

CARLOS MÁRIO MARTINS SILVEIRA

**EFEITO DO KEFIR DE ÁGUA NO ESTRESSE OXIDATIVO, NA  
INFLAMAÇÃO E NA ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATOS *WISTAR***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S587e  
2017  
Silveira, Carlos Mário Martins, 1974-  
Efeito do Kefir de água no estresse oxidativo, na inflamação  
e na esteatose hepática em ratos Wistar / Carlos Mário Martins  
Silveira. – Viçosa, MG, 2017.  
xi, 96f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: José Humberto de Queiroz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Probióticos. 2. Bebidas fermentadas. 3. kefir.  
4. Obesidade. 5. Tecido adiposo. 6. Fígado. 7. Expressão gênica.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica  
e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em  
Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22 ed. 615.329

CARLOS MÁRIO MARTINS SILVEIRA

**EFEITO DO KEFIR DE ÁGUA NO ESTRESSE OXIDATIVO, NA  
INFLAMAÇÃO E NA ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATOS *Wistar***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de novembro de 2017.

---

Hércia Stampini Duarte Martino  
(Coorientadora)

---

Maria do Carmo Gouveia Peluzio  
(Coorientadora)

---

Manoela Maciel dos Santos Dias

---

Vânia Mayumi Nakajima

---

José Humberto de Queiroz  
(Orientador)

“Hoje me sinto mais forte  
Mais feliz, quem sabe  
Só levo a certeza  
De que muito pouco sei  
Ou nada sei”  
“Penso que cumprir a vida  
Seja simplesmente  
Compreender a marcha  
E ir tocando em frente”  
(Almir Sater)

“Não é sobre chegar  
No topo do mundo e saber que venceu  
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu  
É sobre ser abrigo  
E também ter morada em outros corações  
E assim ter amigos contigo em todas as situações  
Que a vida é trem-bala parceiro  
E a gente é só passageiro prestes a partir”  
(Ana Vilela)

“Julgue seu sucesso pelas coisas que  
você teve que renunciar para conseguir”.  
(Dalai Lama)

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

Ao meu orientador, José Humberto de Queiroz (Zezin), por ter aceitado o desafio de trabalhar com o kefir de água.

Aos meus Coorientadores, Hércia Stampini Duarte Martino, Maria do Carmo Gouveia Peluzio e Leandro Licursi de Oliveira, pelas contribuições na realização deste trabalho.

À professora e amiga Silvia Eloiza Priore, pelo carinho e apoio dados nos momentos de dificuldade.

Aos funcionários do DBB, em especial ao Eduardo Monteiro, Marco Aurélio, Priscila Paula, Jean Silva, Carolini Canal e Jefferson Dias, pela agradável convivência e pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

Ao professor Cláudio Lísias Mafra de Siqueira, por ter disponibilizado o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Agentes Infecciosos e Parasitários para a realização das análises moleculares.

Às bolsistas PIBIC Alessandra Silva e Isabela Perígolo pela ajuda na execução do projeto e pelos momentos de descontração.

À minha namorada Tatiana Barrel Neto, pela força, carinho e paciência ao longo deste trajeto.

Aos colegas de república, Caio (Johnny Bravo), Fellipe (Mackey junior), Bráulio (Chefito), Fernando (Ferdinando) e Victor (Tatu), pela convivência e momentos de descontração.

Aos colegas do laboratório de metabolismo e fermentação pelos anos de convivência e coleguismo.

Aos colegas do departamento de Nutrição e Saúde pelo auxílio na execução e finalização do ensaio biológico.

À Silvia Teixeira (Silvícola) pela amizade, atenção e ajuda dispensados ao longo do doutorado.

À Isadora Ferreira (Freak) pela amizade e convivência no doutorado.

À FAPEMIG por parte do apoio financeiro e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Viçosa por ter me proporcionado a realização da graduação e o mestrado em nutrição, e o doutorado em Bioquímica Aplicada.

A todos que de modo direto e indireto contribuíram para a realização e finalização deste trabalho. MUITO OBRIGADO!

## SUMÁRIO

|   |             |
|---|-------------|
| <i>LISTA DE FIGURAS</i>   | <i>vii</i>  |
| <i>LISTA DE TABELAS</i>   | <i>viii</i> |
| <i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>  | <i>ix</i>   |
| <i>RESUMO</i>   | <i>x</i>    |
| <i>ABSTRACT</i>   | <i>xí</i>   |
| <i>1. INTRODUÇÃO</i>  | <i>1</i>    |
| <i>2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE</i>  | <i>2</i>    |
| <i>3. OBJETIVOS</i>   | <i>3</i>    |
| 3.1. Objetivo Geral   | 3           |
| 3.1.2. Objetivos Específicos  | 3           |
| <i>4. REVISÃO DE LITERATURA</i>   | <i>4</i>    |
| 4.1. Obesidade: Aspectos gerais   | 4           |
| 4.2. Obesidade e processo inflamatório  | 6           |
| 4.3. Microbiota intestinal, probióticos e obesidade                                       | 10          |
| 4.4. Obesidade e Doença hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)                          | 14          |
| 4.5. Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA), microbiota intestinal e probióticos | 17          |
| 4.6. Kefir: aspectos gerais   | 19          |
| <i>5. MATERIAIS E MÉTODOS</i>   | <i>23</i>   |
| 5.1. Preparo do kefir de água   | 23          |
| 5.2. Desenho Experimental   | 23          |
| 5.3. Aspectos Éticos  | 26          |
| 5.4. Medidas biométricas e de consumo alimentar   | 26          |
| <i>6. ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO NO PLASMA DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS</i>               | <i>26</i>   |
| 6.1. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)  | 26          |
| 6.2. Atividade da Glutathione S – transferase (GST)                                       | 27          |
| 6.3. Malondialdeído (MDA)   | 27          |
| <i>7. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT - PCR</i>  | <i>28</i>   |
| <i>8. QUANTIFICAÇÃO DE TRIACILGLICERÓIS E COLESTEROL HEPÁTICOS</i>                        | <i>29</i>   |
| <i>9. ESTERIFICAÇÃO DA FRAÇÃO LIPÍDICA E ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS HEPÁTICOS</i> | <i>30</i>   |
| 9.1. Esterificação da fração lipídica   | 30          |

|   |    |
|---|----|
| 9.2. Análise do perfil de ácidos graxos hepáticos _____   | 31 |
| 10. ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS _____   | 31 |
| 10.1. Tecido adiposo _____  | 31 |
| 10.2. Fígado _____  | 32 |
| 11. ANÁLISE ESTATÍSTICA _____   | 32 |
| 12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____  | 33 |
| <i>CAPÍTULO 1: KEFIR DE ÁGUA: POTENCIAL PROBIÓTICO NA ATENUAÇÃO DA ESTEATOSE HEPÁTICA INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA EM RATOS WISTAR OBESOS</i> _____ | 43 |
| RESUMO _____  | 44 |
| ABSTRACT _____  | 45 |
| 1. INTRODUÇÃO _____   | 46 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS _____  | 47 |
| 2.5. Esterificação da fração lipídica e análise do perfil de ácidos graxos hepáticos _____  | 51 |
| 3. RESULTADOS _____   | 52 |
| 4. DISCUSSÃO _____  | 60 |
| 5. CONCLUSÃO _____  | 64 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____   | 65 |
| <i>CAPÍTULO 2: O KEFIR DE ÁGUA MODULA A EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA INFLAMAÇÃO E NA ADIPOGÊNESE EM RATOS WISTAR OBESOS</i> _____                   | 71 |
| RESUMO _____  | 72 |
| ABSTRACT _____  | 73 |
| 1. INTRODUÇÃO _____   | 74 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS _____   | 75 |
| 3. RESULTADOS _____   | 80 |
| 4. DISCUSSÃO _____  | 86 |
| 5. CONCLUSÃO _____  | 90 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____   | 90 |
| CONCLUSÃO GERAL _____   | 95 |
| ANEXO 1 _____   | 96 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Adipocinas e Inflamação metabólica no tecido adiposo.....   | 7  |
| <b>Figura 2.</b> Efeito probiótico do kefir de leite no metabolismo e na saúde do hospedeiro. ....   | 21 |
| <b>Figura 3.</b> Ensaio biológico com o kefir de água.....   | 24 |
| <b>Figura 4.</b> Curva Analítica de TMPO (1,1,3,3 tetramethoxypropane). ....   | 28 |
| <b>Figura 5.</b> Efeito do kefir de água na expressão gênica de A-ADIPO R2, B-PPAR $\alpha$ , C-CPT 1A e D-TNF $\alpha$ no fígado dos animais dos grupos experimentais. ....   | 54 |
| <b>Figura 6.</b> Efeito do kefir de água no teor de A-Triacilgliceróis e B-Colesterol no fígado dos animais dos grupos experimentais. ....   | 55 |
| <b>Figura 7.</b> Efeito do kefir de água na histologia e no percentual de acúmulo de gordura no fígado dos animais dos grupos experimentais. ....  | 59 |
| <b>Figura 8.</b> Efeito do kefir de água na atividade de A - Superóxido Dismutase – SOD e B - Glutathione S-transferase (GST), e na concentração de C - Malondialdeído (MDA) no plasma de ratos dos grupos experimentais. .... | 84 |
| <b>Figura 9.</b> Efeito do kefir de água na expressão gênica de A – Fas, B – LpL, C - TNF $\alpha$ e D – Adiponectina no tecido adiposo epididimal de ratos dos grupos experimentais. ....                                     | 85 |
| <b>Figura 10.</b> Efeito do kefir de água na histomorfometria do tecido adiposo abdominal e nas medidas celulares em relação ao G - diâmetro, H - perímetro e I – Área de ratos dos grupos experimentais.....                  | 86 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.</b> Composição da Dieta de Cafeteria* (g / 1000 g de dieta).....                                      | 25 |
| <b>Tabela 2.</b> Medidas biométricas e de ingestão alimentar dos diferentes grupos<br>ao final do experimento..... | 53 |
| <b>Tabela 3.</b> Composição de ácidos graxos (%) hepáticos nos diferentes grupos<br>experimentais.....             | 57 |
| <b>Tabela 4.</b> Medidas biométricas e de ingestão alimentar dos grupos de animais<br>ao final do experimento..... | 82 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>ACC1</b>                     | Acetil-CoA carboxilase                       |
| <b>ADIPO R2</b>                 | Receptor de Adiponectina                     |
| <b>AOX</b>                      | Aldeído Oxidase                              |
| <b>CPT 1A</b>                   | Carnitina Palmitoil Transferase 1            |
| <b>DHGNA</b>                    | Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica      |
| <b>EHNA</b>                     | Esteato-Hepatite não Alcoólica               |
| <b>Fas</b>                      | Ácido Graxo Sintase                          |
| <b>IL6, 1<math>\beta</math></b> | Interleucinas 6, 1 beta                      |
| <b>iNOS</b>                     | Enzima Oxido Nítrico Sintase Induzível       |
| <b>JNK1</b>                     | Jun N-terminal quinase 1                     |
| <b>LpL</b>                      | Lipoproteína Lipase                          |
| <b>LPS</b>                      | Lipopolissacarídeo de membrana               |
| <b>MCP – 1</b>                  | Proteína Quimiotática para Monócitos         |
| <b>NF<math>\kappa</math>B</b>   | Fator de Necrose Tumoral Beta                |
| <b>PAI – 1</b>                  | Inibidor – 1 do Ativador do Plasminogênio    |
| <b>PPAR<math>\alpha</math></b>  | Receptor Ativado do Peroxissoma alfa         |
| <b>SICAM</b>                    | Molécula de Adesão Intracelular Solúvel      |
| <b>SRI1</b>                     | Substrato do Receptor de Insulina 1          |
| <b>TGF<math>\beta</math></b>    | Fator de Transformação do Crescimento – Beta |
| <b>TNF<math>\alpha</math></b>   | Fator de Necrose Tumoral alfa                |

## RESUMO

SILVEIRA, Carlos Mário Martins, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2017. **Efeito do kefir de água no estresse oxidativo, na inflamação e na esteatose hepática em ratos *wistar***. Orientador: José Humberto de Queiroz. Coorientadores: Hércia Stampini Duarte Martino, Maria do Carmo Gouveia Peluzio e Leandro Licursi de Oliveira.

A obesidade é uma doença multifatorial, e o acúmulo excessivo de gordura no tecido adiposo está na gênese de distúrbios metabólicos e inflamatórios. O kefir de água é uma bebida fermentada que contém micro-organismos com potencial ação probiótica. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do kefir de água no metabolismo lipídico e na inflamação, no fígado e no tecido adiposo, em ratos alimentados com dieta de cafeteria. O experimento teve duração de 15 semanas e os animais foram divididos em seis grupos: G1-Dieta comercial; G2-Dieta comercial e 1 mL de kefir de água; G3-Dieta de cafeteria; G4-Dieta de cafeteria e 1 mL de kefir de água administrado antes da indução da obesidade; G5-Dieta de cafeteria e 1 mL de kefir de água administrado após a indução da obesidade e G6-Dieta de cafeteria e 2 mL de kefir de água administrado após a indução da obesidade. O kefir de água foi administrado 1 vez ao dia por gavagem. Ao final do experimento foram coletados o sangue, o fígado e o tecido adiposo. Analisou-se enzimas antioxidantes e da peroxidação lipídica no plasma, a expressão de genes envolvidos na inflamação e no metabolismo lipídico no fígado e no tecido adiposo, os teores de lipídeos no fígado e a histomorfometria no fígado e no tecido adiposo. O kefir de água aumentou a atividade da glutathione S-transferase (GST) e reduziu a concentração de malondialdeído (MDA) no plasma, quando administrado após a indução da obesidade, na dose de 2 mL, reduziu a expressão de  $TNF\alpha$  no fígado e no tecido adiposo nos ratos obesos, aumentou a expressão dos genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos hepáticos ADIPO R2,  $PPAR\alpha$  e CPT 1A, reduziu o teor de triacilglicerol e o percentual de gordura hepática quando administrado antes da indução da obesidade, e os teores de colesterol em todos os ratos obesos. Além disso, o kefir de água foi capaz de reduzir a expressão do gene adipogênico Fas e aumentar as expressões de LpL e adiponectina no tecido adiposo. Estes resultados demonstram potenciais efeitos benéficos do kefir de água nas complicações metabólicas relacionadas à obesidade e esteatose hepática.

## ABSTRACT

SILVEIRA, Carlos Mário Martins, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2017. **Effect of water kefir in oxidative stress, inflammation and hepatic steatosis in *wistar* rats.** Adviser: José Humberto de Queiroz. Co-advisers: Hércia Stampini Duarte Martino, Maria do Carmo Gouveia Peluzio and Leandro Licursi de Oliveira.

Obesity is a multifactorial disease, and the excessive fat accumulation in adipose tissue is at the genesis of metabolic and inflammatory disorders. Water kefir is a fermented beverage that contains microorganisms with potential probiotic action. The objective of this study was to evaluate the effect of water kefir on lipid metabolism and on inflammation, liver and adipose tissue in rats fed by a cafeteria diet. The experiment lasted 15 weeks and the animals were divided into six groups: G1 - commercial diet; G2 - commercial diet and 1 mL water kefir; G3 - Cafeteria diet; G4 - Cafeteria diet and 1 mL water kefir administered before the induction of obesity; G5 - Cafeteria diet and 1 mL water kefir administered after the induction of obesity and G6 - Cafeteria diet and 2 mL water kefir administered after the induction of obesity. Weight and food consumption were monitored weekly. Water kefir was given once a day by gavage. At the end of the experiment, the blood, liver and adipose tissue were collected. Analyses of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in plasma, expression of genes involved in inflammation and lipid metabolism in liver and adipose tissue, lipid levels in the liver and Histomorphometry in liver and adipose tissue were performed. Water kefir increased the activity of the glutathione S-transferase (GST) enzyme and reduced the concentration of malondialdehyde (MDA) in plasma, when administered after the induction of obesity at the dose of 2 mL, reduced TNF $\alpha$  expression in liver and adipose tissue in all groups of obese rats increased the expression of the genes involved in the oxidation of fatty liver fatty acids ADIPO R2, PPAR $\alpha$  and CPT 1A, reduced the triacylglycerol ester and the percentage of hepatic fat when administered before the induction of obesity, and the cholesterol levels in all groups of obese rats. In addition, water kefir could reduce the expression of the adipogenic Fas gene and increase the expressions of LpL and adiponectin in adipose tissue. These results demonstrate potential beneficial effects of water kefir on metabolic complications related to adipogenesis and inflammation in obesity and hepatic steatosis.

## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada uma epidemia do século XXI, que atinge todas as faixas etárias em diversas populações. Em 2005, 400 milhões de adultos eram obesos em todo o mundo (Aronne *et al.*, 2009), e dados recentes do *Institute for Health Metrics and Evaluation – IMHE (2017)*, apontaram que 2,2 bilhões (30% da população mundial) estavam com sobrepeso ou com obesidade em 2015. O excesso de peso é um fator de risco para doenças crônicas, incluindo as doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, doença crônica renal, câncer e a doença hepática gordurosa não alcoólica (Singh *et al.*, 2013).

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), principal doença crônica do fígado, afeta diversas populações, e têm sua incidência aumentada para 70% nos portadores de diabetes mellitus tipo 2 e em cerca de 90% nos casos de obesidade mórbida. A DHGNA compreende um amplo espectro de disfunções hepáticas caracterizadas pela deposição de gordura no fígado na ausência de infecção ou ingestão significativa de álcool, estando entre as principais causas de cirrose hepática, carcinoma hepatocelular e transplante de fígado (Younossi *et al.*, 2016; Zoller e Tilg, 2016; Doulberis *et al.*, 2017; Reccia *et al.*, 2017).

A obesidade causa inflamação e disfunção orgânica, e a lipotoxicidade, que se caracteriza por uma condição anormal de hipertrofia do adipócito conduz a um desequilíbrio na produção de citocinas pró e antiinflamatórias. Estas citocinas estão relacionadas à modulação de genes ligados à inflamação, regulação do apetite, resistência insulínica e regulação do metabolismo energético (Cave *et al.*, 2008). Evidências sugerem que a inflamação crônica desempenha um papel crítico no desenvolvimento das disfunções metabólicas relacionadas à obesidade (Jung e Choi, 2014).

Estudos têm evidenciado uma relação estreita entre dietas hiperlipídicas com alterações da composição e funções metabólicas da microbiota intestinal (disbiose) na obesidade e doenças no fígado, em animais e humanos, e que a disbiose estaria relacionada à mecanismos inflamatórios e adipogênicos na obesidade e nas doenças hepáticas (Tilg e Kaser, 2011; Alisi *et al.*, 2012; Kobyliak *et al.*, 2016; Machado e Cortez-Pinto, 2016).

Neste contexto, a modulação da microbiota intestinal, e das expressões de genes relacionados à inflamação e ao metabolismo lipídico, na obesidade e na DHGNA, pelos micro-organismos probióticos, têm ganhado importância nos últimos anos (Park *et al.*, 2013; Mohammadmoradi *et al.*, 2014; Novotny Nunez *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2017; Shin *et al.*, 2017; Xue *et al.*, 2017).

O kefir de água é uma bebida caseira, levemente ácida e que contém micro-organismos probióticos na sua composição, como as bactérias lácticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Magalhães *et al.*, 2010; Marsh *et al.*, 2013). *Lactobacillus (L.) spp* e *Lactococcus lactis* são as espécies de bactérias lácticas dominantes nos grãos de kefir de água (Zanirati *et al.*, 2015). Por conter bactérias com comprovada ação probiótica, o kefir de água pode apresentar propriedades benéficas à saúde, às quais ainda são carentes de comprovação científica (Waldherr *et al.*, 2010).

Então, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos do kefir de água na obesidade e na esteatose hepática em ratos *wistar* alimentados com dieta de cafeteria. Foram avaliados marcadores de estresse oxidativo, inflamatório e do metabolismo lipídico.

