doenças cardiovasculares. Ainda, o acúmulo de tecido adiposo tem influência negativa sobre vários órgãos e tecidos, prejudicando o funcionamento das mitocôndrias, organela essencial à produção de energia nas células (BALAN; HALAȚIU; SCRIDON, 2024; DE MELLO; COSTA; ENGEL; REZIN, 2018). A alta ingestão de calorias leva a um aumento da concentração de vários nutrientes, em especial a glicose e os ácidos graxos, o que compromete a função mitocondrial das células. Esse processo leva a uma redução na oxidação de ácidos graxos e inibição do transporte de glicose, afetando em especial o tecido adiposo e os músculos. Nos músculos esqueléticos, isso acarreta resistência à insulina e a uma menor captação de glicose (LUONG; LEE; KIM, 2024). No fígado, a obesidade pode levar a danos mitocondriais, lesões do DNA mitocondrial e ao comprometimento dos processos de fissão mitocondrial. Esses processos afetam negativamente o metabolismo hepático, levando à resistência à insulina e contribuindo para o desenvolvimento de patologias como a esteatose hepática (XIA; VEERAGANDHAM; CAO; XU *et al.*, 2024). No coração também ocorrem mudanças devido a disfunção mitocondrial afetando a capacidade de contração e relaxamento das células cardíacas o que aumenta o risco de arritmias, como a fibrilação atrial (BALAN; HALAȚIU; SCRIDON, 2024; LUONG; LEE; KIM, 2024).

A obesidade é considerada uma pandemia global e está associada ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas não transmissíveis como a hipertensão arterial sistêmica, o diabetes *mellitus* tipo 2, a síndrome metabólica, o câncer, as doenças respiratórias crônicas, dentre outras (PERAL-SANCHEZ; HOJEIJ; OJEDA; STEEGERS-THEUNISSEN *et al.*, 2021).

A incidência da síndrome metabólica (SM) frequentemente segue a incidência de obesidade e diabetes tipo 2. SM é uma condição complexa que tem sido definida de diferentes maneiras ao longo dos anos. A Organização Mundial da Saúde (OMS), o Grupo Europeu para o Estudo da Resistência à Insulina (EGIR) e o Painel de Tratamento Adulto III do Programa Nacional de Educação sobre Colesterol (NCEP ATP III) foram os primeiros a desenvolverem os critérios para identificação da SM. Os critérios para diagnóstico da SM variam conforme diferentes organizações e definições ao longo do tempo, porém, os critérios presentes para este diagnóstico são: diagnóstico de obesidade (por meio da análise do valor da circunferência da cintura ou IMC), concentração de glicose plasmática alterada (hiperglicemia), hipertensão arterial, níveis dos triglicerídeos alterados (hipertrigliceridemia) e os níveis do colesterol HDL alterado (diminuído), sendo que o indivíduo deve apresentar pelo menos 3 ou 4 desses fatores alterados (BOVOLINI; GARCIA; ANDRADE; DUARTE, 2021; FAHED; AOUN; BOUZERDAN; ALLAM *et al.*, 2022).

Vários fatores de risco são associados ao desenvolvimento da SM, incluindo o histórico familiar, tabagismo, idade avançada, obesidade, baixa condição socioeconômica, menopausa, inatividade física e padrões alimentares (SAKLAYEN, 2018).

Além do risco do desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como a SM, indivíduos obesos sofrem com o preconceito social e discriminação, sendo considerados preguiçosos, gulosos, não disciplinados e sem vontade. O estigma do peso é prejudicial também no que se refere a saúde mental, levando o indivíduo a apresentar sintomas de ansiedade, depressão, baixa autoestima, alimentação pobre em nutrientes, isolamento social e no desenvolvimento de transtornos alimentares (MULLER; BLUHER; TSCHOP; DIMARCHI, 2022). Esta visão da sociedade que indivíduos obesos são assim por escolha e que por simplesmente se exercitarem mais e comerem menos poderiam reverter tal situação leva a graves consequências físicas e psicológicas, como também a problemas nas políticas públicas em saúde, na aderência a tratamentos e pesquisa, sendo um grande problema de saúde pública. Assim, o reconhecimento da obesidade como uma doença crônica influencia na mudança da forma como ela é vista, não sendo relacionada a uma falta de disciplina pessoal (RUBINO; PUHL; CUMMINGS; ECKEL *et al.*, 2020).

Como citado anteriormente, a obesidade é caracterizada por um quadro de inflamação crônica de baixo grau e estresse oxidativo, sendo observado na obesidade um TA inflamado, rico em macrófagos, citocinas pró-inflamatórias e moléculas pró-oxidantes (VECCHIÉ; DALLEGRI; CARBONE; BONAVENTURA *et al.*, 2018). Macrófagos do tecido adiposo (ATMs) sofrem uma mudança na obesidade, de sua forma M2 anti-inflamatória para uma forma

M1 pró-inflamatória, estes macrófagos vão expressar fatores associados a resistência à insulina e complicações metabólicas. Estudos mostram uma correlação entre o IMC e a abundância de macrófagos M1, em especial no tecido adiposo subcutâneo, aumentando com a obesidade (REYES-FARIAS; FOS-DOMENECH; SERRA; HERRERO *et al.*, 2021). Macrófagos do tecido adiposo formam até 40% das células do tecido adiposo obeso, enquanto que em indivíduos magros esse número cai para menos de 10% (PURDY; SHATZEL, 2021).

Macrófagos M1 promovem a inflamação através da secreção de mediadores pró-inflamatórios, como TNF α , IL-6, IL-8, IL-12 e IL-23, e também promovem a expressão aumentada de óxido nítrico sintase. Já macrófagos do tipo M2 expressam F4/80, CD301, CD163, arginase-1 e receptores do tipo *Scavenger*, estes macrófagos ajudam a modular a reparação tecidual, imunossupressão e homeostase do tecido adiposo, através da secreção de citocinas anti-inflamatórias (KUMARI; HEEREN; SCHEJA, 2018).

De maneira geral a inflamação é um processo que leva a um maior gasto energético e de maneira direta ou indireta pode induzir a um menor consumo energético (SALTIEL; OLEFSKY, 2017). A inflamação do TA induzida pela obesidade não está associada ao aumento no gasto energético, levando a uma continua inflamação e ganho de peso em pessoas obesas. A inflamação causada pela obesidade é única, envolvendo diversos órgãos como pâncreas, fígado, músculo esquelético, coração, cérebro e tecido adiposo (KAWAI; AUTIERI; SCALIA, 2021; SALTIEL; OLEFSKY, 2017).

A leptina é uma adipocina essencial na regulação do apetite e do gasto energético, que na obesidade devido a seus altos níveis leva há uma perda da capacidade da resposta de seus efeitos regulatórios normais, com uma redução do seu transporte através da barreira hematoencefálica. Na obesidade, a leptina contribui para a migração de monócitos derivados da medula óssea para o TA, resultando em uma elevação dos níveis de IL-6, IL-1, IL-8 e TNF- α e isto resulta no aumento de proteína C reativa (PCR). Essa cascata de acontecimentos resulta em uma inflamação crônica de baixo grau (PURDY; SHATZEL, 2021) (Figura 1).

Além dos macrófagos, outras células do sistema imune como neutrófilos e linfócitos, desempenham funções importantes nos mecanismos da inflamação durante a obesidade. Estudos demonstram que a interação entre neutrófilos e adipócitos leva à inflamação do TAB por meio da produção de IL-1 β com ação de macrófagos infiltrados. Essa cascata inflamatória causada por neutrófilos foi determinada como uma das causas do desenvolvimento de resistência hepática à insulina e de distúrbios metabólicos. Células T reguladoras (Tregs) podem apresentar uma regulação negativa durante a obesidade, causando inflamação no TAB e consequentemente resistência à insulina (KAWAI; AUTIERI; SCALIA, 2021) (Figura 1).

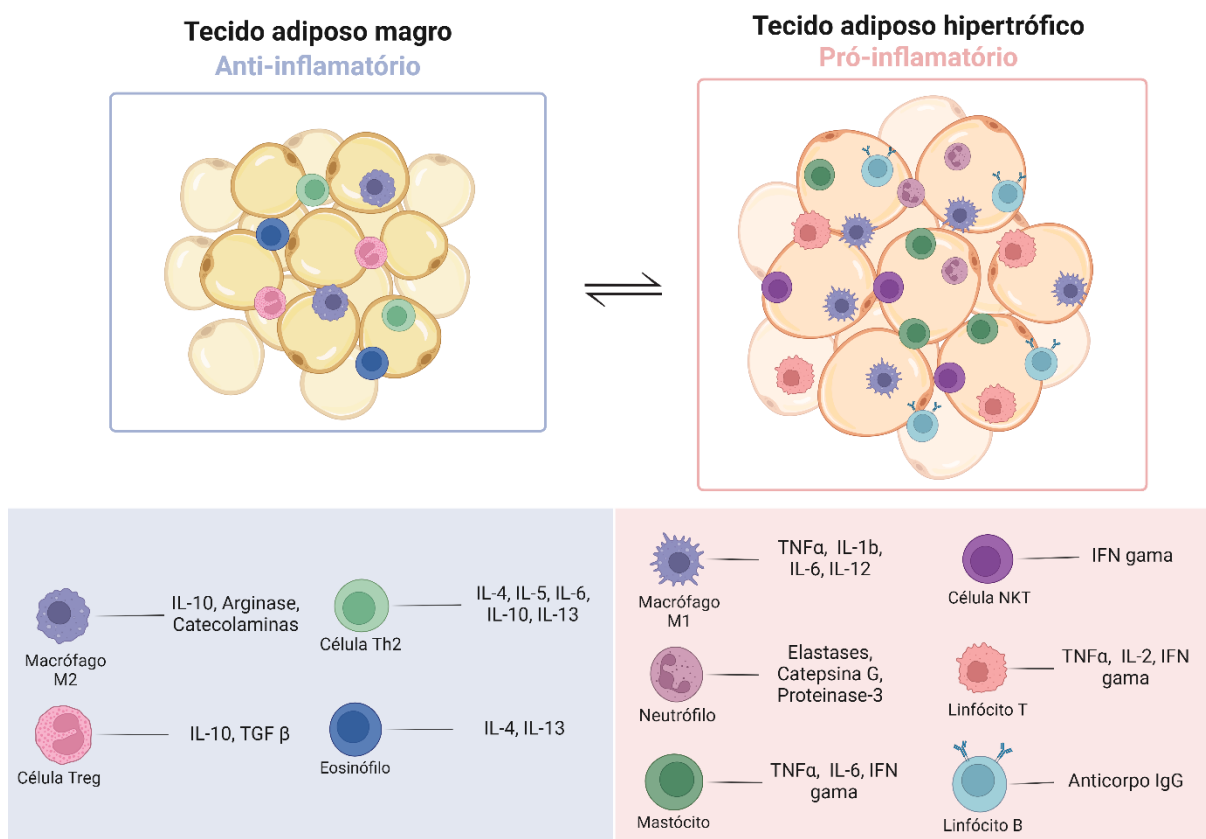


Figura 1. Tecido adiposo inflamado em expansão. Adipócitos hipertróficos e células imunes sofrem mudanças no fenótipo, interrompendo a secreção de citocinas anti-inflamatórias, passando a secretar adipocinas e citocinas inflamatórias que atuam para induzir resistência à insulina periférica. Adaptado de (KAWAI; AUTIERI; SCALIA, 2021). Criado usando o programa Biorender.

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas ou radicais formados a partir da reação de transferência de elétrons ao oxigênio que estão envolvidas no metabolismo aeróbio. A nível celular as EROs são produzidas como subprodutos metabólicos das mitocôndrias, peroxissomos e da xantina oxidase, enquanto que a NADPH oxidase (oxidases da família NOX) e dupla oxidase (DUOX) geram EROs como produtos enzimáticos primários (AL-SHEHRI, 2021; BEDARD; KRAUSE, 2007).

As EROs são moléculas neutras, íons ou radicais, presentes em uma cascata de transições de uma espécie para outra. As EROs incluem ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($OH^\cdot$), ácido nítrico (HNO_3) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que possuem elétrons desemparelhados ou ligações instáveis, reagindo facilmente com proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos, que em altas concentrações podem causar danos irreversíveis ou até a destruição completa destas moléculas (BRIEGER; SCHIAVONE; MILLER; KRAUSE, 2012).

As espécies de oxidantes mais prejudiciais nas células são os radicais hidroxila e o radical peroxinitrito ($ONOO^\cdot$), pois suas taxas de reação com as biomoléculas são muito altas,

sendo basicamente impossível eliminá-los com antioxidantes de baixo peso molecular, como o ácido ascórbico (vitamina C) e a vitamina E. Assim, a única forma de evitar os danos causados por estas espécies é prevenir sua formação através da remoção dos radicais superóxidos e do peróxido de hidrogênio pelas enzimas antioxidantes (JOMOVA; ALOMAR; ALWASEL; NEPOVIMOVA *et al.*, 2024).

As EROs também desempenham papéis importantes na sinalização e em processos biossintéticos. Em níveis normais apresentam papéis importantes na saúde, tendo influência na proliferação celular, diferenciação, regulação da expressão gênica, imunidade inata para combater patógenos e adaptação à hipóxia. O desequilíbrio na produção e degradação de EROs pode levar ao estresse oxidativo. Esse desequilíbrio pode implicar em várias doenças, como câncer, doenças cardiovasculares, cataratas, distúrbios neurodegenerativos, doença de Alzheimer e ao envelhecimento (AL-SHEHRI, 2021).

Os principais locais de geração de EROs são a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, o retículo endoplasmático e as proteínas NOX. Durante a respiração celular, o oxigênio é reduzido por transferência de elétrons, e outros intermediários com elétrons ímpares podem escapar da cadeia, gerando EROs. Enzimas como a xantina oxidase e a óxido nítrico sintase e organelas como mitocôndrias e peroxissomos, produzem EROs como um subproduto metabólico. As EROs podem ser divididas em oxidantes de um elétron (espécies radicais, como superóxido e radical hidroxila) e oxidantes de dois elétrons (espécies não-ramicais, como peróxido de hidrogênio), com diferentes atividades oxidativas. Certas espécies podem causar danos oxidativo a macromoléculas, com geração de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas, que levam à destruição de membranas e consequente morte celular (BRIEGER; SCHIAVONE; MILLER; KRAUSE, 2012; SAHOO; BANIK; BORAH; JAIN, 2022).

A geração de EROs pelas mitocôndrias é um subproduto da cadeia de transporte de elétrons, sendo que mais de 90% das EROs são produzidas pelas mitocôndrias. Na cadeia de citocromo, elétrons derivados de NADH e FADH₂ podem reagir diretamente com oxigênio ou receptores de elétrons, gerando radicais livres (LUSHCHAK, 2014; ZHANG; PAN; FENG; YAN *et al.*, 2022).

As NOX são proteínas ligadas à membrana que transferem elétrons através de membranas para o oxigênio, gerando superóxido. As NOX são compostas por subunidades ligadas à membrana que catalisam a redução do oxigênio. A subunidade catalítica das proteínas NOX contém um domínio desidrogenase C-terminal com sítio de ligação NADPH e uma flavina adenina dinucleotídeo (FAD) ligada. Assim que ativadas, as oxidases NADPH transferem elétrons do NADPH para o FAD, que vai passar os elétrons para dois grupos heme

ligados ao domínio N-terminal, que então passam os elétrons para duas moléculas de oxigênio ao lado posterior da membrana, formando assim ânions superóxido (ANDRÉ-LÉVIGNE; MODARRESSI; PEPPER; PITTET-CUÉNOD, 2017; LIU; SUN; ZHANG; WANG *et al.*, 2022).

Os radicais hidroxila e oxigênio singleto não podem difundir-se através das membranas. No entanto, o peróxido de hidrogênio possui reatividade moderada, uma alta especificidade, forte difusibilidade e alta permeabilidade membranar, o que o torna importante para a sinalização celular, podendo regular diversas atividades fisiológicas (DAN DUNN; ALVAREZ; ZHANG; SOLDATI, 2015).

O controle dos níveis das EROs não ocorre apenas pela produção, mas também pela sua eliminação através de um sistema antioxidante. A defesa antioxidante consiste em substâncias que, quando presentes em menor concentração que a de um substrato oxidável, atrasa, ou evita a oxidação deste substrato. O sistema de defesa está classificado em dois grupos: antioxidante de baixo peso molecular (não-enzimáticos) e antioxidantes de alto peso molecular (enzimáticos) (BRIEGER; SCHIAVONE; MILLER; KRAUSE, 2012).

Os antioxidantes de baixo peso molecular incluem, vitamina C e E, carotenoides, polifenóis, ácido úrico e glutatona (GSH). E os antioxidantes de alto peso molecular como a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR) e catalase (CAT) (Figura 2) (BRIEGER; SCHIAVONE; MILLER; KRAUSE, 2012).

A GSH é um antioxidante sintetizado pela maioria dos organismos vivos, utilizada para controlar os níveis de EROs, tanto pela sua interação direta, como pela sua ação indireta em enzimas que desintoxicam as EROs (Figura 2). A GSH pode interagir com o óxido nítrico para neutralizá-lo, criando um mecanismo regulatório adicional, como a S-nitrosilação (LIU; SUN; ZHANG; WANG *et al.*, 2022).

As superóxido dismutases, SOD1, SOD2 e SOD3, são enzimas que catalisam a reação em que dois superóxidos são convertidos em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, que é então dismutado pela catalase, ou reduzido pela glutatona peroxidase (GPx) (Figura 2). A SOD está amplamente distribuída, tendo três tipos de SODs em mamíferos, SOD1 contém cobre e zinco em seu sítio de ativação e são encontradas no citoplasma de células eucarióticas, SOD2 contém manganês e encontram-se na mitocôndria, e SOD3 é encontrada no fluido extracelular. A catalase possuiu a maior taxa de conversão entre as enzimas e está predominantemente localizada nos peroxissomos. A GPx em conjunto com a SOD e a catalase formam a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo induzido pelas EROs. Esta utiliza o grupamento sulfidril da GSH para reduzir o peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos, formando água e

glutathiona oxidada (GSSG). A GSSG é por sua vez reduzida à GSH novamente pela ação da glutathiona redutase (GR) utilizando NADPH (Figura 2) (JOMOVA; ALOMAR; ALWASEL; NEPOVIMOVA *et al.*, 2024; LUSHCHAK, 2014).

A vitamina C captura o peróxido de hidrogênio e remove aproximadamente 8% do radical superóxido citoplasmático, apesar de que quando comparada à SOD e à GPx essa taxa de remoção seja fisiologicamente baixa (ZHENG; XU; LIEHN; RUSU, 2024).

Além dos antioxidantes não enzimáticos citados previamente, tem-se as β -glucanas, que são polímeros de glicose ligados por ligações glicosídicas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 3) e β -(1 $\rightarrow$ 4) com ramificações do tipo β -(1 $\rightarrow$ 6) (DEKKER; QUEIROZ; CUNHA; BARBOSA-DEKKER, 2019; QUEIROZ; ALEGRANCI; BARBOSA-DEKKER; DEKKER, 2020; WOUK; DEKKER; QUEIROZ; BARBOSA-DEKKER, 2021).

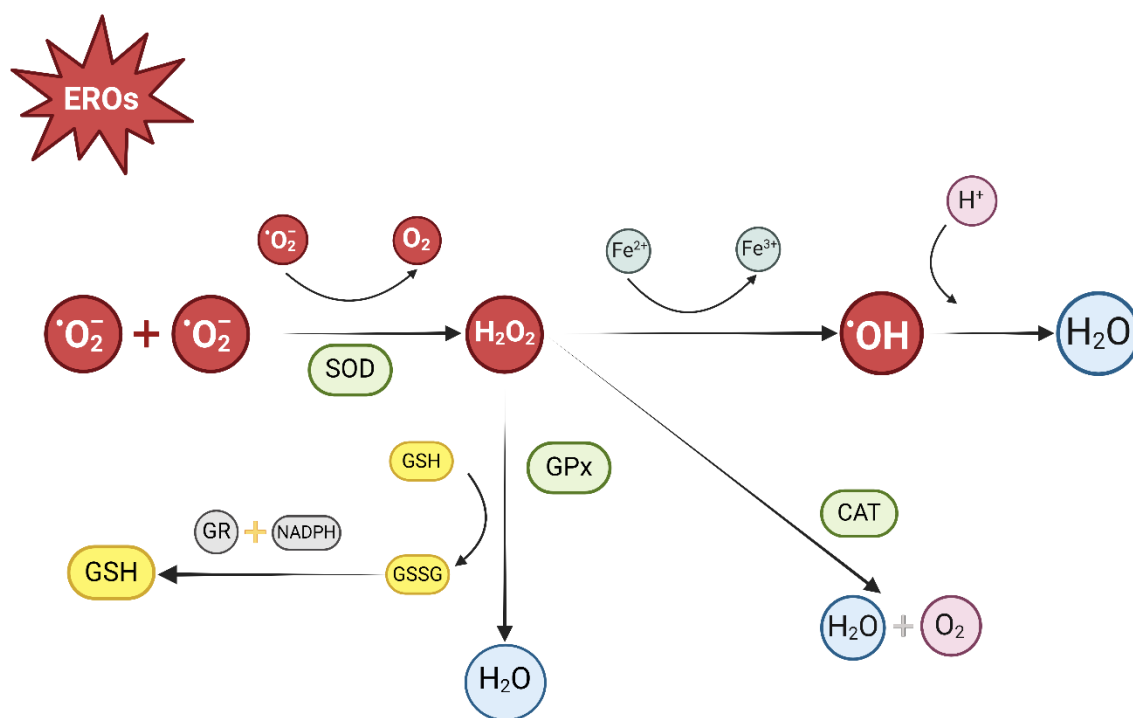


Figura 2. Ação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase. A SOD converte ânions radicais superóxido em peróxido de hidrogênio. O nível fisiológico de peróxido de hidrogênio é mantido pela catalase. Em algumas condições, metais redox (Fe) podem catalisar a formação de radicais hidroxila pela decomposição do peróxido de hidrogênio (reação de Fenton). A GPx converte o peróxido de hidrogênio em H_2O usando glutathiona reduzida (GSH) como substrato, que é então convertida em sua forma oxidada, dissulfeto de glutathiona (GSSG). O GSSG é convertido de volta à sua forma reduzida, GSH usando a enzima glutathiona redutase (GR) (JOMOVA; ALOMAR; ALWASEL; NEPOVIMOVA *et al.*, 2024). Criado usando o programa Biorender.

β -glucanas são polissacarídeos viscosos solúveis em água formados por ligações glicosídicas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 3), β -(1 $\rightarrow$ 4) e β -(1 $\rightarrow$ 6). Estão presentes nas paredes celulares de bactérias, plantas e fungos, e em especial em algas e cereais, tendo um papel importante na formação da estrutura das células, ainda, podem ser produzidos por fungos e secretados no meio de cultivo, sendo desta forma considerados exopolissacarídeos. β -glucanas são classificadas de acordo com o tipo de ramificação da cadeia e o número de ligações glicosídicas, sendo encontradas em bactérias glucanas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 3), em grãos de cereais e algas marinhas glucanas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 3) e β -(1 $\rightarrow$ 4) e em leveduras, glucanas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 3) e β -(1 $\rightarrow$ 6). A função desses polissacarídeos pode variar dependendo de inúmeros fatores como o tamanho da molécula, solubilidade em água, ramificação e a estrutura adotada quando solúvel em água (AOE, 2021; MIRONCZUK-CHODAKOWSKA; KUJAWOWICZ; WITKOWSKA, 2021; QUEIROZ; ALEGRANCI; BARBOSA-DEKKER; DEKKER, 2020; SUZUKI; KUSANO; KONDO; NISHIKAWA *et al.*, 2021; WOUK; DEKKER; QUEIROZ; BARBOSA-DEKKER, 2021).

As β -glucanas tem demonstrado um importante papel na microbiota intestinal, estando presentes em alimentos prebióticos como cogumelos, aveia, cevada e algas marinhas. Estudos *in vivo* demonstraram que o uso de β -glucanas aumentou o crescimento de cepas bacterianas como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, por servirem como um substrato fermentável para estas bactérias intestinais sendo utilizadas como fonte de energia e estimulando o seu desenvolvimento no intestino. Ainda, essas substâncias tem a capacidade de modular a resposta imunológica, promovendo um aprimoramento da função da barreira intestinal, a regulação da resposta inflamatória que desempenha um papel importante no controle de diversas doenças, como doenças infectocontagiosas, obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus* e câncer (JAYACHANDRAN; CHEN; CHUNG; XU, 2018; WANG; QU; WANG; WANG *et al.*, 2022).

Entre estas β -glucanas está a botriosferana, um exopolissacarídeo produzido pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 que caracteriza-se pelas ligações do tipo β -(1 $\rightarrow$ 3) com ramificações do tipo β -(1 $\rightarrow$ 6), sendo assim uma β -(1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana (BARBOSA; STELUTI; DEKKER; CARDOSO *et al.*, 2003). Estudos demonstraram diversas atividades biológicas da botriosferana entre elas: propriedades antimutagênicas, antiproliferativas, antioxidantes, antivirais, anticoagulante, hipoglicêmica, hipocolesterolêmica e antiobesogênica (CARLOTO; BORTOLETI; RODRIGUES; SILVA *et al.*, 2022; COMIRAN; RIBEIRO; SILVA; MARTINS *et al.*, 2020; DALONSO, N.; GOLDMAN, G. H.;

GERN, R. M. M., 2015; GERALDELLI; RIBEIRO; MEDEIROS; COMIRAN *et al.*, 2020a; LI; XUE; PANG; LEN *et al.*, 2019; SILVA; COSTA; SOUZA; RIBEIRO *et al.*, 2018).

A botriosferana demonstrou eficácia em reduzir hiperglicemia, e ao melhorar a resistência à insulina em modelos de obesidade e diabetes, além de ser eficiente ao proteger contra sintomas de caquexia. Esses efeitos benéficos podem estar associados a mecanismos como a inibição da expressão do transportador de glicose SGLT-1, regulação de enzimas hepáticas e pela ativação da AMPK, mecanismos também observados em outras β -glucanas de origem fúngica (WOUK; DEKKER; QUEIROZ; BARBOSA-DEKKER, 2021).

Silva *et al.* (2018) e Ribeiro *et al.* (2022) demonstraram a eficácia da botriosferana ao reduzir a obesidade, esteatose hepática, corrigir a dislipidemia, reduzir a resistência à insulina e a intolerância à glicose no tecido adiposo de ratos machos obesos induzidos por dieta rica em carboidratos e lipídeos. Silva *et al.* (2018) ainda demonstrou seus efeitos sobre a modulação das atividades da AMPK (Proteína Ativada por AMP) e FOXO3a (*Forkhead Transcription Fator 3a*). Ambos os estudos foram realizados com uma dose de botriosferana de 12 mg/kg/dia.

Foi demonstrado um significativo efeito antitumoral da botriosferana na dose de 30 mg/kg/dia em ratos machos tanto magros (GERALDELLI; RIBEIRO; MEDEIROS; COMIRAN *et al.*, 2020b) como obesos (GERALDELLI; RIBEIRO; MEDEIROS; COMIRAN *et al.*, 2020a), sendo o mecanismo antitumoral relacionado com a melhora do perfil metabólico dos animais e efeito antioxidante (SILVA; GERALDELLI; MARTINS; BRAGA *et al.*, 2022).

A botriosferana apresentou um significativo efeito antioxidante em diferentes tecidos, como fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, reduzindo os níveis de marcadores de estresse oxidativo, como TBARS e proteínas carboniladas, e modulando a atividade de enzimas antioxidantes (DA SILVA; GERALDELLI; MARTINS; BRAGA *et al.*, 2022).

Assim, pode-se observar que vários trabalhos foram desenvolvidos demonstrando os efeitos biológicos da botriosferana em machos, e mais estudos são necessários para avaliar os efeitos desta β -(1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana em ratas fêmeas obesas e não obesas. A utilização de fêmeas para este estudo é fundamental para compreender as possíveis diferenças metabólicas e hormonais que podem influenciar a resposta à botriosferana, podendo causar mudanças significativas na regulação do metabolismo e nos resultados esperados. Acredita-se que as ratas obesas apresentarão diversas alterações metabólicas como hiperglicemia, dislipidemia e resistência à insulina, além de impactos negativos e estresse oxidativo em órgãos como fígado, rins, tecido adiposo e músculos. A botriosferana tem potencial para melhorar esses parâmetros metabólicos nas ratas obesas, não gerando nenhum impacto negativo sobre a saúde das ratas avaliadas.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial efeito metabólico, hipocolesterolêmico, sensibilizador de insulina, antioxidante e hematológico da botriosferana em ratas obesas e não obesas.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da botriosferana sobre o ganho de peso das ratas, sua evolução ponderal, ingestão alimentar e peso dos tecidos.

Avaliar os efeitos da botriosferana sobre o perfil glicêmico, lipídico e hematológico das ratas obesas e não obesas.

Avaliar marcadores de estresse oxidativo e a atividade de enzimas antioxidantes em múltiplos órgãos (fígado, tecido adiposo, músculo, rim, coração, baço e cérebro).