## **2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE**

Os probióticos são micro-organismos vivos que quando ingeridos em quantidade adequada, podem conferir benefícios à saúde do hospedeiro. O kefir

de água é uma bebida fermentada por uma simbiose de bactérias lácticas, acéticas e leveduras, e que têm sua produção principalmente em ambiente doméstico em diversos países, incluindo o Brasil. Esta bebida, além de poder veicular micro-organismos com ação probiótica, pode carrear produtos do metabolismo microbiano que podem conferir benefícios à saúde do hospedeiro, atuando na inflamação e no metabolismo lipídico na obesidade.

O kefir de água reduz a inflamação e a lipogênese na obesidade, modulando a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico e na inflamação no fígado e no tecido adiposo.

### **3. OBJETIVOS**

#### *3.1. Objetivo Geral*

Avaliar o efeito do kefir de água no estresse oxidativo, na inflamação e na esteatose hepática em ratos alimentados com dieta de cafeteria.

#### *3.1.2. Objetivos Específicos*

- ✓ Avaliar o efeito do kefir de água em variáveis biométricas e de consumo alimentar dos animais experimentais;
- ✓ Investigar o efeito do kefir de água na modulação do estresse oxidativo no plasma dos animais experimentais;
- ✓ Avaliar o efeito do kefir de água no metabolismo lipídico e na inflamação no fígado dos animais experimentais;
- ✓ Avaliar o efeito do kefir de água no metabolismo lipídico e na inflamação no tecido adiposo dos animais experimentais;
- ✓ Avaliar o efeito do Kefir na histomorfometria dos tecidos hepático e adiposo dos animais experimentais.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1. Obesidade: Aspectos gerais

A obesidade é um problema mundial de saúde pública que atinge todas as faixas etárias, em diversas populações, e por isso, vem sendo considerada como uma epidemia do século XXI. Um estudo realizado pelo *Institute for Health Metrics and Evaluation – IMHE (2017)*, da Universidade de Washington, demonstrou que cerca de 2,2 bilhões (30% da população mundial) estavam com sobrepeso ou com obesidade em 2015. Os dados foram coletados em mais de 195 países ao longo de 25 anos (1990 a 2015) e revelaram que 603 milhões de adultos e 107 milhões de crianças são obesos, equivalendo a 12% da população adulta e 5% da população infantil. Ainda segundo este estudo, em 73 países, os índices de obesidade mais que duplicaram entre 1980 a 2015. No Brasil os índices de obesidade triplicaram entre as crianças e jovens (2 a 19 anos). A prevalência de obesidade nesta faixa etária aumentou de 2,3% (1980) para 8,6% (2015) e o sobrepeso aumentou de 8,8% para 16,5% no mesmo período. Entre a população adulta, a obesidade passou de 8,7% para 22,6% e a taxa de sobrepeso avançou de 25,7% para 35,2%.

A obesidade é uma doença crônica não transmissível e multifatorial que envolve fatores genéticos, neurais e endócrinos, bem como hábitos alimentares inadequados e baixos níveis de atividade física, estabelecidos dentro de um ambiente sociocultural, e que está relacionada ao desenvolvimento de diversas complicações crônicas e ao aumento das taxas de mortalidade. Assim, é de grande importância conhecer os fatores relacionados às suas causas para um tratamento adequado e melhoria da qualidade de vida (Rodrigues *et al.*, 2008; Sanz *et al.*, 2010).

O acúmulo excessivo de gordura na obesidade é consequência tanto de hábitos alimentares e de estilo de vida, quanto de fatores sociológicos e de alterações metabólicas e neuroendócrinas, bem como de componentes hereditários (Marques-Lopes *et al.*, 2004). O tipo de obesidade cuja ocorrência não está ligada a doenças do sistema endócrino tem forte relação com um desequilíbrio alimentar resultante de um aporte calórico excessivo e crônico de macronutrientes em relação ao gasto energético. Entre os hábitos alimentares inadequados pode-se citar o excesso de consumo de alimentos com alto conteúdo energético, ricos em gorduras e altos teores de açúcares (Nakamura e Omaye, 2012).

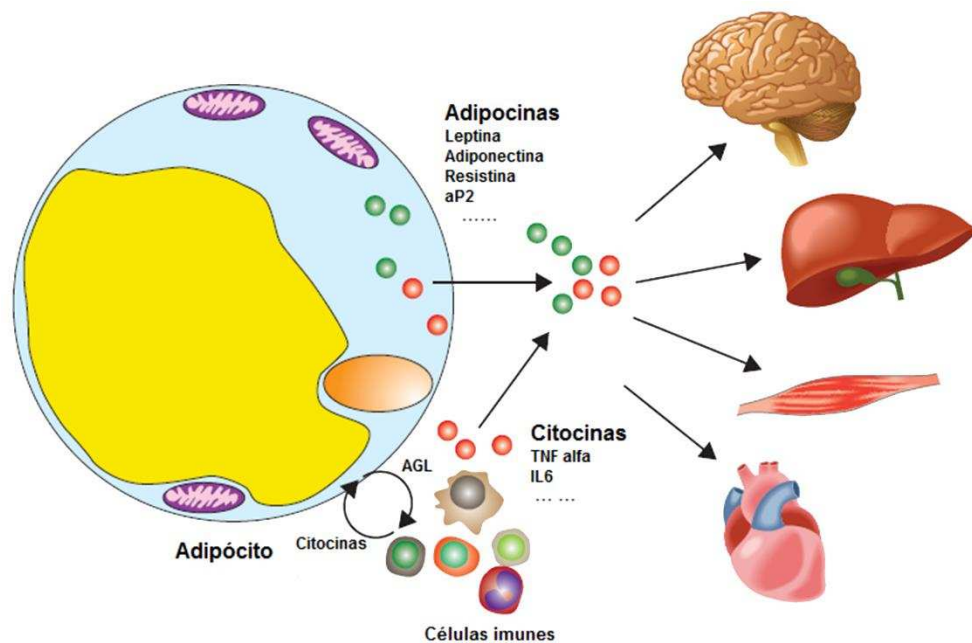
Na obesidade ocorre um estado de desequilíbrio metabólico em vários processos biológicos e o acúmulo excessivo de gordura caracteriza-se como um fator de risco para doenças cardiovasculares, aterosclerose, diabetes mellitus tipo 2, osteoartrite, hipercolesterolemia, alguns tipos de câncer, apneia do sono, asma, e doença hepática gordurosa não alcoólica (Bray, 2004; Stein e Colditz, 2004). Crianças com obesidade adquirem precocemente doenças características da fase adulta, e que agravam a saúde e a qualidade de vida na infância, como a hipertensão arterial, aterosclerose, diabetes mellitus tipo 2, esteatose hepática e distúrbios articulares (Daniels *et al.*, 2005).

Ainda, complicações relativas à obesidade demonstraram relação direta com a expansão da massa de tecido adiposo, e trouxeram elucidações da influência deste tecido no balanço energético e na gênese de distúrbios metabólicos e inflamatórios (Trayhurn, 2007). A obesidade é considerada atualmente um estado de inflamação crônica de baixo grau, devido às alterações inflamatórias que ocorrem no tecido adiposo. O acúmulo de lipídeos neste tecido e a consequente expansão da massa adiposa levam ao início de um processo

inflamatório. Evidências sugerem que a inflamação crônica desempenha um papel crítico no desenvolvimento das disfunções metabólicas relacionadas à obesidade (Navab *et al.*, 2008; Lumeng e Saltiel, 2011; Jung e Choi, 2014).

#### 4.2. Obesidade e processo inflamatório

A obesidade foi associada a uma condição de inflamação crônica e sistêmica de baixo grau no início da década de 1990. Além disso, foi correlacionada positivamente com o estresse oxidativo e o risco para doenças crônicas não transmissíveis, quando foi constatado o aumento da expressão do gene que codifica a citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), no tecido adiposo, e a redução da sensibilidade à insulina em roedores com obesidade induzida pela dieta (Shoelson *et al.*, 2007; Lumeng e Saltiel, 2011; Styskal *et al.*, 2012). Este foi o primeiro “link” funcional entre obesidade e inflamação, que ao longo dos anos evoluiu para o conceito de “inflamação metabólica” (Figura 1). Este conceito tem sido amplamente aceito como um mecanismo de conexão entre a obesidade e suas comorbidades (Hotamisligil, 2006).



**Figura 1.** Adipocinas e Inflamação metabólica no tecido adiposo. Adaptado de Cao. (2014). AGL – Ácidos graxos livres.

A obesidade está diretamente relacionada a alterações nas funções endócrinas e metabólicas do tecido adiposo. Em indivíduos obesos, o acúmulo de lipídeos neste tecido e consequente hipóxia, levam ao desencadeamento do processo inflamatório por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas pelos adipócitos, incluído TNF- $\alpha$ , IL-6, leptina, resistina, enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), proteína C reativa, fator de transformação do crescimento-beta (TGF- $\beta$ ), proteína quimiotática para monócitos (MCP-1), molécula de adesão intracelular solúvel (sICAM), angiotensinogênio, inibidor-1 do ativador do plasminogênio (PAI-1) (Bullo *et al.*, 2007; Shah *et al.*, 2008). Em indivíduos eutróficos, a capacidade de síntese dessas proteínas a partir do tecido adiposo é muito inferior em relação aos indivíduos obesos (Ferrante, 2007; Shah *et al.*, 2008).

O tecido adiposo caracteriza-se pela sua heterogeneidade, sendo composto por adipócitos maduros e células da fração estromal-vascular. Essa fração inclui pré-adipócitos, fibroblastos, células endoteliais, histiócitos e

macrófagos. Em indivíduos obesos, o aumento de macrófagos no tecido adiposo, especificamente no tecido adiposo visceral, é precedido pelo processo de migração de monócitos do sangue para esse tecido, cujas células, quando presentes no tecido adiposo visceral, diferenciam-se em macrófagos (Ferrante, 2007). Esse aumento do processo de quimiotaxia de monócitos, a partir do sangue para o tecido adiposo visceral, é mediado pela MCP-1, a qual se correlaciona positivamente à adiposidade, sendo a sua expressão gênica maior no tecido adiposo visceral quando comparada ao subcutâneo (Canello e Clément, 2006; Cave *et al.*, 2008). Com o avanço da obesidade, ocorre secreção desregulada de adipocinas, possivelmente mediada por ativação de macrófagos residentes ou infiltrados massivamente no tecido adiposo (Haase *et al.*, 2014). As citocinas liberadas pelo processo inflamatório no tecido adiposo afetam as funções metabólicas de alguns órgãos, incluindo o fígado, o coração, o músculo e o cérebro (Ye e McGuinness, 2013).

Os principais fatores implicados no início do processo inflamatório na obesidade são: endotoxemia metabólica (aumento dos níveis plasmáticos de lipopolissacarídeo - LPS), aumento plasmático de ácidos graxos não esterificados, hipertrofia dos adipócitos e aumento da hipóxia no tecido adiposo. Estes fatores ocorrem simultaneamente e acarretam um aumento tanto na infiltração de macrófagos quanto no processo inflamatório. A hipóxia, ocasionada pela expansão do tecido adiposo, induz angiogênese compensatória. Os macrófagos são recrutados para o local afetado, facilitando o processo de vascularização. Além disso, a endotoxemia associada com a alteração da permeabilidade intestinal na obesidade, potencializaria o processo inflamatório no tecido adiposo. A alteração da microbiota intestinal associada à redução da permeabilidade intestinal em obesos, favorece a passagem de micro-organismos

e moléculas derivadas de bactérias do lúmen intestinal para a corrente sanguínea, como o lipopolissacarídeo derivado de bactérias Gram negativas (LPS), peptidoglicanos e a flagelina, que podem ser responsáveis pelo quadro de endotoxemia metabólica e inflamação crônica. Camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura por um período de duas a quatro semanas, exibiram um aumento significativo do LPS no plasma, que é um forte indutor da resposta inflamatória, e está envolvido na liberação de algumas citocinas ligadas ao desencadeamento da resistência insulínica e da obesidade (Cani *et al.*, 2007; Blaut e Bischoff, 2010; De La Serre *et al.*, 2010; Delzenne e Cani, 2011). O LPS pode ser considerado um biomarcador do estado de obesidade ou utilizado para avaliar o impacto de terapias probióticas na obesidade associada à microbiota intestinal (Bäckhed, 2010; Naito *et al.*, 2011; Pussinen *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2014). Tal processo tem papel crucial no desencadeamento da resistência periférica à insulina, e sua gênese está diretamente relacionada ao aumento da concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e a IL-6 (Cani, Patrice D. *et al.*, 2007; Ferrante, 2007; Cave *et al.*, 2008; Pang *et al.*, 2008; Rogero *et al.*, 2008; Kennedy *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Conroy *et al.*, 2011).

O TNF $\alpha$  foi a primeira citocina identificada no tecido adiposo de camundongos obesos. Esta citocina pode ser produzida pelos adipócitos, pelos macrófagos e outras células do sistema imunológico. Além disso, os ácidos graxos não esterificados estimulam a produção de TNF $\alpha$  pelos macrófagos, e o TNF $\alpha$  induz a lipólise para aumentar a liberação de ácidos graxos dos adipócitos (Nguyen *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). Ainda, o TNF $\alpha$  estimula diretamente a lipogênese hepática *in vivo*, e também, é o principal *link* entre a obesidade e o câncer (Park *et al.*, 2010; Cao, 2014). O TNF $\alpha$  age por meio de dois receptores distintos, p55 e p75, os quais ativam as vias Jun N-terminal quinase 1 (JNK1) e

inibem I $\kappa$ B kinase (IKK)/NF $\kappa$ B. JNK1 pode inibir diretamente a sinalização da insulina pela fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (SRI1) nos resíduos de serina e, pode também potencializar a produção de citocinas induzidas pelos ácidos graxos não esterificados. A ativação da IKK também pode inibir o receptor de insulina SRI 1 e também ativar o NF $\kappa$ B para a produção de citocinas inflamatórias (Cao, 2014).

#### 4.3. Microbiota intestinal, probióticos e obesidade

A microbiota intestinal de mamíferos é dominada pelos filos Bacteroidetes, Firmicutes e, numa proporção menor, Actinobacteria e Proteobacteria (Ley *et al.*, 2008). Na obesidade podem ocorrer mudanças no filo e no grupo específico desta microbiota, além de redução da diversidade bacteriana. Tais mudanças são correlacionadas com alterações nas vias metabólicas (Turnbaugh *et al.*, 2008). Aumentos na quantidade relativa de Firmicutes e reduções de Bacteroidetes têm sido associados com a obesidade por meio de comparações entre a microbiota do intestino grosso de camundongos de uma mesma ninhada, sendo um grupo composto por camundongos geneticamente obesos ob/ob (deficientes em leptina) e o outro composto por camundongos magros (ob/+ ou +/+), usando técnicas de sequenciamento de DNA. Além disso, uma maior proporção de *Archaea* também foi encontrada na microbiota cecal dos camundongos geneticamente obesos, quando comparada com a microbiota cecal dos camundongos magros (Samuel *et al.*, 2007).

A obesidade em ratos induzida pela dieta também foi associada a um aumento da proporção de *Eubacterium dolichum*, pertencente ao filo Firmicutes (Turnbaugh *et al.*, 2008). Comparando ratos Zucker obesos (*falfa*) e magros, Waldran *et al.* (2009) encontraram redução na contagem de *Bifidobacterium* e

expressivo aumento das bactérias gram negativas: *Halomonas* e *Sphingomonas*. A obesidade induzida por uma dieta rica em gordura também foi associada com baixos números de *Bifidobacterium* no conteúdo cecal em camundongos (Cani *et al.*, 2007).

Em humanos, alterações semelhantes nas proporções relativas de Firmicutes e Bacteroidetes nas fezes têm sido associadas à obesidade (Ley *et al.*, 2008). Além disso, adultos obesos que consumiram uma dieta hipocalórica (baixo teor de carboidratos ou de gordura) apresentaram aumento significativo de Bacteroidetes nas fezes, paralelamente à perda de peso, ao longo de 1 ano de intervenção. Também em indivíduos obesos, foi encontrada nas fezes, uma proporção inferior de Bacteroidetes em relação às Actinobactérias, quando comparados com indivíduos magros (Ley *et al.*, 2006; Turnbaugh *et al.*, 2009).

Alterações da composição da microbiota fecal parecem preceder o sobrepeso em crianças, no início da vida. Crianças eutróficas apresentaram aumento no número de bifidobactérias, ao passo que as crianças com sobrepeso, tiveram aumento no número de *Staphylococcus aureus* nas fezes durante a infância (Kalliomaki *et al.*, 2008).

Estudos que utilizaram ratos *germ-free* (gnotobióticos) demonstraram que a microbiota intestinal é crítica para a manutenção da função gastrointestinal normal, função imune e digestão normal de nutrientes. A microbiota intestinal está implicada numa variedade de funções: desenvolvimento e função intestinal, incluindo a renovação epitelial, imunomodulação, a motilidade gastrointestinal, e o metabolismo de fármacos. A microbiota intestinal também tem funções metabólicas importantes como metabolização de toxinas alimentares e carcinógenos, biossíntese de nutrientes (vitamina K, do complexo B, aminoácidos) e isoprenoides, fermentação de carboidratos não digeríveis,

desconjugação e desidroxilação de sais biliares, redução da biossíntese de colesterol, auxílio na absorção de certos eletrólitos e minerais, influencia no crescimento e diferenciação dos enterócitos e colonócitos por meio da produção de ácidos graxos de cadeia curta. Ainda, a microbiota intestinal normal ajuda a prevenir a colonização luminal por bactérias patogênicas, tais como cepas específicas de *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Salmonella* e *Shigella* (Dibaise *et al.*, 2008). Gill e colaboradores (2006) demonstraram que a microbiota intestinal normal afeta o metabolismo humano, otimizando a extração de energia dos alimentos (fermentação de carboidratos não digeríveis) e promovendo a homeostasia do indivíduo. De maneira geral, a microbiota intestinal está ligada ao controle do apetite, balanço energético, obesidade, diabetes, função imune, alergias, perturbações do comportamento, doença cardiovascular e alguns tipos de câncer (Flint, 2012).

A dieta ocidental caracterizada por alto teor de gordura e baixo consumo de fibras é considerada um dos principais fatores que contribuem para a disbiose ou alteração da microbiota intestinal, afetando as proporções e tipos de metabólitos produzidos (De Filippo *et al.*, 2010; Requena *et al.*, 2013). Estudo realizado por Jumpertz *et al.* (2011) encontrou mudanças rápidas na microbiota intestinal, relacionadas ao conteúdo energético ingerido, em indivíduos magros e obesos.

A microbiota intestinal é amplamente aceita como indispensável à saúde humana, e o desenvolvimento de terapias baseadas na modulação desta microbiota vem ganhando atenção nos últimos anos. Assim, os antibióticos, probióticos, prebióticos e simbióticos, são considerados alvos terapêuticos com capacidade de alterar a composição da microbiota intestinal. Entretanto, um novo termo, *pharmabiotic*, abrange qualquer forma de modulação terapêutica da

microbiota intestinal, incluindo o uso de bactérias probióticas vivas, metabólitos biologicamente ativos derivados de probióticos, prebióticos, simbióticos, ou bactérias da microbiota intestinal geneticamente modificadas (O'hara e Shanahan, 2006).

Os probióticos são definidos como “micro-organismos vivos”, que se consumidos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde humana (FAO/WHO, 2002). As bactérias lácticas são as mais utilizadas como micro-organismos probióticos, principalmente as do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Outros gêneros como *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc* também são utilizados, bem como a levedura *Saccharomyces boulardii*. A maioria destes micro-organismos vem de produtos lácteos fermentados como kefir, leite maasai e kurut, sendo os derivados lácteos fermentados uma fonte importante, pois podem conter várias espécies de bactérias lácticas (Butel, 2014).

Para ser considerado um probiótico, um micro-organismo deve atender as seguintes características: ser resistente à passagem através do trato gastrointestinal e sobreviver ao estresse fisiológico durante a ingestão: acidez estomacal, pH do intestino e ação de sais biliares; aderir, colonizar e se reproduzir no intestino; equilibrar a microbiota intestinal e produzir metabólitos que modulam o metabolismo microbiano. Ainda, as cepas probióticas não devem apresentar variação genética, ter capacidade imunomodulatória, não devem oferecer risco à saúde humana e permanecerem viáveis durante a vida de prateleira do produto (Pereira, 2013; Butel, 2014).

Devido à sua capacidade de manter o equilíbrio da microbiota intestinal, os probióticos podem ser considerados uma potente medida terapêutica na prevenção e no tratamento da obesidade. Alguns estudos com micro-organismos

probióticos observaram ações anti-obesidade e efeitos hipolipemiantes, atividade antiinflamatória e antioxidante em condições patogênicas. Também, os micro-organismos probióticos estão envolvidos na manutenção da integridade da barreira intestinal, com conseqüente redução da permeabilidade e do nível de LPS sérico (Esposito *et al.*, 2009; Velayudham *et al.*, 2009; An *et al.*, 2011; Vajro *et al.*, 2011; Arora *et al.*, 2012). Estudo realizado por Qiao e colaboradores (2015) encontrou redução do peso corporal, dos níveis séricos de glicose, insulina e LPS, redução sérica das interleucinas pró-inflamatórias IL6, IL12 e TNF $\alpha$ , e supressão na expressão dos genes adipogênicos ACC1 e Fas no tecido adiposo epididimal, em camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com *Lactobacillus reuteri*. Outro estudo semelhante, mas que utilizou o kefir de leite como fonte probiótica, encontrou redução do peso corporal e da concentração plasmática de IL6, além do aumento na expressão dos genes relacionados à via de oxidação lipídica PPAR $\alpha$  e AOX no tecido adiposo epididimal dos camundongos obesos (Kim *et al.*, 2017).

#### 4.4. Obesidade e Doença hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é considerada um problema de saúde pública mundial. Sua incidência aumenta aproximadamente 70% nos portadores de diabetes mellitus tipo 2 e em cerca de 90% nos casos de obesidade mórbida (Doulberis *et al.*, 2017). Esta doença está entre as principais causas de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (Zoller e Tilg, 2016). A definição de DHGNA refere-se a um excessivo acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos em indivíduos sem ingestão etílica significativa (menos do que 20 e 30 g/dia para mulheres e homens respectivamente) (Hashimoto *et al.*, 2013; Than e Newsome, 2015). A DHGNA consiste de duas manifestações clínicas: Esteatose simples e esteato-hepatite não alcoólica (EHNA). Enquanto a

esteatose simples acomete de 80 a 90% dos casos, sendo principalmente benigna e não progressiva, a Esteato-hepatite não alcoólica acomete de 10 a 20% dos casos de DHGNA, podendo progredir para cirrose e/ou carcinoma hepatocelular. Neste caso, há uma associação da esteatose com injúria celular no fígado (degeneração por “balonização” hepatocelular) e inflamação, esteato-hepatite e diferentes graus de fibrose (Hashimoto *et al.*, 2013).

A DHGNA está relacionada principalmente com a obesidade, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia e resistência insulínica. Outras causas secundárias seriam: Síndrome do ovário policístico, distúrbios do sistema endócrino, apneia do sono, ressecção pancreatoduodenal, interação medicamentosa, síndrome do intestino curto, nutrição parenteral e disbiose da microbiota intestinal (Hashimoto *et al.*, 2013; Machado e Cortez-Pinto, 2016; Doulberis *et al.*, 2017).

Fatores dietéticos desempenham um papel crucial na lipogênese hepática, e, portanto, no desenvolvimento da DHGNA e mais tardiamente, na evolução para EHNA. Dietas hiperlipídicas e/ou hiperglicídicas são os principais fatores de risco para o desenvolvimento da DHGNA (Softic *et al.*, 2016). A excessiva ingestão calórica provoca um aumento na esterificação dos ácidos graxos no fígado, elevando a concentração de triacilgliceróis via diacilglicerol O-aciltransferase 2, uma enzima superexpressa na DHGNA (Choi *et al.*, 2007).

Os ácidos graxos acumulados no fígado são provenientes tanto do aumento na captação de ácidos graxos circulantes (lipólise), relacionada à ingestão alimentar excessiva, quanto da lipogênese *de novo* aumentada, uma complexa via de síntese de ácidos graxos a partir da glicose (Reccia *et al.*, 2017). O consumo de carboidratos em excesso ativa a proteína de ligação ao elemento de resposta aos carboidratos (ChREBP) estimulando a lipogênese hepática (Ahmed, 2015; Woods *et al.*, 2015). Além disso, dietas hiperlipídicas, ricas em

ácidos graxos saturados estimulam a expressão do fator de transcrição SREBP-1c (proteína 1c ligadora do elemento regulatório de esterol), que está relacionado com o acúmulo de triacilgliceróis no fígado por meio da ativação de genes envolvidos na síntese e esterificação de ácidos graxos (Aragno *et al.*, 2009).

A ingestão energética e a composição dietética são indispensáveis na gênese das doenças metabólicas. Enquanto ácidos graxos trans e saturados têm efeitos adversos no metabolismo dos lipídeos e da glicose, os ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados (PUFAs) podem reduzir a resistência insulínica, a esteatose hepática e a inflamação em pacientes com DHGNA. Ácidos graxos saturados e trans podem ocasionar inflamação devido à lipotoxicidade no fígado, e alterar a microbiota intestinal conduzindo à endotoxemia. Ácidos graxos saturados induzem estresse no retículo endoplasmático, disfunção celular e apoptose. (Wang *et al.*, 2006; Kirpich *et al.*, 2012; Reccia *et al.*, 2017). O colesterol proveniente da dieta também contribui para o desenvolvimento da esteatose hepática e inflamação, alterando o metabolismo de ácidos graxos pela desregulação da função mitocondrial e modificação da composição lipídica hepática (Vinaixa *et al.*, 2010).

Na obesidade, o tecido adiposo expandido, e a consequente infiltração de macrófagos conduz à produção de citocinas inflamatórias que contribuem para a desregulação na produção de adipocinas, e o desenvolvimento da resistência insulínica e da doença hepática gordurosa não alcoólica (Lumeng e Saltiel, 2011). As adipocinas estão relacionadas com o controle de peso corporal, inflamação, coagulação, resistência insulínica, diabetes, arteriosclerose e câncer (Cao, 2014). O aumento na produção de citocinas inflamatórias, decorrente da expansão do tecido adiposo visceral, tais como TNF $\alpha$ , IL6 e proteína C reativa, se contrapõe à redução na produção de adiponectina, uma adipocina

antiinflamatória (Mirza, 2011). Esta adipocina suprime a produção de glicose e de lipídeos hepáticos, estimula a captação de glicose pelo músculo esquelético, a oxidação de ácidos graxos no fígado e no músculo esquelético, a secreção de insulina e inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias (TNF $\alpha$  e IL6) (Marra e Bertolani, 2009). A adiponectina melhora a resistência insulínica, agindo no fígado e no músculo por meio de dois receptores específicos: Adipo R1 no músculo esquelético e Adipo R2 no fígado. Especificamente no fígado, o receptor Adipo R2 está relacionado com a ativação dos fatores de transcrição AMPK e PPAR $\alpha$ , os quais atuam na expressão de genes ligados ao metabolismo da glicose (captação) e dos lipídeos (beta oxidação), mediados pela adiponectina (Polyzos *et al.*, 2010).

#### *4.5. Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA), microbiota intestinal e probióticos*

Dietas hipercalóricas, ricas em gorduras e açúcares, alteram a microbiota intestinal (Disbiose), promovendo a inflamação e alterando a permeabilidade intestinal (Duseja e Chawla, 2014). A disbiose pode impactar negativamente o metabolismo e a imunidade, favorecendo a obesidade e suas comorbidades, incluindo a resistência insulínica e a DHGNA (Machado e Cortez-Pinto, 2016). A obesidade e a DHGNA estão intimamente relacionadas com a ruptura da integridade da parede intestinal, endotoxemia metabólica e inflamação de baixo grau (Cani e Delzenne, 2009).

A conexão, via veia porta, entre o intestino e o fígado, desempenha uma importante função na patogênese da obesidade e da DHGNA, quando a microbiota intestinal interage com o sistema imune do hospedeiro, modulando a permeabilidade intestinal, a inflamação e a resistência insulínica (Duseja e Chawla, 2014). O desequilíbrio desta microbiota pode contribuir para o

desenvolvimento e progressão da DHGNA pela desregulação do metabolismo energético, endotoxemia, alteração no metabolismo da colina (requerida na síntese de VLDL), geração de etanol endógeno e outros produtos tóxicos (N – óxido de trimetilamina), e alteração do metabolismo dos ácidos biliares (Machado e Cortez-Pinto, 2016). Além disso, a endotoxina (LPS) interage com receptores do sistema imune, especificamente do tipo Toll (TLR 4), mediando um estado de inflamação crônica de baixo grau que afeta o fígado, o tecido adiposo, o cérebro, o pâncreas e os vasos sanguíneos, acarretando DHGNA, resistência insulínica, obesidade, diabetes e arteriosclerose (Jin e Flavell, 2013). A expressão dos receptores Toll nos macrófagos induz a produção de  $TNF\alpha$ , IL6, IL 1 $\beta$ , quimiocinas e a liberação de fatores pró-fibrinogênicos pelas células imunes (Miura e Ohnishi, 2014).

O aumento da permeabilidade intestinal associado à alteração da microbiota, resulta em impacto negativo no fígado pelas toxinas bacterianas. O reestabelecimento da integridade da barreira intestinal, juntamente com o reequilíbrio da microbiota pode ser um importante fator no tratamento/prevenção da DHGNA. Neste contexto, os micro-organismos probióticos têm sua importância pois previnem a translocação bacteriana e invasão do epitélio intestinal, inibem a aderência de bactérias patogênicas na mucosa intestinal, modulam a microbiota local, produzem peptídeos antimicrobianos, reduzem a inflamação e estimulam a imunidade do hospedeiro (Cesaro *et al.*, 2011). Estudo realizado por Ma *et al.* (2008) em camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica e tratados com um *mix* de micro-organismos probióticos (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus thermophilus*) encontrou redução no acúmulo de triglicerídeos hepáticos, melhora da resistência insulínica e redução da expressão do  $TNF\alpha$ .

#### 4.6. *Kefir: aspectos gerais*

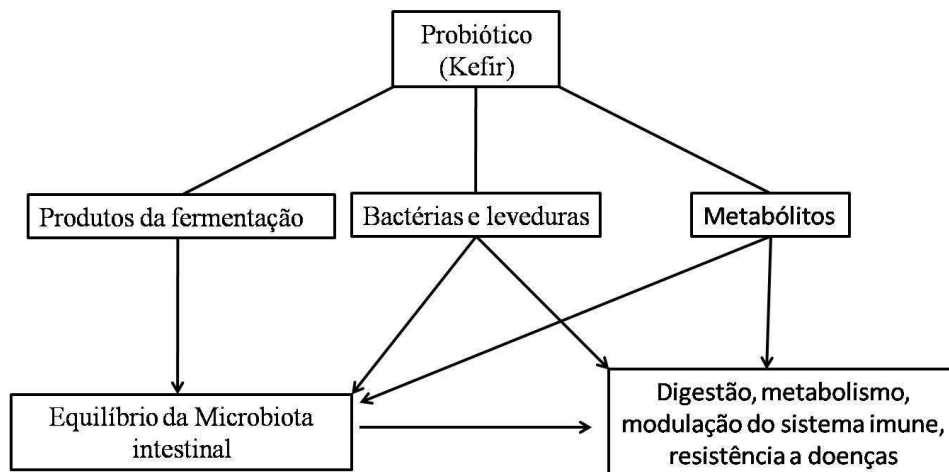
A palavra kefir origina-se do vocabulário turco, derivada da palavra *keif*, que pode ser traduzida como “bem estar” pela sensação experimentada após a ingestão da bebida ou sua alegação de melhoria da saúde (Lopitz-Otsoa *et al.*, 2006). O Kefir é uma bebida láctea fermentada por uma simbiose de bactérias e leveduras, viscosa, suavemente carbonatada, que contém pequenas quantidades de álcool, sendo tradicional no Oriente Médio. O kefir tem origem nas montanhas Caucasianas, na Ásia central, onde é consumido a milhares de anos, passando de geração para geração entre as famílias desta região (Otlés e Cagindi, 2003). De acordo com a região é conhecido por: *quépi*, *kippe*, *kéfir*, *khaphin*, *kiaphir*, *keffir* e *kefyr* (Farnworth, 2005). A produção artesanal do kefir ocorre em muitos países como Argentina, Taiwan, Portugal, países da Europa Central e Norte, Turquia, França, Suécia, Noruega, Finlândia, Hungria, Polónia, Alemanha, Grécia, Áustria e Brasil (Farnworth, 2005; Alsayadi *et al.*, 2013), Canadá (Mainville *et al.*, 2006), Japão (Cheirsilp *et al.*, 2003), Rússia e Estados Unidos (Otlés e Cagindi, 2003) e Iran (Assadi *et al.*, 2000). Segundo Farnworth (2005), não está claro se todos os kefires se originaram de uma única cultura inicial, pois análises microbiológicas de amostras de kefir de diferentes regiões, demonstraram diferenças na população microbiana.

Os grãos de kefir são capazes de fermentar diversos alimentos, como leite de vaca, cabra, ovelha, búfala, açúcar mascavo, sucos de frutas, extrato de soja, entre outros (Machado *et al.*, 2012). Tradicionalmente, o kefir de leite é produzido pelo acréscimo de grãos de kefir (uma massa de proteínas, polissacarídeos, bactérias lácticas e acéticas, e leveduras) em determinada quantidade de leite. Além desses, o leite de soja também pode ser utilizado para produção da bebida (Farnworth, 2005). Os grãos de kefir também podem ser cultivados em uma

solução de água e açúcar, conhecido como kefir de água. Os grãos de kefir de água são bem semelhantes aos grãos de kefir de leite em termos estruturais, associando micro-organismos e produtos formados durante o processo fermentativo (Magalhães *et al.*, 2010).

O kefir de leite tornou-se popular em vários países da Europa Central e de lá para outros continentes. Enquanto em alguns países este produto é desconhecido, na Rússia, Canadá, Alemanha, Suécia, Romênia e outros este produto é produzido comercialmente e consumido em quantidades apreciáveis. Entretanto, nos mesmos países onde a bebida é produzida comercialmente, ocorre também a produção em escala familiar, para consumo próprio. É nesta escala que o kefir ainda é hoje conhecido no Brasil, e vem conquistando adeptos em várias regiões do país nos últimos anos, devido a suas características sensoriais e suas propriedades terapêuticas (Weschenfelder, 2009).

Produtos fermentados, derivados do leite de diferentes animais, são talvez os alimentos fermentados mais comuns no mundo todo. O iogurte, que é conhecido por diferentes nomes em diversos países, é um produto fermentado familiar para os consumidores. O kefir, entretanto, é bem menos conhecido que o iogurte. No entanto, a análise de sua composição indica que o kefir pode conter ingredientes bioativos (Figura 2), os quais podem vir dos próprios micro-organismos (mortos ou vivos), dos metabólitos formados pelos micro-organismos durante o processo de fermentação (bacteriocinas) e da quebra de compostos da matriz alimentar (peptídeos bioativos), os quais podem conferir benefícios à saúde humana, significando que o kefir pode ser considerado um importante produto probiótico (Farnworth, 2005).



**Figura 2.** Efeito probiótico do kefir de leite no metabolismo e na saúde do hospedeiro- Adaptado de Farnworth (2005).

Os grãos de kefir de leite compreendem uma massa gelatinosa branca, composta por proteínas, lipídeos e um tipo de polissacarídeo solúvel, o kefiran, que envolve as bactérias e leveduras no grão, sendo que as bactérias predominantes são as do gênero *Lactobacillus*. Além disso, são encontradas leveduras predominantemente do gênero *Saccharomyces* e outras bactérias do gênero *Acetobacter*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* (Lopitz-Otsoa et al., 2006).

O kefir de água é uma bebida caseira, levemente ácida e que contém etanol em baixas concentrações e CO<sub>2</sub>. Os grãos de kefir de água consistem de um polímero de glicose (dextrana) e como o kefir de leite, uma simbiose de microorganismos. A população microbiana dos grãos de kefir de água inclui bactérias ácido lácticas, tais como *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*, bactérias acéticas como *Acetobacter* e *Bacillus*, e leveduras como *Zygosaccharomyces*, *Candida* e *Kloekera*. No kefir de água, bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Acetobacter*, e leveduras do gênero *Saccharomyces* foram encontradas em maior número. Embora os grãos de kefir de água sejam estruturalmente semelhantes aos do kefir de leite, os grãos do kefir de água são mais

transparentes, mucilaginosos e menos resistentes (Magalhães *et al.*, 2010; Waldherr *et al.*, 2010).

A origem do kefir de água permanece incerta. A primeira descrição científica foi publicada por Beijerinck (1889), na qual os grãos foram chamados de plantas “gingerbeer” e são relatados terem sido importados por soldados britânicos na guerra da Criméia em 1855. Outros nomes são geralmente usados para os grãos de kefir de água como tibicos e tibi (Miguel *et al.*, 2012). Os países com o maior consumo do kefir de água são: Estados Unidos, México, Canadá, Japão, Tailândia, Malásia, França, Grécia, Turquia, Romênia, Rússia, Inglaterra, Noruega, Suécia, Espanha, Portugal, Brasil, Chile e Peru (Leite *et al.*, 2013; Fiorda *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, houve um aumento no consumo do kefir de água, associado a relatos pelos consumidores de efeitos benéficos da bebida fermentada na saúde (sensação de bem-estar). Entretanto, estes benefícios ainda não foram confirmados cientificamente. Contudo, devido à presença de micro-organismos com ação probiótica na sua composição, o kefir de água pode apresentar efeitos, na obesidade e nas doenças hepáticas, na melhoria da microbiota intestinal, na modulação do sistema imune, na redução de citocinas inflamatórias e da síntese de lipídios (lipogênese), bem como no aumento da oxidação de ácidos graxos no tecido adiposo e no fígado. O presente estudo baseia-se na hipótese de que o kefir de água reduz a inflamação e o acúmulo de lipídeos nos tecidos adiposo e hepático, característicos da obesidade e da doença hepática gordurosa não alcoólica.

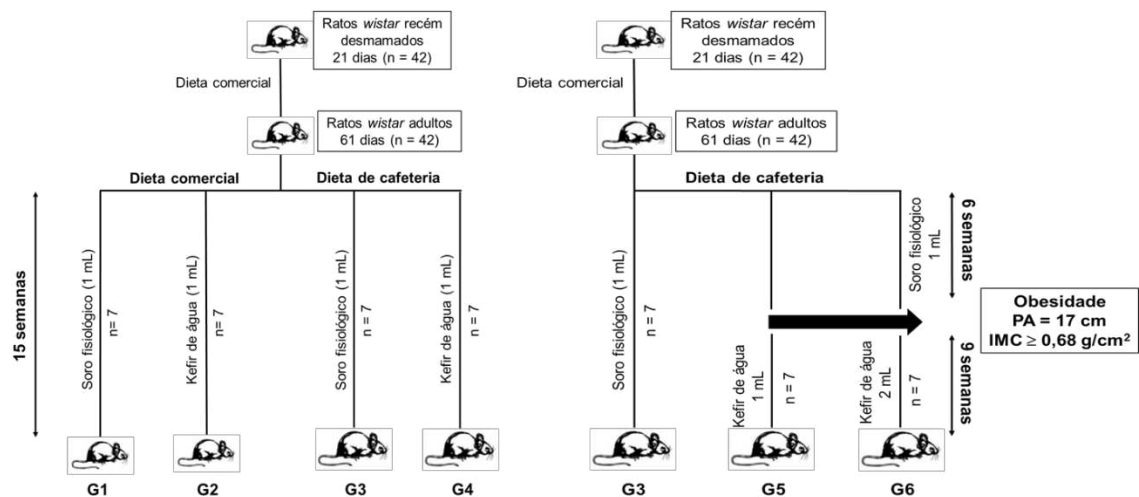
## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Preparo do kefir de água

Os grãos de kefir foram obtidos por doação na cidade de Viçosa - MG, e o açúcar mascavo, de um mesmo lote, foi adquirido no comércio local. Foram inoculados 10 g de grãos de kefir em 100 mL de solução de açúcar mascavo (5% m/v) em água destilada, e realizada a fermentação em incubadora (B.O D MA 415, Marconi) a 28 °C por 24 horas. Após este período, os grãos foram separados do kefir de água com o auxílio de uma peneira (Urdaneta *et al.*, 2007). O processo de fermentação foi repetido diariamente durante todo o período experimental.