Avaliar o perfil comportamental das ratas obesas e não obesas tratadas ou não com botriosferana.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e modelo experimental

Foram utilizadas ratas *Wistar* fêmeas obtidas do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). Os grupos experimentais foram organizados de acordo com o peso das ratas, que apresentaram pesos iniciais equivalentes. As ratas foram mantidas durante todo o período experimental em caixas de polipropileno, com até 6 ratas por caixa, sendo realizada as trocas das caixas a cada 2 dias. Os animais foram mantidos no biotério da UFMT, Campus Universitário de Sinop, a uma temperatura de 22 ± 2 °C com uma umidade relativa do ar de $55\% \pm 5\%$, em um ciclo claro-escuro regular de 12 horas e com água e ração à vontade.

Os protocolos experimentais foram desenvolvidos de acordo com as normas do Comitê de Ética para Uso e Experimentação Animal da Universidade Federal de Mato Grosso, protocolo de aprovação nº 23108.072920/2023-21.

Durante as primeiras seis semanas, desde a introdução da alimentação com ração padrão e ração hipercalórica, os animais foram divididos em dois grupos: Grupo Controle (n=16) e Grupo Obeso (n=16), com 5 ou 6 animais por caixa. Na 6ª semana os animais foram subdivididos em quatro grupos experimentais (n=8 por grupo): Grupo Controle (C), Grupo Controle Botriosferana (CB), Grupo Obeso (O) e Grupo Obeso Botriosferana (OB).

As ratas do Grupo Controle receberam ração padrão para roedores (NUVILAB CR-1, Colombo, Paraná, Brasil; 4% de lipídeos) e água filtrada. Para a indução da obesidade, as ratas do Grupo Obeso foram alimentadas com ração hiperlipídica, composta por banha de porco, leite condensado, bolacha de maisena, ração padrão de roedores (NUVILAB CR-1, Colombo, Paraná, Brasil; 4% de lipídeos), caseína e um sachê composto por vitaminas e minerais, e água com sacarose (300 g/L) durante 8 semanas (COMIRAN; RIBEIRO; SILVA; MARTINS *et al.*, 2020). Os animais foram pesados no início do experimento, e semanalmente, para avaliação da evolução ponderal.

Ao fim da 8ª semana foi realizado o procedimento de eutanásia seguido das análises propostas. Para a eutanásia, as ratas foram anestesiadas utilizando uma mistura de cetamina e xilazina. Em seguida foi realizado o procedimento de punção cardíaca para coleta do sangue destinado às análises. Posteriormente, a decapitação foi realizada com auxílio de uma guilhotina para retirada dos órgãos.

O ciclo estral das ratas não foi padronizado, pois o protocolo exigia a eutanásia logo após os quinze dias do tratamento com botriosferana, para garantir a análise de todos os animais ao final do mesmo período de tratamento.

Tabela 1. Composição nutricional das rações.

Componentes	Ração Padrão (%)	Ração Hiperlipídica (%)
Carboidratos	65,5	45,2
Proteínas (Caseína <99%)	22	20,9
Lipídeos	4	24,5
Fibras	4	4
Mistura de Vitaminas*	1	1
Mistura de Minerais*	3,5	3,5
Total (%)	100	100
Valor Calórico (Kcal)	3800	4849

*Conteúdo suplementado de vitaminas e minerais a cada 1000g de ração hipercalórica: Ferro: 25,2 mg; Potássio: 104,8 µg; Selênio 73,1 µg; Sulfato de molibdênio: 150,0 µg; Vitamina B12: 34,5 µg; Vitamina B6 6 µg; Biotina: 0,12 µg; Vitamina E: 48,9 UI; Vitamina D: 2447,0 UI; e Vitamina A: 15291,2 UI. Fonte: (COMIRAN; RIBEIRO; SILVA; MARTINS *et al.*, 2021).

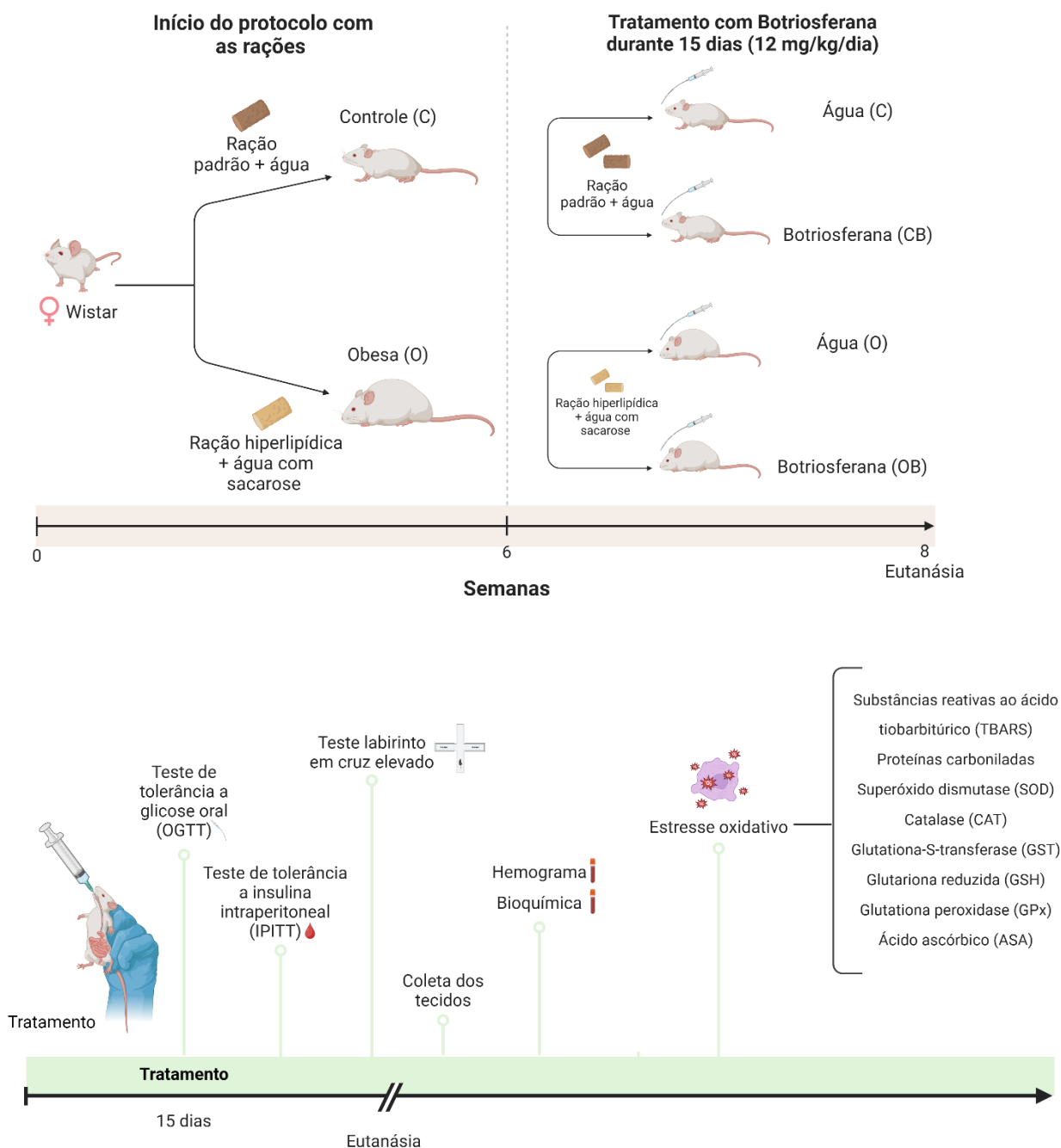


Figura 3. Representação esquemática do protocolo experimental do tratamento com botriosferana. C = Grupo Controle, CB = Grupo Controle Botriosferana, O = Grupo Obeso e OB = Grupo Obeso Botriosferana. Criado usando o programa Biorender.

3.2. Preparo da solução de botriosferana

O preparo da solução de botriosferana se deu inicialmente pelo cultivo isolado da *Botryosphaeria rhodina* MAMB-5 em ágar a 4 °C. O inóculo foi preparado crescendo o fungo em placas de ágar em meio mínimo de Vogel e glicose. Depois de 5 dias de crescimento a 28 °C, fragmentos foram transferidos para frascos que continham sais mínimos de Vogel e glicose,

e incubados a 28 °C por 48 horas em um agitador. As culturas foram homogeneizadas, centrifugadas, e então dissolvidas em solução salina esterilizada. Partes desta suspensão foram adicionadas a frascos de Erlenmeyer contendo meio de sais mínimos de Vogel e glicose, onde as culturas foram crescidas em cultivo submerso durante 72 horas a 28 °C. Após o crescimento a cultura foi centrifugada para separar o micélio do fluido extracelular, este fluido é então tratado com etanol, fazendo com que os exopolissacarídeos precipitem.

O precipitado é dissolvido em água deionizada e passa por um processo de diálise para remover possíveis impurezas, após este processo a solução é congelada e liofilizada obtendo o exopolissacarídeo bruto. Este exopolissacarídeo, a denominada botriosferana, uma β -(1→3)(1→6)-D-glucana, é então dissolvido, sendo mantido a 50 °C por 2 horas (BARBOSA; STELUTI; DEKKER; CARDOSO *et al.*, 2003).

O preparo da solução de botriosferana foi realizado no Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina (UEL), sob orientação da professora Dr^a Aneli Barbosa-Dekker e professor Dr. Robert F. H. Dekker.

Soluções de botriosferana foram preparadas previamente em solução aquosa na concentração de 2 g/L. Para isso, a botriosferana em sua forma liofilizada foi pesada em balança analítica e solubilizada em solução aquosa. Foi utilizado um agitador magnético com aquecimento, até a completa solubilização. Quando totalmente solubilizadas, foram autoclavadas a 121 °C por 20 minutos e estocadas a 4 °C para posterior utilização. As ratas foram tratadas de acordo com o modelo experimental com uma dose de 12 mg/kg/dia de botriosferana via gavagem, por 15 dias.

3.3. Teste do labirinto em cruz elevado

O teste do labirinto em cruz elevado foi realizado em um aparelho posicionado a 50 cm do solo, composto por dois braços abertos e dois braços fechados, conectados por uma plataforma central. Para o teste, cada rata foi colocada individualmente na plataforma, voltada para um dos braços aberto, e liberada para explorar o aparelho durante 5 minutos. Foram registrados o número de entradas em cada braço, o tempo gasto em cada braço e na plataforma central, assim como comportamentos como o “mergulho de cabeça” e a “postura esticada”.

O índice de ansiedade foi calculado pela formula: $1 - (\text{tempo nos braços abertos}/300) + (\text{frequência de entrada nos braços abertos}/\text{número total de entradas})/2$. O número total de entradas se baseia em todas as vezes que as ratas cruzavam o limite inicial dos braços abertos e fechados com as quatro patas.

O teste do labirinto em cruz elevado foi realizado pela professora Dra. Nádia Aléssio Velloso, com a colaboração de um aluno de iniciação científica, no laboratório do Núcleo de Pesquisa e Apoio Didático em Saúde (NUPADS).

3.4. Caracterização da obesidade e análise dos parâmetros bioquímicos

Foram avaliados parâmetros como o peso absoluto dos tecidos: tecido adiposo (gorduras periovariana, retroperitoneal e mesentérica), tecido muscular esquelético (músculos sóleo e extensor digital longo), fígado, rins, adrenais, baço, coração e cérebro.

Com base no peso das gorduras foi calculado o índice de adiposidade de acordo com a seguinte fórmula:

Índice de adiposidade = [(gordura periovariana + gordura retroperitoneal + gordura mesentérica) / peso corporal x 100].

Ainda, o ganho de massa corpórea foi calculado pela diferença entre o peso final do animal na 8ª semana e seu peso inicial (peso na 6ª semana de experimento; quando iniciou-se o tratamento com a botriosferana) (MALAFAIA; NASSIF; RIBAS; ARIEDE *et al.*, 2013).

Para a avaliação dos parâmetros bioquímicos o sangue foi coletado por punção cardíaca, em seringa contendo heparina, na sequência foi colocado em microtubos estéreis e mantidos em uma caixa térmica contendo gelo. Em seguida, realizou-se a centrifugação (3.000 rpm; 10 minutos; Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Hamburg, Germany) a temperatura ambiente. O plasma resultante foi coletado e armazenado a uma temperatura de -80 °C para as análises posteriores, incluindo análise de colesterol total, colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade), triglicerídeos, AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase) e creatinina utilizando kits comerciais (Gold Analisa Diagnóstica®, Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil) através do Analisador Bioquímico Semiautomático modelo BC300 (Contec®, China). Os resultados relativos às lipoproteínas de baixa densidade (colesterol LDL) e lipoproteína de muito baixa densidade (colesterol VLDL) foram obtidas através da aplicação da equação de Friedewald (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972).

Para calcular o colesterol VLDL utilizou-se uma equação que envolve os níveis de triglicerídeos, os quais são divididos por cinco. Já para o cálculo do colesterol LDL a equação é obtida subtraindo a soma do colesterol HDL e do colesterol VLDL do colesterol total (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972). Para calcular o índice TyG, utilizamos os valores de triglicerídeos (Tg) séricos e glicemia de jejum. A fórmula aplicada é o logaritmo neperiano (Ln) do produto entre os valores de Tg (mg/dL) e glicemia de jejum (mg/dL) dividido

por 2. Para o cálculo da eficiência alimentar foi utilizada a seguinte fórmula: $EA = (\text{Ganho de peso} / \text{Consumo de Ração}) \times 100$, onde o ganho de peso é a diferença entre o peso inicial e final das ratas, e o consumo de ração é o total ingerido durante o tratamento. Esse cálculo avalia a capacidade dos animais em converter ração em peso corporal, sendo um indicador da eficiência metabólica.

3.5. Análise do consumo diário de ração, água e calorias

Para a determinação do consumo diário de ração as ratas foram mantidas em caixas de polipropileno (5-6 animais por caixa) onde foram colocados 500 g de ração na caixa. Após 48h ou 72h (aos finais de semana), a ração restante foi pesada, considerando a diferença como a quantidade de ração consumida pelas ratas, sendo esse valor dividido pelo número de animais na caixa e por 2 ou 3 (valor relativo ao intervalo de dias entre uma pesagem e outra). A análise do consumo diário de ração e de água foi realizada durante as 8 semanas de experimento, para avaliar o consumo de ração desde o início do experimento (1ª semana) até o último dia de tratamento (8ª semana). Para a análise do consumo de água, foi aplicado o mesmo protocolo, sendo que a quantidade de água ofertada a cada dois ou três dias foi de 500 mL.

O consumo dos animais expresso em calorias se deu através da seguinte fórmula:

Grupos C e CB: $[(\text{valor consumido de ração/dia/rata (g)} \times 3,77 \text{ (kcal)}) + (\text{valor consumido em água/dia/rato (ml)} \times 0 \text{ (kcal)})] = \text{valor consumido em calorias por dia por rata (kcal)}$.

Grupos O e OB: $[(\text{valor consumido de ração/dia/rata (g)} \times 4,85 \text{ (kcal)}) + (\text{valor consumido em água/dia/rata (ml)} \times 1,2 \text{ (kcal)})] = \text{valor consumido em calorias por dia por rata (kcal)}$.

3.6. Teste de tolerância à glicose oral (oGTT)

Para realização do teste os animais foram submetidos a um jejum de 15 horas, sendo então coletada uma amostra de sangue da veia caudal, através de uma incisão na ponta, correspondendo à glicemia basal (T_0). Na sequência, foi administrada uma solução de glicose (0,25 g/ml) na dose de 2,5 g/kg de peso corporal, via gavagem. As amostras de sangue foram então coletadas nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração da glicose. A glicemia foi determinada por meio de glicosímetro (ACCU-CHEK® ACTIVE, Roche Diabetes,

Brasil). Na sequência, os resultados foram analisados por meio do valor da área sob a curva, representado por glicose $[(\text{mg/dL} \times \text{min}^{-1}) \times 1000]$.

3.7. Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT)

Para a realização do teste os animais foram submetidos a um jejum de 4 horas, sendo coletada uma amostra de sangue da veia caudal, através de uma incisão na ponta, correspondendo à glicemia basal (T_0). Em seguida, foi administrada a insulina regular na dose de 1,0 U/kg de peso corporal por via intraperitoneal, sendo coletadas amostras de sangue nos tempos 4, 8, 12, 16 e 20 minutos após a sobrecarga de insulina. A glicemia foi medida por meio de glicosímetro (ACCU-CHEK® ACTIVE, Roche Diabetes, Brasil). A constante de decaimento de glicose (KiTT) em resposta à sobrecarga de insulina se deu a partir da regressão linear do logaritmo neperiano dos valores glicêmicos obtidos de 4 a 20 minutos no teste (BONORA; MOGHETTI; ZANCANARO; CIGOLINI *et al.*, 1989). Este índice é expresso em %/min e traduz que quanto maior o valor do KiTT maior a sensibilidade à insulina.

3.8. Hemograma

Para realizar a leitura do hemograma foi utilizado o analisador hematológico XN-1000 da Sysmex®, a metodologia aplicada foi a citometria de fluxo fluorescente e impedância. Neste processo, a contagem dos eritrócitos (RBC) foi feita utilizando impedância elétrica, onde a passagem das células por uma abertura causa uma mudança na resistência elétrica. A concentração de hemoglobina (HGB) é medida após a lise dos eritrócitos, sendo sua intensidade de cor avaliada por espectrofotometria. O hematócrito (HCT) é calculado com base no número de eritrócitos e no volume médio corpuscular (VCM). O VCM, por sua vez, é obtido dividindo-se o volume total de eritrócitos pelo número de eritrócitos, enquanto a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) é calculada dividindo-se a concentração de hemoglobina pelo volume de eritrócitos. A contagem total de leucócitos (WBC) e a diferenciação dos neutrófilos, linfócitos e monócitos são realizadas por citometria de fluxo, utilizando o corante fluorescente May-Grunwald Giemsa. As plaquetas (PLT) são contadas pela impedância elétrica, ajustada para seu menor tamanho. Amostras com resultados fora do esperado foram examinadas manualmente utilizando um microscópio óptico Nikon Eclipse E200 para confirmar os resultados ou fornecer uma análise mais detalhada.

3.9. Avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos

Os neutrófilos foram isolados utilizando o método da gelatina descrito por Henson (1971) e modificado por Lucisano e Mantovani (1984). O sangue retirado por meio de punção cardíaca foi separado em um tubo e imediatamente diluído em solução Alsever, que serviu como anticoagulante, sendo então centrifugado por 15 minutos. O plasma e uma camada de glóbulos brancos foram cuidadosamente removidos utilizando pipetas de Pasteur, o *pellet* rico em granulócitos foi então suspenso em solução de gelatina a 2,5%, preparada com NaCl 0,9%, e incubado em banho maria durante 15 minutos a 37 °C. O sobrenadante, rico em neutrófilos, foi então transferido para outro tubo diluído em NaCl a 0,15 M e centrifugado por 10 minutos. Para a lise das células vermelhas restantes, o *pellet* é suspenso em solução de NH₄Cl a 0,83%, aquecido a 37 °C e centrifugado novamente por 10 minutos. O *pellet* resultante foi lavado com NaCl 0,15 M e suspenso em 1 mL de solução de Hanks com 0,1% de gelatina.

Para a avaliação da produção do ânion superóxido as células foram preparadas em microtubulos e uma solução de NBT foi adicionada e essa mistura foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Esse passo permitiu a formação do formazan, que é o produto da reação entre o NBT e o ânion superóxido. Após o banho maria, é adicionado 0,5 mL de HCL para interromper a reação, e a amostra centrifugada durante 5 minutos para separar as células que contêm formazan no *pellet* do sobrenadante. O sobrenadante é descartado e o *pellet* suspenso em DMSO, um solvente que libera o formazan das células para sua leitura. Em seguida foi feita a leitura do sobrenadante por meio de um espectrofotômetro a 565 nm. A absorbância reflete a quantidade de formazan formada, o que é diretamente proporcional à formação de ânion superóxido, e a partir desses valores foi calculada a concentração de formazan em mM.

As análises foram realizadas no laboratório do Núcleo de Pesquisa e Apoio Didático em Saúde (NUPADS) pela professora Me. Lucineia Reuse Albiero, com a colaboração de alunos do seu grupo de pesquisa.

3.10. Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada em amostras do fígado, tecido adiposo, músculo, rim, coração, cérebro e baço, e incluiu a análise das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST) e glutathione peroxidase (GPx), bem como dos marcadores de estresse oxidativo, glutathione reduzida (GSH), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), determinação das proteínas carboniladas

e vitamina C. Para o preparo das amostras da CAT, SOD, GST, GPx, TBARS, proteínas carboniladas e vitamina C foi utilizado o tampão fosfato de potássio (TFK) 50 mM e pH 7,8. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 rpm à 4 °C durante 15 minutos, e o sobrenadante foi armazenado à -20 °C até o momento da análise.

A dosagem de proteínas, para correção dos valores dos testes, foi realizada pelo método de Bradford, que se baseia na ligação do corante Coomassie Brilhante Blue G-250 às proteínas. Primeiramente a solução de Bradford é diluída na proporção de 1:5 em água ultrapura e armazenada em frasco âmbar. As amostras dos tecidos foram diluídas conforme a necessidade do experimento. Em um tubo de ensaio foram pipetados 20 µL da amostra em triplicata, adiciona-se 900 µL da solução de Bradford diluída a cada tubo, que são então colocados no vórtex e a solução é lida no espectrofotômetro a 595 nm. É criada uma curva padrão utilizando albumina bovina. As absorbâncias obtidas são usadas para calcular a equação da reta e a concentração de proteínas nas amostras é obtida a partir desta equação (BRADFORD, 1976).

As análises foram realizadas no Laboratório Integrado de Pesquisas Químicas (LiPEQ) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), sob orientação da professora Dr^a Valéria Dornelles Gindri Senhorin.

3.10.1. Peroxidação lipídica

A técnica de dosagem da TBARS realizada baseia-se na formação de um complexo rosa entre substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) e o malondialdeído (MDA), que é um indicador de peroxidação lipídica. Esta técnica segue o método de Buege e Aust (1978), em que a amostra é adicionada de ácido tricloroacético (TCA) 10% e centrifugada a 4250 rpm por 15 minutos, o sobrenadante é então pipetado e incubado com ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% a 100 °C por 10 minutos em banho maria, resultando na formação de um complexo rosa. Esta solução é então medida em um leitor de microplacas (Biolisa Reader, Bioclin[®], Belo Horizonte, Brasil) a 492 nm. O resultado foi expresso em nmol MDA/mg proteína (BUEGE; AUST, 1978).

3.10.2. Determinação de proteínas carboniladas

A dosagem de proteínas carboniladas foi o método utilizado para avaliar o dano oxidativo às proteínas. A técnica consiste na reação das proteínas carboniladas com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), formando complexos de hidrazona que podem ser quantificados espectrofotometricamente. Os tecidos homogeneizados são distribuídos em triplicata nos poços

da microplaca, onde em um poço de cada amostra é pipetado ácido clorídrico (HCL) 2,0 M (controle) e os outros dois recebem DNPH 10 mM. Após incubar em sala escura por 10 minutos, hidróxido de sódio (NaOH) 6,0 M é adicionado para neutralizar a reação, e a absorbância é lida a 450 nm no leitor de microplacas (Biolisa Reader, Bioclin[®], Belo Horizonte, Brasil). A concentração de proteínas carboniladas é calculada a partir da diferença de absorbância entre as amostras tratadas com DNPH e o controle, corrigida pela concentração de proteínas (COLOMBO; CLERICI; GARAVAGLIA; GIUSTARINI *et al.*, 2016). O resultado foi expresso como nmol de carbonil/mg proteína.

3.10.3. Catalase

Para determinação da atividade da catalase utilizou-se o tampão TFK 50 mM pH 7,0, previamente aquecido a 37 °C. A leitura da atividade da catalase foi realizada em espectrofotômetro, utilizando um programa específico para a enzima, através da medida da decaída da absorbância do H₂O₂ a 240 nm. Foram pipetados 25 µL da amostra, 1000 µL do tampão TFK e 25 µL de H₂O₂ (300 mM) em uma cubeta de quartzo. As leituras foram realizadas em duplicata, com intervalo de 15 segundos durante 1 minuto, sendo a diferença entre a primeira e a última leitura utilizada para o cálculo da atividade enzimática. Dos resultados foi subtraído o valor de um branco, que consistia em uma leitura de tampão sem amostra. A atividade da catalase foi avaliada com base no princípio da absorbância do H₂O₂ a 240 nm, expressos como µmol/min/mg proteína (NELSON; KIESOW, 1972).

3.10.4. Superóxido dismutase

A atividade da SOD foi medida utilizando um método modificado de Misra e Fridovich (1972). O tampão carbonato de sódio (57,7 mM) foi mantido a 30 °C em banho-maria. Em uma cubeta de vidro foram adicionados 980 µL de tampão carbonato e 11 µL de solução de bitartarato de adrenalina (60 mM), preparados em água ultrapura, em diferentes volumes da amostra (20 µL, 40 µL e 60 µL), a mistura foi agitada por 8 segundos antes de iniciar a medição da absorbância a 480 nm. A leitura do branco foi realizada com a mesma mistura sem a amostra.

Cada concentração foi analisada em duplicata, e a absorbância foi registrada a cada 10 segundos por 1 minuto. A atividade da SOD foi determinada comparando os valores da mudança de absorbância das amostras com os do branco, garantindo que esses valores fossem menores e diminuíssem com o aumento do volume da amostra. Todos os reagentes foram

mantidos no gelo durante o procedimento para preservar a estabilidade da enzima. O resultado foi expresso como UI SOD/mg proteína (MISRA; FRIDOVICH, 1972).

3.10.5. *Glutathione reduzida*

Para a dosagem de GSH foram preparados os seguintes reagentes: sal dissódico dihidratado (EDTA 0,02 M), ácido tricloroacético 50% (TCA), Tris 0,4 M, ácido 5,5 ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB 0,01 M) e tampão fosfato de potássio (PBS 0,05 M). O tecido foi homogeneizado com EDTA 0,02 M, seguido pela desproteinização com TCA 50% e centrifugação a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi separado e adicionado à solução de Tris 0,4 M e DTNB 0,01 M, sendo então realizada a leitura da absorbância a 412 nm. O resultado foi expresso em μmol GSH/mg proteína (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

3.10.6. *Glutathione-S-transferase*

A atividade da GST foi determinada pelo uso do reagente 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), que na presença de glutathione reduzida forma GS-dinitrobenzeno, lido pela absorbância a 340 nm. Para leitura, foram preparadas soluções de tampão fosfato de potássio (TFK) 20 mM (pH 6,5), NaCl 150 mM, GSH 10 mM e CDBN 20 mM. As amostras homogeneizadas foram incubadas com GSH em banho maria a 30 °C durante 40 segundos. A leitura da absorbância foi realizada imediatamente após a adição do CDBN, à 340 nm. A atividade enzimática foi expressa como μmol GS-DNB/min/mg proteína (HABIG; PABST; JAKOBY, 1974).

3.10.7. *Glutathione peroxidase*

A dosagem da atividade da GPx baseia-se na quantificação do consumo de NADPH, realizado através de leitura espectrofotométrica a 340 nm, medindo a absorbância ao longo de 1 minuto em intervalo de 10 segundos. Esta reação envolve a conversão de glutathione reduzida (GSH) em glutathione oxidada (GSSG) pela ação da GPx na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), seguida pela redução da GSSG de volta a GSH pela ação da glutathione redutase (GR) através do consumo de NADPH. O sistema para reação é preparado imediatamente antes do uso, e é composto por NADPH (0,0031 g em 20 mL de TFK 100 mM pH 7,0), GSH (0,00768

g em 20 mL de TFK), GR (10 μ L), azida (250 μ L 100 mM) e tampão TFK (100 mM pH 7,0) para completar 20 mL de solução. O H_2O_2 foi preparado por meio da diluição de 40 μ L de H_2O_2 em 49,960 mL de água ultrapura.

A reação é calculada através da variação da absorbância e do coeficiente de extinção molar do NADPH (6,22 mM^{-1}), sendo expressa em unidades de $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (PAGLIA; VALENTINE, 1967).

3.10.8. Ácido ascórbico

Para quantificar o ácido ascórbico (ASA) foi adicionada às amostras a solução de ácido tricloroacético (TCA) 5% e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi pipetado em tubos em triplicata e a eles foram adicionados água (H_2O), TCA 13,3% e 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) e incubados em banho maria a 37 °C por 3 horas. Na sequência foi adicionado ácido sulfúrico (H_2SO_4) 65% e realizada a leitura da absorbância a 520 nm. O resultado final foi expresso em $\mu\text{mol ASA/g}$ tecido (ROE, 1954).

3.11. Análise estatística

Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão, sendo submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, o teste de análise de variância de duas vias (ANOVA *two-way*), seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey para a comparação de mais de duas médias através do programa GraphPad Prism versão 8.0 (Windows GraphPad Prism Software, San Diego/CA, USA). Dados não paramétricos foram analisados pelo teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de Dunn. Os valores da evolução ponderal foram mostrados como média e os limites máximo e mínimo de 95% do intervalo de confiança para a média, e foram comparados ponto por ponto usando o teste de análise de variância de duas vias (ANOVA *two-way*) seguido do teste de múltiplas comparações Bonferroni para a comparação de mais de duas médias. O nível de significância mínima aceitável foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da obesidade e comportamento alimentar dos animais

Analisando a evolução ponderal das ratas, observou-se que houve um ganho de peso progressivo em ambos os grupos, C e O, porém observou-se que a partir da quinta semana de indução da obesidade, houve diferença significativa no peso corporal das ratas dos grupos obesos em relação ao grupo controle, sendo o peso significativamente maior no grupo das ratas obesas quando comparado às ratas controles (Figura 4).

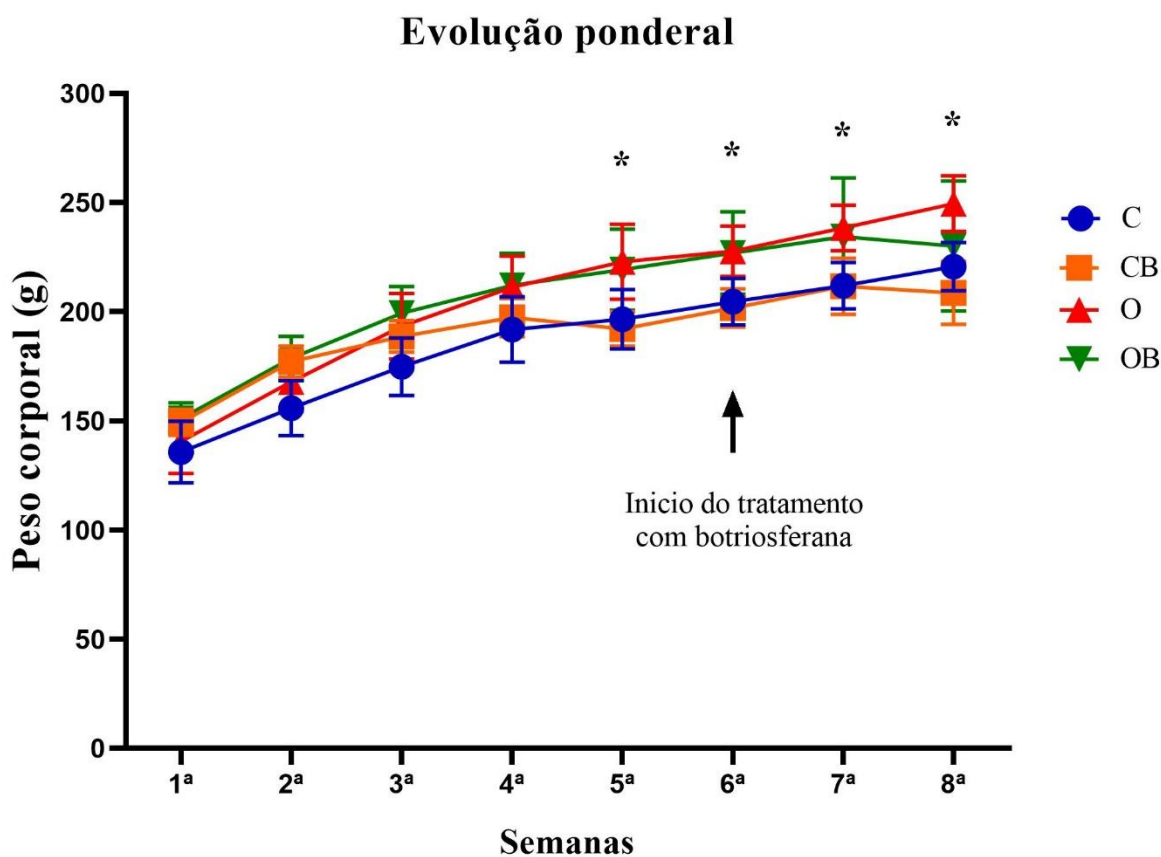


Figura 4. Evolução ponderal dos animais dos grupos: Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB) entre a 1ª e a 8ª semana do protocolo experimental. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias, seguida do teste de múltiplas comparações Bonferroni. * $p < 0,05$ vs C.

De acordo com a análise do consumo alimentar, de ração, água e calorias, dos grupos C, CB, O e OB durante as 8 semanas de experimento, observou-se que o consumo de ração foi significativamente menor nos animais O em relação aos animais C (Figura 5 A), por outro lado

não houve diferença estatística entre os grupos C e O em relação ao consumo de água e calorias (Figuras 6 A e 7 A, respectivamente). E a botriosferana não alterou esses parâmetros.

Avaliando o consumo de ração cumulativo, demonstrado em gramas, desde a primeira semana de experimento até o final da 8ª semana, observou-se um aumento progressivo no consumo de ração em todos os grupos, demonstrando que com o ganho de peso das ratas aumentou-se também o consumo de ração em gramas. No entanto, o grupo O apresentou um consumo cumulativo significativamente menor em comparação ao grupo C a partir da segunda semana de protocolo experimental ($p < 0,0001$) (Figura 5 B).

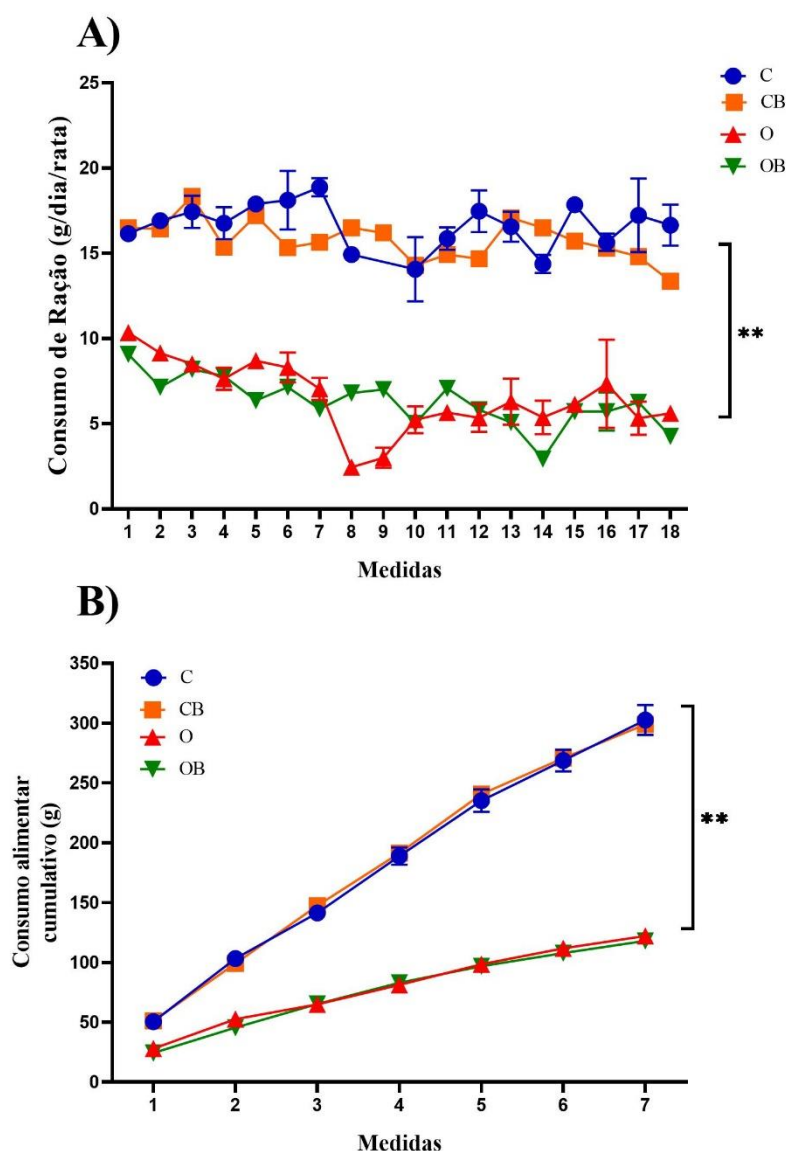


Figura 5. Comparação da ingestão alimentar (A) e do consumo de ração cumulativo em gramas (B) entre a 1ª e a 8ª semanas do protocolo experimental (A). Grupos: Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB). A análise estatística foi realizada utilizando o teste de ANOVA de duas vias, seguida do teste de múltiplas comparações Bonferroni. ** $p < 0,0001$ vs C.

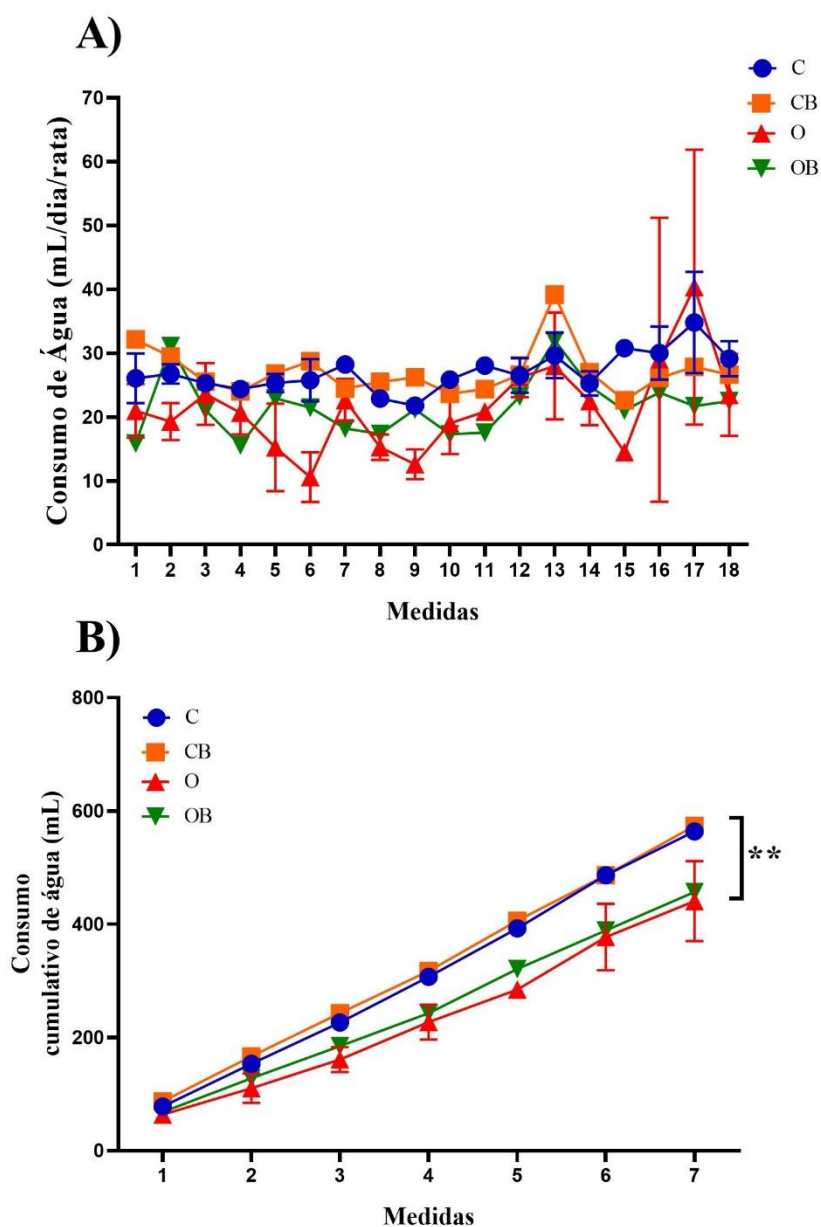


Figura 6. Comparação do consumo de água (A) e do consumo de água cumulativo em mL (B) entre a 1^a e a 8^a semana do protocolo experimental. Grupos: Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB). A análise estatística foi realizada utilizando o teste de ANOVA de duas vias, seguida do teste de múltiplas comparações Bonferroni. ** $p < 0,0001$ vs C.

Avaliando o consumo alimentar cumulativo em calorias desde a primeira semana de experimento até o final da 8^a semana, observou-se um aumento progressivo no consumo calórico de todos os grupos. No entanto, não houve diferença entre os grupos em relação ao consumo em calorias (Figura 7 B).

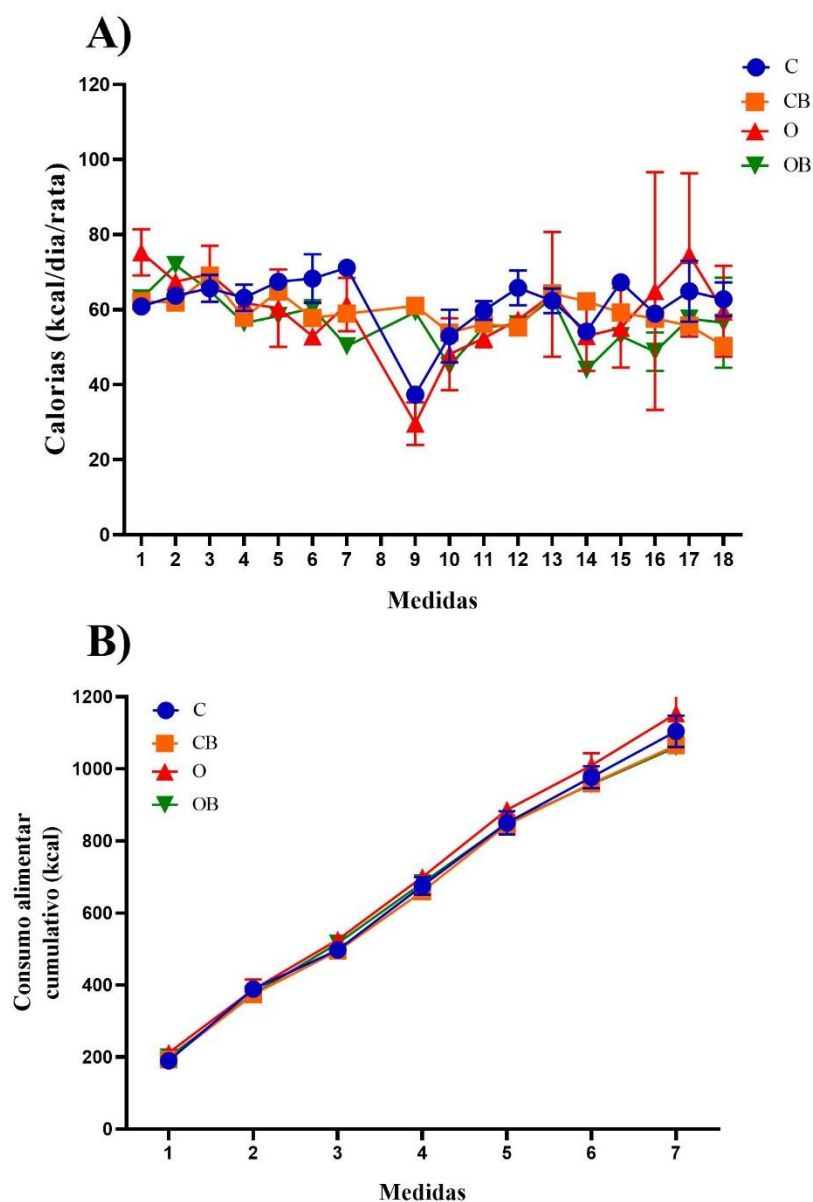


Figura 7. Comparação do consumo de ração em calorias (A) e alimentar cumulativo em calorias (kcal) (B) entre a 1ª e a 8ª semanas do protocolo experimental. Grupos: Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB). A análise estatística foi realizada utilizando o teste de ANOVA de duas vias, seguida do teste de múltiplas comparações Bonferroni.

Em relação aos dados murinométricos, os resultados mostram que o grupo O apresentou peso inicial, na 6ª semana, maior que o grupo C, indicando a eficácia do modelo de indução da obesidade. Ao final do tratamento, na 8ª semana, o grupo O continuou com peso significativamente maior que o grupo C, mas os grupos CB e OB apresentaram um peso corporal significativamente menor em relação aos seus respectivos grupos controle, C e O, demonstrando um significativo efeito da botriosferana na modulação do ganho de peso destes animais, promovendo uma relevante perda de peso (Tabela 2 e Figura 8).

O ganho de peso dos animais C e O foi semelhante entre eles, porém o ganho de peso dos animais CB e OB foi negativo, demonstrando que o tratamento com botriosferana levou a uma significativa perda de peso durante este período de 15 dias de tratamento (Tabela 2 e Figura 9).

O índice de adiposidade foi estatisticamente maior no grupo O em comparação ao grupo C. A massa de tecido adiposo periovariano, retroperitoneal e mesentérico foi significativamente maior no grupo O comparado ao grupo C. O tratamento com botriosferana foi eficaz em reduzir significativamente a quantidade de gordura retroperitoneal das ratas do grupo OB em relação ao grupo O (Tabela 2 e Figura 9). Vale salientar que embora não tenha sido observado diferença estatística entre os grupos, a botriosferana conseguiu reduzir a quantidade de tecido adiposo total tanto no grupo CB como no grupo OB em 17,5% e 22,7%, respectivamente (Tabela 3).

Não houve diferença estatística entre os grupos em relação ao peso do tecido muscular esquelético (Tabela 3).

O peso do fígado foi significativamente maior no grupo O em comparação ao grupo C, demonstrando que a obesidade está contribuindo para o aumento deste órgão. O tratamento com botriosferana não alterou este parâmetro (Tabela 3).

Parâmetros como, peso dos rins, adrenais, baço, cérebro e coração não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 2. Parâmetros biológicos dos animais.

	C n = 8	CB n = 8	O n = 8	OB n = 8
Peso inicial (g)^a	212,1 ± 11,3	213,3 ± 11,4	241,8 ± 17,8**	239,7 ± 15,01
Peso Final (g)^b	226,2 ± 13,9	208,5 ± 14,4	255,2 ± 22,4*	235,0 ± 21,6
Ganho de peso (g)	14,1 ± 3,73	- 4,71 ± 5,79**	13,5 ± 7,27	- 4,75 ± 16,1 [#]
Índice de adiposidade (x100)	3,22 ± 0,98	2,80 ± 0,40	7,65 ± 1,50**	6,48 ± 1,56
Eficiência alimentar (%)	19,3 ± 3,09	-8,07 ± 9,90	65,6 ± 19,6	-21,8 ± 74,4 [#]

Grupos: Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB). N=8 ratas por grupo. Resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. ^a Peso aferido na 6ª semana. ^b Peso aferido na 8ª semana. * $p < 0,05$ vs C; ** $p < 0,01$ vs C; # $p < 0,05$ vs O.

Tabela 3. Peso dos tecidos e consumo alimentar dos animais.

	C n = 8	CB n = 8	O n = 8	OB n = 8
Músculo sóleo (g)^a	0,090 (0,08;0,10)	0,090 (0,08;0,10)	0,100 (0,09;0,10)	0,105 (0,10;0,11)
Músculo EDL (g)^a	0,080 (0,08;0,09)	0,095 (0,06;0,10)	0,080 (0,07;0,09)	0,085 (0,08;0,09)
Fígado (g)	6,22 ± 0,46	6,36 ± 0,55	7,13 ± 0,64*	6,50 ± 0,50
Rins (g)	1,45 ± 0,11	1,40 ± 0,08	1,46 ± 0,10	1,36 ± 0,07
Adrenais (mg)	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,03	0,06 ± 0,01
Baço (g)	0,51 ± 0,07	0,52 ± 0,07	0,49 ± 0,05	0,50 ± 0,04
Cérebro (g)	1,71 ± 0,16	1,75 ± 0,04	1,71 ± 0,11	1,64 ± 0,12
Coração (g)	0,73 ± 0,09	0,73 ± 0,06	0,78 ± 0,07	0,80 ± 0,06
Consumo de ração (g/dia/rata)^b	16,8 ± 1,02	14,5 ± 0,02	5,92 ± 0,94**	5,42 ± 0,35**
Consumo água (mL/dia/rata)^b	31,1 ± 3,84	26,6 ± 0,03	29,3 ± 10,9	26,8 ± 6,36
Consumo de calorias (Kcal/dia/rata)^b	63,4 ± 3,84	55,0 ± 0,05	66,2 ± 20,6	57,5 ± 10,3

Grupos: Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB). N=8 ratas por grupo. Resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. ^a Analizado pelo teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de Dunn, sendo os valores expressos como mediana e interquartil (25% e 75%). ^b Média do consumo entre a 6^a e 8^a semanas. * $p < 0,05$ vs C; ** $p < 0,01$ vs C; # $p < 0,05$ vs O.

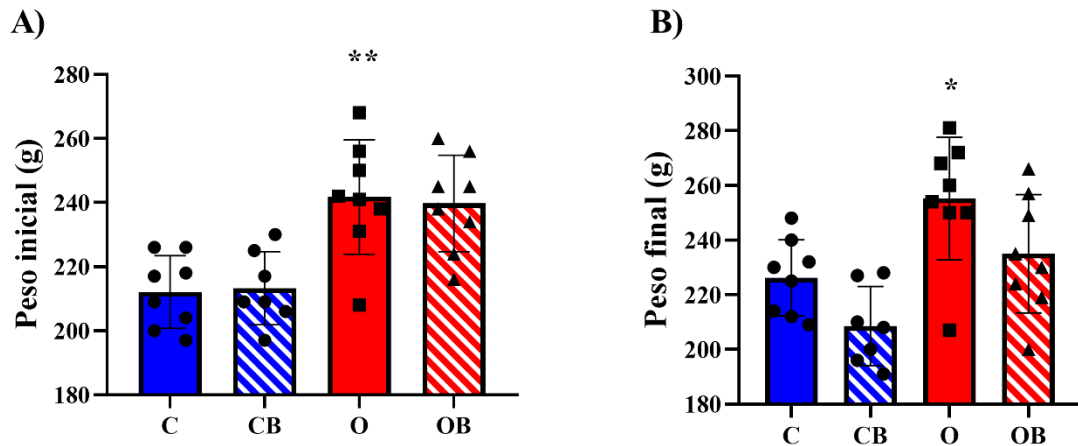


Figura 8. Peso inicial (6ª semana) (A) e peso final (8ª semana) (B) dos animais dos grupos Controle (C) Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias, seguida do teste de múltiplas comparações de Tukey. ** $p < 0,01$ vs C; * $p < 0,05$ vs C.

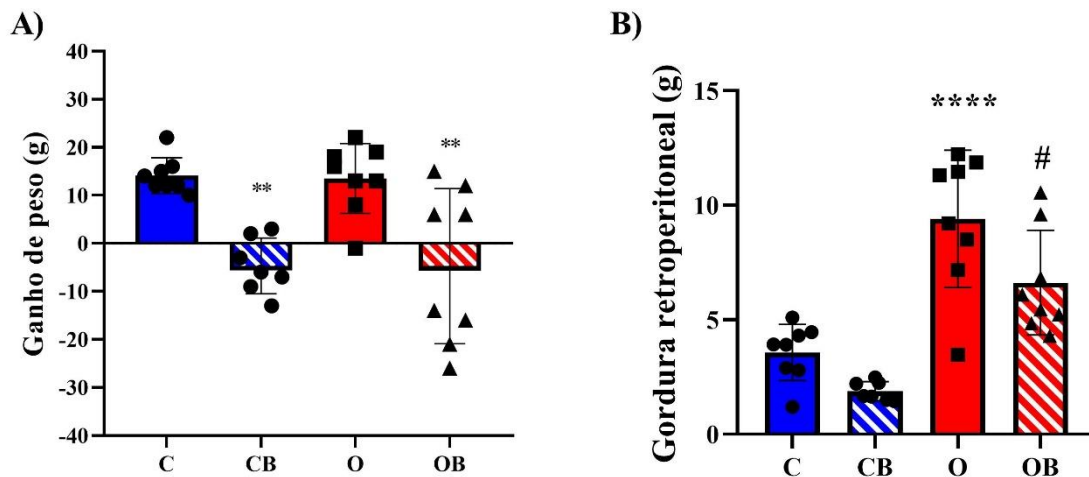


Figura 9. Ganho de peso entre 6ª e 8ª semana (A), e gordura retroperitoneal (B) dos animais dos grupos Controle (C) Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias, seguida do teste de múltiplas comparações de Tukey. **** $p < 0,001$ vs C; ** $p < 0,05$ vs C.

4.2. Teste do labirinto em cruz elevado

No teste comportamental do labirinto em cruz elevado, utilizado para avaliar o comportamento relacionado à ansiedade, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos C, CB, O e OB. Esses resultados indicam que tanto a obesidade quanto o tratamento com botriosferana não influenciaram significativamente os parâmetros associados à ansiedade das ratas, conforme demonstrado pelo tempo passado nos braços abertos e fechados do labirinto. É possível que o modelo de obesidade utilizado não tenha influenciado o comportamento ansioso das ratas como era esperado, ou que o número reduzido dos animais avaliados tenha limitado a detecção de diferenças significativas entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 4. Parâmetros analisados no teste do labirinto em cruz elevado.

	C n = 8	CB n = 8	O n = 8	OB n = 8
Frequência em braço aberto (%)	32,0 ± 25,5	7,07 ± 10,4	13,4 ± 14,5	20,3 ± 18,0
Tempo em braço aberto (%)	8,88 ± 10,7	0,83 ± 1,32	3,71 ± 5,43	12,1 ± 12,7
Mergulhos^a	2,00 (2,0;10,0)	2,00 (0,0;2,0)	1,00 (0,0;4,5)	1,00 (0,25;7,5)
Espreitas^a	4,00 (3,0;8,0)	3,00 (1,0;3,0)	6,00 (1,5;7,0)	2,50 (0,0;5,0)
Rearings	18,9 ± 4,90	18,4 ± 10,7	19,3 ± 8,06	19,2 ± 5,94
Índice de ansiedade	0,79 ± 0,15	0,97 ± 0,44	0,90 ± 0,12	0,83 ± 0,15

Grupos: Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB). Resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias, seguida do teste de múltiplas comparações de Tukey. ^aAnalisado pelo teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de Dunn, sendo os valores expressos como mediana e interquartil (25% e 75%).

4.3. Perfil glicêmico, lipídico e hematológico

Os resultados do teste de sensibilidade à insulina intraperitoneal (IPITT), apresentam que a curva glicêmica (gráfico A) obteve uma redução da glicemia ao longo do tempo em todos os grupos, indicando uma resposta ao teste de sensibilidade à insulina. Porém, a taxa de redução foi mais acentuada nos grupos C e CB quando comparada aos grupos O e OB (Figura 10A).

A constante de decaimento da glicose (KiTT), figura 10B, mostra que os grupos C e CB possuem valores de KiTT significativamente maiores do que o grupo O, sugerindo uma melhor

sensibilidade à insulina nesses grupos. No grupo O houve uma redução significativa na sensibilidade à insulina comparado ao grupo C. O tratamento com botriosferana não corrigiu a sensibilidade à insulina no grupo OB, nem melhorou a sensibilidade à insulina no grupo CB. Tais resultados sugerem que a obesidade reduziu significativamente a sensibilidade à insulina, e que o tratamento com botriosferana não foi capaz de corrigir este parâmetro.

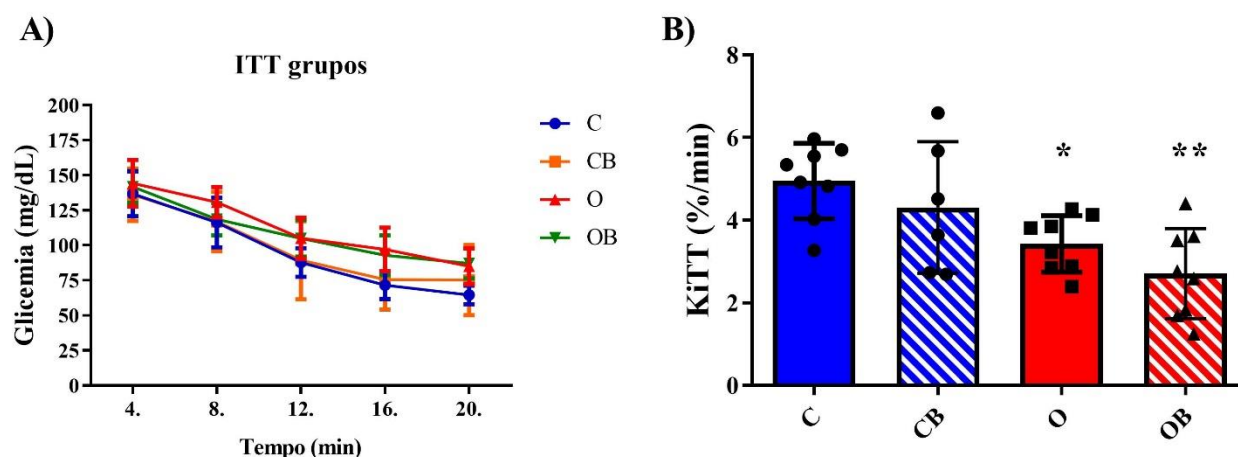


Figura 10. Curva glicêmica (A) e constante de decaimento da glicose (KiTT) (B), obtidas por meio do teste de sensibilidade à insulina intraperitoneal (IPITT) dos grupos Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB). Resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias, seguida do teste de múltiplas comparações de Tukey. * $p < 0,05$ vs C; ** $p < 0,01$ vs CB.