### 5.2. Desenho Experimental

O esquema geral do desenho experimental está apresentado na Figura 3. Foram utilizados 42 ratos machos recém-desmamados com 21 dias de idade (*Wistar*, variedade *albinus*, classe *Rodentia*), com peso médio de 69g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV. Até o 60º dia de idade, fase adulta, os animais foram mantidos em caixas de polietileno consumindo ração comercial (Presence/In Vivo® Nutrição Animal) e água destilada *ad libitum*. A temperatura da sala de experimentação foi controlada em 22 ± 3°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas.



**Figura 3.** Ensaio biológico com o kefir de água

No 61º dia, os animais foram pesados e alocados em gaiolas individuais, de aço inoxidável e divididos aleatoriamente em seis grupos ( $n = 7$ ), de forma que a diferença entre as médias de peso dos grupos não ultrapassasse 3 g: G1 (dieta Comercial e 1 mL de soro fisiológico), G2 (dieta comercial e 1 mL de kefir de água), G3, G5 e G6 (dieta de cafeteria e 1 mL de soro fisiológico) e G4 (dieta de cafeteria e 1 mL de kefir de água). Após 6 semanas de intervenção com a dieta de cafeteria, foram realizadas as medidas de peso e comprimento para o cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC) para confirmação da indução da obesidade – Perímetro abdominal (PA)  $\geq 17$  cm e Índice de Massa Corporal (IMC)  $\geq 0,68$  g/cm<sup>2</sup> - (Novelli *et al.*, 2007; Reynés *et al.*, 2014) nos grupos G3, G5 e G6. Logo em seguida, os animais obesos (média IMC =  $0,72 \pm 0,02$  e PA =  $19,4 \pm 0,7$  cm) foram realocados, mantendo a similaridade de peso entre os grupos (Natal *et al.*, 2017). Os animais dos grupos G3 continuaram recebendo soro fisiológico, e os grupos G5 e G6 receberam 1 mL e 2 mL de kefir de água respectivamente. A administração do soro fisiológico e do kefir de água foi realizada diariamente por gavagem. O peso e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente. A dose de kefir administrada por gavagem forneceu

3,87 x 10<sup>7</sup> UFC/mL de bactérias ácido lácticas e 2,20 x 10<sup>13</sup> UFC/mL de leveduras totais.

Ao final do experimento, os ratos ficaram em jejum por 12 horas e foram anestesiados (Isoflurano 100%, Isoforine, Cristália<sup>®</sup>, em aparelho de anestesia inalatória conforme resolução 714, 20 de julho de 2002) e submetidos à eutanásia por punção cardíaca. O sangue foi coletado em tubos com ou sem anticoagulante (heparina) para obtenção do plasma ou do soro, após centrifugação sob refrigeração (4 °C) por 10 minutos a 3000 g. O fígado e os tecidos adiposos abdominal e epididimal dos animais foram retirados e pesados. Amostras do fígado e do tecido adiposo abdominal foram retiradas e fixadas em formaldeído tamponado 10% por 24 horas e armazenadas em álcool 70% para as análises histológicas. Amostras do fígado, do tecido adiposo epididimal foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultra freezer à temperatura de -80 °C.

**Tabela 1.** Composição da Dieta de Cafeteria\* (g / 1000 g de dieta)

| Ingredientes         | Quantidade (g) |
|----------------------|----------------|
| Patê de presunto     | 223            |
| Batata palha frita   | 111            |
| Bacon                | 111            |
| Mortadela            | 111            |
| Biscoito maisena     | 111            |
| Achocolatado em pó   | 111            |
| Leite integral em pó | 111            |
| Ração comercial      | 111            |

\*(Brito, 2013); Proporção de 2:1 do patê de presunto para os outros ingredientes da dieta.

### 5.3. Aspectos Éticos

O experimento foi conduzido de acordo com os Princípios Éticos para Experimentação Animal, aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA/ UFV) da UFV, Viçosa, MG sob o protocolo 79/2014 (Anexo 1).

### 5.4. Medidas biométricas e de consumo alimentar

A avaliação do consumo alimentar e a aferição do peso dos animais foram feitos uma vez por semana ao longo de todo o experimento (15 semanas). O perímetro abdominal foi mensurado no ponto cranial aos membros pélvicos do animal com auxílio de fita métrica e o índice de massa corporal (IMC) foi obtido pela razão entre o peso (g) e o quadrado do comprimento (cm). Para o cálculo do percentual de adiposidade abdominal foram somados os pesos dos tecidos adiposos abdominal e epididimal, divididos pelo peso corporal total e multiplicado por 100.

O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi calculado pela razão entre o ganho de peso (média semanal) e a quantidade total de dieta consumida (média semanal). O coeficiente de eficiência energética (CEE) foi calculado pela razão entre o ganho de peso (média semanal) e o total de calorias ingeridas (média semanal). O consumo de gordura foi calculado multiplicando-se a média de consumo semanal pelo teor de lipídeos em 100 g de dieta.

## **6. ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO NO PLASMA DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

### 6.1. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada segundo Dieterich et al. (2000). A metodologia baseia-se na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido  $O_2^-$  à peróxido de hidrogênio, diminuindo assim a razão de auto-oxidação do pirogalol. A determinação da atividade de SOD foi expressa em U

SOD / mL, onde 1 U é igual à quantidade da enzima que causa 50% de inibição da autoxidação do pirogallol. Foram pipetados em microplaca de 96 poços, em duplicata, 60  $\mu$ L de plasma puro, 219  $\mu$ L de tampão Tris HCl 50 mM, pH 8,2, contendo 1 mM de EDTA, 6  $\mu$ L de MTT (3- (4,5- Dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (1,25 mM) e 15  $\mu$ L de pirogallol (100  $\mu$ M). A placa foi incubada por 5 minutos a 37°C, sendo a leitura feita no comprimento de onda a 570 nm.

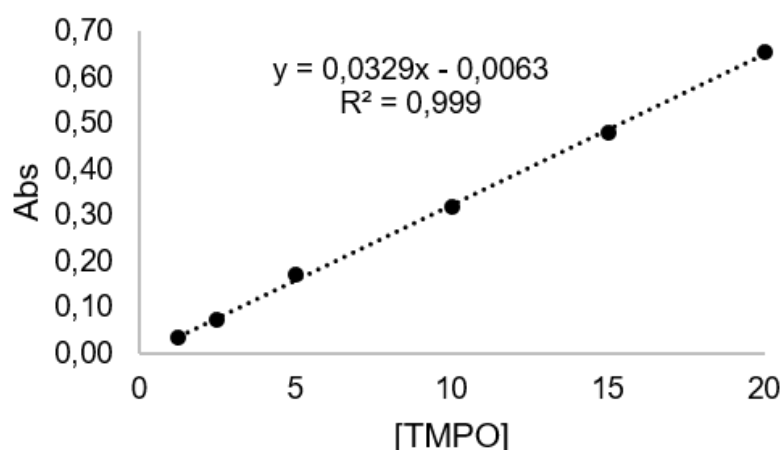
### 6.2. *Atividade da Glutathione S – transferase (GST)*

A atividade da enzima Glutathione S-transferase (GST) foi determinada de acordo com Habig et al. (1974), usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. As GSTs catalisam a reação de conjugação do substrato CDNB com a GSH (glutathione na forma reduzida), formando um tioéter, que pode ser rastreado pelo aumento de absorvância. Assim, 1000  $\mu$ L de solução de reação contendo 950  $\mu$ L de tampão fosfato de potássio (0,1 M pH 7,0), 10  $\mu$ L de CDNB 0,1 M (diluído em etanol PA 80%) e 10  $\mu$ L de GSH 100 mM (diluído em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0) foram adicionados a 30  $\mu$ L de plasma puro, em duplicata. A leitura da absorvância foi realizada em cubeta de quartzo (1,5 mL) utilizando-se espectrofotômetro (T70+ UV/VIS), no qual foi avaliado o aumento linear da absorvância a 340 nm durante 60 segundos, sendo descartados os 30 segundos iniciais. Os dados foram expressos em  $\mu$ Mol GST /min/ mL.

### 6.3. *Malondialdeído (MDA)*

A concentração de malondialdeído foi determinada pelo método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), segundo metodologia proposta por Buege & Aust. (1978). Em tubos Eppendorf de 2 mL foram acrescentados 200  $\mu$ L de plasma puro, em duplicata, e 400  $\mu$ L de solução TBARS (ácido tricloroacético 15 %, 0,375 % de ácido tiobarbitúrico e HCl 0,25

M). Os tubos foram agitados em vórtex por 10 segundos e logo em seguida colocados em banho maria a 95°C por 30 minutos. Após este período, os tubos foram resfriados em banho de gelo e foram acrescentados 600 µL de n-butanol. Os tubos foram novamente agitados em vórtex por 2 minutos e centrifugados a 3500 g por 5 minutos. Após a coleta do sobrenadante, foi utilizado um volume de 200 µL para leitura da absorvância em leitor de microplaca (Multiskan Go) a 535 nm. A concentração de MDA foi obtida por meio de uma curva padrão de TMPO (1,1,3,3 tetramethoxypropane) nas concentrações de 0; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 µM. A Figura 4 demonstra a equação da curva analítica utilizada para o cálculo da concentração de MDA no plasma. Os dados foram expressos em µMol MDA / mL.



**Figura 4.** Curva Analítica de TMPO (1,1,3,3 tetramethoxypropane)

## 7. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT - PCR

O RNA foi extraído do tecido hepático e do tecido adiposo epididimal usando o reagente Trizol (Invitrogen™, USA), sendo a sua concentração e pureza avaliados em espectrofotômetro Multiskan Go (Thermo Scientific, DE, USA), e a integridade do RNA por eletroforese em gel de agarose. Para a síntese do cDNA, utilizou-se o kit M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen Brasil Ltda.),

seguinte o protocolo do fabricante. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada por reação em cadeia da polimerase da transcriptase reversa em tempo real (RT-PCR) utilizando o equipamento AB StepOne Real Time PCR System e o reagente 2X SYBR Green Máster Mix (Applied Biosystems, CA, USA). O volume final de cada reação foi de 10 µl, sendo 1 µl do cDNA; 1,2 µl da mistura dos primers a 5 µM (senso e antisenso), 5,0 µl do reagente Sybr Green 2,8 µl de água nuclease free (Ambion) autoclavada. Os parâmetros utilizados na corrida foram 15 min a 95°C e em seguida 40 ciclos de 95°C (15s), 60°C (30s) e 72°C (30s), seguido pela análise da curva de melting (95°C (30s), 60°C (30s) e 95°C (30s)). As análises foram feitas em duplicata, sendo expressos os valores médios de cada grupo. Os níveis relativos de expressão de cada gene foram determinados pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  no AB SepOne Real Time PCR System (Applied Biosystem) software. A  $\beta$ -Actina foi utilizada como gene endógeno de referência. Para a análise da expressão gênica no fígado e no tecido adiposo foram utilizados os seguintes iniciadores:

| Iniciadores                      | Fw                     | Rv                     |
|----------------------------------|------------------------|------------------------|
| <b>PPAR<math>\alpha</math></b>   | CCTGCCTTCCCTGTGAAC     | ATCTGCTTCAAGTGGGGAGA   |
| <b>CPT – 1A</b>                  | GTAAGGCCACTGATGAAGGAAA | ATTTGGGTCCGAGGTTGACA   |
| <b>ADIPO R<sub>2</sub></b>       | CATGTTTGCCACCCCTCAGTA  | ATGCAAGGTAGGGATGATTCCA |
| <b>Fas</b>                       | AGCCCCTCAAGTGACAGTG    | TGCCA ATGTGTTTTCCCTGA  |
| <b>LpL</b>                       | CAGCTGGGCCTAACTTT      | CCTCTCTGCAATCACACGAA   |
| <b>Adiponectina</b>              | AATCCTGCCAGTCATGAAG    | CATCTCCTGGGTCAACCTTA   |
| <b>TNF<math>\alpha</math></b>    | ACAAGGCTGCCCGACTA      | TGGAAGACTCCTCCCAGGTATG |
| <b><math>\beta</math>-actina</b> | AGGGGAAGGGTGAAAAGATG   | GAGAGGGTGGATGGGTAGGG   |

## 8. QUANTIFICAÇÃO DE TRIACILGLICERÓIS E COLESTEROL HEPÁTICOS

Os lipídeos foram extraídos do fígado pelo método de Folch et al. (1957). Aproximadamente 100 mg de fígado foi triturado em tubo de vidro com o auxílio de “Ultra – Turrax disperser (IKA)” em 1900 µL de solução contendo clorofórmio-metanol (2:1). Logo em seguida foram adicionados 400 µL de metanol e realizadas homogeneização em vórtex (10 segundos) e centrifugação a 3.000 g

(dez minutos). O sobrenadante foi coletado com pipeta de Pasteur e transferido para outro tubo, sendo adicionados 800 µL de clorofórmio e 640 µL de solução de NaCl (0,73%). Novamente foram realizadas homogeneização em vórtex (30 segundos) e centrifugação a 3.000 g (dez minutos). A fase superior foi descartada e a fase inferior foi lavada três vezes com solução de Folch (3% de clorofórmio, 48% metanol, 47% de água e 2% de NaCl a 0,2%). O extrato lipídico foi seco em estufa a 37 °C por 12 horas. Para análise do teor de triglicéridos e colesterol total, ao extrato lipídico seco foi adicionado 1 mL de isopropanol. As análises foram realizadas utilizando “kits enzimáticos (BIOCLIN)” para análise de triglicérides e colesterol em soro ou plasma, seguindo as normas do fabricante.

## **9. ESTERIFICAÇÃO DA FRAÇÃO LIPÍDICA E ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS HEPÁTICOS**

### *9.1. Esterificação da fração lipídica*

Os lipídeos foram extraídos do fígado pelo método de Folch et al. (1957) e esterificados pelo método proposto por Hartman e Lago (1973). Às frações lipídicas, foram adicionados o reagente de saponificação (solução metanólica de hidróxido de sódio 2%) e levados ao banho-maria a 80°C por 15 minutos. Logo em seguida, foram adicionados o reagente de esterificação (solução metanólica composta por cloreto de amônio e ácido sulfúrico concentrado), sendo a mistura novamente colocada em banho-maria por mais 15 minutos. Após o resfriamento, foram adicionados às amostras NaCl 20% e 0,5 mL de hexano, sendo homogeneizadas em vórtex por 30 segundos. Após essa etapa, adicionou-se mais 0,5 mL de hexano sendo o sobrenadante recolhido, transferido para *vials* âmbar de 1 mL, seco em nitrogênio e mantido sobre congelamento a -20 °C até o momento das análises por cromatografia gasosa.

## *9.2. Análise do perfil de ácidos graxos hepáticos*

As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás modelo CG Solution (SHIMADZU), equipado com detector por ionização de chama (FID). Para registro e análise dos cromatogramas, o aparelho é acoplado a um microcomputador, utilizando-se o programa GC Solution. Foi utilizada uma coluna capilar Carbowax (30 m x 0,25 mm). Para a separação cromatográfica, 1 µL de amostra foi injetado com auxílio de seringa de 10 µL (Hamilton®) em sistema Split = 1/10. O gás nitrogênio foi utilizado como carreador com velocidade linear programada para 43,2 cm/s e os gases Hidrogênio e Ar sintético formaram a chama no detector. As temperaturas do injetor e do detector foram controladas isotermicamente em 200 °C e 220 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 100 °C (mantida por 5 minutos), aumentando em 4 °C/minuto até atingir 220 °C (mantida por 10 minutos). O fluxo de gás de arraste na coluna foi de 0,4 mL/minuto. A identificação dos compostos foi realizada pelo tempo de retenção do padrão correspondente.

## **10. ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS**

### *10.1. Tecido adiposo*

Fragmentos do tecido adiposo abdominal foram fixados em formalina 10% e incluídos em parafina. Foram obtidos cortes semi seriados com 5 µm de espessura e, posteriormente, os cortes foram laminados e corados com Hematoxilina/Eosina (HE). As lâminas foram montadas com Entellan (Merck®) e analisadas em microscópio de luz (OLYMPUS BX 60). As imagens foram obtidas em câmera digital (Q COLOR 3 OLYMPUS® AMERICA INC.) com auxílio do software Q COLOR OLYMPUS®. As imagens das secções histológicas foram capturadas com objetiva de 10X, sendo medidos o diâmetro, o perímetro e a

área dos adipócitos com auxílio do aplicativo Image Pro-Plus® versão 4.5, usando o valor médio de mil adipócitos por grupo.

### *10.2. Fígado*

Fragmentos do fígado foram fixados em formalina e incluídos em resina glicolmetacrilato (Leica, Histoiresin®). Foram obtidos cortes semi seriados com 3 µm de espessura e, posteriormente, os cortes foram laminados e corados com azul de toluidina. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck®) e analisadas em microscópio de luz (OLYMPUS BX 60). As imagens foram obtidas em câmera digital (Q COLOR 3 OLYMPUS® AMERICA INC.) com auxílio do software Q COLOR OLYMPUS®. As imagens das secções histológicas foram capturadas com objetiva de 40X. A quantificação da deposição lipídica presente nos campos histológicos foi realizada utilizando-se o aplicativo ImageJ (Fiji). Padronizou-se a sobreposição de uma matriz quadrada padrão (14 linhas x 19 colunas) nos campos fotografados, totalizando 266 pontos (interseções entre linhas e colunas). Foram analisadas 10 fotos por animal e contabilizados os pontos sobre núcleos, citoplasma, vasos, células de kuppfer (macrófagos) e vesículas de gordura. Os dados foram expressos em percentual de gordura hepática.

## **11. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As análises foram conduzidas segundo um delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram expressos como média ± desvio-padrão (DP). Para análise descritiva dos dados e testes de comparação de grupos independentes utilizou-se o software GraphPad Prisma versão 6.0. Para avaliação da distribuição normal das variáveis foi realizado o teste de Kolmogorov-Sminorv. O teste de ANOVA a um fator seguido do teste de

Bonferroni foi utilizado para comparação das médias entre os grupos. Foi adotado nível de significância de 5% de probabilidade.

## 12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, M. Non-alcoholic fatty liver disease in 2015. **World journal of hepatology**, v. 7, n. 11, p. 1450-1459, 2015.

ALISI, A.; CECCARELLI, S.; PANERA, N.; NOBILI, V. Causative role of gut microbiota in non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 132, 2012.

ALSAYADI, M. S. M.; AL-JAWFI, Y.; BELARBI, M.; SABRI, F. Z. Antioxidant potency of water kefir. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2, n. 6, p. 2444-2447, 2013.

AN, H.; PARK, S.; LEE, D.; KIM, J.; CHA, M.; LEE, S.; LIM, H.; KIM, K.; HA, N. Antiobesity and lipid-lowering effects of Bifidobacterium spp. in high fat diet-induced obese rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2011.

ARAGNO, M.; TOMASINELLI, C. E.; VERCELLINATTO, I.; CATALANO, M. G.; COLLINO, M.; FANTOZZI, R.; DANNI, O.; BOCCUZZI, G. SREBP-1c in nonalcoholic fatty liver disease induced by Western-type high-fat diet plus fructose in rats. **Free radical biology & medicine**, v. 47, n. 7, p. 1067-1074, 2009.

ARONNE, L. J.; NELINSON, D. S.; LILLO, J. L. Obesity as a disease state: a new paradigm for diagnosis and treatment. **Clinical Cornerstone**, v. 9, n. 4, p. 9-25, 2009.

ARORA, T.; ANASTASOVSKA, J.; GIBSON, G.; TUOHY, K.; SHARMA, R. K.; BELL, J.; FROST, G. Effect of Lactobacillus acidophilus NCDC 13 supplementation on the progression of obesity in diet-induced obese mice. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 08, p. 1382-1389, 2012.