De acordo com os resultados do teste de tolerância à glicose oral (OGTT) a área sob a curva (AUC) foi significativamente maior no grupo O em relação ao grupo C, indicando uma intolerância à glicose. Porém, o tratamento com botriosferana no grupo OB levou a uma redução significativa da AUC comparado ao grupo O, demonstrando uma melhora na tolerância à glicose com o tratamento com esta beta-glucana. Estes resultados demonstram que a obesidade comprometeu significativamente a tolerância à glicose. Entretanto o tratamento com botriosferana foi eficaz em corrigir este parâmetro no grupo OB (Figura 11).

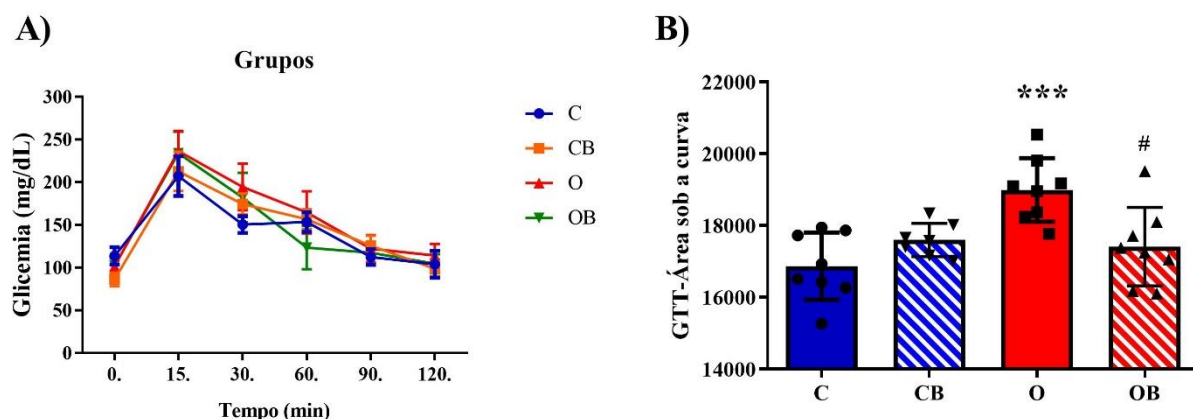


Figura 11. Curva glicêmica (A) e área sobre a curva (B), obtidas por meio do teste de tolerância à glicose oral (OGTT) dos grupos Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB). Resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias, seguida do teste de múltiplas comparações de Tukey. *** $p < 0,001$ vs C; # $p < 0,05$ vs O.

Segundo os resultados dos parâmetros bioquímicos o grupo obeso apresentou níveis significativamente elevados de colesterol total, triglicérides, colesterol LDL e VLDL em comparação ao grupo controle. No entanto, esses níveis foram reduzidos de maneira significativa no grupo tratado com botriosferana, demonstrando um efeito positivo do tratamento. Além disso, o índice Tyg, um indicador de resistência à insulina, foi maior no grupo obeso em relação ao controle, mas foi reduzido após o tratamento com botriosferana. Observou-se também um aumento significativo nos níveis de creatinina no grupo controle botriosferana em comparação com o grupo controle, enquanto nos grupos obesos não houve diferença significativa. As concentrações de ALT e AST não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 5. Parâmetros bioquímicos.

	C n = 8	CB n = 8	O n = 8	OB n = 8
Glicemia (mg/dL)	113,8 ± 9,57	103,1 ± 17,7	102,8 ± 8,74	103,8 ± 10,7
Colesterol total (mg/dL)	76,0 ± 5,28	69,8 ± 5,29	104,8 ± 22,1**	77,2 ± 11,8 [#]
Triglicérides (mg/dL)	50,9 ± 6,35	43,9 ± 5,30	71,8 ± 14,9**	56,5 ± 9,72 [#]
Colesterol HDL (mg/dL)	29,8 ± 10,4	36,5 ± 9,77	23,0 ± 10,3	30,2 ± 11,6
Colesterol LDL (mg/dL)	34,7 ± 4,41	27,0 ± 11,2	63,3 ± 14,6**	41,7 ± 17,8 [#]
Colesterol VLDL (mg/dL)	10,1 ± 1,27	8,78 ± 1,06	14,37 ± 2,98**	11,6 ± 2,02 [#]
Creatinina (mg/dL)	0,63 ± 0,03	0,84 ± 0,11**	0,66 ± 0,02	0,70 ± 0,06 ^{&}
ALT (mg/dL)	43,2 ± 15,1	34,6 ± 6,3	37,9 ± 10,1	46,3 ± 7,98
AST (mg/dL)	99,1 ± 13,3	111,9 ± 48,0	77,0 ± 12,1	98,2 ± 18,3
Índice Tyg	8,03 ± 0,15	7,64 ± 0,20	8,26 ± 0,25*	7,98 ± 0,23 [#]

Grupos: Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB). Resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. ALT = Alanina aminotransferase. AST = Aspartato aminotransferase. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias, seguida do teste de múltiplas comparações de Tukey. * $p < 0,05$ vs C; ** $p < 0,01$ vs C; & $p < 0,05$ vs CB; # $p < 0,05$ vs O.

Por meio da análise do hemograma, observou-se que todos os valores estavam dentro dos valores de referência para ratas *Wistar*, não sendo observado diferença estatística entre os grupos (Tabela 5). Isso sugere que, durante o experimento, os animais se mantiveram saudáveis, não apresentando sinais de anemia, infecção ou outras alterações, indicando que a indução da obesidade ou o tratamento com a botriosferana não causaram alterações nestes parâmetros hematológicos.

Tabela 6. Parâmetros hematológicos dos animais.

	C n = 8	CB n = 8	O n = 8	OB n = 8
Eritrócitos (milh./mm ³)	7,18 ± 029	7,11 ± 0,48	7,30 ± 0,17	7,12 ± 0,46
Hemoglobina (g/dL)	13,48 ± 0,31	12,96 ± 0,76	13,45 ± 0,20	12,96 ± 0,63
Hematócrito (%)	39,84 ± 1,52	39,83 ± 3,07	40,09 ± 0,65	38,62 ± 2,49
VCM^a (fL)	55 (54;55)	56 (54;57)	55 (54;55,7)	54 (54;55)
CHCM (g/dL)	33,85 ± 0,70	32,58 ± 0,80	33,38 ± 2,30	33,60 ± 0,86
Leucócitos totais (/mm ³)	5040 ± 1250	4090 ± 808	4955 ± 1412	5396 ± 1385
Neutrófilos (/mm ³)	1004 ± 199	859 ± 261	1204 ± 392	1129 ± 408
Linfócitos (/mm ³)	3351 ± 1439	2828 ± 692	3337 ± 984	3738 ± 968
Monócitos (/mm ³)	380 ± 321	372 ± 245	371 ± 341	466 ± 225
Plaquetas (/mm ³)	956,9 ± 75,2	809,1 ± 305	885,4 ± 191	911,7 ± 34,5

Grupos: Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB). VCM = volume corpuscular médio. CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média. Resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias, seguida do teste de múltiplas comparações de Tukey. ^aAnalizado pelo teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de Dunn, sendo os valores expressos como mediana e interquartil (25% e 75%). Valores de referência (mínimo e máximo) baseados nos dados provenientes do biotério da Universidade Tiradentes.

4.4. Avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos

A análise da produção de ânion superóxido pelos neutrófilos não apresentou diferença estatística entre os grupos controle, obeso, e obeso tratado com botriosferana. Este resultado indica que, a obesidade não alterou substancialmente o metabolismo oxidativo dos neutrófilos em relação à produção de ânion superóxido. Uma possível explicação para este resultado seria a capacidade da botriosferana modular a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em outros tecidos e células, mas não necessariamente nos neutrófilos. Ainda, é possível que o modelo de tratamento utilizado tenha levado a uma adaptação nos neutrófilos, levando-os a serem menos reativos ao estímulo para produção de ânion superóxido. Tais fatores podem indicar que o impacto da botriosferana no metabolismo oxidativo de neutrófilos possa ser

limitado. Vale ressaltar que o estímulo com botriosferana foi feito só *in vivo*, durante os 15 dias de tratamento dos animais não sendo as células expostas novamente à botriosferana durante o teste *in vitro*.

4.5. Análises bioquímicas dos marcadores de estresse oxidativo

4.5.1. Fígado

Os níveis de TBARS, foi significativamente maior no grupo O em comparação ao grupo C, sugerindo um aumento na peroxidação lipídica devido à obesidade. No entanto, o tratamento com botriosferana foi capaz de corrigir este parâmetro, reduzindo significativamente os níveis de TBARS no grupo OB em comparação ao grupo O. O nível de carbonil, dado que indica danos oxidativos às proteínas, foi maior no grupo obeso (41,7%) em comparação com o grupo C, porém não foi diferente estatisticamente. No entanto, a botriosferana foi eficaz em reduzir significativamente os níveis de proteínas carboniladas no grupo OB em relação ao grupo O ($p < 0,05$).

A atividade da GPx foi significativamente menor no grupo OB em comparação com o grupo O, sugerindo que a botriosferana possa ter modulado a atividade desta enzima.

Não houve diferença estatística entre os grupos para as análises da SOD, CAT, GST, GSH e ASA (Tabela 6).

Tabela 7. Parâmetros bioquímicos do estresse oxidativo no fígado.

	C n = 8	CB n = 8	O n = 8	OB n = 8
TBARS (nmol MDA/mg proteína)	0,138 ± 0,04	0,159 ± 0,07	0,287 ± 0,12**	0,131 ± 0,03 [#]
Carbonil (nmol carbonil/mg proteína)	4,87 ± 1,73	4,82 ± 3,27	6,90 ± 2,06	3,51 ± 1,81 [#]
SOD (UI SOD/mg proteína)	5,49 ± 1,55	5,60 ± 1,52	6,41 ± 1,60	5,80 ± 1,71
CAT^a (μmol/min/mg proteína)	176,4 (169,4;297,7)	217,8 (177,3;274,1)	242,3 (196,8;323,4)	210,6 (196,2;260,5)
GPx (μmol/min/mg proteína)	9,83 ± 2,31	7,43 ± 2,99	9,02 ± 3,59	4,66 ± 1,77 [#]
GST (μmol GS-DNB/min/mg proteína)	439,8 ± 92,4	305,9 ± 129,7	468,7 ± 183,0	399,1 ± 186,3
GSH (μmol GSH/mg proteína)	62,6 ± 25,4	54,0 ± 28,0	63,7 ± 21,8	55,1 ± 21,7
ASA (μmol ASA/g tecido)	1,17 ± 0,69	1,29 ± 0,95	0,87 ± 0,59	1,37 ± 0,51

Grupos: Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB). Resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias, seguida do teste de múltiplas comparações de Tukey. ^aAnalisado pelo teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de Dunn, sendo os valores expressos como mediana e interquartil (25% e 75%). * $p < 0,05$ vs C; ** $p < 0,01$ vs C; # $p < 0,05$ vs O.

4.5.2. Músculo

A análise dos parâmetros bioquímicos do estresse oxidativo no músculo demonstra que a botriosferana foi eficaz ao reduzir significativamente os níveis de TBARS no grupo CB em comparação ao grupo C, além de promover uma queda de 24,6% no grupo OB em relação ao grupo O. Em relação às proteínas carboniladas, o grupo CB apresentou um aumento significativo comparado ao grupo C. A análise da catalase foi significativamente maior no grupo O em comparação ao grupo C, e o grupo CB também apresentou um aumento significativo em relação ao grupo C. Tanto a atividade da GST quanto a da GPx não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Tabela 7).

Tabela 8. Parâmetros bioquímicos do estresse oxidativo no músculo.

	C n = 8	CB n = 8	O n = 8	OB n = 8
TBARS (nmol MDA/mg proteína)	4,55 ± 0,98	2,89 ± 1,06*	4,92 ± 1,03	3,71 ± 0,44
Carbonil (nmol carbonil/mg proteína)	172,7 ± 8,22	212,8 ± 49,9*	191,1 ± 19,2	181,6 ± 18,0
GST (μmol GS-DNB/min/mg proteína)	1059 ± 93,1	1194 ± 249,9	1155 ± 168,6	1100 ± 101,0
GPx (μmol/min/mg proteína)	23,1 ± 4,57	18,6 ± 1,86	20,1 ± 4,41	21,7 ± 5,99
CAT (μmol/min/mg proteína)	27,1 ± 4,43	39,4 ± 6,33**	42,7 ± 3,93**	38,3 ± 9,17

Grupos: Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB). Resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias, seguida do teste de múltiplas comparações de Tukey. ^aAnalisado pelo teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de Dunn, sendo os valores expressos como mediana e interquartil (25% e 75%). * $p < 0,05$ vs C; ** $p < 0,01$ vs C; # $p < 0,05$ vs O.

4.5.3. Tecido adiposo

Os níveis de TBARS apresentaram uma queda significativa no grupo O quando comparado ao grupo C. Não houve diferença significativa nos níveis de carbonilação de proteínas entre os grupos. A atividade da catalase foi significativamente menor no grupo CB em comparação ao grupo C, e apresentou uma queda de 36,3% no grupo OB quando comparado ao grupo O. A atividade da GST foi significativamente maior no grupo O em comparação ao grupo C, embora não tenha havido diferença estatística significativa, o grupo OB apresentou uma queda de 27,5% na atividade da GST em comparação ao grupo O. Os níveis de ácido ascórbico foram significativamente maiores nos animais tratados com botriosferana (CB e OB), quando comparado aos grupos C e O, respectivamente. A atividade da GPx foi significativamente maior no grupo CB quando comparado ao grupo C, enquanto que os grupos obesos não apresentaram diferença significativa. Não foi observada diferença estatística na atividade da SOD e da GSH entre os grupos (Tabela 8).

Tabela 9. Parâmetros bioquímicos do estresse oxidativo no tecido adiposo.

	C n = 8	CB n = 8	O n = 8	OB n = 8
TBARS (nmol MDA/mg proteína)	1,92 ± 1,05	1,18 ± 0,86	0,68 ± 0,30*	0,67 ± 0,43
Carbonil (nmol carbonil/mg proteína)	255,3 ± 41,6	213,4 ± 15,8	229,8 ± 73,3	238,2 ± 48,3
SOD^a (UI SOD/mg proteína)	74,0 (46,0;83,2)	50,2 (31,5;79,9)	57,6 (31,0;98,2)	58,2 (46,0;80,1)
CAT (μmol/min/mg proteína)	54,1 ± 14,6	30,8 ± 8,18*	44,9 ± 17,5	28,6 ± 12,8
GPx (μmol/min/mg proteína)	10,34 ± 5,55	4,54 ± 2,99*	7,87 ± 3,56	5,76 ± 3,20
GST (μmol GS-DNB/min/mg proteína)	201,3 ± 27,6	252,4 ± 82,3	325,9 ± 47,1**	237,1 ± 71,9
GSH^a (μmol GSH/mg proteína)	1252 (515,5;1819)	547,8 (457,7;1104)	1175 (594,8;1721)	583,6 (347,6;1743)
ASA (μmol ASA/g tecido)	0,071 ± 0,04	0,134 ± 0,03*	0,025 ± 0,02	0,088 ± 0,03 [#]

Grupos: Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB). Resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias, seguida do teste de múltiplas comparações de Tukey. ^aAnalizado pelo teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de Dunn, sendo os valores expressos como mediana e interquartil (25% e 75%). * $p < 0,05$ vs C; ** $p < 0,01$ vs C; [#] $p < 0,05$ vs O

4.5.4. Rins

A análise dos níveis de TBARS nos rins demonstrou uma redução significativa no grupo OB quando comparado ao grupo O, sugerindo uma ação da botriosferana sobre este parâmetro. A carbonilação de proteínas também diminuiu significativamente no grupo OB em comparação ao grupo O, indicando uma redução no dano oxidativo às proteínas. A atividade da GPx foi significativamente maior no grupo OB em comparação ao grupo O, e apesar de não ter demonstrado diferença estatística significativa, os níveis de GPx no grupo CB foram 45,8% maiores quando comparados ao grupo C. Não houve diferença estatística significativa na atividade da SOD, CAT, GSH, GST, e ASA, embora os níveis de GST nos grupos tratados com botriosferana tenham apresentado queda (Tabela 9).

Tabela 10. Parâmetros bioquímicos do estresse oxidativo nos rins.

	C n = 8	CB n = 8	O n = 8	OB n = 8
TBARS^a (nmol MDA/mg proteína)	2,85 (1,54;3,64)	2,15 (1,09;3,31)	2,70 (2,56;4,35)	1,34 [#] (0,91;1,75)
Carbonil (nmol carbonil/mg proteína)	221,8 ± 13,8	207,3 ± 42,5	218,9 ± 30,1	178,3 ± 26,1 [#]
SOD (UI SOD/mg proteína)	87,55 ± 13,1	79,6 ± 7,07	88,7 ± 10,3	78,1 ± 15,4
CAT (µmol/min/mg proteína)	150,9 ± 25,8	150,9 ± 19,8	154,0 ± 10,5	151,3 ± 10,2
GPx (µmol/min/mg proteína)	6,35 ± 2,21	9,26 ± 3,21	6,38 ± 2,55	10,2 ± 1,86 [#]
GST (µmol GS-DNB/min/mg proteína)	1975 ± 176	1730 ± 313	1940 ± 343	1617 ± 486
GSH (µmol GSH/mg proteína)	264,4 ± 103	202,6 ± 52,0	224,5 ± 89,2	201,2 ± 61,26
ASA (µmol ASA/g tecido)	1,48 ± 0,25	1,58 ± 0,24	1,80 ± 0,34	1,96 ± 0,31

Grupos: Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB). Resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias, seguida do teste de múltiplas comparações de Tukey. ^aAnalizado pelo teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de Dunn, sendo os valores expressos como mediana e interquartil (25% e 75%). * $p < 0,05$ vs C; ** $p < 0,01$ vs C; # $p < 0,05$ vs O.

4.5.5. Coração

Não houve diferença estatística em nenhum marcador pró ou antioxidante avaliado no coração dos animais (Tabela 10).

Tabela 11. Parâmetros bioquímicos do estresse oxidativo no coração.

	C n = 8	CB n = 8	O n = 8	OB n = 8
TBARS (nmol MDA/mg proteína)	0,47 ± 0,29	0,31 ± 0,19	0,66 ± 0,62	0,42 ± 0,14
Carbonil (nmol carbonil/mg proteína)	219,2 ± 32,0	194,0 ± 40,3	226,5 ± 16,1	204,1 ± 15,8
SOD (UI SOD/mg proteína)	90,7 ± 15,8	90,0 ± 15,1	100,2 ± 20,0	96,4 ± 47,5
CAT (μmol/min/mg proteína)	250,3 ± 85,1	199,9 ± 36,9	285,1 ± 11,8	195,5 ± 37,4
GPx (μmol/min/mg proteína)	6,70 ± 0,96	6,80 ± 2,49	8,06 ± 2,39	7,61 ± 2,00
GST (μmol GS-DNB/min/mg proteína)	44,0 ± 7,75	47,4 ± 9,00	47,2 ± 3,56	51,5 ± 4,25
GSH^a (μmol GSH/mg proteína)	87,8 (82,5;101,8)	106,9 (82,1;115,2)	110,6 (98,36;118,1)	112,1 (103,3;131,5)
ASA (μmol ASA/g tecido)	2,49 ± 0,51	2,61 ± 0,65	2,44 ± 0,77	2,58 ± 0,45

Grupos: Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB). Resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias, seguida do teste de múltiplas comparações de Tukey. ^aAnalizado pelo teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de Dunn, sendo os valores expressos como mediana e interquartil (25% e 75%). * $p < 0,05$ vs C; ** $p < 0,01$ vs C; # $p < 0,05$ vs O.

4.5.6. Cérebro

Embora não tenha havido diferença estatística em alguns dos marcadores pró ou antioxidantes avaliados no cérebro dos animais, observou-se uma diferença significativa nos níveis de ácido ascórbico no grupo CB em relação ao grupo C, sendo este valor significativamente maior no grupo tratado com botriosferana (Tabela 11).

Tabela 12. Parâmetros bioquímicos do estresse oxidativo no cérebro.

	C n = 8	CB n = 8	O n = 8	OB n = 8
TBARS (nmol MDA/mg proteína)	5,48 ± 6,2	3,39 ± 4,3	4,21 ± 4,8	2,59 ± 2,25
Carbonil ^a (nmol carbonil/mg proteína)	94,39 (34,59;395,7)	61,83 (27,81;96,05)	70,35 (30,74;155,3)	55,98 (32,64;393,4)
SOD ^a (UI SOD/mg proteína)	65,8 (35,2;148,1)	30,3 (24,5;76,5)	34,3 (24,3;141,5)	41,08 (33,1;123,4)
CAT (μmol/min/mg proteína)	57,8 ± 21,5	44,4 ± 44,0	71,9 ± 58,8	66,5 ± 46,8
GPx ^a (μmol/min/mg proteína)	5,66 (1,50;9,23)	1,88 (1,04;3,98)	1,61 (1,34;6,35)	2,33 (1,00;3,08)
GST ^a (μmol GS-DNB/min/mg proteína)	888,1 (293,3;1855)	271,8 (246,9;619,4)	411,1 (244,4;1638)	505,4 (275,5;1074)
GSH ^a (μmol GSH/mg proteína)	140,0 (52,4;209,8)	56,18 (44,5;68,9)	70,9 (45,6;170,7)	52,2 (35,3;122,5)
ASA (μmol ASA/g tecido)	3,70 ± 0,88	4,90 ± 0,45*	4,08 ± 0,52	4,12 ± 0,94

Grupos: Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB). Resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias, seguida do teste de múltiplas comparações de Tukey. ^aAnalizado pelo teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de Dunn, sendo os valores expressos como mediana e interquartil (25% e 75%). * $p < 0,05$ vs C; ** $p < 0,01$ vs C; # $p < 0,05$ vs O.

4.5.7. Baço

Não houve diferença estatística em nenhum marcador pró ou antioxidante avaliado no baço dos animais (Tabela 12).

Tabela 13. Parâmetros bioquímicos do estresse oxidativo no baço.

	C n = 8	CB n = 8	O n = 8	OB n = 8
TBARS (nmol MDA/mg proteína)	0,207 ± 0,13	0,261 ± 0,18	0,237 ± 0,24	0,255 ± 0,15
Carbonil (nmol carbonil/mg proteína)	7,66 ± 2,0	7,07 ± 1,75	7,3 ± 2,69	7,00 ± 1,58
SOD (UI SOD/mg proteína)	13,1 ± 1,78	14,8 ± 5,86	17,0 ± 5,18	15,9 ± 3,59
CAT (µmol/min/mg proteína)	88,7 ± 33,8	72,0 ± 27,4	86,5 ± 33,7	72,9 ± 15,1
GPx^a (µmol/min/mg proteína)	2,50 (1,32;3,71)	2,42 (1,72;3,09)	1,89 (1,36;4,33)	2,62 (1,13;2,80)
GST^a (µmol GS-DNB/min/mg proteína)	94,35 (94,3;118,5)	138,0 (111,2;362,4)	122,9 (97,6;313,2)	143,1 (106,2;195,8)
GSH (µmol GSH/mg proteína)	32,5 ± 15,7	56,7 ± 31,8	26,4 ± 12,0	36,6 ± 13,0
ASA (µmol ASA/g tecido)	2,03 ± 1,50	2,38 ± 1,36	2,44 ± 1,18	2,43 ± 0,96

Grupos: Controle (C), Controle Botriosferana (CB), Obeso (O) e Obeso Botriosferana (OB). Resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias, seguida do teste de múltiplas comparações de Tukey. ^aAnalizado pelo teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de Dunn, sendo os valores expressos como mediana e interquartil (25% e 75%). * $p < 0,05$ vs C; ** $p < 0,01$ vs C; # $p < 0,05$ vs O.

5. DISCUSSÃO

De acordo com os dados analisados, observou-se que os animais obesos apresentaram maior acúmulo de tecido adiposo visceral sem alteração da massa muscular, também apresentaram hepatomegalia, resistência à insulina, intolerância à glicose, dislipidemia e estresse oxidativo, demonstrando que o modelo de obesidade induzido por dieta rica em carboidratos e lipídeos foi eficaz. Esses achados refletem as características clássicas da obesidade e suas complicações, confirmando que o modelo experimental utilizado reproduziu corretamente os distúrbios metabólicos associados à obesidade em humanos (LITWIN; KUŁAGA, 2021). Ainda, com estes dados foi possível observar que a dieta rica em carboidratos e lipídios desencadeou com sucesso a SM em ratas, sendo caracterizada pela obesidade, resistência à insulina e dislipidemia (ZHANG; KONG; JING; ZHOU *et al.*, 2022).

Sabe-se que na obesidade, o acúmulo de tecido adiposo, especialmente o visceral, é um dos principais fatores que contribuem para o desenvolvimento de comorbidades, como resistência à insulina, diabetes *mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares e esteatose hepática. O tecido adiposo, além de atuar como reservatório de energia, atua como órgão endócrino, liberando adipocinas e citocinas pró-inflamatórias que influenciam o estado inflamatório crônico de baixo grau típico da obesidade. Esse estado inflamatório contribui para o aumento do estresse oxidativo, que se caracteriza pela produção excessiva de EROs e pela redução da capacidade antioxidante, o que pode causar danos celulares e ao desenvolvimento de complicações metabólicas (GOOSSENS, 2017; MANNA; JAIN, 2015), o que de fato foi observado no presente trabalho em ratas obesas induzidas pela dieta rica em lipídeos e carboidratos.

O estudo de Silva et al. (2018) demonstrou que animais machos, induzidos por uma dieta rica em gordura e açúcar, apresentaram um aumento significativo tanto no peso corporal quanto no índice de adiposidade e no acúmulo de tecido adiposo em comparação com animais controle machos. Da mesma forma, Comiran et al. (2020) corroboraram esses resultados em estudos com ratos *Wistar* submetidos a uma dieta semelhante à utilizada neste trabalho. Ainda, Feriani et al. (2021) em um estudo utilizando modelo animal com uma dieta hiperlipídica demonstrou que os animais do grupo que consumiu esta dieta apresentaram um peso significativamente maior em relação ao grupo controle, assim como alterações nos parâmetros e marcadores do perfil lipídico plasmático.

No presente trabalho, apesar de não ter sido observado um aumento significativo no consumo calórico, os animais ainda apresentaram um ganho significativo de peso corporal, um

aumento do índice de adiposidade e do tecido adiposo (representado pelas gorduras periovariana, retroperitoneal e mesentérica). Sugerindo que a composição da dieta, e não apenas a quantidade de calorias ingeridas, desempenha um papel importante na indução da obesidade e no acúmulo de gordura corporal. Ainda, o resultado da eficiência alimentar suporta este achado demonstrando que mesmo com o menor consumo de alimentos as ratas obesas apresentaram ganho de peso e maior acúmulo de tecido adiposo.

Na obesidade, o aumento dos depósitos de gordura ocorre devido à hiperplasia e/ou hipertrofia dos adipócitos, o que resulta em um tecido adiposo disfuncional desencadeando um estado inflamatório crônico de baixo grau (KAWAI; AUTIERI; SCALIA, 2021; SUN; KUSMINSKI; SCHERER, 2011). Essa inflamação do tecido adiposo leva a uma desregulação da produção de citocinas como a leptina. A leptina atua no controle do apetite, reduzindo a ingestão alimentar e aumentando a saciedade. Dessa forma, a menor ingestão alimentar observada no grupo obeso pode estar relacionada ao aumento dos níveis séricos de leptina, frequentemente encontrado em animais obesos (DE SIBIO; LUVIZOTTO; OLIMPIO; CORREIA *et al.*, 2013), ainda este menor consumo alimentar em gramas pode estar relacionado com o fato da dieta rica em lipídeos e carboidratos ser hipercalórica, assim um menor consumo em quantidade já é o necessário para manter o mesmo aporte calórico aos animais do grupo obeso, como foi observado no resultado do consumo alimentar cumulativo em calorias (Figura 8 B).

Ao analisar os efeitos da botriosferana, observou-se que esta beta-glucana apresentou um importante efeito antiobesogênico. O tratamento com botriosferana resultou em uma redução significativa do peso corporal e na redução do tecido adiposo em ratas obesas, especificamente, tecido adiposo retroperitoneal, o que contribuiu para a melhora de vários parâmetros metabólicos nestes animais. Ainda, a redução significativa no tecido adiposo retroperitoneal no grupo OB sugere que a botriosferana pode atenuar a deposição de gordura visceral, que é um dos principais fatores de risco associados à obesidade, e isso refletiu na melhora da tolerância à glicose, na melhora da sensibilidade à insulina e na correção da dislipidemia por esta beta-glucana. Beta-glucanas, como a botriosferana, podem atuar na redução do acúmulo de tecido adiposo pela ativação da AMPK, um regulador chave do metabolismo energético. Sua ativação promove a oxidação de ácidos graxos, priorizando o uso da gordura como fonte energética, levando a uma diminuição tecido adiposo. Ainda, com a melhora da sensibilidade à insulina causada por beta-glucanas, ocorre uma redução do acúmulo excessivo de gordura (STRĄCZKOWSKI; NIKOŁAJUK; MAJEWSKI; FILARSKI *et al.*, 2018).

No OGTT, a botriosferana demonstrou ser eficaz ao melhorar a tolerância à glicose no grupo OB, indicando um potencial benefício desta beta-glucana no controle da glicemia, inclusive no tratamento do diabetes *mellitus* tipo 2. Ainda, observou-se que a botriosferana corrigiu a dislipidemia diminuindo significativamente os níveis de colesterol total, colesterol-LDL, triglicerídeos e colesterol-VLDL.

Semelhantemente, trabalho de Silva et. al. (2018) demonstrou que em ratos *Wistar* machos, a botriosferana na mesma dose de 12 mg/kg/dia durante 15 dias de tratamento foi eficaz em promover uma perda significativa no peso corporal, redução dos depósitos de gordura, em especial o tecido adiposo periepídimo e mesentérico. A botriosferana também melhorou a tolerância à glicose e corrigiu a dislipidemia, aumentando os níveis de HDL e causando uma redução nos níveis do índice Tyg (Tabela 3). Ainda, em um estudo feito por Ribeiro et al. (2022), em ratos *Wistar* machos, a botriosferana após 30 dias de tratamento foi capaz de reduzir significativamente o ganho de peso e o acúmulo de tecido adiposo retroperitoneal, assim como corrigiu os níveis de glicose, triglicerídeos, VLDL e melhorou significativamente a sensibilidade à insulina.

A botriosferana também demonstrou propriedades hipoglicêmicas e hipocolesterolêmicas em ratos induzidos por diabetes e em ratos que receberam uma dieta hiperlipídica, respectivamente (MIRANDA-NANTES 2011)

As β -glucanas têm sido amplamente estudadas pelo seu potencial hipocolesterolêmico, além dos efeitos imunomoduladores. Mecanismos como o deslocamento do colesterol das micelas, a ligação ou a precipitação do colesterol, inibição das enzimas digestivas, ligação aos ácidos biliares e consequente diminuição da sua participação na formação de micelas, contribuem para esse efeito (DOS SANTOS; CURY; FERRAZ; CORRENTE *et al.*, 2018; JESCH; CARR, 2017; KOROLENKO; BGATOVA; OVSYUKOVA; SHINTYAPINA *et al.*, 2020).

Sabe-se que as beta-glucanas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 3) apresentam efeitos hipocolesterolêmicos e hipoglicêmicos (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). Sua capacidade em reduzir o colesterol total e o LDL-colesterol é atribuída à inibição da absorção intestinal de colesterol e ao aumento da excreção de ácido biliares, como também pela fermentação das β -glucanas por bactérias intestinais (microbiota) em ácidos graxos de cadeia curta, que são absorvidos e inibem a síntese de colesterol hepático, e pelo aumento da excreção de colesterol nas fezes (WOUK; DEKKER; QUEIROZ; BARBOSA-DEKKER, 2021).

Os efeitos hipolipidêmicos das β -glucanas vêm sendo amplamente estudados em modelos animais. Em um estudo com hamsters hiperlipidêmicos as β -glucanas da cevada

demonstraram uma capacidade significativa ao reduzir os níveis de colesterol por meio da diminuição da atividade da enzima HMG-CoA redutase no fígado, principal enzima envolvida na síntese de colesterol. De maneira semelhante, o consumo de extrato do cogumelo *Grifola frondosa*, seco, rico em β -glucanas, também apresentou efeitos hipocolesterolêmicos, diminuindo os níveis de triglicerídeos, colesterol total, colesterol LDL e VLDL (WOUK; DEKKER; QUEIROZ; BARBOSA-DEKKER, 2021).

Esses resultados são consistentes com a redução observada nos níveis de lipídios plasmáticos nos grupos tratados com botriosferana no presente trabalho. Além disso, o efeito hipoglicêmico conhecido das beta-glucanas está associado com os efeitos de redução do esvaziamento gástrico e redução da absorção gastrointestinal de glicose na presença deste polímero de beta-glucana, o que contribui para a manutenção dos níveis de glicose circulante, melhora da sensibilidade à insulina e melhora na tolerância à glicose observada no grupo OB. Tais resultados sugerem que a botriosferana pode atuar no controle de dislipidemias e na regulação glicêmica, destacando-se no tratamento de condições associadas à obesidade (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013; WOUK; DEKKER; QUEIROZ; BARBOSA-DEKKER, 2021).

Os dados bioquímicos deste estudo mostram que a obesidade induzida nos animais levou a um aumento significativo nos níveis de triglicérides, colesterol total, LDL e VLDL, em comparação com os animais do grupo controle, indicando um perfil característico de dislipidemia. No entanto, o tratamento com botriosferana foi eficaz em reverter essas alterações. Esse efeito hipolipemiante da botriosferana pode ser devido às suas atividades antioxidante e de modulação do metabolismo lipídico, contribuindo para redução do estresse oxidativo com consequente melhora da função hepática, bem como pode estar relacionada com os mecanismos de deslocamento do colesterol das micelas, a ligação ou a precipitação do colesterol, inibição das enzimas digestivas e ligação aos ácidos biliares, como descrito em outros artigos e citados anteriormente (DOS SANTOS; CURY; FERRAZ; CORRENTE *et al.*, 2018; JESCH; CARR, 2017; KOROLENKO; BGATOVA; OVSYUKOVA; SHINTYAPINA *et al.*, 2020).

O índice Tyg, um marcador de resistência à insulina estava elevado no grupo obeso em comparação ao controle, indicando a associação entre obesidade e resistência à insulina e a botriosferana foi eficaz em reduzir significativamente este índice, demonstrando um importante efeito sensibilizador da insulina (RAMDAS NAYAK; SATHEESH; SHENOY; KALRA, 2022).

Um estudo que utilizou compostos naturais demonstrou que estes podem prevenir o desenvolvimento da obesidade através da modulação de diversas vias, sendo uma delas a estimulação da síntese do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR- γ). O

aumento nos níveis do PPAR- γ seriam os responsáveis pelo escurecimento do tecido adiposo, levando a um aumento do seu metabolismo e uma diminuição da deposição de lipídios, bem como melhora da sensibilidade à insulina (KOBI; MATIAS; GASPARINI; TOREZANI-SALES *et al.*, 2023).

A hipertrigliceridemia, observada nas ratas obesas, pode causar um desbalanço na relação oxidante-antioxidante, sugerindo que um aumento nos níveis de ácidos graxos disponíveis pode aumentar a peroxidação lipídica em diversos tecidos, como o fígado.

Além dos efeitos metabólicos observados, o tratamento com botriosferana também influenciou positivamente os marcadores de estresse oxidativo em diferentes tecidos, demonstrando um importante efeito antioxidante, em especial pela redução da peroxidação lipídica e aumento nos níveis de ASA. No fígado, houve uma redução significativa nos níveis de TBARS e proteínas carboniladas, indicando menor peroxidação lipídica e danos às proteínas no grupo obeso tratado com botriosferana. Houve também aumento dos níveis de ASA, sugerindo que a botriosferana pode potencialmente melhorar a capacidade da resposta antioxidante. No músculo esquelético, sóleo, a queda nos níveis de TBARS tanto nos grupos CB quanto OB, juntamente com o aumento na atividade da catalase no grupo CB, reforça o papel da botriosferana na redução do estresse oxidativo, especialmente em relação à peroxidação lipídica. Ainda, no tecido adiposo, o aumento nos níveis de ASA em ambos os grupos tratados (CB e OB), apontam uma modulação positiva em relação ao estresse oxidativo neste tecido, o que pode estar contribuindo para manter os níveis de TBARS e de proteínas carboniladas semelhantes em relação aos seus respectivos grupos controles, C e O, respectivamente. Nos rins, a botriosferana promoveu uma queda significativa nos níveis de TBARS e proteínas carboniladas no grupo OB, e aumentou a atividade da GPx em ambos os grupos tratados.

No fígado, a botriosferana foi eficaz em reduzir a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas, mesmo com a redução da atividade da GPx. No músculo, o aumento da atividade da catalase nos animais CB pode estar contribuindo para a redução dos níveis de TBARS neste grupo, porém os níveis de proteínas carboniladas nos animais CB foi mais alta no grupo CB em relação ao grupo C.

Os efeitos imunológicos das β -D-glucanas estão relacionados à modulação do sistema imunológico, estimulando a produção de citocinas. A atividade antioxidante destes compostos pode ocorrer por diversos mecanismos como, a captura de radicais e ânions radicais, a ligação de íons metálicos que atuam como catalisadores, redução de peróxidos e indução de atividades enzimáticas antioxidantes (WOUK; DEKKER; QUEIROZ; BARBOSA-DEKKER, 2021).

No trabalho de Giese et al. (2015) a botriosferana foi avaliada quanto a sua atividade antioxidante *in vitro* e comparada a outras β -D-glucanas. A botriosferana apresentou uma capacidade de captura do radical hidroxila superior aos demais polissacarídeos, correspondendo a um total de 90,6%. O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio também foram avaliados, e a botriosferana demonstrou uma capacidade de captura de 37% e 38%, respectivamente. Essa capacidade de captura dos radicais pode estar relacionada ao número de grupo hidroxila nos polissacarídeos e ao número de ramificações (DALONSO, N.; GOLDMAN, G. H.; GERN, R. M., 2015).

Song et al. (2020) demonstrou em um estudo com peixes que uma beta-(1 $\rightarrow$ 3)-glucana proveniente da alga *Euglena gracilis* foi capaz de aumentar significativamente as atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx. Além disso, o estudo evidenciou a capacidade da beta-glucana em reduzir níveis de P66shc, uma proteína adaptadora envolvida na regulação dos níveis de EROs.

Como citado anteriormente, no presente estudo, foi observado que a botriosferana foi capaz de diminuir os níveis de TBARS no fígado, no músculo e nos rins, e de carbonilação de proteínas no fígado, nos rins e cérebro. Esses resultados indicam que essa β -glucana exerce uma ação protetora contra a lipoperoxidação lipídica e a oxidação proteica. Ainda, a botriosferana foi capaz de aumentar os níveis de ASA dos grupos tratados, o que comprova seu efeito antioxidante. Isso sugere que a botriosferana foi eficaz em diminuir o estresse oxidativo nestes tecidos tanto por meio do aumento nos níveis de ASA e da atividade de enzimas antioxidantes como a catalase e a GPx, como por uma ação direta de sua molécula rica em grupos hidroxila e ramificações. Semelhantemente, Silva et al. (2022) também demonstrou que a botriosferana exibiu uma importante atividade antioxidante no fígado e no tecido tumoral de ratos machos obesos e não obesos com o tumor de Walker-256.

Ainda, esses dados dos marcadores pró e antioxidantes vão de encontro com resultados de outros estudos que mostram que a obesidade é um fator de risco independente para aumentar a peroxidação lipídica por meio da lesão celular progressiva e cumulativa resultante da pressão da grande massa corporal. Essa lesão leva a liberação de citocinas, como TNF- α , o que leva à geração de EROs nos tecidos, que como consequência causa peroxidação lipídica (NOEMAN; HAMOODA; BAALASH, 2011). A carbonilação de proteínas aumenta na obesidade, isso ocorre devido ao dano causado nas proteínas celulares pelas EROs.

As EROs são os principais causadores da peroxidação lipídica, um processo que envolve a oxidação de ácidos graxos insaturados e outros lipídios, o que leva a formação de peróxidos e outros compostos reativos, que podem desencadear diversas reações que resultam em danos

celulares (GASCHLER; STOCKWELL, 2017). O ácido ascórbico tem papel importante na prevenção da peroxidação lipídica, atuando junto ao α -tocoferol para proteger as membranas celulares (WESOŁOWSKI; MILA-KIERZENKOWSKA; PAWŁOWSKA; SZEWCZYK-GOLEC *et al.*, 2023). A detoxificação dos produtos da peroxidação lipídica é feita pela conjugação com a glutatona, através da enzima glutatona-S-transferase (KAUSHIK; KAUR, 2003; WESOŁOWSKI; MILA-KIERZENKOWSKA; PAWŁOWSKA; SZEWCZYK-GOLEC *et al.*, 2023).

Dados dos parâmetros bioquímicos do estresse oxidativo no tecido adiposo revelaram resultados inesperados. Ao contrário do esperado, os níveis de TBARS foram menores em ambos os grupos obesos (O e OB) em comparação aos grupos controle (C e CB). Além disso, a atividade da GST foi significativamente maior no grupo O em relação ao grupo C. Acredita-se que a alta atividade da GST no grupo de ratas obesas (O) possa estar contribuindo para a redução significativa da peroxidação lipídica neste tecido. Ainda, observou-se que a botriosferana não alterou os níveis de TBARS e de proteínas carboniladas em relação aos seus respectivos grupos controles C e O, porém aumentou significativamente os níveis de ácido ascórbico neste tecido. Esse fator pode estar contribuindo para a sua atividade antioxidante neste tecido rico em lipídeos.

Além disso, tais resultados apresentados no tecido adiposo podem ser devido a duração do experimento, onde provavelmente o grupo obeso não desenvolveu um nível de obesidade capaz de levar ao estresse oxidativo e desbalanço redox em todos os órgãos e tecidos (JESCH; CARR, 2017; KOBI; MATIAS; GASPARINI; TOREZANI-SALES *et al.*, 2023; KOROLENKO; BGATOVA; OVSYUKOVA; SHINTYAPINA *et al.*, 2020; NOEMAN; HAMOODA; BAALASH, 2011; SILVA; SILVA; AGUILAR; SILVA *et al.*, 2022).

Desta forma, como citado anteriormente, observa-se que os resultados do presente estudo em fêmeas tratadas com botriosferana se assemelham a achados prévios em modelos experimentais com machos, evidenciando que independente do sexo e das alterações hormonais, a botriosferana foi eficaz em promover perda de peso, redução do acúmulo de tecido adiposo e melhora dos parâmetros metabólicos e antioxidantes, tanto em machos como em fêmeas. Em estudo com machos, a botriosferana foi capaz de reduzir o peso corporal, o acúmulo de tecido adiposo periepídimo e mesentérico, a esteatose hepática, dislipidemia, resistência à insulina e intolerância à glicose, além de melhorar parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, como diminuição da lipoperoxidação lipídica e melhora da atividade de enzimas antioxidantes (DA SILVA; GERALDELLI; MARTINS; BRAGA *et al.*, 2022; SILVA; COSTA; SOUZA; RIBEIRO *et al.*, 2018) (Quadro 01). Em fêmeas, observamos que houve

uma redução significativa no ganho de peso corporal, em ambos os grupos tratados, diminuição do tecido adiposo retroperitoneal, melhora na tolerância à glicose, melhora na sensibilidade à insulina, melhora no perfil lipídico com correção dos triglicérides, colesterol total, colesterol LDL, colesterol VLDL e importante efeito antioxidante observado em diversos tecidos (Quadro 01). A essa consistência pode-se atribuir que a botriosferana exerce seus efeitos antiobesogênicos e antioxidantes tanto em machos como em fêmeas.

Este estudo é o primeiro a demonstrar os efeitos significativos da botriosferana, uma β -(1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana, em ratas *Wistar*, revelando suas propriedades antiobesogênicas antioxidantes, sensibilizador da insulina e hipocolesterolêmicas. Os resultados obtidos não apenas destacam a botriosferana como um potencial intervenção terapêutica contra a obesidade, como também evidenciam novas perspectivas para o tratamento de comorbidades associadas. Portanto este trabalho é uma grande contribuição para o entendimento da interação entre β -glucanas e o metabolismo, influenciando o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes no combate à obesidade.

Quadro 1. Comparação entre os resultados obtidos entre machos e fêmeas tratadas com botriosferana.

Parâmetros	Fêmeas	Machos*
Perda de peso	Sim	Sim
Redução do consumo de ração	Não	Sim
Redução do tecido adiposo retroperitoneal	Sim	Não
Redução do tecido adiposo mesentérico	Não	Sim
Redução do tecido adiposo perigonadal	Não	Sim
Redução do Tecido muscular	Não	Não
Redução da hepatomegalia	Sim	Sim
Redução da esteatose hepática	Não avaliado	Sim
Redução da hiperglicemia	Não	Sim
Manutenção dos níveis glicêmicos normais	Sim	Sim
Melhora da tolerância à glicose	Sim	Sim
Melhora da sensibilidade à insulina	Sim	Sim
Redução de Triglicerídeos	Sim	Sim
Redução de Colesterol Total	Sim	Não
Redução de LDL	Sim	Não

Redução de VLDL	Sim	Sim
Aumento de HDL	Sim	Sim
Efeito antioxidante	Sim	Sim

Dados em machos obtidos dos trabalhos de Silva et al., 2018; Ribeiro et al., 2022 e Silva et al., 2022.

6. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a obesidade induzida pela dieta rica em carboidratos e lipídeos promoveu alterações no metabolismo dos animais. Com isso, o uso da botriosferana demonstrou-se promissor ao diminuir os efeitos adversos da obesidade, promovendo diminuição no peso corporal e no tecido adiposo retroperitoneal, e ainda melhorando a tolerância à glicose. Em relação aos parâmetros do estresse oxidativo, a botriosferana foi capaz de reduzir a lipoperoxidação lipídica e a carbonilação de proteínas em diferentes tecidos, evidenciando seu papel protetor contra o dano oxidativo induzido pela obesidade (Figura 12).

Os efeitos antiobesogênico e antioxidante observados com o uso da botriosferana em ratos *Wistar* destacam seu potencial como um composto promissor no tratamento da obesidade e suas comorbidades, como o diabetes e a dislipidemia. Esse fármaco apresenta grande potencial para tratamento dessas doenças, que representam um grande problema de saúde pública.

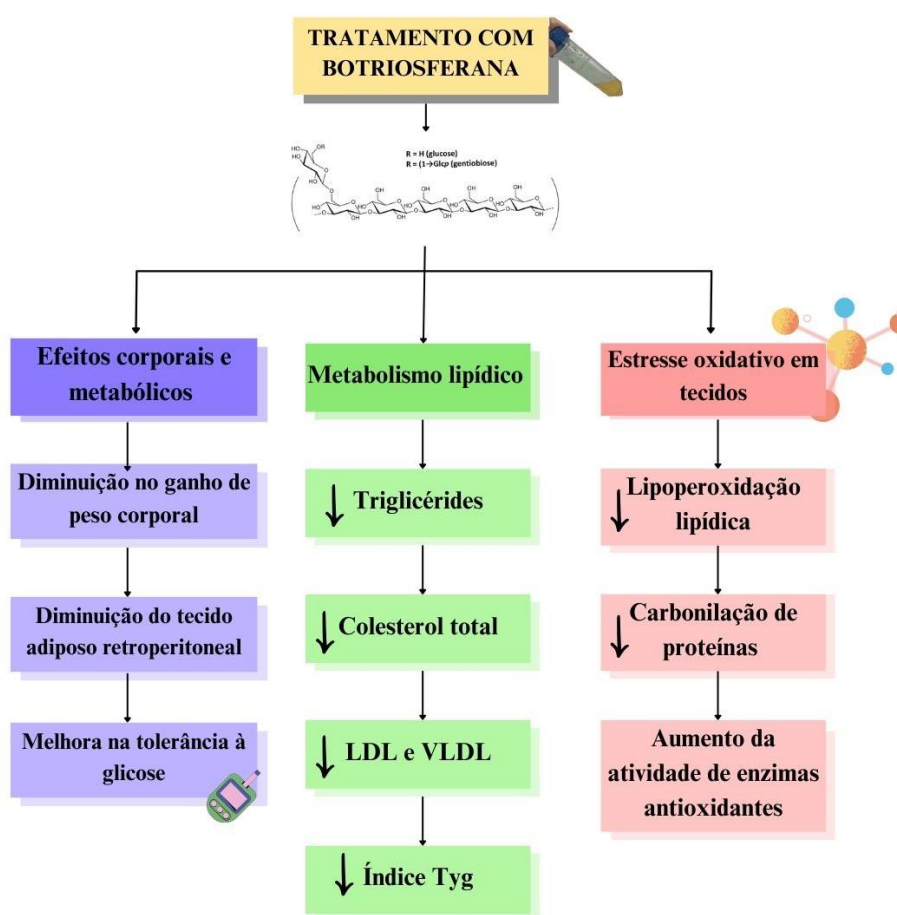


Figura 12. Representação esquemática dos efeitos da botriosferana em ratos *Wistar* obesos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SHEHRI, S. S. Reactive oxygen and nitrogen species and innate immune response. **Biochimie**, 181, p. 52-64, Feb 2021.

AMBELE, M. A.; DHANRAJ, P.; GILES, R.; PEPPER, M. S. Adipogenesis: A Complex Interplay of Multiple Molecular Determinants and Pathways. **Int J Mol Sci**, 21, n. 12, Jun 16 2020.

ANDRÉ-LÉVIGNE, D.; MODARRESSI, A.; PEPPER, M. S.; PITTET-CUÉNOD, B. Reactive Oxygen Species and NOX Enzymes Are Emerging as Key Players in Cutaneous Wound Repair. **Int J Mol Sci**, 18, n. 10, Oct 15 2017.

AOE, S. Beta-Glucan in Foods and Health Benefits. **Nutrients**, 14, n. 1, Dec 27 2021.

BALAN, A. I.; HALAȚIU, V. B.; SCRIDON, A. Oxidative Stress, Inflammation, and Mitochondrial Dysfunction: A Link between Obesity and Atrial Fibrillation. **Antioxidants (Basel)**, 13, n. 1, Jan 17 2024.

BARBOSA, A. M.; STELUTI, R. M.; DEKKER, R. F.; CARDOSO, M. S. *et al.* Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3;1→6)-beta-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, Botryosphaeria sp. **Carbohydr Res**, 338, n. 16, p. 1691-1698, Jul 29 2003.

BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol Rev**, 87, n. 1, p. 245-313, Jan 2007.

BOVOLINI, A.; GARCIA, J.; ANDRADE, M. A.; DUARTE, J. A. Metabolic Syndrome Pathophysiology and Predisposing Factors. **Int J Sports Med**, 42, n. 3, p. 199-214, Mar 2021.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72, p. 248-254, May 7 1976.

BRIEGER, K.; SCHIAVONE, S.; MILLER, F. J., Jr.; KRAUSE, K. H. Reactive oxygen species: from health to disease. **Swiss Med Wkly**, 142, p. w13659, 2012.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, 52, p. 302-310, 1978.

CARLOTO, A. C. M.; BORTOLETI, B.; RODRIGUES, A. C. J.; SILVA, T. F. *et al.* Botryosphaeran, [(1 → 3)(1 → 6)-beta-D-glucan], induces apoptosis-like death in promastigotes of Leishmania amazonensis, and exerts a leishmanicidal effect on infected

macrophages by activating NF- κ B and producing pro-inflammatory molecules. **Chem Biol Interact**, 351, p. 109713, Jan 5 2022.

CHOE, S. S.; HUH, J. Y.; HWANG, I. J.; KIM, J. I. *et al.* Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 7, p. 30, 2016.

COLOMBO, G.; CLERICI, M.; GARAVAGLIA, M. E.; GIUSTARINI, D. *et al.* A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, 1019, p. 178-190, Apr 15 2016.

COMIRAN, P. K.; RIBEIRO, M. C.; SILVA, J. H. G.; MARTINS, K. O. *et al.* Botryosphaeran Attenuates Tumor Development and the Cancer Cachexia Syndrome in Walker-256 Tumor-Bearing Obese Rats and Improves the Metabolic and Hematological Profiles of These Rats. **Nutr Cancer**, 73, n. 7, p. 1175-1192, 2020.

COMIRAN, P. K.; RIBEIRO, M. C.; SILVA, J. H. G.; MARTINS, K. O. *et al.* Botryosphaeran Attenuates Tumor Development and the Cancer Cachexia Syndrome in Walker-256 Tumor-Bearing Obese Rats and Improves the Metabolic and Hematological Profiles of These Rats. **Nutr Cancer**, 73, n. 7, p. 1175-1192, 2021.

DA SILVA, T. P.; GERALDELLI, D.; MARTINS, K. O.; BRAGA, A. J. L. *et al.* Antioxidant, anti-inflammatory and beneficial metabolic effects of botryosphaeran [(1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -d-glucan] are responsible for its anti-tumour activity in experimental non-obese and obese rats bearing Walker-256 tumours. **Cell Biochem Funct**, Feb 28 2022.

DALONSO, N.; GOLDMAN, G. H.; GERN, R. M. β -(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-Glucans: medicinal activities, characterization, biosynthesis and new horizons. **Appl Microbiol Biotechnol**, 99, n. 19, p. 7893-7906, Oct 2015.

DALONSO, N.; GOLDMAN, G. H.; GERN, R. M. β -(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-Glucans: medicinal activities, characterization, biosynthesis and new horizons. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 99, n. 19, p. 7893-7906, 2015/10/01 2015.

DAN DUNN, J.; ALVAREZ, L. A.; ZHANG, X.; SOLDATI, T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. **Redox Biol**, 6, p. 472-485, Dec 2015.

DE MELLO, A. H.; COSTA, A. B.; ENGEL, J. D. G.; REZIN, G. T. Mitochondrial dysfunction in obesity. **Life Sci**, 192, p. 26-32, Jan 1 2018.

DE SIBIO, M. T.; LUVIZOTTO, R. A. M.; OLIMPIO, R. M. C.; CORRÊA, C. R. *et al.* A comparative genotoxicity study of a supraphysiological dose of triiodothyronine (T3) in obese rats subjected to either calorie-restricted diet or hyperthyroidism. 8, n. 2, p. e56913, 2013.

DE SOUZA, R. J.; BRAY, G. A.; CAREY, V. J.; HALL, K. D. *et al.* Effects of 4 weight-loss diets differing in fat, protein, and carbohydrate on fat mass, lean mass, visceral adipose tissue, and hepatic fat: results from the POUNDS LOST trial. **Am J Clin Nutr**, 95, n. 3, p. 614-625, Mar 2012.

DEKKER, R. F. H.; QUEIROZ, E. A. I. F.; CUNHA, M. A. A.; BARBOSA-DEKKER, A. M. Botryosphaeran – A Fungal Exopolysaccharide of the (1→3)(1→6)-β-D-Glucan Kind: Structure and Biological Functions. *In: Extracellular Sugar-Based Biopolymers Matrices*, 2019. cap. Chapter 11, p. 433-484. (Biologically-Inspired Systems).

DONG, H.; QIN, M.; WANG, P.; LI, S. *et al.* Regulatory effects and mechanisms of exercise on activation of brown adipose tissue (BAT) and browning of white adipose tissue (WAT). **Adipocyte**, 12, n. 1, p. 2266147, Dec 2023.

DOS SANTOS, K. C.; CURY, S. S.; FERRAZ, A.; CORRENTE, J. E. *et al.* Recovery of Cardiac Remodeling and Dysmetabolism by Pancreatic Islet Injury Improvement in Diabetic Rats after Yacon Leaf Extract Treatment. **Oxid Med Cell Longev**, 2018, p. 1821359, 2018.

FAHED, G.; AOUN, L.; BOU ZERDAN, M.; ALLAM, S. *et al.* Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. **Int J Mol Sci**, 23, n. 2, Jan 12 2022.

FERIANI, A.; BIZZARRI, M.; TIR, M.; ALDAWOOD, N. *et al.* High-fat diet-induced aggravation of cardiovascular impairment in permethrin-treated Wistar rats. **Ecotoxicol Environ Saf**, 222, p. 112461, Oct 1 2021.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, 18, n. 6, p. 499-502, Jun 1972.

FRIGOLET, M. E.; GUTIÉRREZ-AGUILAR, R. The colors of adipose tissue. **Gac Med Mex**, 156, n. 2, p. 142-149, 2020.

FUNCKE, J. B.; SCHERER, P. E. Beyond adiponectin and leptin: adipose tissue-derived mediators of inter-organ communication. **J Lipid Res**, 60, n. 10, p. 1648-1684, Oct 2019.

GASCHLER, M. M.; STOCKWELL, B. R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochem Biophys Res Commun**, 482, n. 3, p. 419-425, Jan 15 2017.

GERALDELLI, D.; RIBEIRO, M. C.; MEDEIROS, T. C.; COMIRAN, P. K. *et al.* Botryosphaeran, a (1 → 3)(1 → 6)-β-D-glucan, reduces tumor development and cachexia syndrome in obese male rats by increasing insulin sensitivity and FOXO3a activity. **Int J Biol Macromol**, 165, n. Pt A, p. 985-994, Dec 15 2020a.

GERALDELLI, D.; RIBEIRO, M. C.; MEDEIROS, T. C.; COMIRAN, P. K. *et al.* Tumor development in rats and cancer cachexia are reduced by treatment with botryosphaeran by increasing apoptosis and improving the metabolic profile. **Life Sci**, 252, p. 117608, Jul 1 2020b.

GIESE, E. C.; GASCON, J.; ANZELMO, G.; BARBOSA, A. M. *et al.* Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other β -D-glucans. **Int J Biol Macromol**, 72, p. 125-130, Jan 2015.

GOOSSENS, G. H. The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. **Obes Facts**, 10, n. 3, p. 207-215, 2017.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem**, 249, n. 22, p. 7130-7139, Nov 25 1974.