ASSADI, M. M.; POURAHMAD, R.; MOAZAMI, N. Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 6, p. 541-543, 2000.

BÄCKHED, F. Addressing the gut microbiome and implications for obesity. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 4, p. 259-261, 2010.

BEIJERINCK, M. W. Sur le kefir. Archives Neerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles,. **Haarlem**, v. 23, p. 248–258, 1889.

BLAUT, M.; BISCHOFF, S. C. Probiotics and Obesity. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 57, n. 1, p. 20-23, 2010.

BRAY, G. A. Medical Consequences of Obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2583-2589, 2004.

BRITO, L. F. **Efeito do Extrato Das Folhas De Manga Ubá (Mangífera Indica L) e Da Mangiferina Na Modulação Da Expressão Dos Receptores CB1, PPAR $\gamma$  E ADIPOCINAS Em Ratos Alimentados Com Dieta De Cafeteria**. 2013. 100p Doutorado (Doutorado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.
- BULLO, M.; CASAS-AGUSTENCH, P.; AMIGO-CORREIG, P.; ARANCETA, J.; SALAS-SALVADO, J. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. **Public Health Nutr**, v. 10, n. 10A, p. 1164-1172, 2007.
- BUTEL, M. J. Probiotics, gut microbiota and health. **Médecine et Maladies Infectieuses** v. 44, n. 1, p. 1-8, 2014.
- CANCELLO, R.; CLÉMENT, K. Review article: Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. **An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 113, n. 10, p. 1141-1147, 2006.
- CANI, P. D.; AMAR, J.; IGLESIAS, M. A.; POGGI, M.; KNAUF, C.; BASTELICA, D.; NEYRINCK, A. M.; FAVA, F.; TUOHY, K. M.; CHABO, C.; WAGET, A.; DELMÉE, E.; COUSIN, B.; SULPICE, T.; CHAMONTIN, B.; FERRIÈRES, J.; TANTI, J.-F.; GIBSON, G. R.; CASTEILLA, L.; DELZENNE, N. M.; ALESSI, M. C.; BURCELIN, R. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 7, p. 1761-1772, 2007.
- CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 6, p. 737-743, 2009.
- CANI, P. D.; NEYRINCK, A. M.; FAVA, F.; KNAUF, C.; BURCELIN, R. G.; TUOHY, K. M.; GIBSON, G. R.; DELZENNE, N. M. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. **Diabetologia**, v. 50, n. 11, p. 2374-2383, 2007.
- CAO, H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. **The Journal of endocrinology**, v. 220, n. 2, p. 47-59, 2014.
- CAVE, M. C.; HURT, R. T.; FRAZIER, T. H.; MATHESON, P. J.; GARRISON, R. N.; MCCLAIN, C. J.; MCCLAVE, S. A. Obesity, inflammation, and the potential application of pharmaconutrition. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 23, n. 1, p. 16-34, 2008.
- CESARO, C.; TISO, A.; DEL PRETE, A.; CARIELLO, R.; TUCCILLO, C.; COTTICELLI, G.; DEL VECCHIO BLANCO, C.; LOGUERCIO, C. Gut microbiota and probiotics in chronic liver diseases. **Digestive and Liver Disease**, v. 43, n. 6, p. 431-438, 2011.
- CHEIRSILP, B.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 100, n. 1, p. 43-53, 2003.
- CHOI, C. S.; SAVAGE, D. B.; KULKARNI, A.; YU, X. X.; LIU, Z. X.; MORINO, K.; KIM, S.; DISTEFANO, A.; SAMUEL, V. T.; NESCHEN, S.; ZHANG, D.; WANG, A.; ZHANG, X. M.; KAHN, M.; CLINE, G. W.; PANDEY, S. K.; GEISLER, J. G.; BHANOT, S.; MONIA, B. P.; SHULMAN, G. I. Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 31, p. 22678-22688, 2007.

COLLABORATORS, T. G. O. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 1, p. 13-27, 2017.

CONROY, K. P.; DAVIDSON, I. M.; WARNOCK, M. Pathogenic obesity and nutraceuticals. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 70, n. 4, p. 426-438, 2011.

DANIELS, S. R.; ARNETT, D. K.; ECKEL, R. H.; GIDDING, S. S.; HAYMAN, L. L.; KUMANYIKA, S.; ROBINSON, T. N.; SCOTT, B. J.; ST. JEOR, S.; WILLIAMS, C. L. Overweight in Children and Adolescents: Pathophysiology, Consequences, Prevention, and Treatment. **Circulation**, v. 111, n. 15, p. 1999-2012, 2005.

DE FILIPPO, C.; CAVALIERI, D.; DI PAOLA, M.; RAMAZZOTTI, M.; POULLET, J. B.; MASSART, S.; COLLINI, S.; PIERACCINI, G.; LIONETTI, P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 33, p. 1-6, 2010.

DE LA SERRE, C. B.; ELLIS, C. L.; LEE, J.; HARTMAN, A. L.; RUTLEDGE, J. C.; RAYBOULD, H. E. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 299, n. 2, p. 440-448, 2010.

DELZENNE, N. M.; CANI, P. D. Interaction Between Obesity and the Gut Microbiota: Relevance in Nutrition. **Annual Review of Nutrition**, v. 31, n. 1, p. 15-31, 2011.

DIBAISE, J. K.; ZHANG, H.; CROWELL, M. D.; KRAJMALNIK-BROWN, R.; DECKER, G. A.; RITTMANN, B. E. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, n. 4, p. 460-469, 2008.

DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K.; HASENFUSS, G.; PRESTLE, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, v. 101, n. 1, p. 33-39, 2000.

DOULBERIS, M.; KOTRONIS, G.; GIALAMPRINO, D.; KOUNTOURAS, J.; KATSINELOS, P. Non-alcoholic fatty liver disease: An update with special focus on the role of gut microbiota. **Metabolism**, v. 71, p. 182-197, 2017.

DUSEJA, A.; CHAWLA, Y. K. Obesity and NAFLD: the role of bacteria and microbiota. **Clinics in liver disease**, v. 18, n. 1, p. 59-71, 2014.

ESPOSITO, E.; IACONO, A.; BIANCO, G.; AUTORE, G.; CUZZOCREA, S.; VAJRO, P.; CANANI, R. B.; CALIGNANO, A.; RASO, G. M.; MELI, R. Probiotics Reduce the Inflammatory Response Induced by a High-Fat Diet in the Liver of Young Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 139, n. 5, p. 905-911, 2009.

FAO/WHO. **Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food** London, Ontario. Canada 2002.

FARNWORTH, E. R. Kefir - a complex probiotic. **Food Science and Technology Bulletin**, v. 2, n. 1, p. 1-17, 2005.

- FERRANTE, A. W. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. **Journal of Internal Medicine**, v. 262, n. 4, p. 408-414, 2007.
- FIORDA, F. A.; DE MELO PEREIRA, G. V.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RAKSHIT, S. K.; PAGNONCELLI, M. G. B.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. **Food Microbiol**, v. 66, p. 86-95, 2017.
- FLINT, H. J. The impact of nutrition on the human microbiome. **Nutrition Reviews**, v. 70, p. S10-S13, 2012.
- FOLCH, J.; LESS, M.; STANJEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.
- GILL, S. R.; POP, M.; DEBOY, R. T.; ECKBURG, P. B.; TURNBAUGH, P. J.; SAMUEL, B. S.; GORDON, J. I.; RELMAN, D. A.; FRASER-LIGGETT, C. M.; NELSON, K. E. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. **Science**, v. 312, n. 5778, p. 1355-1359, 2006.
- HAASE, J.; WEYER, U.; IMMIG, K.; KLÖTING, N.; BLÜHER, M.; EILERS, J.; BECHMANN, I.; GERICKE, M. Local proliferation of macrophages in adipose tissue during obesity-induced inflammation. **Diabetologia**, v. 57, n. 3, p. 562-571, 2014.
- HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.
- HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory practice**, v. 22, n. 6, p. 475-477, 1973.
- HASHIMOTO, E.; TANIAI, M.; TOKUSHIGE, K. Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 28 n. 4, p. 64-70, 2013.
- HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860-867, 2006.
- JIN, C.; FLAVELL, R. A. Innate sensors of pathogen and stress: Linking inflammation to obesity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 2, p. 287-294, 2013.
- JUMPERTZ, R.; LE, D. S.; TURNBAUGH, P. J.; TRINIDAD, C.; BOGARDUS, C.; GORDON, J. I.; KRAKOFF, J. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, n. 1, p. 58-65, 2011.
- JUNG, U. J.; CHOI, M. S. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 4, p. 6184-6223, 2014.
- KALLIOMAKI, M.; COLLADO, M. C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 3, p. 534-8, 2008.

KENNEDY, A.; MARTINEZ, K.; CHUANG, C.-C.; LAPOINT, K.; MCINTOSH, M. Saturated Fatty Acid-Mediated Inflammation and Insulin Resistance in Adipose Tissue: Mechanisms of Action and Implications. **The Journal of Nutrition**, v. 139, n. 1, p. 1-4, 2009.

KIM, D. H.; KIM, H.; JEONG, D.; KANG, I. B.; CHON, J. W.; KIM, H. S.; SONG, K. Y.; SEO, K. H. Kefir alleviates obesity and hepatic steatosis in high-fat diet-fed mice by modulation of gut microbiota and mycobiota: targeted and untargeted community analysis with correlation of biomarkers. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 44, p. 35-43, 2017.

KIRPICH, I. A.; FENG, W.; WANG, Y.; LIU, Y.; BARKER, D. F.; BARVE, S. S.; MCCLAIN, C. J. The type of dietary fat modulates intestinal tight junction integrity, gut permeability, and hepatic toll-like receptor expression in a mouse model of alcoholic liver disease. **Alcoholism, clinical and experimental research** v. 36, n. 5, p. 835-846, 2012.

KOBYLIAK, N.; CONTE, C.; CAMMAROTA, G.; HALEY, A. P.; STYRIAK, I.; GASPAR, L.; FUSEK, J.; RODRIGO, L.; KRUZLIAK, P. Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. **Nutrition & metabolism**, v. 13, p. 1-14, 2016.

LEE, M.-J.; WU, Y.; FRIED, S. K. Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 13, n. 4, p. 371-376, 2010.

LEE, S. J.; BOSE, S.; SEO, J.-G.; CHUNG, W.-S.; LIM, C.-Y.; KIM, H. The effects of co-administration of probiotics with herbal medicine on obesity, metabolic endotoxemia and dysbiosis: A randomized double-blind controlled clinical trial. **Clinical Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 973-981, 2014.

LEITE, A. M. D. O.; MIGUEL, M. A. L.; PEIXOTO, R. S.; ROSADO, A. S.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 341-349, 2013.

LEY, R. E.; HAMADY, M.; LOZUPONE, C.; TURNBAUGH, P. J.; RAMEY, R. R.; BIRCHER, J. S.; SCHLEGEL, M. L.; TUCKER, T. A.; SCHRENZEL, M. D.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. **Science**, v. 320, n. 5883, p. 1647-1651, 2008.

LEY, R. E.; TURNBAUGH, P. J.; KLEIN, S.; GORDON, J. I. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1022-1023, 2006.

LOPITZ-OTSOA, F.; REMENTERIA, A.; ELGUEZABAL, N.; GARAIZAR, J. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, n. 2, p. 67-74, 2006.

LUMENG, C. N.; SALTIEL, A. R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 6, p. 2111-2117, 2011.

MA, X.; HUA, J.; LI, Z. Probiotics Improve High Fat Diet-induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance by Increasing Hepatic NKT cells. **Journal of hepatology**, v. 49, n. 5, p. 821-830, 2008.

- MACHADO, B. A. S.; REIS, J. H. O. R.; PIRES, E. A. P.; SANTOS, F. L. S. Mapeamento tecnológico de patentes de kefir **Cadernos de Prospecção**, v. 5, n. 2, p. 86-97, 2012.
- MACHADO, M. V.; CORTEZ-PINTO, H. Diet, Microbiota, Obesity, and NAFLD: A Dangerous Quartet. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 4, p. 1-20, 2016.
- MAGALHÃES, K.; DE M. PEREIRA, G. V.; DIAS, D.; SCHWAN, R. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 1241-1250, 2010.
- MAINVILLE, I.; ROBERT, N.; LEE, B.; FARNWORTH, E. R. Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir. **Systematic and Applied Microbiology** v. 29, n. 1, p. 59-68, 2006.
- MARQUES-LOPES, I.; MARTI, A.; MORENO-ALIAGA, M. J.; MARTÍNEZ, A. Aspectos genéticos da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 327-338, 2004.
- MARRA, F.; BERTOLANI, C. Adipokines in liver diseases. **Hepatology**, v. 50, n. 3, p. 957-969, 2009.
- MARSH, A. J.; O'SULLIVAN, O.; HILL, C.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D. Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. **FEMS Microbiol Lett**, v. 348, n. 1, p. 79-85, 2013.
- MIGUEL, M. G. C. P.; SANTOS, M. R. R. M.; DUARTE, W. F.; DE ALMEIDA, E. G.; SCHWAN, R. F. Physico-chemical and microbiological characterization of corn and rice 'calugi' produced by Brazilian Amerindian people. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 524-532, 2012.
- MIRZA, M. S. Obesity, Visceral Fat, and NAFLD: Querying the Role of Adipokines in the Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **ISRN Gastroenterology**, v. 2011, p. 1-11, 2011.
- MIURA, K.; OHNISHI, H. Role of gut microbiota and Toll-like receptors in nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 23, p. 7381-7391, 2014.
- MOHAMMADMORADI, S.; JAVIDAN, A.; KORDI, J. Boom of probiotics: This time non-alcoholic fatty liver disease – A mini review. **Journal of Functional Foods**, v. 11, n. Supplement C, p. 30-35, 2014.
- NAITO, E.; YOSHIDA, Y.; MAKINO, K.; KOUNOSHI, Y.; KUNIHIRO, S.; TAKAHASHI, R.; MATSUZAKI, T.; MIYAZAKI, K.; ISHIKAWA, F. Beneficial effect of oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on insulin resistance in diet-induced obesity mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 3, p. 650-657, 2011.
- NAKAMURA, Y.; OMAE, S. Metabolic diseases and pro- and prebiotics: Mechanistic insights. **Nutrition & Metabolism**, v. 9, n. 60, p. 1-9, 2012.
- NATAL, D. I. G.; RODRIGUES, K. C. D. C.; MOREIRA, M. E. D. C.; DE QUEIRÓZ, J. H.; BENJAMIN, L. D. A.; DOS SANTOS, M. H.; SANT'ANA, H. M. P.; MARTINO, H. S. D. Bioactive compounds of the Ubá mango juices decrease inflammation and hepatic steatosis in obese Wistar rats. **Journal of Functional Foods**, v. 32, n. Supplement C, p. 409-418, 2017.

NAVAB, M.; GHARAVI, N.; WATSON, A. D. Inflammation and metabolic disorders. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 11, n. 4, p. 459-464, 2008.

NGUYEN, M. T.; SATOH, H.; FAVELYUKIS, S.; BABENDURE, J. L.; IMAMURA, T.; SBODIO, J. I.; ZALEVSKY, J.; DAHIYAT, B. I.; CHI, N. W.; OLEFSKY, J. M. JNK and tumor necrosis factor-alpha mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 42, p. 35361-35371, 2005.

NOVELLI, E. L. B.; DINIZ, Y. S.; C M GALHARDI, C. M.; G M X EBAID, G. M.; RODRIGUES, H. G.; MANI, F.; FERNANDES, A. A. H.; CICOONA, A. C.; NOVELLI FILHO, J. L. V. B. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, p. 111-119, 2007.

NOVOTNY NUNEZ, I.; MALDONADO GALDEANO, C.; DE MORENO DE LEBLANC, A.; PERDIGON, G. Lactobacillus casei CRL 431 administration decreases inflammatory cytokines in a diet-induced obese mouse model. **Nutrition**, v. 31, n. 7-8, p. 1000-1007, 2015.

O'HARA, A. M.; SHANAHAN, F. The gut flora as a forgotten organ. **EMBO Reports**, v. 7, n. 7, p. 688-693, 2006.

OTLES, S.; CAGINDI, O. Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 54-59, 2003.

PANG, C.; GAO, Z.; YIN, J.; ZHANG, J.; JIA, W.; YE, J. Macrophage infiltration into adipose tissue may promote angiogenesis for adipose tissue remodeling in obesity. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 295, n. 2, p. E313-E322, 2008.

PARK, D. Y.; AHN, Y. T.; PARK, S. H.; HUH, C. S.; YOO, S. R.; YU, R.; SUNG, M. K.; MCGREGOR, R. A.; CHOI, M. S. Supplementation of Lactobacillus curvatus HY7601 and Lactobacillus plantarum KY1032 in diet-induced obese mice is associated with gut microbial changes and reduction in obesity. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. 1-12, 2013.

PARK, E. J.; LEE, J. H.; YU, G. Y.; HE, G.; ALI, S. R.; HOLZER, R. G.; OSTERREICHER, C. H.; TAKAHASHI, H.; KARIN, M. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. **Cell**, v. 140, n. 2, p. 197-208, 2010.

PEREIRA, J. A. R. **Respostas metabólicas em camundongos submetidos à dieta indutora de obesidade e alimentados com iogurtes probióticos e yacon**. 2013. 161p (Doutorado). Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

POLYZOS, S. A.; KOUNTOURAS, J.; ZAVOS, C.; TSIAOUI, E. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. **Diabetes, obesity & metabolism**, v. 12, n. 5, p. 365-383, 2010.

PUSSINEN, P. J.; HAVULINNA, A. S.; LEHTO, M.; SUNDVALL, J.; SALOMAA, V. Endotoxemia Is Associated With an Increased Risk of Incident Diabetes. **Diabetes Care**, v. 34, n. 2, p. 392-397, 2011.

RECCIA, I.; KUMAR, J.; AKLADIOS, C.; VIRDIS, F.; PAI, M.; HABIB, N.; SPALDING, D. Non-alcoholic fatty liver disease: A sign of systemic disease. **Metabolism**, v. 72, p. 94-108, 2017.

- REQUENA, T.; COTTER, P.; SHAHAR, D. R.; KLEIVELAND, C. R.; MARTÍNEZ-CUESTA, M. C.; PELÁEZ, C.; LEA, T. Interactions between gut microbiota, food and the obese host. **Trends in Food Science & Technology**, v. 34, n. 1, p. 44-53, 2013.
- REYNÉS, B.; GARCÍA-RUIZ, E.; DÍAZ-RÚA, R.; PALOU, A.; OLIVER, P. Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet. **Food Research International**, v. 64, p. 839-848, 2014.
- RODRIGUES, A. E.; MAROSTEGAN, P. F.; MANCINI, M. C.; DALCANALE, L.; MELO, M. E. D.; CERCATO, C.; HALPERN, A. Análise da taxa metabólica de repouso avaliada por calorimetria indireta em mulheres obesas com baixa e alta ingestão calórica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, p. 76-84, 2008.
- ROGERO, M. M.; BORELLI, P.; VINOLO, M. A. R.; FOCK, R. A.; DE OLIVEIRA PIRES, I. S.; TIRAPEGUI, J. Dietary glutamine supplementation affects macrophage function, hematopoiesis and nutritional status in early weaned mice. **Clinical Nutrition**, v. 27, n. 3, p. 386-397, 2008.
- SAMUEL, B. S.; HANSEN, E. E.; MANCHESTER, J. K.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B.; FULTON, R.; LATREILLE, P.; KIM, K.; WILSON, R. K.; GORDON, J. I. Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. **Proceedings of the National Academy of Sciences Journal**, v. 104, n. 25, p. 10643-10648, 2007.
- SANZ, Y.; SANTACRUZ, A.; GAUFFIN, P. Gut microbiota in obesity and metabolic disorders. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, n. 03, p. 434-441, 2010.
- SHAH, A.; MEHTA, N.; REILLY, M. P. Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 32, n. 6, p. 638-644, 2008.
- SHIN, J. H.; NAM, M. H.; LEE, H.; LEE, J. S.; KIM, H.; CHUNG, M. J.; SEO, J. G. Amelioration of obesity-related characteristics by a probiotic formulation in a high-fat diet-induced obese rat model. **European journal of nutrition**, p. 1-10, 2017.
- SHOELSON, S. E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2169-2180, 2007.
- SINGH, G. M.; DANAEI, G.; FARZADFAR, F.; STEVENS, G. A.; WOODWARD, M.; WORMSER, D.; KAPTOGE, S.; WHITLOCK, G.; QIAO, Q.; LEWINGTON, S.; DI ANGELANTONIO, E.; VANDER HOORN, S.; LAWES, C. M. M.; ALI, M. K.; MOZAFFARIAN, D.; EZZATI, M. The Age-Specific Quantitative Effects of Metabolic Risk Factors on Cardiovascular Diseases and Diabetes: A Pooled Analysis. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, p. e65174, 2013.
- SOFTIC, S.; COHEN, D. E.; KAHN, C. R. Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 61, n. 5, p. 1282-1293, 2016.
- STEIN, C. J.; COLDITZ, G. A. The Epidemic of Obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2522-2525, 2004.