HENSON, P. M. The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. I. The role of antibody and complement on nonphagocytosable surfaces or phagocytosable particles. **J Immunol**, 107, n. 6, p. 1535-1546, Dec 1971.

JAYACHANDRAN, M.; CHEN, J.; CHUNG, S. S. M.; XU, B. A critical review on the impacts of β -glucans on gut microbiota and human health. **J Nutr Biochem**, 61, p. 101-110, Nov 2018.

JESCH, E. D.; CARR, T. P. Food Ingredients That Inhibit Cholesterol Absorption. **Prev Nutr Food Sci**, 22, n. 2, p. 67-80, Jun 2017.

JOMOVA, K.; ALOMAR, S. Y.; ALWASEL, S. H.; NEPOVIMOVA, E. *et al.* Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. **Arch Toxicol**, 98, n. 5, p. 1323-1367, May 2024.

KAUSHIK, S.; KAUR, J. Chronic cold exposure affects the antioxidant defense system in various rat tissues. **Clin Chim Acta**, 333, n. 1, p. 69-77, Jul 1 2003.

KAWAI, T.; AUTIERI, M. V.; SCALIA, R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. **Am J Physiol Cell Physiol**, 320, n. 3, p. C375-c391, Mar 1 2021.

KOBI, J.; MATIAS, A. M.; GASPARINI, P. V. F.; TOREZANI-SALES, S. *et al.* High-fat, high-sucrose, and combined high-fat/high-sucrose diets effects in oxidative stress and inflammation in male rats under presence or absence of obesity. **Physiol Rep**, 11, n. 7, p. e15635, Apr 2023.

KOROLENKO, T. A.; BGATOVA, N. P.; OVSYUKOVA, M. V.; SHINTYAPINA, A. *et al.* Hypolipidemic Effects of β -Glucans, Mannans, and Fucoidans: Mechanism of Action and Their Prospects for Clinical Application. **Molecules**, 25, n. 8, Apr 16 2020.

KUMARI, M.; HEEREN, J.; SCHEJA, L. Regulation of immunometabolism in adipose tissue. **Semin Immunopathol**, 40, n. 2, p. 189-202, Feb 2018.

LEE, H. S.; LEE, J. Effects of Exercise Interventions on Weight, Body Mass Index, Lean Body Mass and Accumulated Visceral Fat in Overweight and Obese Individuals: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Int J Environ Res Public Health**, 18, n. 5, Mar 5 2021.

LEE, S. H.; PARK, S. Y.; CHOI, C. S. Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. **Diabetes Metab J**, 46, n. 1, p. 15-37, Jan 2022.

LI, X.; REN, Y.; CHANG, K.; WU, W. *et al.* Adipose tissue macrophages as potential targets for obesity and metabolic diseases. **Front Immunol**, 14, p. 1153915, 2023.

LI, X.; XUE, Y.; PANG, L.; LEN, B. *et al.* Agaricus bisporus-derived β -glucan prevents obesity through PPAR γ downregulation and autophagy induction in zebrafish fed by chicken egg yolk. **Int J Biol Macromol**, 125, p. 820-828, Mar 15 2019.

LIMA, C. M.; LIMA, A. K.; MELO, M. G. D.; DÓRIA, G. A. A. *et al.* Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, 10, n. 3, 04/07 2014.

LIN, X.; LI, H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 12, p. 706978, 2021.

LITWIN, M.; KUŁAGA, Z. Obesity, metabolic syndrome, and primary hypertension. **Pediatr Nephrol**, 36, n. 4, p. 825-837, Apr 2021.

LIU, B.; DU, Y.; WU, Y.; SNETSELAAR, L. G. *et al.* Trends in obesity and adiposity measures by race or ethnicity among adults in the United States 2011-18: population based study. **Bmj**, 372, p. n365, Mar 16 2021.

LIU, T.; SUN, L.; ZHANG, Y.; WANG, Y. *et al.* Imbalanced GSH/ROS and sequential cell death. **J Biochem Mol Toxicol**, 36, n. 1, p. e22942, Jan 2022.

LUCISANO, Y. M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **J Immunol**, 132, n. 4, p. 2015-2020, Apr 1984.

LUONG, P. Q.; LEE, G. B.; KIM, J. I. Inhibition of HDAC6 mitigates high-fat diet-induced kidney inflammation and hypertension via reduced infiltration of macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**, 735, p. 150800, Nov 26 2024.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chem Biol Interact**, 224, p. 164-175, Dec 5 2014.

MA, G.; MÁZARO, R. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação (Ethical and practical**

principles of the use of experimental animals). Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP: 2004. 19 p.

MANIYADATH, B.; ZHANG, Q.; GUPTA, R. K.; MANDRUP, S. Adipose tissue at single-cell resolution. **Cell Metab**, 35, n. 3, p. 386-413, Mar 7 2023.

MANNA, P.; JAIN, S. K. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. 13, n. 10, p. 423-444, 2015.

MIRANDA-NANTES, C. C.; FONSECA, E. A.; ZAIA, C. T.; DEKKER, R. F. *et al.* Hypoglycemic and Hypcholesterolemic Effects of Botryosphaeran from Botryosphaeria rhodina MAMB-05 in Diabetes-Induced and Hyperlipidemia Conditions in Rats. **Mycobiology**, 39, n. 3, p. 187-193, Sep 2011.

MIRONCZUK-CHODAKOWSKA, I.; KUJAWOWICZ, K.; WITKOWSKA, A. M. Beta-Glucans from Fungi: Biological and Health-Promoting Potential in the COVID-19 Pandemic Era. **Nutrients**, 13, n. 11, Nov 6 2021.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, 247, n. 10, p. 3170-3175, May 25 1972.

MULLER, T. D.; BLUHER, M.; TSCHOP, M. H.; DIMARCHI, R. D. Anti-obesity drug discovery: advances and challenges. **Nat Rev Drug Discov**, 21, n. 3, p. 201-223, Mar 2022.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). **Anal Biochem**, 49, n. 2, p. 474-478, Oct 1972.

NOEMAN, S. A.; HAMOODA, H. E.; BAALASH, A. A. Biochemical Study of Oxidative Stress Markers in the Liver, Kidney and Heart of High Fat Diet Induced Obesity in Rats. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, 3, n. 1, p. 17, 2011/08/03 2011.

OLIVEIRA, G. M. M.; BRANT, L. C. C.; POLANCZYK, C. A.; MALTA, D. C. *et al.* Cardiovascular Statistics - Brazil 2021. **Arq Bras Cardiol**, 118, n. 1, p. 115-373, Jan 2022.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J Lab Clin Med**, 70, n. 1, p. 158-169, Jul 1967.

PERAL-SANCHEZ, I.; HOJEIJ, B.; OJEDA, D. A.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M. *et al.* Epigenetics in the Uterine Environment: How Maternal Diet and ART May Influence the Epigenome in the Offspring with Long-Term Health Consequences. **Genes (Basel)**, 13, n. 1, Dec 23 2021.

PURDY, J. C.; SHATZEL, J. J. The hematologic consequences of obesity. **Eur J Haematol**, 106, n. 3, p. 306-319, Mar 2021.

QUEIROZ, E. A. I. F.; ALEGRANCI, P.; BARBOSA-DEKKER, A. M.; DEKKER, R. F. H. Roles of β -Glucans in Oxidative Stress and Cancer. In: CHAKRABORTI, S.; RAY, B. K., *et al* (Ed.). **Handbook of Oxidative Stress in Cancer: Mechanistic Aspects**. Singapore: Springer Singapore, 2020. p. 1-19.

RAMDAS NAYAK, V. K.; SATHEESH, P.; SHENOY, M. T.; KALRA, S. Triglyceride Glucose (TyG) Index: A surrogate biomarker of insulin resistance. **J Pak Med Assoc**, 72, n. 5, p. 986-988, May 2022.

REGUERO, M.; GÓMEZ DE CEDRÓN, M.; WAGNER, S.; REGLERO, G. *et al.* Precision Nutrition to Activate Thermogenesis as a Complementary Approach to Target Obesity and Associated-Metabolic-Disorders. **Cancers (Basel)**, 13, n. 4, Feb 18 2021.

REYES-FARIAS, M.; FOS-DOMENECH, J.; SERRA, D.; HERRERO, L. *et al.* White adipose tissue dysfunction in obesity and aging. **Biochem Pharmacol**, 192, p. 114723, Oct 2021.

RIBEIRO, M. C.; SILVA, A. Z. D.; GIORDANI, M. A.; LIRA, C. *et al.* Extended treatment with (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)-beta-d-glucan (Botryosphaeran) reduces obesity and its comorbidities in high-fat/high-sugar diet-fed rats. **Cell Biochem Funct**, 40, n. 7, p. 773-783, Oct 2022.

ROE, J. H. Chemical determination of ascorbic, dehydroascorbic, and diketogulonic acids. **Methods Biochem Anal**, 1, p. 115-139, 1954.

RUBINO, F.; PUHL, R. M.; CUMMINGS, D. E.; ECKEL, R. H. *et al.* Joint international consensus statement for ending stigma of obesity. **Nat Med**, 26, n. 4, p. 485-497, Apr 2020.

SAHOO, B. M.; BANIK, B. K.; BORAH, P.; JAIN, A. Reactive Oxygen Species (ROS): Key Components in Cancer Therapies. **Anticancer Agents Med Chem**, 22, n. 2, p. 215-222, 2022.

SAKLAYEN, M. G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. **Curr Hypertens Rep**, 20, n. 2, p. 12, Feb 26 2018.

SALTIEL, A. R.; OLEFSKY, J. M. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. **J Clin Invest**, 127, n. 1, p. 1-4, Jan 3 2017.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, 25, n. 1, p. 192-205, Oct 24 1968.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A.; MOHAMMADIAN, S.; VAZINI, H.; TAGHADOSI, M. *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **J Cell Physiol**, 233, n. 9, p. 6425-6440, Sep 2018.

SIES, H.; JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 21, n. 7, p. 363-383, Jul 2020.

SILVA, A. Z.; COSTA, F. P. L.; SOUZA, I. L.; RIBEIRO, M. C. *et al.* Botryosphaeran reduces obesity, hepatic steatosis, dyslipidaemia, insulin resistance and glucose intolerance in diet-induced obese rats. **Life Sci**, 211, p. 147-156, Oct 15 2018.

SILVA, D. L.; SILVA, N.; AGUILAR, E. C.; SILVA, M. E. *et al.* Kinkan orange protects hypercholesterolemic rats against dyslipidemia and oxidative stress. **An Acad Bras Cienc**, 94, n. suppl 3, p. e20201066, 2022.

SILVA, T. P.; GERALDELLI, D.; MARTINS, K. O.; BRAGA, A. J. L. *et al.* Antioxidant, anti-inflammatory and beneficial metabolic effects of botryosphaeran [(1→3)(1→6)-β-d-glucan] are responsible for its anti-tumour activity in experimental non-obese and obese rats bearing Walker-256 tumours. **Cell Biochem Funct**, Feb 28 2022.

SONG, L.; ZHOU, Y.; NI, S.; WANG, X. *et al.* Dietary Intake of β-Glucans Can Prolong Lifespan and Exert an Antioxidant Action on Aged Fish *Nothobranchius guentheri*. **Rejuvenation Res**, 23, n. 4, p. 293-301, Aug 2020.

STEFAN, N. Causes, consequences, and treatment of metabolically unhealthy fat distribution. **Lancet Diabetes Endocrinol**, 8, n. 7, p. 616-627, Jul 2020.

STRĄCZKOWSKI, M.; NIKOŁAJUK, A.; MAJEWSKI, R.; FILARSKI, R. *et al.* The effect of moderate weight loss, with or without (1, 3)(1, 6)-β-glucan addition, on subcutaneous adipose tissue inflammatory gene expression in young subjects with uncomplicated obesity. **Endocrine**, 61, n. 2, p. 275-284, Aug 2018.

SUN, K.; KUSMINSKI, C. M.; SCHERER, P. E. Adipose tissue remodeling and obesity. **J Clin Invest**, 121, n. 6, p. 2094-2101, Jun 2011.

SUZUKI, T.; KUSANO, K.; KONDO, N.; NISHIKAWA, K. *et al.* Biological Activity of High-Purity beta-1,3-1,6-Glucan Derived from the Black Yeast *Aureobasidium pullulans*: A Literature Review. **Nutrients**, 13, n. 1, Jan 16 2021.

SYNYTSYA, A.; NOVÁK, M. Structural diversity of fungal glucans. **Carbohydr Polym**, 92, n. 1, p. 792-809, Jan 30 2013.

TADA, R.; ADACHI, Y.; ISHIBASHI, K.-i.; OHNO, N. An unambiguous structural elucidation of a 1,3-β-d-glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa* by solution NMR experiments. **Carbohydrate Research**, 344, n. 3, p. 400-404, 2009/02/17/ 2009.

VECCHIÉ, A.; DALLEGRI, F.; CARBONE, F.; BONAVENTURA, A. *et al.* Obesity phenotypes and their paradoxical association with cardiovascular diseases. **Eur J Intern Med**, 48, p. 6-17, Feb 2018.

WANG, J.; HU, S.; NIE, S.; YU, Q. *et al.* Reviews on Mechanisms of In Vitro Antioxidant Activity of Polysaccharides. **Oxid Med Cell Longev**, 2016, p. 5692852, 2016.

WANG, X.; QU, Y.; WANG, Y.; WANG, X. *et al.* β-1,6-Glucan From *Pleurotus eryngii* Modulates the Immunity and Gut Microbiota. **Front Immunol**, 13, p. 859923, 2022.

WESOŁOWSKI, R.; MILA-KIERZENKOWSKA, C.; PAWŁOWSKA, M.; SZEWCZYK-GOLEC, K. *et al.* The Influence of Winter Swimming on Oxidative Stress Indicators in the Blood of Healthy Males. **Metabolites**, 13, n. 2, Jan 17 2023.

WHO. **Obesity**. 2024. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_3. Acesso em: 11/11/2024.

WOUK, J.; DEKKER, R. F. H.; QUEIROZ, E.; BARBOSA-DEKKER, A. M. β-Glucans as a panacea for a healthy heart? Their roles in preventing and treating cardiovascular diseases. **Int J Biol Macromol**, 177, p. 176-203, Apr 30 2021.

XIA, W.; VEERAGANDHAM, P.; CAO, Y.; XU, Y. *et al.* Obesity causes mitochondrial fragmentation and dysfunction in white adipocytes due to RalA activation. **Nat Metab**, 6, n. 2, p. 273-289, Feb 2024.

ZATTERALE, F.; LONGO, M.; NADERI, J.; RACITI, G. A. *et al.* Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. **Front Physiol**, 10, p. 1607, 2019.

ZHANG, B.; PAN, C.; FENG, C.; YAN, C. *et al.* Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation. **Redox Rep**, 27, n. 1, p. 45-52, Dec 2022.

ZHANG, N.; KONG, F.; JING, X.; ZHOU, J. *et al.* Hongqu Rice Wines Ameliorate High-Fat/High-Fructose Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats. **Alcohol Alcohol**, 57, n. 6, p. 776-787, Nov 11 2022.

ZHENG, H.; XU, Y.; LIEHN, E. A.; RUSU, M. Vitamin C as Scavenger of Reactive Oxygen Species during Healing after Myocardial Infarction. **Int J Mol Sci**, 25, n. 6, Mar 7 2024.

8. ARTIGO

***In vivo* Antiobesogenic, Hypocholesterolemic and Antioxidant Effects of Botryosphaeran (a Fungal Exocellular (1→3)(1→6)-β-D-glucan) in Treating Obese and Non-Obese Female Wistar Rats**

Running title: Antiobesogenic effect of botryosphaeran.

Isabelle Zanata Fabiane^a, Daniel Izidoro Ferreira da Silva^a, Délcio Francisco Chagas Netto^b, Francine Nunes Ferreira^b, Isabela Petenati de Oliveira^b, Sabrina Leticia Bubans Junges^b, Anna Carolina Vilela^b, Robert F. H. Dekker^c, Aneli M. Barbosa-Dekker^c, Pâmela Alegranci^a, Valéria Dornelles Gindri Sinhorin^d, Eveline Aparecida Isquierdo Fonseca de Queiroz^{a,*}

^a Núcleo de Pesquisa e Apoio Didático em Saúde (NUPADS), Programa de Pós-Graduação Ciências em Saúde, Instituto de Ciências da Saúde, Câmpus Universitário de Sinop, Universidade Federal de Mato Grosso, CEP: 78.550-728, Sinop-MT, Brazil.

^b Instituto de Ciências da Saúde, Câmpus Universitário de Sinop, Universidade Federal de Mato Grosso, CEP: 78.550-728, Sinop, Mato Grosso, Brazil.

* **Corresponding author:** Dr. Eveline A.I.F. Queiroz. Núcleo de Pesquisa e Apoio Didático em Saúde (NUPADS), Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Câmpus Universitário de Sinop, Universidade Federal de Mato Grosso, 1200 Alexandre Ferronato Avenue, Cidade Jardim, CEP: 78.550-728, Sinop-MT, Brazil. Tel. +55 66 98130-6664. E-mail: eveline.queiroz@ufmt.br; eveline.ufmt@gmail.com

^c *Beta*-Glucan Produtos Farmoquímicos EIRELI, Lote 24^A, Bloco Zircônia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina, Avenida João Miguel Caram 731, CEP: 86036-700, Londrina, Paraná, Brazil.

^d Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Região Pró Centro-Oeste, Câmpus Universitário de Cuiabá, Universidade Federal de Mato Grosso, CEP: 78.060-900, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil.

Orcid numbers:

Isabelle Zanata Fabiane: <https://orcid.org/0000-0002-8784-8500>

E-mail: isabellezanata.izf@gmail.com

Daniel Izidoro Ferreira da Silva: <https://orcid.org/0009-0009-6060-0095>

E-mail: izidorodaniel15@hotmail.com

Delcio Francisco Chagas Netto: <https://orcid.org/0000-0001-8404-098X>

E-mail: delcio.chagas7@gmail.com

Francine Nunes Ferreira: <https://orcid.org/0000-0003-4762-5158>

E-mail: francinenunesferreira3@gmail.com

Isabela Petenati de Oliveira: <https://orcid.org/0009-0003-1621-5241>

E-mail: Isabela.petenati@gmail.com

Sabrina Leticia Bubans Junges: <https://orcid.org/0009-0009-1297-2599>

E-mail: sabrina-jungues2013@hotmail.com

Anna Carolina Vilela: <https://orcid.org/0009-0003-3588-9540>

E-mail: annavilela15@gmail.com

Robert F. H. Dekker: <https://orcid.org/0000-0002-3787-6917>

E-mail: xylanase@gmail.com

Aneli M. Barbosa-Dekker: <https://orcid.org/0000-0002-2339-8985>

E-mail: anelibarbosa@gmail.com

Pâmela Alegranci: <https://orcid.org/0000-0003-4490-0556>

E-mail: palegranci@gmail.com

Valéria Dornelles Gindri Sinhorin: <http://orcid.org/0000-0002-5070-0043>
E-mail: valeria.sinhorin@ufmt.br

Eveline Aparecida Isquierdo Fonseca de Queiroz: <https://orcid.org/0000-0002-8094-1585>
E-mail: eveline.queiroz@ufmt.br

Abstract

Botryosphaeran is an exocellular (1→3)(1→6)-β-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria rhodina*, that promotes significant metabolic effects in male rats, as antiobesogenic and hypoglycemic effects. In this study our objective is to analyze the metabolic effects of botryosphaeran in obese and non-obese female rats. Rats were divided into four groups: Control (C), Control treated with botryosphaeran (CB), Obese (O), and Obese treated with botryosphaeran (OB); n=8/group. Control rats fed a standart diet and water, while obese rats were fed a high-fat diet/high sugar diet, *ad-libitum*, over 8 weeks. On 6th week, CB and OB groups received treatment with botryosphaeran (12 mg/kg body-weight/day) by gavage for 15 days. Obese rats presented high-weight gain, accumulation of adipose tissue, glucose intolerance, insulin resistance, hepatomegaly and high levels of TBARS (marker of oxidative stress) in the liver. Treatment with botryosphaeran significantly reduced the final body-weight (g)(C: 226.3±14.0 vs. CB: 208.6±14.5; O: 255.3±22.4 vs. OB:235.0±21.6), visceral adipose tissue (g)(C: 7.1±2.0 vs. CB: 5.9±1.0; O: 19.8±5.1 vs. OB:15.3±4.4), retroperitoneal adipose tissue (g)(C: 3.6±1.2 vs. CB: 1.9±0.4; O: 9.4±3.0 vs. OB: 6.6±2.3, $p<0.05$), and corrected glucose intolerance ($p<0.01$). Furthermore, botryosphaeran reduced the levels of TBARS (45.4%) in liver, reducing oxidative stress. Additionally, no differences were observed in the liver for protein

carbonyls, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and ascorbic acid between groups. In conclusion, botryosphaeran was observed to promote a significant antiobesogenic effect, promoting an expressive loss in body-weight, reduction of adipose tissue, correction of glucose intolerance and promoting an antioxidant effect in the female rats.

Keywords: Ascomyceteous fungus; *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05; Obesity; Dyslipidemia; Oxidative damage.

1 Introduction

The rise in the rates of obesity around the world affects people of all ages, sex and has a serious negative impact on one's personal life, family, social, and financial well-being. Obesity is characterized by an increase in body mass due to significant accumulation of adipose tissue (AT), especially visceral white adipose tissue (visceral fat) (PERAL-SANCHEZ; HOJEIJ; OJEDA; STEEGERS-THEUNISSEN *et al.*, 2021; VECCHIÉ; DALLEGRI; CARBONE; BONAVENTURA *et al.*, 2018). Adipocyte hyperplasia (an increase in cell number) and hypertrophy (an increase in cell size) are the principal causes of the increase in AT, that are accompanied by increased chemokine secretion, dysregulation of fatty acid flux, cell death, and hypoxia (DONG; QIN; WANG; LI *et al.*, 2023; MANIYADATH; ZHANG; GUPTA; MANDRUP, 2023). Adipocytes proliferate in quantity and size in the early stages of life, stabilize at a later stage, and then begin to rise again in adolescence. Studies have indicated that the number of adipocytes remains constant in both lean and obese adults, where neither obesity nor weight-loss significantly alter this condition, suggesting that hypertrophy is

the primary factor in adult obesity (MANIYADATH; ZHANG; GUPTA; MANDRUP, 2023).

Pro-inflammatory cytokines, pro-oxidant molecules, and macrophages are abundant in inflammatory AT, which in obesity, is linked to long-term, low-grade inflammation, oxidative stress and insulin resistance (VECCHIÉ; DALLEGRI; CARBONE; BONAVENTURA *et al.*, 2018). The pro-inflammatory M1 phenotype of adipose tissue macrophages (ATMs) replace the anti-inflammatory M2 phenotype in obesity (LI; REN; CHANG; WU *et al.*, 2023). Factors linked to insulin resistance and metabolic complications are expressed by the M1 macrophages. Research shows compelling evidence of a positive correlation between body mass index (BMI) and M1 macrophage abundance, especially in subcutaneous adipose tissue, where their numbers rise in tandem with obesity (PURDY; SHATZEL, 2021; REYES-FARIAS; FOS-DOMENECH; SERRA; HERRERO *et al.*, 2021). In addition to upregulating the expression of nitric oxide synthase, M1 macrophages also secrete pro-inflammatory mediators such as tumor necrosis factor-*alpha* (TNF- α), and interleukins 6 (IL-6), 8 (IL-8) and 12 (IL-12) (LI; REN; CHANG; WU *et al.*, 2023; SHAPOURI-MOGHADDAM; MOHAMMADIAN; VAZINI; TAGHADOSI *et al.*, 2018). Alternatively, M2 macrophages express CD301, CD163, F4/80, arginase-1 and scavenger-type receptors. They secrete anti-inflammatory cytokines, and contribute to immunosuppression, tissue repair, and adipose tissue homeostasis (KUMARI; HEEREN; SCHEJA, 2018). Metabolic disorders and development of insulin resistance have been associated with this inflammatory cascade, which is partially mediated by neutrophils (ZATTERALE; LONGO; NADERI; RACITI *et al.*, 2019).

Obesity may cause regulatory T cells (Tregs) to be downregulated, which would lead to increased insulin resistance and inflammation in visceral AT (KAWAI; AUTIERI;

SCALIA, 2021). Reactive oxygen species (ROS), also known as free radical species, are products of oxygen-related electron transfer reactions that occur during aerobic metabolism (AL-SHEHRI, 2021). While ROS are produced as primary enzymatic products generated by the actions of NADPH oxidase (NOX) and dual oxidase (DUOX), they can also be produced at the cellular level as metabolic by-products in mitochondria, peroxisomes, and via the action of xanthine oxidase (BRIEGER; SCHIAVONE; MILLER; KRAUSE, 2012; SAHOO; BANIK; BORAH; JAIN, 2022; ZHANG; PAN; FENG; YAN *et al.*, 2022). ROS includes neutral compounds, ions, or free radicals that are involved in species transitions, such as hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\text{OH}^\bullet$), superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\bullet -}$), and nitric oxide ($\text{NO}^\bullet$). These molecules have unpaired electrons or unstable bonds; they can readily combine with proteins, lipids, carbohydrates and nucleic acids, which may even lead to irreversible inactivation or degradation (SIES; JONES, 2020). Three regions in animal cells where ROS production mainly occurs include the endoplasmic reticulum, the mitochondrial electron transport chain and the proteins of the NADPH oxidase family. Electrons from NADH and FAD combine with oxygen, or other electron acceptors, to generate free radicals. Mitochondria generate over 90% of ROSs as consequences of electron transport (ANDRÉ-LÉVIGNE; MODARRESSI; PEPPER; PITTET-CUÉNOD, 2017; LIU; SUN; ZHANG; WANG *et al.*, 2022; LUSHCHAK, 2014). The regulation of ROS involves the generation of ROS, and its elimination through the antioxidant defense system, which can be classified as either high molecular weight (enzymatic and polymeric compounds) or low molecular weight (non-enzymatic free-radical scavengers)(BRIEGER; SCHIAVONE; MILLER; KRAUSE, 2012; JOMOVA; ALOMAR; ALWASEL; NEPOVIMOVA *et al.*, 2024).

Antioxidants that do not involve enzymes include polyphenolic compounds, but carbohydrate biopolymers such as polysaccharides are known to possess antioxidant activities (WANG; HU; NIE; YU *et al.*, 2016). Among these are the β -D-glucans which comprise polymers made up of repeating D-glucose residues connected by glycosidic bonds, e.g., a backbone chain comprising β -(1 $\rightarrow$ 3) linkages containing β -(1 $\rightarrow$ 6) linked substituents (DEKKER; QUEIROZ; CUNHA; BARBOSA-DEKKER, 2019; QUEIROZ; ALEGRANCI; BARBOSA-DEKKER; DEKKER, 2020; WOUK; DEKKER; QUEIROZ; BARBOSA-DEKKER, 2021). Botryosphaeran is an exopolysaccharide of the (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan kind, and is produced by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 (BARBOSA; STELUTI; DEKKER; CARDOSO *et al.*, 2003). This specific β -glucan has been demonstrated as an antioxidant molecule, *in vitro* (GIESE; GASCON; ANZELMO; BARBOSA *et al.*, 2015) and *in vivo* (DA SILVA; GERALDELLI; MARTINS; BRAGA *et al.*, 2022) in obese male rats bearing tumors. Furthermore, a variety of biological activities, such as anti-mutagenicity, hypocholesterolemia, and antiobesogenicity, have been demonstrated in male Wistar rats through treatment with botryosphaeran (CARLOTO; BORTOLETI; RODRIGUES; SILVA *et al.*, 2022; COMIRAN; RIBEIRO; SILVA; MARTINS *et al.*, 2020; DALONSO, N.; GOLDMAN, G. H.; GERN, R. M. M., 2015).

No investigation, however, has yet been reported assessing the effects of botryosphaeran in female rats (CARLOTO; BORTOLETI; RODRIGUES; SILVA *et al.*, 2022; COMIRAN; RIBEIRO; SILVA; MARTINS *et al.*, 2020; DALONSO, N.; GOLDMAN, G. H.; GERN, R. M., 2015; GERALDELLI; RIBEIRO; MEDEIROS; COMIRAN *et al.*, 2020a; b; SILVA; COSTA; SOUZA; RIBEIRO *et al.*, 2018; SILVA; GERALDELLI; MARTINS; BRAGA *et al.*, 2022). Thus, this study addresses and aims to evaluate the effects of botryosphaeran in obese and non-obese female Wistar rats,

examining body-weight gains, glycemic and lipidemic profiles and oxidative stress markers. In the present study, we anticipated that obese female rats would show signs of insulin resistance, dyslipidemia, hyperglycemia, and increased parameters related to oxidative stress among other metabolic abnormalities. We further anticipated that botryosphaeran would improve the metabolic and oxidant parameters of obese female rats, as we had previously observed this to occur from our all-male rat studies (SILVA; COSTA; SOUZA; RIBEIRO *et al.*, 2018), without showing any adverse effects on the animal's health. Herewith, we report the outcomes of this investigation and compare our findings with data reported from previous studies on Wistar male rats.

2 Material and Methods

2.1 Animals and experimental protocol

The experimental protocol, using female *Wistar* rats ($n = 8$), was in accordance with the Guide of the "Use and Care of Laboratory Animals" (ARRIVE guidelines for reporting *in-vivo* experiments), and was approved by the Ethics Committee for Animal Use and Experimentation at Universidade Federal de Mato Grosso (protocol number 23108.072920/2023-21). During the whole experimental period, the animals were kept in polyethylene cages under controlled conditions of temperature ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), relative humidity ($55 \pm 5\%$), light/dark cycle (12 h), with *ad libitum* access to a commercial ration and filtered water.

Two experimental models of the female rats were studied, they included non-obese (control group, C) and obese (obese group, O). The animals were randomly assigned to two treatments, to receive (1) commercial rat chow (Nuvilab Cr-1, Nuvital, Colombo, Paraná, Brazil) and water, and (2) a high-fat diet (24.5% energy from fat) composed of commercial rat chow (Nuvilab Cr-1) supplemented with added lard,

condensed milk, biscuit, protein supplement (casein), vitamins (A, B6, B12, D, E and biotin), a mineral mix, and a high-sugar diet (sucrose 300 g/L of water) during the 8-week period of the experiment (COMIRAN; RIBEIRO; SILVA; MARTINS *et al.*, 2020).

In the sixth week of the experiment, the female animals (8 rats in each group) were subdivided into four groups: control (C), control + botryosphaeran (CB), obese (O) and obese + botryosphaeran (OB). The CB and OB groups received treatment with botryosphaeran (12 mg/kg body weight (b.w.)/day) administered by gavage over 15 days, while the C and O groups received the same volume of water every evening when the rats were treated. The dose of botryosphaeran was based on a previous study by our group (SILVA; COSTA; SOUZA; RIBEIRO *et al.*, 2018).

Botryosphaeran was produced by *B. rhodina* MAMB-05 under submerged fermentation conditions on sucrose (6%, w/v) medium, and isolated from the fermentation broth by ethanol precipitation (BARBOSA; STELUTI; DEKKER; CARDOSO *et al.*, 2003). Stock solutions of botryosphaeran (2.0 g/L) were prepared in distilled water, autoclaved at 121 °C for 20 min, and used to assess the biological activities on non-obese and obese *Wistar* female rats, by administering ~3 mL of botryosphaeran solution/rat/day by gavage.

The animals were weighed weekly during all experimental protocols (Figure 1). The intake of food, water, and calories were analyzed according to the protocol described by Silva *et al.* (2018) (SILVA; COSTA; SOUZA; RIBEIRO *et al.*, 2018). Accumulated feed intake, measured in grams and calories, was calculated by adding the total intake of each week to that of the previous weeks. This was repeated weekly, allowing for progressive monitoring of food consumption by each group.

The characterization of obesity was described by Ribeiro et al. (2022) (RIBEIRO; SILVA; GIORDANI; LIRA *et al.*, 2022). At the end of the 8th week, the rats were deprived of ration for 12 h, then weighed and euthanasia performed for each group. The rats were euthanized by cardiac puncture under anesthesia using a mixture of ketamine (113 mg/kg b.w.) and xylazine (7.4 mg/kg b.w.) and administering 0.15 mL/100 g b.w. intraperitoneally.

Blood samples collected through cardiac puncture using heparinized syringes were kept at 8 °C and followed by centrifugation (3,000 x *g*/15 min at room temperature). The plasma obtained was frozen at -80 °C, and used for the analysis of triglycerides, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-cholesterol), AST (aspartate transaminase), ALT (alanine transaminase) and creatinine; all of which were determined spectrophotometrically using specific commercial kits (Gold Analisa Diagnóstica®, Ltda., Belo Horizonte, MG, Brazil). The analyzes were performed using a Semi-Automatic Biochemical Analyzer model BC300 (Contec®, China).

The VLDL-cholesterol, LDL-cholesterol, atherogenic index and triglyceride-glucose (TyG) index, used to evaluate insulin resistance, were calculated as described by Silva et al. 2018 (MIRANDA-NANTES; FONSECA; ZAIA; DEKKER *et al.*, 2011; SILVA; COSTA; SOUZA; RIBEIRO *et al.*, 2018).

Total blood samples were collected in EDTA tubes for hemogram analysis (erythrogram, leukogram and platelet count), which was performed on an automatic hematology analyzer (XN-1000 from Sysmex®, Japan).

Tissue samples from the liver, adipose tissue, spleen, kidneys, adrenals, brain, heart, soleus muscle, and extensor digitorum longus (EDL) muscle were collected by dissection, washed with isotonic saline solution, dividing each of them for future analyses.

2.2 Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

The OGTT was conducted after the animals were fasted for 15 h. Blood samples were collected from the caudal vein. A glucose solution (0.5 g/mL) was administered via gavage at a dose of 2.5 g/kg of rat body weight. Blood samples were taken at 15, 30, 60, 90, and 120 min after glucose administration. Blood glucose was determined using the Glucometer and tips (ACCU-CHEK® ACTIVE, Roche Diabetes, Brazil) and results were analyzed according to the protocol described in Silva et al (2018)(SILVA; COSTA; SOUZA; RIBEIRO *et al.*, 2018).

2.3 Analysis of biochemical oxidative stress

To assess the effect of botryosphaeran treatment on oxidative stress, we determined the levels of up to eight biochemical parameters, enzymatic and non-enzymatic antioxidants, and biomarkers of lipid and protein damage.

Tissue samples (liver, muscle, adipose tissue, kidney, and heart) were homogenized in 50 mM potassium phosphate buffer (KPB) solution at pH 7.8, and the homogenate used for various biochemical assays.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were quantified using a method adapted from Buege and Aust (1978) (BUEGE; AUST, 1978) for measuring lipid peroxidation. Samples were treated with 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged for 15 min at 4250 rpm. After centrifugation and addition of 0.67% (w/v) thiobarbituric acid (TBA), samples were incubated at 100 °C for 10 min. The resulting pink solution was measured spectrophotometrically at 532 nm.

Protein carbonylation was determined following the method of Colombo et al., (2016) (COLOMBO; CLERICI; GARAVAGLIA; GIUSTARINI *et al.*, 2016) involving

derivation with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). Samples of 80 μL aliquots were pipetted into multi-welled microplates followed by the addition, in sequence, of 80 μL of 2.0 M HCl and 80 μL of 10 mM DNPH, and the plates incubated for 10 min in the dark. Subsequently, 40 μL of 6.0 M NaOH was added, and after another 10-min incubation, the absorbance was measured spectrophotometrically at 450 nm using a microplate reader (Biolisa Reader, Bioclin[®], Belo Horizonte, Brazil).

Superoxide dismutase (SOD) activity was assessed by the inhibition of oxidation of adrenaline and measured spectrophotometrically at 480 nm using a UV-VIS spectrophotometer according to Misra and Fridovich (1972) (MISRA; FRIDOVICH, 1972). The assay was performed by pipetting 1000 μL of 57.7 mM sodium carbonate buffer solution and 11 μL of adrenaline solution 60 mM into a cuvette, and the absorbance immediately read in a spectrophotometer. The absorbance of each sample was recorded at times 0 s and followed every 10 s up to 60 s.

Catalase activity was evaluated based on the principle of the decrease in absorbance of hydrogen peroxide (H_2O_2) at 240 nm due to its metabolism by catalase (NELSON; KIESOW, 1972). Catalase activity was measured at 240 nm spectrophotometrically, using 25 μL of the sample, 1000 μL of 50 mM phosphate buffer (PB) solution (pH 7.0), and 25 μL of 300 mM H_2O_2 , with readings taken every 15 s for upto 1 min.

Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured based on the quantification of NADPH consumption, through spectrophotometric readings at 340 nm measuring absorbance over a period of 1 min at 10-s intervals. The reaction involves the conversion of reduced glutathione (GSH) into oxidized glutathione (GSSG) by the action of GPx in the presence of H_2O_2 , followed by the reduction of GSSG back to GSH by the action of glutathione reductase (GR) through the consumption of NADPH

(PAGLIA; VALENTINE, 1967). The technique for determining glutathione S-transferase (GST) activity is based on the enzyme's ability to detoxify organic peroxides. For the determination of GST (HABIG; PABST; JAKOBY, 1974), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) is added, which, in the presence of glutathione, forms GS-dinitrobenzene (GS-DNB) that absorbs at 340 nm. GST activity was measured by incubating 25 μ L of homogenized samples with 1.25 mL of 20 mM PB solution (pH 6.5), 150 μ L of 10 mM reduced glutathione (GSH), and 75 μ L of 20 mM CDNB. The mixture was vortexed and incubated at 30 °C for 40 s. The absorbance was read at 340 nm on a spectrophotometer, and the activity of GST was calculated based on the formation of GS-DNB.

To determine ascorbic acid (ASA) levels, the samples were treated with 700 μ L of TCA (5%) and centrifuged. The resulting supernatant was then pipetted into tubes, where water, 13.3% TCA, and 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) had first been added. Samples were incubated at 37 °C for 3 h for the derivatization of ascorbic acid. Subsequently, the reaction was neutralized with 0.1 M sulfuric acid. The absorbance was measured at 520 nm to determine the concentration of ASA (ROE, 1954).

2.4. Data analysis

The results obtained were analyzed by a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by *Tukey's post hoc* tests. Additionally, for non-parametric data *Kruskal-Wallis* tests followed by *Dunn's post hoc* analysis was employed. A significance level of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Results were presented as mean $\pm$ standard deviation, or as median and interquartile (25 and 75%). The weight values were compared point by point using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni multiple comparison test for comparing more than two means. All

statistical analyses and graphs were performed using GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1 Characterization of obesity and analysis of feed intake by female rats

According to the results from the 1st to 8th week of the experimental protocol, the C and O groups were observed to progressively increase body weight gains. The body weight was noticeably higher in group O compared to the C group from the fifth week onwards (Figure 2). The consumption of food was substantially lower in the O group when compared to the C group ($p < 0.0001$), but there were no significant differences in water or calorie consumption (Figure 3).

Analyzing the data from the 6th to the 8th week of the experiment (15 days of treatment), the initial body weight was demonstrated to be significantly higher in the O and OB groups when compared to the C group (Figure 4A). The final body weights in the 8th week of the experiment were statistically higher in the O group compared to the C group, but the treatment with botryosphaeren was effective in significantly decreasing the body weights of the CB and OB groups of female rats when compared with the C and O rat groups, respectively, demonstrating a notable body mass loss after treatment with botryosphaeran for 15 days (Figure 4C). Furthermore, the body weight gains between the 15-day period were similar between C and O groups but were significantly lower in the CB and OB groups. Moreover, botryosphaeran significantly decreased retroperitoneal fat in the OB group when compared with the O group (Figure 4D).

Additionally, the results demonstrated that the O group exhibited higher levels of mesenteric, retroperitoneal and periovarian adipose tissue, as well as showing a

higher adiposity index than the C group (Table 1). Furthermore, botryosphaeran decreased total fat mass in the CB and OB groups by 17.5% and 22.7%, respectively, but the differences were not significant statistically (Table 1). The liver weights were higher in the O group than in the C group, suggesting that obesity-related liver enlargement was affected by the high-fat and high-sugar diet in the female rats. There were no observed differences in the weights of Soleus and EDL muscle tissues, nor in the kidneys, adrenal glands, spleen, brain, and heart tissue between the groups (Table 1).

In accordance with the feed intake, from the sixth to the eighth week of the experiment, similar outcomes were observed: there was no difference in the water and caloric intake between all of the groups. However, in the obese groups (O and OB) the consumption of food was significantly lower when compared to the control groups (C and CB) (Table 1). The cumulative food intake, in grams, however, showed a consistent rise. Nevertheless, the O group consumed significantly less ration than the C group ($p < 0.0001$). The cumulative caloric intake increased progressively without any significant differences between the groups (Figure 3).

3.2 Analysis of glucose tolerance in female rats

In the eighth week of the experiment, the OGTT was conducted after 15 h of fasting. The baseline glycemic level (T_0) did not differ between all groups. At 120 min after the glucose overload, the levels of glucose were: C 103.9; CB 98.7; O 114.0; and OB 104.5 mg/dL, which had returned to the baseline level. The obese group (O) had a significantly higher area under the curve (AUC, Figure 5) than the control group (C), demonstrating a decreased capacity to control the blood glucose level through pancreatic insulin secretion in the female rats, and, as a result, presented glucose

intolerance. This finding implies that diet-induced obesity had a negative impact on glucose metabolism. In contrast to the O group, the obese-treated female group (OB) experienced a significant reduction in AUC following treatment with botryosphaeran ($p < 0.05$), suggesting a marked improvement in glucose tolerance in this group of female rats (Figure 5).

3.3 Analysis of metabolic parameters of the female rats

According to the biochemical results, the levels of total cholesterol, triglycerides, LDL-cholesterol, and VLDL-cholesterol were significantly higher in the O group than the C group ($p < 0.001$). This may suggest damage to the lipid profile caused by the induced obesity in the female rats. Botryosphaeran treatment, however, significantly decreased these levels in the OB group, indicating a positive impact caused by the treatment with this specific fungal β -glucan and its effect on the metabolism of lipids. By contrast, no differences were observed in the levels of blood glucose, HDL-cholesterol, AST and ALT between the 4 different female rat groups (Table 2). Additionally, insulin resistance was confirmed by the TyG index value, which was significantly higher in the obese group than in the control group. The TyG index value significantly decreased following botryosphaeran treatment, indicating the improvement of insulin sensitivity in the treated obese animals. The atherogenic index was also significantly higher in the obese group compared to the control group; however, the treatment with botryosphaeran significantly decreased these levels (Table 2).

The CB and OB groups had significantly higher levels of creatinine than the C and O groups, respectively (Table 2), demonstrating that treatment with botryosphaeran increased the concentration of creatinine in the blood, which could

indicate that β -glucan bore an impact on renal function. Apparently neither obesity nor botryosphaeran treatment had a discernible effect on the hepatic function markers, as evidenced by the concentrations in the liver enzymes ALT and AST that did not differ significantly between the groups.

3.4 Analysis of the hematological parameters of the female rats

There were no statistically significant differences between the groups according to the hematological parameters analyzed, which showed that all values were within the reference ranges (MA; MÁZARO, 2004) for the *Wistar* female rats (Table 3).

3.5 Oxidative stress exhibited by the female rats

3.5.1 Antioxidant effect of botryosphaeran in liver tissue of non-obese and obese female rats

The obese group (O) of female rats had significantly higher levels of TBARS, an indicator of lipid peroxidation, than the control group (C). Botryosphaeran treatment, however, successfully reversed this parameter, decreasing significantly the TBARS levels in the treated OB group when compared to the O group (Table 4). This finding suggests that in the obese rats, botryosphaeran could protect against lipid peroxidation. The levels of carbonyl protein were significantly reduced by the treatment with botryosphaeran in the OB group as compared to the O group, providing additional evidence of its antioxidant potential in reducing oxidative stress in the liver.

The GPx activity was considerably lower in the OB group than in the O group, indicating that botryosphaeran may have regulated this enzyme's gene expression or activity as a protective mechanism in reaction to the animal's decreased levels of oxidative stress. The GST, SOD, CAT, and GST activities did not show any significant

differences between the four groups, as well as the levels of ASA and GSH (Table 4). These findings imply that botryosphaeran has a protective role in reducing oxidative stress in the female obese rats, primarily by reducing lipid oxidation.

3.5.2 Antioxidant effect of botryosphaeran in adipose tissue of non-obese and obese female rats

When comparing the O group to the C group, the TBARS levels revealed a significant drop. Between the groups, there was no large variation in the amounts of protein carbonylation. Catalase activity was significantly lower in the CB group compared to the C group, while the O group had significantly higher GST activity than the C group. When compared to the C and O groups, the animals treated with botryosphaeran (CB and OB) exhibited considerably higher levels of ASA. As there was no significant difference observed in the obese groups, GPx activity was significantly lower in the CB group compared to the C group. There were no statistical variations in the groups on the GSH levels and SOD activity (Table 5).

3.5.3 Antioxidant effect of botryosphaeran in muscle tissue of non-obese and obese female rats

The oxidative stress indicators in muscle tissue shows that the TBARS levels in the CB group were considerably lower than those of the C group due to the treatment with botryosphaeran, showing a decrease in lipid peroxidation. In comparison to the C group, there was a notable increase in protein carbonyls, a marker of oxidative damage to proteins, in the CB group (Table 6). The O group had significantly higher CAT activity than the C group, which is an important antioxidant defense enzyme and may be an adaptive response to increased oxidative stress brought on by obesity. Intriguingly, the CB group exhibited a significantly higher level of CAT activity than the C group, which

may be part of the mechanistic action of botryosphaeran in non-obese rats involving stimulating catalase activity. Regarding the GST and GPx activities, no differences were noted between the groups (Table 6).

3.5.4 Antioxidant effect of botryosphaeran in kidney tissue of non-obese and obese female rats

The kidney TBARS levels showed a significant reduction in the OB group compared to the O group, suggesting an effect of botryosphaeran on this parameter. Protein carbonylation also decreased significantly in the OB group, indicating reduced oxidative damage to proteins. GPx activity was significantly higher in the OB group, while in the CB group the activity was some 45.8% higher than in the C group. No significant differences were observed in SOD, CAT, and GST activities, and GSH and ascorbic acid levels (Table 7).

3.5.5 Antioxidant effect of botryosphaeran in striated cardiac muscle tissue of non-obese and obese female rats

No statistical difference was observed in any pro- or antioxidant markers evaluated in the female animals' hearts (Table 8).

4. Discussion

From the analyzes of the data on the Wistar female rats obtained in this study, we observed that the obese animals displayed elevated levels of lipid deposition, hepatomegaly, insulin resistance, glucose intolerance, dyslipidemia, and oxidative stress. These findings were supported by the diet (combination of high-fat and high-sugar) to induce the obesity model of the female rats studied. Botryosphaeran

significantly reduced retroperitoneal adipose tissue, corrected glucose intolerance, improved insulin sensitivity, and promoted hypocholesterolemic and antioxidant effects.

These outcomes confirm that the disturbances in metabolism can be a connection to that of the human obesity condition in the experimental model of the female rats used in our study, which were successfully reproduced, and characterized the basic manifestations of obesity and its consequences. This study also revealed that metabolic syndrome (MS) characterized by obesity, hyperglycemia, insulin resistance, and dyslipidemia in the female rats was effectively modelled by a high-fat high-sugar diet (ZHANG; KONG; JING; ZHOU *et al.*, 2022).

The accumulation of adipose tissue, particularly visceral fat, is a cause for comorbidities such as insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and hepatic steatosis (GOOSSENS, 2017). Besides storage of energy, adipose tissue is also an endocrine organ which secretes pro-inflammatory cytokines and adipokines that increases low-grade inflammation typical of obesity (MANNA; JAIN, 2015). Inflammation causes increased oxidative stress as observed in our study that arose from the female rats fed a high-fat and high-sugar diet. The increased inflammation experienced produced elevated levels of ROS, while the antioxidant defenses declined. This can cause problems for the cell and its metabolism, possibly influenced by female hormones as progesterone and estrogen, that can influence mitochondrial activity and enzyme function.

Previous investigations from our lab on obese and non-obese Wistar male rats revealed that dietary-induced obesity increased body weights of the animals, increased adiposity, and fat deposits in the obese male rats as compared to the control animals (SILVA; COSTA; SOUZA; RIBEIRO *et al.*, 2018). Further work using an equivalent diet

also confirmed the finding where the male rats gained significant amounts of weight, and alterations in the lipid profiles were observed (COMIRAN; RIBEIRO; SILVA; MARTINS *et al.*, 2020; FERIANI; BIZZARRI; TIR; ALDAWOOD *et al.*, 2021) (Table 9). The female rats of the obese group in the present study exhibited higher body weights, a higher adiposity index and increased fat storage (periovarian, retroperitoneal and mesenteric fat gain) with no corresponding higher caloric intake when compared to the control group. This observation means that distribution and the kind of food consumed, other than the energy intake content, affected obesity and fat deposition in the obese female rats.

Concerning the effects of treatment with botryosphaeran, this particular β -glucan impacted significantly on the anti-obesity condition of the female rats, according to our research. The treatment with botryosphaeran reduced body weight gain and fat in the obese female rats, particularly in retroperitoneal adipose tissue (Figure 4D). This observation demonstrates that botryosphaeran can decrease visceral fat storage, a critical feature of obesity based on its ability to enhance insulin tolerance and normalize dyslipidemia.

Our findings demonstrate that the obesity model of the female rats induced by the high-fat and high-sugar diet, and treatment with botryosphaeran, appears to bestow a potential therapeutic effect on managing the animal's body-weight gains.

Botryosphaeran treatment was found to be effective in improving glucose tolerance in the OB female rat group during OGTT, indicating that this β -glucan may be helpful in the management of glycemia including type 2 diabetes mellitus. Moreover, botryosphaeran reduced the total cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol, and triglyceride levels, thereby improving dyslipidemia.

In diabetic male rats, and male rats fed on a high-lipid diet, botryosphaeran also demonstrated hypoglycemia and hypocholesterolemia (MIRANDA-NANTES; FONSECA; ZAIA; DEKKER *et al.*, 2011). Besides immunomodulatory activities, studies (DOS SANTOS; CURY; FERRAZ; CORRENTE *et al.*, 2018; JESCH; CARR, 2017; KOROLENKO; BGATOVA; OVSYUKOVA; SHINTYAPINA *et al.*, 2020) have reported the effects of β -glucans on hypocholesterolemic activity; the ability to lower cholesterol levels. This effect is caused by several factors, among which are suppression of cholesterol synthesis, displacement of cholesterol from micelles, cholesterol binding or precipitation, inhibition of cholesterol digestive enzymes, and the ability of bile acids to participate in the formation of micelles and their excretion in the feces (DOS SANTOS; CURY; FERRAZ; CORRENTE *et al.*, 2018; JESCH; CARR, 2017; KOROLENKO; BGATOVA; OVSYUKOVA; SHINTYAPINA *et al.*, 2020).

The effects of β -glucans on lipid levels have been studied widely in animal models (WOUK; DEKKER; QUEIROZ; BARBOSA-DEKKER, 2021). β -Glucans extracted from barley (cereal β -glucans of mixed linkages of the (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 4) type) have been reported to greatly reduce cholesterol levels in hyperlipidemic hamsters by inhibiting hydroxyl-methyl-glutaryl-CoA reductase (HMG-CoA), an important enzyme in cholesterol biosynthesis (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). Similarly, the culinary mushroom, *Grifola frondosa* (Maitake) containing large amounts of β -glucan of the (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) type, could reduce the levels of total cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol, and triglycerides (TADA; ADACHI; ISHIBASHI; OHNO, 2009).

Moreover, as noted in our study on the OB female rats' group, the possibility of an effect of β -glucans lowering the glycemic index of food, and slow gastric emptying thus reducing the absorption of glucose in the intestine, improved insulin sensitivity and glucose tolerance. The findings of our study suggest that botryosphaeran can

serve as an agent to treat dyslipidemia and glucose intolerance, allowing this natural product to treat obesity-related conditions (WOUK; DEKKER; QUEIROZ; BARBOSA-DEKKER, 2021). These results demonstrated the potential therapeutic benefit of botryosphaeran as a modulator of glucose metabolism in obesity.

Due to botryosphaeran's antioxidant properties (GIESE; GASCON; ANZELMO; BARBOSA *et al.*, 2015), the treatment of the female rats with botryosphaeran, lowered oxidative stress and consequently, increased liver function, as well as improving the regulation of lipid metabolism.

Obesity is closely related to insulin resistance, and the TyG index (index for insulin resistance) observed was significantly higher in the female obese rats than in the control group. The TyG index was reduced by botryosphaeran as expected and suggests that this fungal exopolysaccharide may play an important physiological role in insulin sensitivity (RAMDAS NAYAK; SATHEESH; SHENOY; KALRA, 2022). Hypertriglyceridemia that was observed in the obese female rats should result in changing the oxidant-antioxidant state, meaning that the availability of fatty acids to induce peroxidation in the liver and other tissues may be enhanced.

Research has demonstrated that natural enzymes can prevent obesity by altering several pathways involved in fat production, including the production of peroxisome proliferated-activated receptor-*gamma* (PPAR- γ). This effect appears to occur through increased PPAR- γ levels that stimulate brown adipose tissue while at the same time reducing the accumulation of stored lipids and increasing basal metabolism (LI; XUE; PANG; LEN *et al.*, 2019).

In accordance with the hematological analysis, it was observed that there were no statistically significant differences between the groups according to the hematological parameters analyzed (Table 3). This observation implies that the

animals were healthy throughout the experimental period conducted, and did not exhibit any signs of infection, anemia, or other hematological variations. Basically, the data supports the safety of the intervention in preserving the health of the female rat groups, by showing that neither the treatment with botryosphaeran nor the induction of obesity had any negative impact on the hematological profile in these rats (Table 3).

Besides the metabolic effects exerted by botryosphaeran, female rats treated with this specific β -glucan exhibited antioxidant effects on oxidative stress in various tissues and there was a significant decrease in the MDA levels and in protein carbonylation, as well as an increase in ascorbic acid concentration. The antioxidant properties of β -glucans have been reported by Giese et al. (2015) (GIESE; GASCON; ANZELMO; BARBOSA *et al.*, 2015). Botryosphaeran demonstrated high hydroxyl radical scavenging capacity (90.6%), and scavenging of superoxide anion radical and hydrogen peroxide by 37% and 38%, respectively. This activity is thought to be attributable to its hydroxyl groups along the (1 $\rightarrow$ 3)-linked backbone chain and its branching substituents comprising glucose and gentiobiose via (1 $\rightarrow$ 6) linkages (GIESE; GASCON; ANZELMO; BARBOSA *et al.*, 2015).

Our study is the first to demonstrate the major effects of botryosphaeran, a fungal exopolysaccharide of the (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)-linked β -D-glucan type, in female Wistar rats; and its anti-obesogenic, antioxidant, insulin sensitising, and hypocholesterolemic properties. It is important to highlight that weight loss and the reduction of retroperitoneal adipose tissue were more pronounced in female than in male rats. Additionally, the hypocholesterolemic effect observed in females was even better compared to that previously demonstrated in males. In females, both triglycerides and total cholesterol, as well as all other lipoproteins, were normalized after treatment with botryosphaeran. Moreover, the correction of total cholesterol and LDL-cholesterol

levels occurred exclusively in females compared to what we observed in Wistar male rats (RIBEIRO; SILVA; GIORDANI; LIRA *et al.*, 2022; SILVA; COSTA; SOUZA; RIBEIRO *et al.*, 2018). Also, the reduction in protein carbonylation in the liver was observed only in the female rats. Besides, an increase in ascorbic acid levels in adipose tissue was detected solely in females (DA SILVA; GERALDELLI; MARTINS; BRAGA *et al.*, 2022). These results suggest that β -glucans can regulate lipid metabolism and are useful in the treatment of related dyslipidemias, highlighting botryosphaeran as a promising therapeutic candidate for obesity and comorbidities. Some of the activities manifested by botryosphaeran in the female rats differed from those exhibited by Wistar male rats are shown in Table 9.

5. Conclusion

The data presented in our study shows that the high-fat/high-sugar diet induced obesity in the female rat animals and resulted in several metabolic changes. Treatment with botryosphaeran showed that this β -glucan appeared to be a good candidate to mitigate the detrimental impacts of obesity on body weight and glucose tolerance. Regarding oxidative stress, botryosphaeran exerted a protective effect against lipid peroxidation and protein carbonylation in a variety of tissues, confirming its effect on oxidative damage. Botryosphaeran treatment exhibited a greater anti-obesogenic and anti-oxidant effect on the Wistar female rats (Figure 6) compared to male rats from previous studies of our research group (SILVA; COSTA; SOUZA; RIBEIRO *et al.*, 2018) (RIBEIRO; SILVA; GIORDANI; LIRA *et al.*, 2022) (Table 9). This effect implicates the potential of botryosphaeran as an attractive natural product for controlling obesity and its comorbidity, diabetes and dyslipidemia, which constitutes a global public health issue.

Acknowledgements

The authors are grateful to CAPES (proc. nº. 23108.008665/2024-44 – Isabelle Zanata Fabiane), and Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT (proc. nº 23108.059871/2024-12 – Delcio Francisco Chagas Netto, proc. nº 138738/2024-6 – Francine Nunes Ferreira, proc. nº 23108.059915/2024-12 – Sabrina Leticia Bubans Junges) for post-graduate scholarships. The authors gratefully acknowledge the excellent technical assistance of Morenna Alana Giordani and Cleberson Lira of UFMT. The authors also gratefully acknowledge the excellent technical assistance of the team at Laboratórios Integrados de Pesquisas em Ciências Químicas (LiPEQ) for the biochemical analyses.

Conflict of interest

None of the authors have a personal or financial conflict of interest.

Authorship

All authors have read and approved of the final manuscript.