STYSKAL, J.; VAN REMMEN, H.; RICHARDSON, A.; SALMON, A. B. Oxidative stress and diabetes: What can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 46-58, 2012.

THAN, N. N.; NEWSOME, P. N. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. **Atherosclerosis**, v. 239, n. 1, p. 192-202, 2015.

TILG, H.; KASER, A. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 6, p. 2126-2132, 2011.

TRAYHURN, P. Adipocyte biology. **Obesity Reviews** v. 8, n. 1, p. 41-44, 2007.

TURNBAUGH, P. J.; BÄCKHED, F.; FULTON, L.; GORDON, J. I. Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. **Cell Host & Microbe**, v. 3, n. 4, p. 213-223, 2008.

TURNBAUGH, P. J.; HAMADY, M.; YATSUNENKO, T.; CANTAREL, B. L.; DUNCAN, A.; LEY, R. E.; SOGIN, M. L.; JONES, W. J.; ROE, B. A.; AFFOURTIT, J. P.; EGHOLM, M.; HENRISSAT, B.; HEATH, A. C.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 480-484, 2009.

URDANETA, E.; BARRENETXE, J.; ARANGUREN, P.; IRIGOYEN, A.; MARZO, F.; IBÁÑEZ, F. C. Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats. **Nutrition Research**, v. 27, n. 10, p. 653-658, 2007.

VAJRO, P.; MANDATO, C.; LICENZIATI, M. R.; FRANZESE, A.; VITALE, D. F.; LENTA, S.; CAROPRESO, M.; VALLONE, G.; MELI, R. Effects of Lactobacillus rhamnosus Strain GG in Pediatric Obesity-related Liver Disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 52, n. 6, p. 740-743 2011.

VELAYUDHAM, A.; DOLGANIUC, A.; ELLIS, M.; PETRASEK, J.; KODYS, K.; MANDREKAR, P.; SZABO, G. VSL#3 probiotic treatment attenuates fibrosis without changes in steatohepatitis in a diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model in mice. **Hepatology**, v. 49, n. 3, p. 989-997, 2009.

VINAIXA, M.; ÁNGEL RODRÍGUEZ, M.; RULL, A.; BELTRÁN, R.; BLADÉ, C.; BREZMES, J.; CAÑELLAS, N.; JOVEN, J.; CORREIG, X. Metabolomic Assessment of the Effect of Dietary Cholesterol in the Progressive Development of Fatty Liver Disease. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 5, p. 2527-2538, 2010.

WALDHERR, F. W.; DOLL, V. M.; MEISSNER, D.; VOGEL, R. F. Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from Lactobacillus hilgardii TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. **Food Microbiology**, v. 27, n. 5, p. 672-678, 2010.

WALDRAM, A.; HOLMES, E.; WANG, Y.; RANTALAINEN, M.; WILSON, I. D.; TUOHY, K. M.; MCCARTNEY, A. L.; GIBSON, G. R.; NICHOLSON, J. K. Top-down systems biology modeling of host metabotype-microbiome associations in obese rodents. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 5, p. 2361-2375, 2009.

WANG, D.; WEI, Y.; PAGLIASSOTTI, M. J. Saturated Fatty Acids Promote Endoplasmic Reticulum Stress and Liver Injury in Rats with Hepatic Steatosis. **Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 943-951, 2006.

WANG, S.; SONI, K. G.; SEMACHE, M.; CASAVANT, S.; FORTIER, M.; PAN, L.; MITCHELL, G. A. Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism. **Molecular genetics and metabolism**, v. 95, n. 3, p. 117-1126, 2008.

WESCHENFELDER, S. **Caracterização de kefir tradicional quanto à composição físico-química, sensorialidade e atividade anti-Escherichia coli**. 2009. 72p (Mestrado). Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

WOODS, C. P.; HAZLEHURST, J. M.; TOMLINSON, J. W. Glucocorticoids and non-alcoholic fatty liver disease. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 154, p. 94-103, 2015.

XUE, L.; HE, J.; GAO, N.; LU, X.; LI, M.; WU, X.; LIU, Z.; JIN, Y.; LIU, J.; XU, J.; GENG, Y. Probiotics may delay the progression of nonalcoholic fatty liver disease by restoring the gut microbiota structure and improving intestinal endotoxemia. **Scientific Reports**, v. 7, n. 29/09/2017, p. 1-13, 2017.

YE, J.; MCGUINNESS, O. P. Inflammation during obesity is not all bad: Evidence from animal and human studies. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 304, n. 5, p. 466-477, 2013.

YOUNOSSI, Z. M.; KOENIG, A. B.; ABDELATIF, D.; FAZEL, Y.; HENRY, L.; WYMER, M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology**, v. 64, n. 1, p. 73-84, 2016.

ZANIRATI, D. F.; ABATEMARCO, M.; SANDES, S. H. D. C.; NICOLI, J. R.; NUNES, Á. C.; NEUMANN, E. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. **Anaerobe**, v. 32, n. Supplement C, p. 70-76, 2015.

ZOLLER, H.; TILG, H. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. **Metabolism**, v. 65, n. 8, p. 1151-1160, 2016.

**CAPÍTULO 1: KEFIR DE ÁGUA: POTENCIAL PROBIÓTICO NA  
ATENUAÇÃO DA ESTEATOSE HEPÁTICA INDUZIDA POR DIETA  
HIPERLIPÍDICA EM RATOS WISTAR OBESOS**

## **Kefir de água: potencial probiótico na atenuação da esteatose hepática induzida por dieta hiperlipídica em ratos wistar obesos**

Water kefir: probiotic potential for mitigating hepatic steatosis induced by hyperlipidic diet in obese Wistar rats

### **RESUMO**

O presente estudo investigou os efeitos do kefir de água na esteatose hepática em ratos obesos. Os animais foram divididos em seis grupos, entre dieta comercial e dieta de cafeteria, com e sem kefir de água. Foram analisadas as expressões de genes envolvidos na inflamação e no metabolismo lipídico, o teor de lipídeos e o perfil de ácidos graxos hepáticos. O kefir de água reduziu a expressão de  $TNF\alpha$  nos animais obesos, aumentou a expressão de ADIPO R2, PPAR $\alpha$  e CPT 1A e reduziu os teores de triacilglicerol e colesterol hepáticos. Os resultados sugerem que o kefir de água atenua a esteatose hepática, reduzindo a inflamação, e o acúmulo de triacilgliceróis e colesterol no fígado.

**Palavras chave:** micro-organismos probióticos, doença hepática gordurosa, obesidade, dieta de cafeteria.

## ABSTRACT

The present study investigated the effect of water kefir on hepatic steatosis in obese rats. The animals were divided into six groups, amongst commercial and cafeteria diet, with and without water kefir. Gene expression involved in inflammation and in lipid metabolism were analyzed, as well as liver lipid levels and the fatty acid profile. Water kefir reduced  $TNF\alpha$  expression in obese animals, as well as increased ADIPO R2,  $PPAR\alpha$  and CPT 1A expression and reduced liver triacylglycerol and cholesterol levels. The results suggest that water kefir can improve hepatic steatosis by reducing liver inflammation and accumulation of triacylglycerol and cholesterol.

**Keywords:** probiotic microorganisms, fatty liver disease, fatty acid oxidation, obesity, hyperlipidic diet

## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade é um problema de saúde pública mundial, caracterizada pelo acúmulo acentuado de lipídeos no tecido adiposo. O excesso de peso é um fator de risco para doenças crônicas, incluindo as doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, doença crônica renal, câncer e a doença hepática gordurosa não alcoólica (Singh *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) têm surgido como a principal doença crônica do fígado, aumentando sua incidência para 70% nos portadores de diabetes mellitus tipo 2 e em cerca de 90% nos casos de obesidade mórbida (Younossi *et al.*, 2016; Douberis *et al.*, 2017). A DHGNA compreende um amplo espectro de disfunções hepáticas caracterizadas pela deposição de gordura no fígado na ausência de infecção ou ingestão significativa de álcool (Reccia *et al.*, 2017). Esta doença está entre as principais causas de cirrose hepática, carcinoma hepatocelular e transplante de fígado (Zoller e Tilg, 2016).

Recentes estudos têm mostrado uma relação estreita entre dietas hipercalóricas, ricas em gorduras, e obesidade com a alteração da microbiota intestinal (disbiose) e doenças no fígado (Cani *et al.*, 2008; Cani e Delzenne, 2009; De La Serre *et al.*, 2010; Alisi *et al.*, 2012; Kirpich *et al.*, 2012; Duseja e Chawla, 2014; Machado e Cortez-Pinto, 2016). Neste contexto, a modulação desta microbiota pelos probióticos ganha importância terapêutica na DHGNA (Cesaro *et al.*, 2011; Mohammadmoradi *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2017).

Os micro-organismos probióticos podem reverter diferentes condições inflamatórias no trato gastrointestinal e danos hepáticos. Os efeitos terapêuticos estão relacionados a mecanismos diretos e indiretos de ação dos probióticos, incluindo a modulação da microbiota e fortalecimento do epitélio intestinal,

produção de peptídeos antimicrobianos, redução da inflamação e modulação do sistema imune (Esposito *et al.*, 2009; Aron-Wisnewsky *et al.*, 2013). Ainda, estudos encontraram redução no acúmulo de gordura hepática relacionada à ação dos micro-organismos probióticos (Everard *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2017).

O kefir de água é uma bebida caseira, levemente ácida, com baixo teor de etanol e CO<sub>2</sub>. Os grãos de kefir de água são constituídos de um polímero de glicose (dextrana), e por uma simbiose de micro-organismos que inclui bactérias lácticas, tais como *Lactobacillus* spp, *Leuconostoc* spp e *Streptococcus* spp, bactérias acéticas e leveduras como *Saccharomyces* spp e *Candida* spp (Magalhães *et al.*, 2010; Waldherr *et al.*, 2010; Magalhães *et al.*, 2011). *Lactobacillus* (*L.*) spp e *Lactococcus lactis* são as espécies de bactérias lácticas dominantes nos grãos de kefir de água (Zanirati *et al.*, 2015), e por conter bactérias com comprovada ação probiótica, como os *Lactobacillus*, o kefir de água pode apresentar propriedades probióticas, às quais ainda são carentes de comprovação científica (Waldherr *et al.*, 2010).

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar se o kefir de água tem efeito na esteatose hepática em ratos com obesidade induzida pela dieta de cafeteria.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### *2.1. Preparação do kefir de água*

Os grãos de kefir foram obtidos por doação na cidade de Viçosa - MG, e o açúcar mascavo, de uma mesma marca e lote, adquirido no comércio local. Foram inoculados 10 g de grãos de kefir em 100 mL de solução de açúcar mascavo (5% m/v) em água destilada, e realizada a fermentação em incubadora (B.O D MA 415, Marconi) a 28 °C por 24 horas. Após este período, os grãos

foram separados do kefir de água com o auxílio de uma peneira (Urdaneta *et al.*, 2007). O processo de fermentação foi repetido diariamente durante todo o período experimental.

## 2.2. Modelo experimental

O experimento foi conduzido de acordo com os Princípios Éticos para Experimentação Animal, e aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, MG, sob o protocolo 79/2014.

Ratos machos *Wistar* recém-desmamados, com 21 dias de idade e pesando aproximadamente 69 g foram recebidos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV. Até o 60º dia de idade (fase adulta) os animais foram mantidos em caixas de polietileno consumindo ração comercial (Presence/In Vivo® Nutrição Animal) e água destilada *ad libitum*. A temperatura da sala de experimentação foi controlada em 22°C ± 3°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas.

No 61º dia, os animais foram pesados e alocados em gaiolas individuais, de aço inoxidável e divididos aleatoriamente em seis grupos (n = 7), de forma que a diferença entre as médias de peso dos grupos não ultrapassasse 3 g: G1 (dieta Comercial e 1 mL de soro fisiológico), G2 (dieta comercial e 1 mL de kefir de água), G3, G5 e G6 (dieta de cafeteria e 1 mL de soro fisiológico) e G4 (dieta de cafeteria e 1 mL de kefir de água). Após 6 semanas de intervenção com a dieta de cafeteria foram realizadas as medidas de peso e comprimento para o cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC) para confirmação da indução da obesidade - PA ≥ 17 cm e IMC ≥ 0,68 g/cm<sup>2</sup> - (Novelli *et al.*, 2007; Reynés *et al.*, 2014) nos grupos G3, G5 e G6. O IMC foi calculado pela razão entre o peso corporal (g) e o comprimento naso-anal (cm) ao quadrado. Os animais obesos

(média IMC =  $0,72 \pm 0,02$  e PA =  $19,4 \pm 0,7$  cm) foram realocados, mantendo a similaridade de peso entre os grupos (Natal *et al.*, 2017). Os animais dos grupos G3 continuaram recebendo soro fisiológico, e os grupos G5 e G6 receberam 1 mL e 2 mL de kefir de água respectivamente.

A dieta de cafeteria foi composta pelos seguintes alimentos: Patê de presunto, batata palha frita, bacon, mortadela, biscoito de maisena, achocolatado em pó, leite integral em pó e ração comercial na proporção de 2:1:1:1:1:1:1:1:1. A administração do soro fisiológico e do kefir de água foi realizada uma vez ao dia por gavagem. A dose de kefir administrada por gavagem forneceu  $3,87 \times 10^7$  UFC/mL de bactérias lácticas e  $2,20 \times 10^{13}$  UFC/mL de leveduras totais. Os animais consumiram as dietas experimentais (comercial e de cafeteria), e água destilada *ad libitum*. O peso e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente.

Ao final do experimento, os ratos ficaram em jejum por 12 horas, foram anestesiados (Isoflurano 100%, Isoforine, Cristália<sup>®</sup>, em aparelho de anestesia inalatória) e submetidos à eutanásia por punção cardíaca. Os fígados dos animais foram retirados e amostras destes tecidos foram coletadas, fixadas em formaldeído tamponado 10% por 24 horas e armazenadas em álcool 70% para a análise histológica. O restante foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em ultra freezer à temperatura de  $-80$  °C para análises posteriores.

### *2.3. Análise da expressão gênica pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT - PCR)*

O RNA foi extraído do tecido hepático usando o reagente Trizol (Invitrogen<sup>TM</sup>, USA), sendo a sua concentração e pureza avaliados em espectrofotômetro Multiskan Go (ThermoScientific, DE, USA), e a integridade do

RNA por eletroforese em gel de agarose. Para a síntese do cDNA, utilizou-se o kit M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen Brasil Ltda.), seguindo o protocolo do fabricante. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada por reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real (RT-PCR) utilizando o equipamento AB StepOne Real Time PCR System e o reagente 2X SYBR Green Máster Mix (AppliedBiosystems, CA, USA). Os parâmetros utilizados na corrida foram 15 min a 95°C e em seguida 40 ciclos de 95°C (30s), 60°C (30s) e 72°C (30s), seguido pela análise da curva de melting. As análises foram realizadas em duplicata, sendo expressos os valores médios de cada grupo. Os níveis relativos de expressão de cada gene foram determinados pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  no AB StepOne Real Time PCR System (AppliedBiosystem) software. A  $\beta$ -Actina foi utilizada como gene endógeno de referência. Foram utilizados os seguintes iniciadores:

| Iniciadores                      | Forward                | Reverse                |
|----------------------------------|------------------------|------------------------|
| <b>PPAR<math>\alpha</math></b>   | CCTGCCTTCCCTGTGAAC     | ATCTGCTTCAAGTGGGGAGA   |
| <b>CPT – 1A</b>                  | GTAAGGCCACTGATGAAGGAAA | ATTTGGGTCCGAGGTTGACA   |
| <b>ADIPO R<sub>2</sub></b>       | CATGTTTGCCACCCCTCAGTA  | ATGCAAGGTAGGGATGATTCCA |
| <b>TNF<math>\alpha</math></b>    | ACAAGGCTGCCCGACTA      | TGGAAGACTCCTCCCAGGTATG |
| <b><math>\beta</math>-actina</b> | AGGGGAAGGGTGAAAAGATG   | GAGAGGGTGGATGGGTAGGG   |

#### 2.4. Quantificação de triacilgliceróis e colesterol hepáticos

Os lipídeos foram extraídos do fígado pelo método de Folch et al. (1957). Aproximadamente 100 mg de fígado foram triturados em tubo de vidro com o auxílio de “Ultra – Turrax disperser (IKA)” em 1900  $\mu$ L de solução de clorofórmio-metanol (2:1). Logo em seguida foram adicionados 400  $\mu$ L de metanol e realizada a homogeneização em vórtex (10 segundos) e centrifugação a 3.000 g (10 minutos). O sobrenadante foi coletado com pipeta de Pasteur e transferido para outro tubo, sendo adicionados 800  $\mu$ L de clorofórmio e 640  $\mu$ L de solução de NaCl (0,73%). Novamente foram realizadas homogeneização em vórtex (30 segundos) e centrifugação a 3.000 g (dez minutos). A fase superior foi

descartada e a fase inferior foi lavada três vezes com solução de Folch (3% de clorofórmio, 48% metanol, 47% de água e 2% de NaCl a 0,2%). O extrato lipídico foi seco em estufa a 37 °C por aproximadamente 12 horas. Para análise do teor de triacilgliceróis e colesterol, foi adicionado 1 mL de isopropanol ao extrato lipídico seco. As análises foram realizadas utilizando “kits enzimáticos (BIOCLIN)” para análise de triacilgliceróis e colesterol em soro ou plasma, seguindo as normas do fabricante.

#### *2.5. Esterificação da fração lipídica e análise do perfil de ácidos graxos hepáticos*

Os lipídeos foram extraídos do fígado pelo método de Folch et al. (1957) e esterificados pelo método proposto por Hartman e Lago (1973). As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás modelo CG Solution (SHIMADZU), equipado com detector FID. Foi utilizada uma coluna capilar Carbowax (30 m x 0,25 mm). O volume de injeção foi de 1 µL de amostra em razão de Split = 1/10. O gás nitrogênio foi utilizado como carreador com velocidade linear programada para 43,2 cm/s e os gases Hidrogênio e Ar sintético formaram a chama no detector. As temperaturas do injetor e do detector foram respectivamente de 200 °C e 220 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 100 °C (mantida por 5 minutos), aumentando em 4 °C/minuto até atingir 220 °C (mantida por 10 minutos). O fluxo de gás de arraste na coluna foi de 0,4 mL/minuto.

#### *2.6. Análise histomorfométrica do fígado*

Fragmentos do fígado foram fixados em formalina e incluídos em resina glicolmetacrilato (Leica, Historesin®). Foram obtidos cortes semi-seriados com 3 µm de espessura e, posteriormente, os cortes foram laminados e corados com azul de toluidina. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck®) e analisadas em microscópio de luz (OLYMPUS BX 60). As imagens foram obtidas em câmera digital (Q COLOR 3 OLYMPUS®AMERICA INC.) com auxílio do

software Q COLOR OLYMPUS®. As imagens das secções histológicas foram capturadas com objetiva de 40X. A quantificação da deposição lipídica presente nos campos histológicos foi realizada utilizando-se o aplicativo ImageJ (Fiji). Padronizou-se a sobreposição de uma matriz quadrada padrão (14 linhas x 19 colunas) nos campos fotografados, totalizando 266 pontos (interseções entre linhas e colunas). Foram analisadas 10 fotos por animal e contabilizados os pontos sobre núcleos, citoplasma, vasos, células de kuppfer e vesículas de gordura. Os dados foram expressos em percentual de gordura hepática.

### *2.8. Análise Estatística*

As análises foram conduzidas segundo um delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (DP). Para análise descritiva dos dados e testes de comparação de grupos independentes utilizou-se o software GraphPad Prisma versão 6.0. O teste de ANOVA a um fator seguido pelo teste de Bonferroni ( $\alpha = 5\%$ ) foi utilizado para comparação das médias entre os grupos.

## **3. RESULTADOS**

### *3.1. Indicadores biométricos e de consumo alimentar*

Os dados dos indicadores biométricos (peso, ganho de peso e IMC), do consumo alimentar e do consumo de gordura dos grupos experimentais estão apresentados na Tabela 2. Os grupos que receberam dieta de cafeteria, com e sem kefir de água, apresentaram peso inicial e final, ganho de peso e IMC semelhantes, e maiores em relação ao grupo que recebeu dieta comercial (G1). O consumo alimentar não foi diferente entre os grupos de ratos obesos, tratados e não tratados com kefir, e foi menor em relação ao consumo alimentar dos grupos com dieta comercial (G1 e G2), no entanto, o consumo de gordura foi maior nos grupos de animais obesos, com e sem kefir de água.

**Tabela 2.** Medidas biométricas e de ingestão alimentar dos diferentes grupos ao final do experimento.

| Medidas                  | Grupos (n = 7)            |                             |                           |                             |                             |                             |
|--------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                          | G1                        | G2                          | G3                        | G4                          | G5                          | G6                          |
| Peso inicial (g)         | 381,14±13,45 <sup>b</sup> | 385,42±8,58 <sup>b</sup>    | 424,85±16,30 <sup>a</sup> | 425,14±16,20 <sup>a</sup>   | 424,28±27,21 <sup>a</sup>   | 424,85±27,14 <sup>a</sup>   |
| Peso final (g)           | 421,89±23,71 <sup>c</sup> | 438,56±20,38 <sup>b,c</sup> | 500,56±34,66 <sup>a</sup> | 483,78±39,06 <sup>a,b</sup> | 485,78±51,14 <sup>a,b</sup> | 482,67±29,43 <sup>a,b</sup> |
| Ganho de peso(g)         | 43,50±5,92 <sup>b</sup>   | 45,66±8,23 <sup>b</sup>     | 80,83±9,45 <sup>a</sup>   | 79,50±6,53 <sup>a</sup>     | 81,66±17,69 <sup>a</sup>    | 78,00±12,69 <sup>a</sup>    |
| IMC (g/cm <sup>2</sup> ) | 0,60±0,02 <sup>b</sup>    | 0,65±0,03 <sup>b</sup>      | 0,74±0,03 <sup>a</sup>    | 0,73±0,03 <sup>a</sup>      | 0,72±0,03 <sup>a</sup>      | 0,72±0,02 <sup>a</sup>      |
| CA (g)                   | 179,45±11,91 <sup>a</sup> | 178,11±10,70 <sup>a</sup>   | 156,71±8,56 <sup>b</sup>  | 158,33±7,58 <sup>b</sup>    | 152,07±9,29 <sup>b</sup>    | 152,05±7,86 <sup>b</sup>    |
| CG (g)                   | 3,20±0,13 <sup>b</sup>    | 3,17±0,10 <sup>b</sup>      | 34,94±2,55 <sup>a</sup>   | 34,93±2,13 <sup>a</sup>     | 33,46±2,91 <sup>a</sup>     | 33,40±1,92 <sup>a</sup>     |

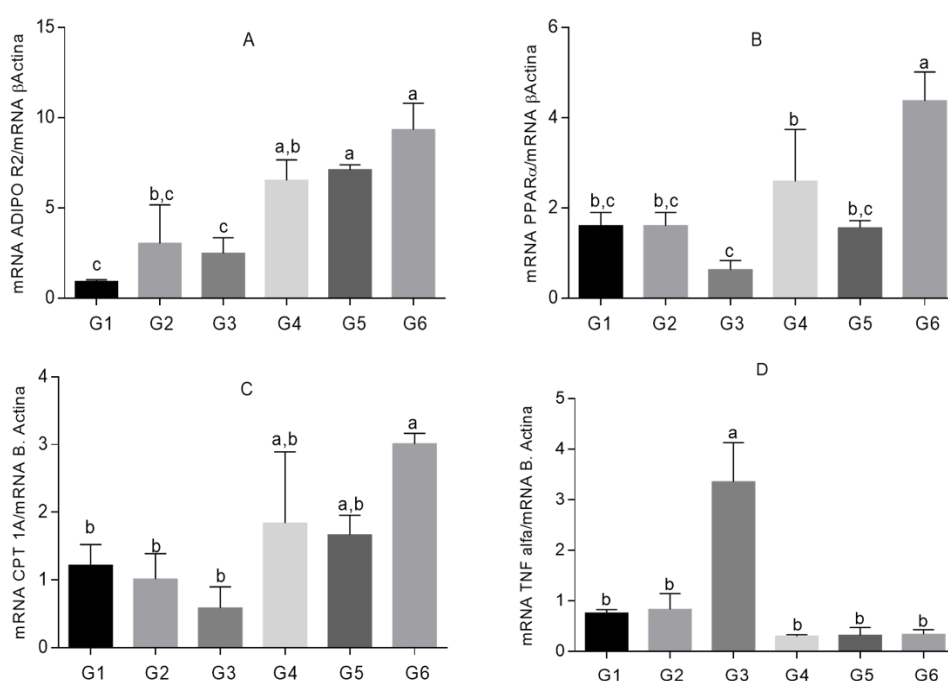
G1 = Dieta comercial; G2 = Dieta comercial e kefir de água (1 mL); G3 = Dieta de Cafeteria; G4 = Dieta de Cafeteria e kefir de água (1 mL); G5 = Dieta de Cafeteria e kefir de água (1 mL); G6 = Dieta de Cafeteria e kefir de água (2 mL)

IMC = Índice de massa corpórea; CA = Consumo alimentar (média semanal); CG = Consumo de gordura (Média semanal); Médias em uma mesma linha seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Bonferroni ( $\alpha = 5\%$ )

### 3.2. Expressão gênica no tecido hepático

As expressões dos genes ADIPO R2, PPAR $\alpha$ , CPT 1A e TNF $\alpha$  hepáticos estão apresentadas na Figura 5. O consumo de kefir de água pelos animais, antes e após a indução da obesidade, promoveu expressão significativamente superior de ADIPOR2 em comparação ao grupo que consumiu apenas dieta de cafeteria (Fig. 5A).

O tratamento com 2 mL de kefir (G6), após a indução da obesidade, promoveu a maior expressão de PPAR $\alpha$ . Ainda, a administração de 1 mL de kefir de água, antes da indução da obesidade (G4), promoveu maior expressão de PPAR $\alpha$  em relação ao grupo de ratos obesos que não consumiu a bebida fermentada (G3) (Fig. 5B).



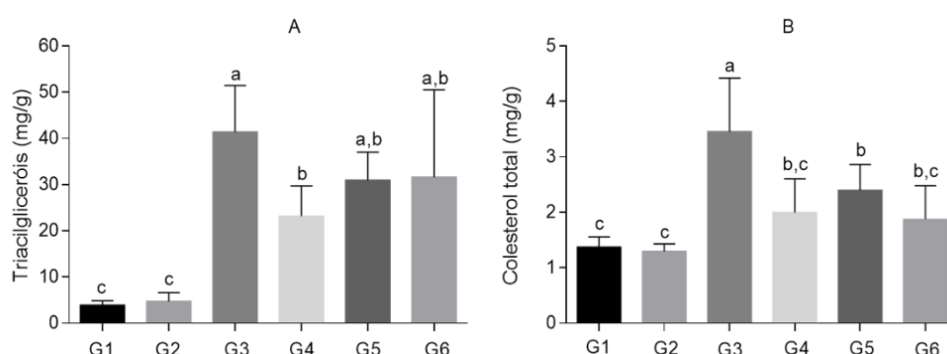
**Figura 5.** Efeito do kefir de água na expressão gênica de A-ADIPO R2, B-PPAR $\alpha$ , C-CPT 1A e D-TNF $\alpha$  no fígado dos animais dos grupos experimentais: G1 - Dieta comercial; G2 - Dieta comercial e 1 mL de kefir de água; G3 - Dieta de cafeteria; G4 - Dieta de cafeteria e 1 mL de kefir de água; G5 - Dieta de cafeteria e 1 mL de kefir de água e G6 - Dieta de cafeteria e 2 mL de kefir de água. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 4). Médias dos diferentes grupos comparadas pelo teste de Bonferroni ( $\alpha = 5\%$ ).

A administração de 2 mL de kefir de água (G6), após a indução da obesidade, causou maior expressão de CPT1A em comparação ao grupo obeso que não recebeu a bebida fermentada (G3). Entretanto, não houve diferença na expressão deste gene entre os animais que receberam dieta de cafeteria com kefir de água, antes (G4) e após (G5 e G6) a indução da obesidade (Fig. 5C).

Houve redução significativa na expressão gênica de TNF $\alpha$  nos grupos de ratos que receberam kefir de água antes e após a indução da obesidade, com valores semelhantes ao grupo que recebeu dieta comercial (G1) (Figure 5D).

### 3.3. Teor de triacilgliceróis e colesterol hepáticos

O efeito do kefir de água nos teores de triacilgliceróis e colesterol hepáticos nos animais experimentais estão apresentados na Figura 6. O grupo de animais que recebeu kefir de água, antes da indução da obesidade (G4), apresentou uma redução significativa no teor de triacilgliceróis hepáticos em relação ao grupo de animais obesos sem kefir de água (G3) (Fig. 6A). Já o teor de colesterol hepático foi reduzido em todos os grupos de ratos obesos que receberam kefir de água (Fig. 6B).



**Figura 6.** Efeito do kefir de água no teor de A-Triacilgliceróis e B-Colesterol no fígado dos animais dos grupos experimentais: G1 - Dieta comercial; G2 - Dieta comercial e 1 mL de kefir de água; G3 - Dieta de cafeteria; G4 - Dieta de cafeteria e 1 mL de kefir de água; G5 - Dieta de cafeteria e 1 mL de kefir de água e G6 - Dieta de cafeteria e 2 mL de kefir de água. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 7). Médias dos diferentes grupos comparadas pelo teste de Bonferroni ( $\alpha = 5\%$ ).

#### *3.4. Perfil de ácidos graxos hepáticos*

Na Tabela 3 estão apresentadas as médias percentuais dos ácidos graxos majoritários, e do total de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados no fígado dos ratos dos diferentes grupos experimentais. Os animais alimentados com dieta de cafeteria, com e sem kefir de água, apresentaram percentuais de ácidos graxos poliinsaturados semelhantes, e menores em relação aos percentuais encontrados nos grupos alimentados com dieta comercial. Destaca-se também que os percentuais de ácido oleico nos grupos de ratos obesos foram superiores aos percentuais de ácido oleico encontrados nos fígados dos animais alimentados com dieta comercial.

**Tabela 3.** Composição de ácidos graxos (%) hepáticos nos diferentes grupos experimentais.

| Ácidos graxos | Grupos Experimentais          |                               |                               |                               |                               |                               |
|---------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|               | G1                            | G2                            | G3                            | G4                            | G5                            | G6                            |
| C16:0         | 19,86±1,52 <sup>b</sup>       | 19,69±0,89 <sup>b</sup>       | 23,38±0,75 <sup>a</sup>       | 22,01±0,36 <sup>a</sup>       | 22,80±1,18 <sup>a</sup>       | 22,45±1,13 <sup>a</sup>       |
| C18:0         | 19,00±2,17 <sup>a</sup>       | 19,00±1,66 <sup>a</sup>       | 12,86±1,51 <sup>b</sup>       | 14,02±1,59 <sup>b</sup>       | 13,71±2,18 <sup>b</sup>       | 13,18±2,91 <sup>b</sup>       |
| C18:1 n9      | 9,28±2,52 <sup>b</sup>        | 6,84±0,42 <sup>b</sup>        | 26,44±2,15 <sup>a</sup>       | 25,63±1,96 <sup>a</sup>       | 27,48±0,98 <sup>a</sup>       | 26,31±4,11 <sup>a</sup>       |
| C18:2 n6      | 21,96±1,30 <sup>a</sup>       | 20,04±1,75 <sup>a</sup>       | 16,00±0,65 <sup>b</sup>       | 15,95±0,55 <sup>b</sup>       | 15,80±0,64 <sup>b</sup>       | 16,24±0,89 <sup>b</sup>       |
| C20:4 n6      | 22,52±1,28 <sup>a</sup>       | 23,80±0,99 <sup>a</sup>       | 14,35±2,00 <sup>b</sup>       | 14,53±1,55 <sup>b</sup>       | 13,15±1,22 <sup>b</sup>       | 13,95±1,93 <sup>b</sup>       |
| <b>Σ AGS</b>  | <b>39,60±1,86<sup>a</sup></b> | <b>39,41±1,45<sup>a</sup></b> | <b>37,00±0,88<sup>a</sup></b> | <b>36,74±1,56<sup>a</sup></b> | <b>37,26±2,43<sup>a</sup></b> | <b>36,31±2,21<sup>a</sup></b> |
| <b>Σ AGMI</b> | <b>9,74±2,55<sup>b</sup></b>  | <b>7,29±0,49<sup>b</sup></b>  | <b>27,16±2,25<sup>a</sup></b> | <b>26,31±1,98<sup>a</sup></b> | <b>28,20±0,95<sup>a</sup></b> | <b>26,94±4,12<sup>a</sup></b> |
| <b>Σ AGPI</b> | <b>45,64±2,05<sup>a</sup></b> | <b>44,84±2,52<sup>a</sup></b> | <b>31,55±2,21<sup>b</sup></b> | <b>31,70±1,77<sup>b</sup></b> | <b>30,18±1,72<sup>b</sup></b> | <b>31,31±1,88<sup>b</sup></b> |

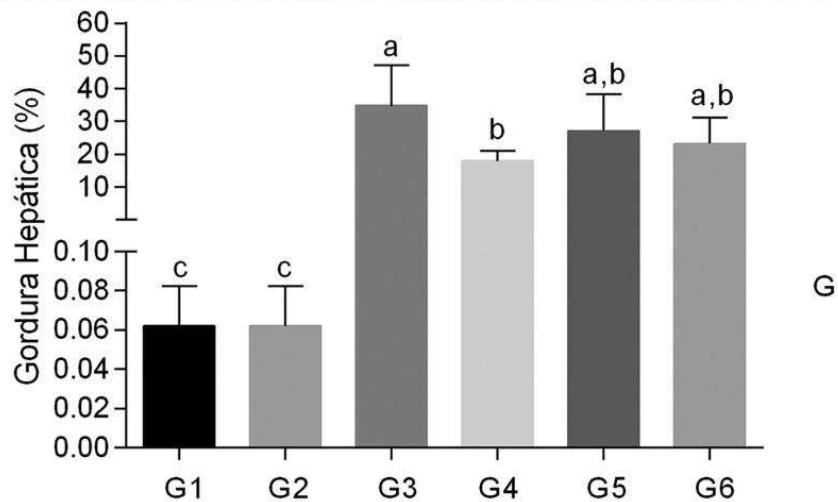
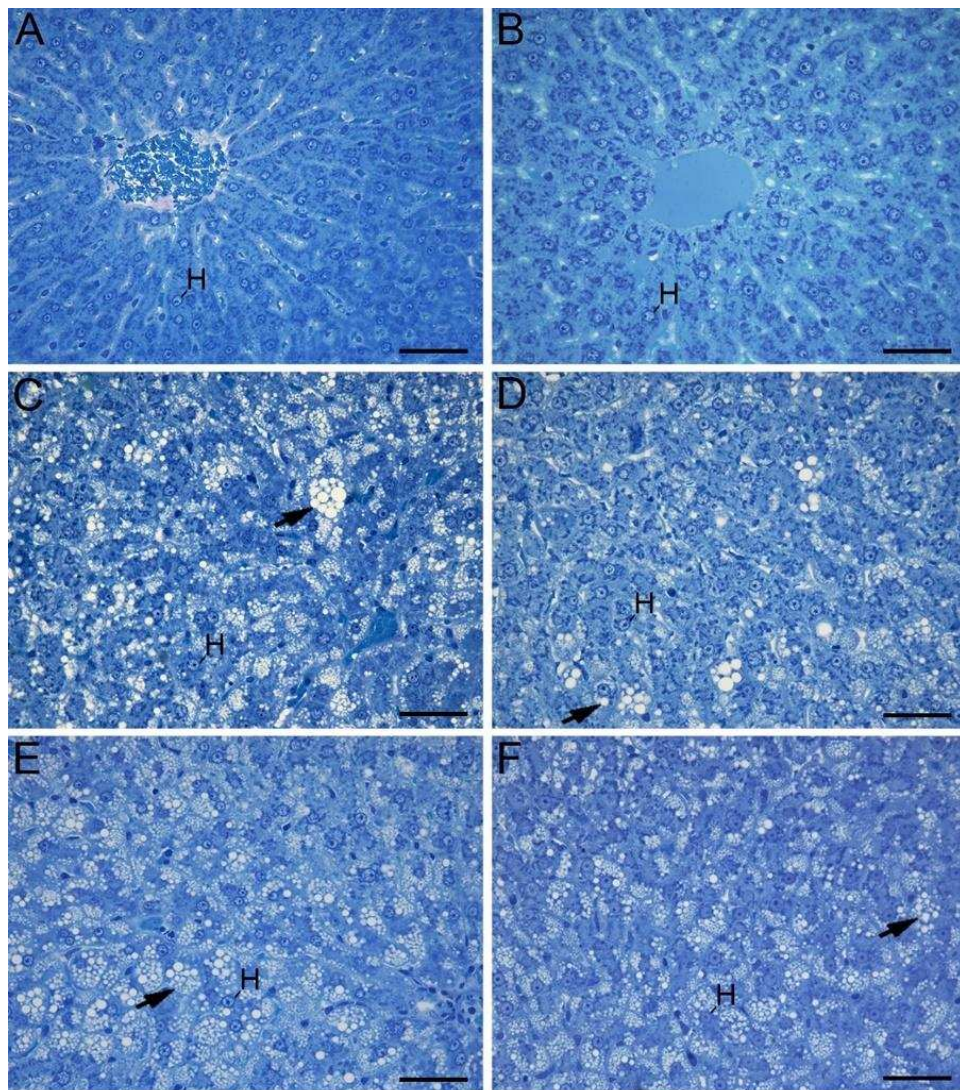
Dieta comercial (G1); Dieta comercial e 1 mL de kefir de água (G2); Dieta de cafeteria (G3); Dieta de cafeteria e 1 mL de kefir de água (G4); Dieta de cafeteria e 1 mL de kefir de água (G5); Dieta de cafeteria e 2 mL de kefir de água (G6).

Dados apresentados como média ± desvio padrão (n = 7). Médias dos diferentes grupos comparadas pelo teste de Bonferroni ( $\alpha = 5\%$ ).

Ácido palmítico – C16:0; Ácido esteárico – C18:0; Ácido oleico – C18:1 n9; Ácido linolêico – C18:2 n6; Ácido araquidônico – C20:4 n6. # AGS: Ácidos graxos saturados; AGMI: Ácidos graxos monoinsaturados; AGPI: Ácidos graxos poliinsaturados

### *3.5. Histomorfometria e percentual de gordura hepática*

De acordo com a análise histomorfométrica, o grupo de animais que receberam 1 mL de kefir de água (G4), antes da indução da obesidade, apresentou menos vesículas de gordura nos hepatócitos (Fig. 7D), e conseqüentemente, um menor percentual de gordura hepática (Fig. 7G), em relação ao grupo que recebeu apenas dieta de cafeteria (G3) (Figura 7C).