References

- [1] Peral-Sanchez I, et al. Epigenetics in the Uterine Environment: How Maternal Diet and ART May Influence the Epigenome in the Offspring with Long-Term Health Consequences. *Genes (Basel)*, 2021, 13(1)
- [2] Vecchié A, et al. Obesity phenotypes and their paradoxical association with cardiovascular diseases. *Eur J Intern Med*, 2018, 48: 6-17
- [3] Dong H, et al. Regulatory effects and mechanisms of exercise on activation of brown adipose tissue (BAT) and browning of white adipose tissue (WAT). *Adipocyte*, 2023, 12(1): 2266147
- [4] Maniyadath B, et al. Adipose tissue at single-cell resolution. *Cell Metab*, 2023, 35(3): 386-413
- [5] Li X, et al. Adipose tissue macrophages as potential targets for obesity and metabolic diseases. *Front Immunol*, 2023, 14: 1153915

- [6] Reyes-Farias M, et al. White adipose tissue dysfunction in obesity and aging. *Biochem Pharmacol*, 2021, 192: 114723
- [7] Purdy JC and Shatzel JJ. The hematologic consequences of obesity. *Eur J Haematol*, 2021, 106(3): 306-19
- [8] Shapouri-Moghaddam A, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6425-40
- [9] Kumari M, et al. Regulation of immunometabolism in adipose tissue. *Semin Immunopathol*, 2018, 40(2): 189-202
- [10] Zatterale F, et al. Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Front Physiol*, 2019, 10: 1607
- [11] Kawai T, et al. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2021, 320(3): C375-c91
- [12] Al-Shehri SS. Reactive oxygen and nitrogen species and innate immune response. *Biochimie*, 2021, 181: 52-64
- [13] Brieger K, et al. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*, 2012, 142: w13659
- [14] Sahoo BM, et al. Reactive Oxygen Species (ROS): Key Components in Cancer Therapies. *Anticancer Agents Med Chem*, 2022, 22(2): 215-22
- [15] Zhang B, et al. Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation. *Redox Rep*, 2022, 27(1): 45-52
- [16] Sies H and Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(7): 363-83
- [17] Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*, 2014, 224: 164-75
- [18] Liu T, et al. Imbalanced GSH/ROS and sequential cell death. *J Biochem Mol Toxicol*, 2022, 36(1): e22942
- [19] André-Lévigne D, et al. Reactive Oxygen Species and NOX Enzymes Are Emerging as Key Players in Cutaneous Wound Repair. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10)
- [20] Jomova K, et al. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. *Arch Toxicol*, 2024, 98(5): 1323-67
- [21] Wang J, et al. Reviews on Mechanisms of In Vitro Antioxidant Activity of Polysaccharides. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 5692852

- [22] Dekker RFH, et al. Botryosphaeran – A Fungal Exopolysaccharide of the (1→3)(1→6)-β-D-Glucan Kind: Structure and Biological Functions. Extracellular Sugar-Based Biopolymers Matrices, 2019: 433-84
- [23] Queiroz EAlF, et al. Roles of β-Glucans in Oxidative Stress and Cancer//Chakraborti S, BK Ray and S Roychowdhury. Handbook of Oxidative Stress in Cancer: Mechanistic Aspects. Singapore: Springer Singapore, 2020: 1-19
- [24] Wouk J, et al. β-Glucans as a panacea for a healthy heart? Their roles in preventing and treating cardiovascular diseases. Int J Biol Macromol, 2021, 177: 176-203
- [25] Barbosa AM, et al. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3;1→6)-beta-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, Botryosphaeria sp. Carbohydr Res, 2003, 338(16): 1691-8
- [26] Giese EC, et al. Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other β-D-glucans. Int J Biol Macromol, 2015, 72: 125-30
- [27] da Silva TP, et al. Antioxidant, anti-inflammatory and beneficial metabolic effects of botryosphaeran [(1→3)(1→6)-β-d-glucan] are responsible for its anti-tumour activity in experimental non-obese and obese rats bearing Walker-256 tumours. Cell Biochem Funct, 2022
- [28] Comiran PK, et al. Botryosphaeran Attenuates Tumor Development and the Cancer Cachexia Syndrome in Walker-256 Tumor-Bearing Obese Rats and Improves the Metabolic and Hematological Profiles of These Rats. Nutr Cancer, 2020, 73(7): 1175-92
- [29] Dalonso N, et al. β-(1→3),(1→6)-Glucans: medicinal activities, characterization, biosynthesis and new horizons. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(19): 7893-906
- [30] Carloto ACM, et al. Botryosphaeran, [(1 → 3)(1 → 6)-beta-D-glucan], induces apoptosis-like death in promastigotes of Leishmania amazonensis, and exerts a leishmanicidal effect on infected macrophages by activating NF-kB and producing pro-inflammatory molecules. Chem Biol Interact, 2022, 351: 109713
- [31] Silva TP, et al. Antioxidant, anti-inflammatory and beneficial metabolic effects of botryosphaeran [(1→3)(1→6)-β-d-glucan] are responsible for its anti-tumour activity in experimental non-obese and obese rats bearing Walker-256 tumours. Cell Biochem Funct, 2022

- [32] Dalonso N, et al. β -(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-Glucans: medicinal activities, characterization, biosynthesis and new horizons. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(19): 7893-906
- [33] Geraldelli D, et al. Botryosphaeran, a (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan, reduces tumor development and cachexia syndrome in obese male rats by increasing insulin sensitivity and FOXO3a activity. *Int J Biol Macromol*, 2020, 165(Pt A): 985-94
- [34] Geraldelli D, et al. Tumor development in rats and cancer cachexia are reduced by treatment with botryosphaeran by increasing apoptosis and improving the metabolic profile. *Life Sci*, 2020, 252: 117608
- [35] Silva AZ, et al. Botryosphaeran reduces obesity, hepatic steatosis, dyslipidaemia, insulin resistance and glucose intolerance in diet-induced obese rats. *Life Sci*, 2018, 211: 147-56
- [36] Ribeiro MC, et al. Extended treatment with (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)-beta-d-glucan (Botryosphaeran) reduces obesity and its comorbidities in high-fat/high-sugar diet-fed rats. *Cell Biochem Funct*, 2022, 40(7): 773-83
- [37] Miranda-Nantes CC, et al. Hypoglycemic and Hypocholesterolemic Effects of Botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 in Diabetes-Induced and Hyperlipidemia Conditions in Rats. *Mycobiology*, 2011, 39(3): 187-93
- [38] Buege JA and Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 1978, 52: 302-10
- [39] Colombo G, et al. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1019: 178-90
- [40] Misra HP and Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 1972, 247(10): 3170-5
- [41] Nelson DP and Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem*, 1972, 49(2): 474-8
- [42] Paglia DE and Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 1967, 70(1): 158-69
- [43] Habig WH, et al. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 1974, 249(22): 7130-9

- [44] Roe JH. Chemical determination of ascorbic, dehydroascorbic, and diketogulonic acids. *Methods Biochem Anal*, 1954, 1: 115-39
- [45] MA G and Máزارo R. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação (Ethical and practical principles of the use of experimental animals). Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, 2004
- [46] Zhang N, et al. Hongqu Rice Wines Ameliorate High-Fat/High-Fructose Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats. *Alcohol Alcohol*, 2022, 57(6): 776-87
- [47] Goossens GH. The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obes Facts*, 2017, 10(3): 207-15
- [48] Manna P and Jain SK. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. 2015, 13(10): 423-44
- [49] Feriani A, et al. High-fat diet-induced aggravation of cardiovascular impairment in permethrin-treated Wistar rats. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 222: 112461
- [50] Dos Santos KC, et al. Recovery of Cardiac Remodeling and Dysmetabolism by Pancreatic Islet Injury Improvement in Diabetic Rats after Yacon Leaf Extract Treatment. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 1821359
- [51] Jesch ED and Carr TP. Food Ingredients That Inhibit Cholesterol Absorption. *Prev Nutr Food Sci*, 2017, 22(2): 67-80
- [52] Korolenko TA, et al. Hypolipidemic Effects of β -Glucans, Mannans, and Fucoidans: Mechanism of Action and Their Prospects for Clinical Application. *Molecules*, 2020, 25(8)
- [53] Synytsya A and Novák M. Structural diversity of fungal glucans. *Carbohydr Polym*, 2013, 92(1): 792-809
- [54] Tada R, et al. An unambiguous structural elucidation of a 1,3- β -d-glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa* by solution NMR experiments. *Carbohydr Res*, 2009, 344(3): 400-4
- [55] Ramdas Nayak VK, et al. Triglyceride Glucose (TyG) Index: A surrogate biomarker of insulin resistance. *J Pak Med Assoc*, 2022, 72(5): 986-8
- [56] Li X, et al. Agaricus bisporus-derived β -glucan prevents obesity through PPAR γ downregulation and autophagy induction in zebrafish fed by chicken egg yolk. *Int J Biol Macromol*, 2019, 125: 820-8

Figure legends

Figure 1. Schematic representation of the experimental protocol for treatment of female Wistar rats with botryosphaeran and parameters evaluated. C = Control Group, CB = Botryosphaeran + Control Group, O = Obese Group, and OB = Obese + Botryosphaeran Group.

Figure 2. Body weight evaluations of the female rats in groups: Control (C), Botryosphaeran Control Group (CB), Obese Group (O) and Obese Botryosphaeran Group (OB) between the 1st and 8th week of the experimental protocol. Statistical analysis was performed using Two-way ANOVA, followed by the Bonferroni multiple comparison test. * $p < 0.05$ vs. C.

Figure 3. Comparison of food (A), water (B), and calorie intake (C), as well as the cumulative values for each category, between 1st and 8th weeks of the experimental protocol of the female rats. Groups: Control (C), Botryosphaeran Control Group (CB), Obese Group (O) and Obese Botryosphaeran Group (OB). Statistical analysis was performed using Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's multiple comparison test. ** $p < 0.0001$ vs. C.

Figure 4. Initial body weight (6th week) (A) and final body weight (8th week) (B), as well as weight gain between the 6th and 8th weeks (C), and retroperitoneal adipose tissue (D) of animals from the Control (C), Botryosphaeran + Control Group (CB), Obese Group (O) and Obese + Botryosphaeran Group (OB) groups for the female rats. Results are presented as mean $\pm$ standard deviation. Statistical analysis was performed using Two-way ANOVA, followed by *Tukeys* multiple comparison test. * $p < 0.05$ vs C; ** $p < 0.001$ vs C; # $p < 0.05$ vs O.

Figure 5. Glycemic curve (A) and area under the curve (B) obtained through the oral glucose tolerance test (OGTT) for the Control (C), Botryosphaeran + Control Group (CB), Obese Group (O) and Obese + Botryosphaeran Group (OB) groups for the female rats. Results are presented as mean $\pm$ standard deviation. Statistical analysis was performed using Two-way ANOVA, followed by *Tukeys* multiple comparison test. ** $p < 0.001$ vs C; # $p < 0.05$ vs O.

Figure 6. Schematic representation of the effects of botryosphaeran treatment in the obese Wistar female rats.

Tables

Table 1. Biological parameters evaluated

	C n = 8	CB n = 8	O n = 8	OB n = 8
Adiposity index (x100)	3.22 ± 0.98	2.80 ± 0.40	7.65 ± 1.50**	6.48 ± 1.56
Periovarian adipose tissue (g)^a	1.96 (1.57; 2.46)	2.82 (2.52;3.40)	5.90** (4.59; 8.08)	5.43 (4.93; 6.79)
Mesenteric adipose tissue (g)	1.33 ± 0.38	1.07 ± 0.21	3.46 ± 0.80**	2.83 ± 1.12
Total adipose tissue (g)	7.10 ± 2.02	5.86 ± 1.03	19.8 ± 5.11**	15.3 ± 4.39*
Soleus muscle (g)^a	0.090 (0.08; 0.10)	0.090 (0.08; 0.10)	0.100 (0.09; 0.10)	0.105 (0.10; 0.11)
EDL muscle (g)^a	0.080 (0.08;0.09)	0.095 (0.06;0.10)	0.080 (0.07;0.09)	0.085 (0.08;0.09)
Liver (g)	6.22 ± 0.46	6.36 ± 0.55	7.13 ± 0.64*	6.50 ± 0.50
Kidneys (g)	1.45 ± 0.11	1.40 ± 0.08	1.46 ± 0.10	1.36 ± 0.07
Adrenals (mg)	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.03	0.06 ± 0.01
Spleen (g)	0.51 ± 0.07	0.52 ± 0.07	0.49 ± 0.05	0.50 ± 0.04
Brain (g)	1.71 ± 0.16	1.75 ± 0.04	1.71 ± 0.11	1.64 ± 0.12
Heart (g)	0.73 ± 0.09	0.73 ± 0.06	0.78 ± 0.07	0.80 ± 0.06
Food intake (g/day/rat) ^b	16.8 ± 1.02	14.4 ± 0.02	5.92 ± 0.94**	5.42 ± 0.35**
Water intake (mL/day/rat) ^b	31.1 ± 3.84	26.6 ± 0.03	29.3 ± 10.9	26.8 ± 6.36
Calories intake (kcal/day/rat) ^b	63.4 ± 3.84	55.0 ± 0.05	66.2 ± 20.6	57.5 ± 10.3

Groups: Control (C), Control + Botryosphaeran (CB), Obese (O), Obese + Botryosphaeran (OB). Results analyzed by ANOVA are presented as the mean ± standard deviation. Each sample was measured in duplicate or triplicate. Two-way ANOVA followed by *Tukeys post-hoc* test. ^a Analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's *post-hoc* analysis, the values are expressed as the median and interquartile (25% and 75%). %. ^b Average consumption between 6th and 8th weeks. * $p < 0.05$ vs C; ** $p < 0.01$ vs. C; & $p < 0.05$ vs. CB; # $p < 0.05$ vs. O.

Table 2. Serum biochemical parameters

	C n = 8	CB n = 8	O n = 8	OB n = 8
Glucose (mg/dL)	113.8 ± 9.57	103.1 ± 17.7	102.8 ± 8.74	103.8 ± 10.7
Triglycerides (mg/dL)	50.9 ± 6.35	43.9 ± 5.30	71.8 ± 14.9**	56.5 ± 9.72 [#]
Total cholesterol (mg/dL)	76.0 ± 5.28	69.8 ± 5.29	104.8 ± 22.1**	77.2 ± 11.8 [#]
HDL-cholesterol (mg/dL)	29.8 ± 10.4	36.5 ± 9.77	23.0 ± 10.3	30.2 ± 11.6
LDL-cholesterol (mg/dL)	34.7 ± 4.41	27.0 ± 11.2	63.3 ± 14.6**	41.7 ± 17.8 [#]
VLDL-cholesterol (mg/dL)	10.1 ± 1.27	8.78 ± 1.06	14.3 ± 2.98**	11.6 ± 2.02 [#]
Atherogenic index	0.23 ± 0.11	0.09 ± 0.02	0.59 ± 0.13**	0.30 ± 0.18 [#]
Creatinine (mg/dL)	0.63 ± 0.03	0.84 ± 0.11**	0.66 ± 0.02	0.70 ± 0.06 ^{&}
ALT (mg/dL)	43.2 ± 15.1	34.6 ± 6.3	37.9 ± 10.1	46.3 ± 7.98
AST (mg/dL)	99.1 ± 13.3	111.9 ± 48.0	77.0 ± 12.1	98.2 ± 18.3
TyG value	8.03 ± 0.15	7.64 ± 0.20	8.26 ± 0.25*	7.98 ± 0.23 [#]

Groups: Control (C), Control + Botryosphaeran (CB), Obese (O), Obese + Botryosphaeran (OB). Results analyzed by ANOVA are presented as the mean ± standard deviation. Each sample was measured in duplicate or triplicate. Two-way ANOVA followed by *Tukeys post-hoc* test. ^a Analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's *post-hoc* analysis, the values are expressed as the median and interquartile (25% and 75%). ALT; Alanine aminotransferase. AST; Aspartate aminotransferase. TyG; Triglyceride-Glucose Index. * $p < 0.05$ vs. C; ** $p < 0.01$ vs. C; & $p < 0.05$ vs. CB; # $p < 0.05$ vs. O.

Table 3. Serum hematological parameters

	C n = 8	CB n = 8	O n = 8	OB n = 8	Reference values (MA; MÁZARO, 2004)
Erythrocytes (million/mm ³)	7.18 ± 0.29	7.11 ± 0.48	7.30 ± 0.17	7.12 ± 0.46	5.21 – 8.83
Hemoglobin (g/dL)	13.4 ± 0.31	12.9 ± 0.76	13.4 ± 0.20	12.9 ± 0.63	11.1 – 17.1
Hematocrit (%)	39.84 ± 1.52	39.83 ± 3.07	40.09 ± 0.65	38.62 ± 2.49	27.2 – 48.5
MCV^a (fL)	55 (54;55)	56 (54;57)	55 (54;55,7)	54 (54; 55)	45.0 – 56.7
MCH (g/dL)	33.85 ± 0.70	32.58 ± 0.80	33.38 ± 2.30	33.60 ± 0.86	30.4 – 43.9
WBC (/mm ³)	5040 ± 1250	4090 ± 808	4955 ± 1412	5396 ± 1385	2300 – 9900
Neutrophils (/mm ³)	1004 ± 199	859 ± 261	1204 ± 392	1129 ± 408	69 – 4554
Lymphocytes (/mm ³)	3351 ± 1439	2828 ± 692	3337 ± 984	3738 ± 968	1216 – 18.050
Monocytes (/mm ³)	380 ± 321	372 ± 245	371 ± 341	466 ± 225	23 – 1336
Platelets (/mm ³)	956.9 ± 75.2	809.1 ± 305	885.4 ± 191	911.7 ± 34.5	760 – 1313

Groups: Control (C), Control + Botryosphaeran (CB), Obese (O), Obese + Botryosphaeran (OB). Results analyzed by ANOVA are presented as the mean ± standard deviation. Each sample was measured in duplicate or triplicate. Two-way ANOVA followed by *Tukeys post-hoc* test. ^a Analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's *post-hoc* analysis, the values are expressed as the median and interquartile (25% and 75%). MCV = Mean corpuscular volume. MCH = Mean corpuscular hemoglobin. WBC = White blood cells.

Table 4. Oxidative stress parameters in liver tissue.

	C n = 8	CB n = 8	O n = 8	OB n = 8
Liver Tissue				
TBARS (nmol MDA/mg protein)	0.138 ± 0.04	0.159 ± 0.07	0.287 ± 0.12**	0.131 ± 0.03 [#]
Carbonyl (nmol carbonyl/mg protein)	4.87 ± 1.73	4.82 ± 3.27	6.90 ± 2.06	3.95 ± 2.10
SOD (units/mg protein)	5.49 ± 1.55	5.60 ± 1.52	6.41 ± 1.60	5.80 ± 1.71
CAT^a (μmol/min/mg protein)	176.4 (169.4;297.7)	217.8 (177.3;274.1)	242.3 (196.8;323.4)	210.6 (196.2;260.5)
GPx (μmol/min/mg protein)	9.83 ± 2.31	7.43 ± 2.99	9.02 ± 3.59	4.66 ± 1.77 [#]
GST (μmol GS-DNB/min/mg protein)	439.8 ± 92.4	305.9 ± 129.7	468.7 ± 183.0	399.1 ± 186.3
GSH (μmol GSH/mg protein)	62.6 ± 25.4	54.0 ± 28.0	63.7 ± 21.8	55.1 ± 21.7
ASA (μmol ASA/g tissue)	1.17 ± 0.69	1.29 ± 0.95	0.87 ± 0.59	1.37 ± 0.51

Groups: Control (C), Control + Botryosphaeran (CB), Obese (O), Obese + Botryosphaeran (OB). Results analyzed by ANOVA are presented as the mean ± standard deviation. Each sample was measured in duplicate or triplicate. Two-way ANOVA followed by *Tukeys post-hoc* test. ^a Analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's *post-hoc* analysis, the values are expressed as the median and interquartile (25% and 75%). ** *p* < 0.01 vs. C; # *p* < 0.05 vs. O.

Table 5. Oxidative stress parameters in adipose tissue.

	C n = 8	CB n = 8	O n = 8	OB n = 8
Adipose Tissue				
TBARS (nmol MDA/mg protein)	1.92 ± 1.05	1.18 ± 0.86	0.68 ± 0.30*	0.67 ± 0.43
Carbonyl (nmol carbonyl/mg protein)	255.3 ± 41.6	213.4 ± 15.8	229.8 ± 73.3	238.2 ± 48.3
SOD (units/mg protein)	74.0 (46.0;83.2)	50.2 (31.5;79.9)	57.6 (31.0;98.2)	58.2 (46.0;80.1)
CAT (µmol/min/mg protein)	54.1 ± 14.6	30.8 ± 8.18*	44.9 ± 17.5	28.6 ± 12.8
GPx (µmol/min/mg protein)	10.34 ± 5.55	4.54 ± 2.99*	7.87 ± 3.56	5.76 ± 3.20
GST (µmol GS-DNB/min/mg protein)	201.3 ± 27.6	252.4 ± 82.3	325.9 ± 47.1**	237.1 ± 71.9
GSH^a (µmol GSH/mg protein)	1252 (515.5;1819)	547.8 (457.7;1104)	1175 (594.8;1721)	583.6 (347.6;1743)
ASA (µmol ASA/g tissue)	0.071 ± 0.04	0.134 ± 0.03*	0.025 ± 0.02	0.088 ± 0.03 [#]

Groups: Control (C), Control + Botryosphaeran (CB), Obese (O), Obese + Botryosphaeran (OB). Results analyzed by ANOVA are presented as the mean ± standard deviation. Each sample was measured in duplicate or triplicate. Two-way ANOVA followed by *Tukeys post-hoc* test. ^a Analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's *post-hoc* analysis, the values are expressed as the median and interquartile (25% and 75%). * *p* < 0.05 vs. C; ** *p* < 0.01 vs. C; [#] *p* < 0.05 vs. O.

Table 6. Oxidative stress parameters in muscle tissue.

	C	CB	O	OB
	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8
Muscle Tissue				
TBARS (nmol MDA/mg protein)	4.55 ± 0.98	2.89 ± 1.06*	4.92 ± 1.03	3.71 ± 0.44
Carbonyl (nmol carbonyl/mg protein)	172.7 ± 8.22	212.8 ± 49.9*	191.1 ± 19.2	181.6 ± 18.0
GST (μmol GS-DNB/min/mg protein)	1059 ± 93.1	1194 ± 249.9	1155 ± 168.6	1100 ± 101.0
GPx (μmol/min/mg protein)	23.1 ± 4.57	18.6 ± 1.86	20.1 ± 4.41	21.7 ± 5.99
CAT (μmol/min/mg protein)	27.1 ± 4.43	39.4 ± 6.33**	42.7 ± 3.93**	38.3 ± 9.17

Groups: Control (C), Control + Botryosphaeran (CB), Obese (O), Obese + Botryosphaeran (OB). Results are presented as the mean ± standard deviation. Each sample was measured in duplicate or triplicate. Two-way ANOVA followed by *Tukeys post-hoc* test. * $p < 0.05$ vs. C; ** $p < 0.01$ vs. C.

Table 7. Oxidative stress parameters in renal tissue.

	C	CB	O	OB
	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8
Renal Tissue				
TBARS^a (nmol MDA/mg protein)	2.85 (1.54;3.64)	2.15 (1.09;3.31)	2.70 (2.56;4.35)	1.34 [#] (0.91;1.75)
Carbonyl (nmol carbonyl/mg protein)	221.8 ± 13.8	207.3 ± 42.5	218.9 ± 30.1	178.3 ± 26.1 [#]
SOD (units/mg protein)	87.55 ± 13.1	79.6 ± 7.07	88.7 ± 10.3	78.1 ± 15.4
CAT (μmol/min/mg protein)	150.9 ± 25.8	150.9 ± 19.8	154.0 ± 10.5	151.3 ± 10.2
GPx (μmol/min/mg protein)	6.35 ± 2.21	9.26 ± 3.21	6.38 ± 2.55	10.2 ± 1.86 [#]
GST (μmol GS-DNB/min/mg protein)	1975 ± 176	1730 ± 313	1940 ± 343	1617 ± 486
GSH (μmol GSH/mg protein)	264.4 ± 103	202.6 ± 52.0	224.5 ± 89.2	201.2 ± 61.2
ASA (μmol ASA/g tissue)	1.48 ± 0.25	1.58 ± 0.24	1.80 ± 0.34	1.96 ± 0.31

Groups: Control (C), Control + Botryosphaeran (CB), Obese (O), Obese + Botryosphaeran (OB). Results analyzed by ANOVA are presented as the mean ± standard deviation. Each sample was measured in duplicate or triplicate. Two-way ANOVA followed by *Tukeys post-hoc* test. ^a Analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's *post-hoc* analysis, the values are expressed as the median and interquartile (25% and 75%). [#] *p* < 0.05 vs. O.

Table 8. Oxidative stress parameters in striated cardiac muscle tissue.

	C	CB	O	OB
	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8
Striated Cardiac Muscle Tissue				
TBARS (nmol MDA/mg protein)	0.47 ± 0.29	0.31 ± 0.19	0.66 ± 0.62	0.42 ± 0.14
Carbonyl (nmol carbonyl/mg protein)	219.2 ± 32.0	194.0 ± 40.3	226.5 ± 16.1	204.1 ± 15.8
SOD (units/mg protein)	90.7 ± 15.8	90.0 ± 15.1	100.2 ± 20.0	96.4 ± 47.5
CAT (μmol/min/mg protein)	250.3 ± 85.1	199.9 ± 36.9	285.1 ± 11.8	195.5 ± 37.4
GPx (μmol/min/mg protein)	6.70 ± 0.96	6.80 ± 2.49	8.06 ± 2.39	7.61 ± 2.00
GST (μmol GS-DNB/min/mg protein)	44.0 ± 7.75	47.4 ± 9.00	47.2 ± 3.56	51.5 ± 4.25
GSH^a (μmol GSH/mg protein)	87.8 (82.5;101.8)	106.9 (82.1;115.2)	110.6 (98.36;118.1)	112.1 (103.3;131.5)
ASA (μmol ASA/g tissue)	2.49 ± 0.51	2.61 ± 0.65	2.44 ± 0.77	2.58 ± 0.45

Groups: Control (C), Control + Botryosphaeran (CB), Obese (O), Obese + Botryosphaeran (OB). Results analyzed by ANOVA are presented as the mean ± standard deviation. Each sample was measured in duplicate or triplicate. Two-way ANOVA followed by *Tukeys post-hoc* test. ^a Analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's *post-hoc* analysis, the values are expressed as the median and interquartile (25% and 75%).

Table 9. Comparison of the results obtained between Wistar female and male rats treated with botryosphaeran.

Parameters	Females	Males*
Body weight loss	Yes	Yes
Reduction in feed intake	No	Yes
Reduction of retroperitoneal adipose tissue	Yes	No
Reduction of mesenteric adipose tissue	No	Yes
Reduction of perigonadal adipose tissue	No	Yes
Reduction of muscle tissue	No	No
Reduction of hepatomegaly	Yes	Yes
Reduction of hepatic steatosis	Not evaluated	Yes
Reduction of hyperglycemia	No	Yes
Maintenance of normal glycemic levels	Yes	Yes
Improvement in glucose tolerance	Yes	Yes
Improvement in insulin sensitivity	Yes	Yes
Reduction of triglycerides	Yes	Yes
Reduction of total cholesterol	Yes	No
Reduction of LDL	Yes	No
Reduction of VLDL	Yes	Yes
Increase in HDL	Yes	Yes
Antioxidant effect	Yes	Yes

* Data on Wistar male rats was obtained from the studies of Silva et al., 2022 (DA SILVA; GERALDELLI; MARTINS; BRAGA *et al.*, 2022), Silva et al., 2018 (SILVA; COSTA; SOUZA; RIBEIRO *et al.*, 2018); and Ribeiro et al., 2022 (RIBEIRO; SILVA; GIORDANI; LIRA *et al.*, 2022).

ANEXO

13/12/2023, 12:25

SEI/UFMT - 6461723 - Despacho

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

DESPACHO

Processo nº 23108.072920/2023-21

Interessado: EVELINE APARECIDA ISQUIERDO FONSECA DE QUEIROZ



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Certificamos que o processo SEI Nº 23108.072920/2023-21 sobre “ESTUDO DOS EFEITOS DA BOTRIOSFERANA EM RATAS OBESAS E NÃO OBESAS E SUA PROLE”, sob a responsabilidade de Eveline Aparecida Isquierdo Fonseca de Queiroz, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT em reunião ordinária de 27 de novembro de 2023.

We certify that the SEI process 23108.072920/2023-21, entitled “Study of botryospheran effects in obese and non-obese female rats and its offspring”, under de responsibility of Eveline Aparecida Isquierdo Fonseca de Queiroz, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Commission for Ethics in the Use of Animals (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on November 17 th, 2023.

Número de animais experimentados: 344 ratos (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar

Number of experimented animals: 344 rats (*Rattus norvegicus*), Wistar.

Validade até 31/10/2026

Cuiabá-MT, 12 de dezembro de 2023.

PROF. DR. KLEDIR ANDERSON HOFSTAETTER SPOHR

PRESIDENTE

PROFA. DRA. MICHELLE IGARASHI WATANABE

VICE-PRESIDENTE



Documento assinado eletronicamente por **KLEDIR ANDERSON HOFSTAETTER SPOHR, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 12/12/2023, às 11:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **MICHELLE IGARASHI, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 12/12/2023, às 12:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6461723** e o código CRC **6AE0E9FB**.