**Figura 7.** Efeito do kefir de água na histologia e no percentual de acúmulo de gordura no fígado dos animais dos grupos experimentais: (**G1 – Fig. 7A**) Dieta comercial; (**G2 – Fig. 7B**) Dieta comercial e 1 mL de kefir de água; (**G3 – Fig. 7C**) Dieta de cafeteria; (**G4 – Fig. 7D**) Dieta de cafeteria e 1 mL de kefir de água; (**G5 – Fig. 7E**) Dieta de cafeteria e 1 mL de kefir de água e (**G6 – Fig. 7F**) Dieta de cafeteria e 2 mL de kefir de água. Coloração Azul de Toluidina. Barra: 50  $\mu$ m. # Médias seguidas por uma mesma letra no gráfico (**Fig. 7G**) não diferem pelo teste de Bonferroni a 5% de probabilidade. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 7). \* As setas nas figuras indicam vesículas de gordura. H = hepatócito

#### 4. DISCUSSÃO

O kefir de água é produzido e consumido de forma caseira, por diversas populações no mundo, sendo uma fonte viável e de baixo custo de microorganismos potencialmente probióticos, como os *Lactobacillus* (Farnworth, 2005; Waldherr *et al.*, 2010).

Nesse estudo nós mostramos o primeiro relato científico dos potenciais benefícios do kefir de água, na Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (DHGNA) induzida por dieta de cafeteria, quando administrado antes e após a indução da obesidade em ratos.

A dieta de cafeteria é um modelo robusto de dieta indutora de obesidade em ratos (Sampey *et al.*, 2011). Esta dieta inclui alimentos altamente palatáveis, típicos de uma dieta ocidental, ricos em açúcares e gorduras (Shafat *et al.*, 2009). Além da obesidade, a dieta de cafeteria utilizada no presente estudo causou o desenvolvimento da esteatose hepática (Fig. 4), mostrando que a composição da dieta produzida foi capaz de promover alterações relacionadas ao excesso de peso.

A dieta de cafeteria aumentou a expressão de TNF $\alpha$  nos animais obesos que não receberam kefir de água. As dietas hipercalóricas, ricas em gorduras, alteram a microbiota intestinal (disbiose), podendo acarretar ruptura da integridade da parede intestinal. A obesidade e a DHGNA também estão intimamente relacionadas com um aumento na permeabilidade da parede intestinal, endotoxemia metabólica e inflamação de baixo grau (Loguercio *et al.*, 2005; Cani *et al.*, 2007; Cani *et al.*, 2008; Cani e Delzenne, 2009; De La Serre *et al.*, 2010; Henao-Mejia *et al.*, 2013). Desta forma, o aumento da permeabilidade intestinal associado à disbiose, resulta na translocação de patógenos e suas toxinas para o fígado, via veia porta hepática, principalmente o lipopolissacarídeo

de membrana, derivado das bactérias gram negativas (LPS). O LPS se liga às células de Kupffer via receptores Toll-Like, conduzindo a ativação do fator de transcrição NFκβ e a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNFα (Su, 2002; Li *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2008; Gratz *et al.*, 2010; Nardone *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013; Paoella *et al.*, 2014; Ranadheera *et al.*, 2014; Qiao *et al.*, 2015).

Em nosso estudo, o kefir de água reduziu a expressão da citocina pró-inflamatória TNFα em todos os grupos de ratos obesos. Este resultado pode estar relacionado à modulação da microbiota intestinal pelos micro-organismos presentes no kefir de água, reforçando o potencial probiótico desta bebida fermentada. O kefir de água contém micro-organismos de comprovada ação probiótica, como os Lactobacilos e Bifidobacterias (Magalhães *et al.*, 2010; Gulitz *et al.*, 2011; Zanirati *et al.*, 2015; Laureys *et al.*, 2017), os quais são capazes de colonizar o lúmen intestinal e modular a microbiota local, reduzindo gêneros de bactérias patogênicas relacionadas às respostas inflamatórias (Toscano *et al.*, 2017).

A lipogênese hepática resulta principalmente de uma excessiva ingestão calórica e reduzido gasto energético. Um aumento na lipogênese, concomitante à redução na oxidação de ácidos graxos, resulta em maior suscetibilidade à DHGNA (Fabbrini *et al.*, 2010). O consumo do kefir de água aumentou a expressão de genes relacionados à oxidação de ácidos graxos hepáticos nos animais obesos, ADIPO R2, PPARα e CPT 1A, principalmente quando administrado após a indução da obesidade e na maior dose (2 mL), podendo contribuir com a redução no acúmulo de gordura hepática decorrente da obesidade.

O metabolismo de lipídeos hepáticos, envolvendo tanto a síntese, quanto a oxidação de ácidos graxos, é controlado por diversos genes (Bechmann *et al.*, 2012). No presente estudo avaliou-se a via de ativação do fator de transcrição PPAR $\alpha$  pelo receptor de adiponectina, ADIPO R2. Este receptor atua diretamente no aumento da expressão do gene PPAR $\alpha$ , mediante a ação da adiponectina, uma adipocina regulatória do metabolismo lipídico (Song *et al.*, 2016).

A ativação do PPAR $\alpha$  promove o catabolismo de ácidos graxos, por meio da ativação de vários genes que codificam enzimas envolvidas na  $\beta$ -oxidação mitocondrial, como o gene CPT 1A, resultando na redução do acúmulo de lipídeos no fígado (Iacono *et al.*, 2011). No presente trabalho foi observado que a via de ativação de genes relacionados à oxidação de ácidos graxos pelo PPAR $\alpha$ , pode ser o principal mecanismo de ação do kefir de água no metabolismo de lipídeos hepáticos, visto que houve aumento significativo na expressão dos genes ADIPO R2, PPAR $\alpha$  e CPT1A.

Outros estudos também observaram a relação entre micro-organismos probióticos e aumento da oxidação de triacilgliceróis no fígado de animais (Li *et al.*, 2003; Esposito *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015). Kim e colaboradores (2017) encontraram aumento na expressão de PPAR $\alpha$ , e redução no conteúdo hepático de triacilgliceróis no fígado de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com kefir de leite. Os autores correlacionaram o aumento da expressão gênica de PPAR $\alpha$  no fígado com o aumento de bactérias probióticas (*Lactobacillus*) no intestino dos animais experimentais. Então, devido à presença de *Lactobacillus* na composição do kefir de água (Magalhães *et al.*, 2011) podemos inferir que o aumento na expressão de PPAR $\alpha$  encontrado em nosso estudo, pode estar

associado à uma propriedade probiótica destes micro-organismos presentes no kefir de água.

O teor de colesterol hepático foi reduzido em todos os grupos de animais obesos que receberam kefir de água. A redução no teor hepático de colesterol também foi encontrada em animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com micro-organismos probióticos (Wang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2017). A redução na síntese hepática, e o aumento da excreção e degradação do colesterol podem ser os mecanismos associados à redução do conteúdo hepático de colesterol pelos micro-organismos probióticos (Fukushima e Nakano, 2007; Jeun *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2012).

Nossos resultados mostraram que a dieta de cafeteria consumida pelos animais provocou alteração no perfil de ácidos graxos no fígado. Dietas hiperlipídicas, ricas em ácidos graxos saturados e colesterol, como a utilizada neste estudo, provocam acúmulo de triacilgliceróis no fígado, característico da doença hepática gordurosa não alcoólica, e podem resultar em desequilíbrio no metabolismo dos ácidos graxos (Pita *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2016).

O perfil de ácidos graxos hepáticos encontrados no presente estudo é semelhante ao relatado por Colina-Coca *et al.* (2014) em ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Os percentuais totais de ácidos graxos poliinsaturados hepáticos foram menores nos grupos de ratos obesos, com e sem kefir de água. Dietas hiperlipídicas, ricas em colesterol, inibem a dessaturação de ácidos graxos essenciais, reduzindo a síntese de ácidos graxos poliinsaturados (Pita *et al.*, 2002).

A síntese endógena de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados é regulada por meio da ativação das enzimas elongases e dessaturases (Zhukova *et al.*, 2014). O ácido oleico foi o principal ácido graxo monoinsaturado

encontrado, e em maiores proporções nos grupos alimentados com dieta de cafeteria, com e sem kefir de água. Entretanto, nestes grupos houve redução hepática do percentual de ácido esteárico (C18:0). Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que dietas ricas em ácidos graxos saturados induzem aumento na síntese hepática de ácidos graxos monoinsaturados, principalmente o ácido oleico, a partir do ácido esteárico, por meio do estímulo de uma dessaturase ( $\Delta$ -9) (Wang *et al.*, 2016). Este mecanismo permite a conversão do ácido graxo saturado (mais tóxico) em uma forma menos tóxica (monoinsaturado) (Ciapaite *et al.*, 2011). Ainda, o ácido oleico é o substrato preferencial para a síntese de triacilgliceróis, ésteres de colesterol e fosfolipídios, contribuindo para um aumento no conteúdo de triacilglicerol e colesterol no fígado dos ratos alimentados com a dieta de cafeteria.

## **5. CONCLUSÃO**

O kefir de água demonstrou efeitos benéficos na modulação de genes relacionados às vias inflamatória e do metabolismo lipídico, na esteatose hepática de animais obesos. O kefir de água reduziu a expressão da citocina pró inflamatória  $TNF\alpha$ , e aumentou a expressão de genes ligados à via de oxidação dos ácidos graxos nos animais obesos. O kefir de água atenuou o teor de triacilgliceróis, e o percentual de gordura hepática, quando administrado antes da indução da obesidade, e reduziu o teor de colesterol em todos os grupos de ratos obesos. O nosso estudo apresenta os primeiros indícios do potencial probiótico do kefir de água, na redução da inflamação e do acúmulo de gordura hepática, induzida pela dieta de cafeteria em animais obesos.

### **Conflitos de interesse**

Os autores declaram não haver nenhum conflito de interesse

## Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais por financiar parte da pesquisa.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALISI, A.; CECCARELLI, S.; PANERA, N.; NOBILI, V. Causative role of gut microbiota in non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 132, 2012.

ARON-WISNEWSKY, J.; GABORIT, B.; DUTOUR, A.; CLEMENT, K. Gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease: new insights. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 4, p. 338-348, 2013.

BECHMANN, L. P.; HANNIVOORT, R. A.; GERKEN, G.; HOTAMISLIGIL, G. S.; TRAUNER, M.; CANBAY, A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. **Journal of Hepatology**, v. 56, n. 4, p. 952-964, 2012.

CANI, P. D.; BIBILONI, R.; KNAUF, C.; WAGET, A.; NEYRINCK, A. M.; DELZENNE, N. M.; BURCELIN, R. G. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1470-1481, 2008.

CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 6, p. 737-743, 2009.

CANI, P. D.; NEYRINCK, A. M.; FAVA, F.; KNAUF, C.; BURCELIN, R. G.; TUOHY, K. M.; GIBSON, G. R.; DELZENNE, N. M. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. **Diabetologia**, v. 50, n. 11, p. 2374-2383, 2007.

CESARO, C.; TISO, A.; DEL PRETE, A.; CARIELLO, R.; TUCCILLO, C.; COTTICELLI, G.; DEL VECCHIO BLANCO, C.; LOGUERCIO, C. Gut microbiota and probiotics in chronic liver diseases. **Digestive and Liver Disease**, v. 43, n. 6, p. 431-438, 2011.

CIAPAITE, J.; VAN DEN BROEK, N. M.; TE BRINKE, H.; NICOLAY, K.; JENESON, J. A.; HOUTEN, S. M.; PROMPERS, J. J. Differential effects of short- and long-term high-fat diet feeding on hepatic fatty acid metabolism in rats. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1811, n. 7-8, p. 441-51, 2011.

COLINA-COCA, C.; RODRÍGUEZ-ALCALÁ, L. M.; FONTECHA, J.; GONZÁLEZ-PEÑA, D.; DE ANCOS, B.; SÁNCHEZ-MORENO, C. Effects of hypercholesterolemic diet enriched with onion as functional ingredient on fatty acid metabolism in Wistar rats. **Food Research International**, v. 64, p. 546-552, 2014.

DE LA SERRE, C. B.; ELLIS, C. L.; LEE, J.; HARTMAN, A. L.; RUTLEDGE, J. C.; RAYBOULD, H. E. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. **American**

**Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 299, n. 2, p. 440-448, 2010.

DOULBERIS, M.; KOTRONIS, G.; GIALAMPRIKOU, D.; KOUNTOURAS, J.; KATSINELOS, P. Non-alcoholic fatty liver disease: An update with special focus on the role of gut microbiota. **Metabolism**, v. 71, p. 182-197, 2017.

DUSEJA, A.; CHAWLA, Y. K. Obesity and NAFLD: the role of bacteria and microbiota. **Clinics in liver disease**, v. 18, n. 1, p. 59-71, 2014.

ESPOSITO, E.; IACONO, A.; BIANCO, G.; AUTORE, G.; CUZZOCREA, S.; VAJRO, P.; CANANI, R. B.; CALIGNANO, A.; RASO, G. M.; MELI, R. Probiotics Reduce the Inflammatory Response Induced by a High-Fat Diet in the Liver of Young Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 139, n. 5, p. 905-911, 2009.

EVERARD, A.; MATAMOROS, S.; GEURTS, L.; DELZENNE, N. M.; CANI, P. D. Saccharomyces boulardii administration changes gut microbiota and reduces hepatic steatosis, low-grade inflammation, and fat mass in obese and type 2 diabetic db/db mice. **MBio**, v. 5, n. 3, p. 1011-1014, 2014.

FABBRINI, E.; SULLIVAN, S.; KLEIN, S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. **Hepatology**, v. 51, n. 2, p. 679-689, 2010.

FARNWORTH, E. R. Kefir - a complex probiotic. **Food Science and Technology Bulletin**, v. 2, n. 1, p. 1-17, 2005.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANJEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FUKUSHIMA, M.; NAKANO, M. The effect of a probiotic on faecal and liver lipid classes in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 73, n. 5, p. 701-710, 2007.

GRATZ, S. W.; MYKKANEN, H.; EL-NEZAMI, H. S. Probiotics and gut health: A special focus on liver diseases. **World Journal of Gastroenterology** v. 16, n. 4, p. 403-410, 2010.

GULITZ, A.; STADIE, J.; WENNING, M.; EHRMANN, M. A.; VOGEL, R. F. The microbial diversity of water kefir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 284-288, 2011.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory practice**, v. 22, n. 6, p. 475-477, 1973.

HENAO-MEJIA, J.; ELINAV, E.; THAISS, C. A.; LICONA-LIMON, P.; FLAVELL, R. A. Role of the intestinal microbiome in liver disease. **Journal of Autoimmunity**, v. 46, p. 66-73, 2013.

IACONO, A.; RASO, G. M.; CANANI, R. B.; CALIGNANO, A.; MELI, R. Probiotics as an emerging therapeutic strategy to treat NAFLD: focus on molecular and biochemical mechanisms. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 22, n. 8, p. 699-711, 2011.

JEUN, J.; KIM, S.; CHO, S.-Y.; JUN, H.-J.; PARK, H.-J.; SEO, J.-G.; CHUNG, M.-J.; LEE, S.-J. Hypocholesterolemic effects of Lactobacillus plantarum KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice. **Nutrition**, v. 26, n. 3, p. 321-330, 2010.

KIM, D. H.; KIM, H.; JEONG, D.; KANG, I. B.; CHON, J. W.; KIM, H. S.; SONG, K. Y.; SEO, K. H. Kefir alleviates obesity and hepatic steatosis in high-fat diet-fed mice by modulation of gut microbiota and mycobiota: targeted and untargeted community analysis with correlation of biomarkers. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 44, p. 35-43, 2017.

KIRPICH, I. A.; FENG, W.; WANG, Y.; LIU, Y.; BARKER, D. F.; BARVE, S. S.; MCCLAIN, C. J. The type of dietary fat modulates intestinal tight junction integrity, gut permeability, and hepatic toll-like receptor expression in a mouse model of alcoholic liver disease. **Alcoholism, clinical and experimental research** v. 36, n. 5, p. 835-846, 2012.

LAUREYS, D.; VAN JEAN, A.; DUMONT, J.; DE VUYST, L. Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water kefir fermentation process. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 7, p. 2811-2819, 2017.

LI, Z.; YANG, S.; LIN, H.; HUANG, J.; WATKINS, P. A.; MOSER, A. B.; DESIMONE, C.; SONG, X. Y.; DIEHL, A. M. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 37, n. 2, p. 343-350, 2003.

LOGUERCIO, C.; FEDERICO, A.; TUCCILLO, C.; TERRACCIANO, F.; D'AURIA, M. V.; DE SIMONE, C.; DEL VECCHIO BLANCO, C. Beneficial effects of a probiotic VSL#3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 39, n. 6, p. 540-543, 2005.

MA, X.; HUA, J.; LI, Z. Probiotics Improve High Fat Diet-induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance by Increasing Hepatic NKT cells. **Journal of hepatology**, v. 49, n. 5, p. 821-830, 2008.

MACHADO, M. V.; CORTEZ-PINTO, H. Diet, Microbiota, Obesity, and NAFLD: A Dangerous Quartet. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 4, p. 1-20, 2016.

MAGALHÃES, K.; DE M. PEREIRA, G. V.; DIAS, D.; SCHWAN, R. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 1241-1250, 2010.

MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, G. V. D. M.; CAMPOS, C. R.; DRAGONE, G.; SCHWAN, R. F. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 693-702, 2011.

MOHAMMADMORADI, S.; JAVIDAN, A.; KORDI, J. Boom of probiotics: This time non-alcoholic fatty liver disease – A mini review. **Journal of Functional Foods**, v. 11, n. Supplement C, p. 30-35, 2014.

NARDONE, G.; COMPARE, D.; LIGUORI, E.; DI MAURO, V.; ROCCO, A.; BARONE, M.; NAPOLI, A.; LAPI, D.; IOVENE, M. R.; COLANTUONI, A. Protective effects of *Lactobacillus paracasei* F19 in a rat model of oxidative and metabolic hepatic injury. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 299, n. 3, p. 669-676, 2010.

NATAL, D. I. G.; RODRIGUES, K. C. D. C.; MOREIRA, M. E. D. C.; DE QUEIRÓZ, J. H.; BENJAMIN, L. D. A.; DOS SANTOS, M. H.; SANT'ANA, H. M. P.; MARTINO, H. S. D. Bioactive compounds of the Ubá mango juices decrease inflammation and hepatic steatosis in obese Wistar rats. **Journal of Functional Foods**, v. 32, n. Supplement C, p. 409-418, 2017.

NOVELLI, E. L. B.; DINIZ, Y. S.; C M GALHARDI, C. M.; G M X EBAID, G. M.; RODRIGUES, H. G.; MANI, F.; FERNANDES, A. A. H.; CICOONA, A. C.; NOVELLI FILHO, J. L. V. B. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, p. 111-119, 2007.

PAOLELLA, G.; MANDATO, C.; PIERRI, L.; POETA, M.; DI STASI, M.; VAJRO, P. Gut-liver axis and probiotics: Their role in non-alcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 42, p. 15518-15531, 2014.

PITA, M. L.; HOYOS, M.; MARTIN-LACAVE, I.; OSUNA, C.; FERNÁNDEZ-SANTOS, J. M.; GUERRERO, J. M. Long-term melatonin administration increases polyunsaturated fatty acid percentage in plasma lipids of hypercholesterolemic rats. **Journal of Pineal Research**, v. 32, n. 3, p. 179-186, 2002.

QIAO, Y.; SUN, J.; XIA, S.; LI, L.; LI, Y.; WANG, P.; SHI, Y.; LE, G. Effects of different *Lactobacillus reuteri* on inflammatory and fat storage in high-fat diet-induced obesity mice model. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 424-434, 2015.

RANADHEERA, C. S.; EVANS, C. A.; ADAMS, M. C.; BAINES, S. K. Effect of dairy probiotic combinations on in vitro gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell adhesion and cytokine secretion. **Journal of Functional Foods**, v. 8, n. Supplement C, p. 18-25, 2014.

RECCIA, I.; KUMAR, J.; AKLADIOS, C.; VIRDIS, F.; PAI, M.; HABIB, N.; SPALDING, D. Non-alcoholic fatty liver disease: A sign of systemic disease. **Metabolism**, v. 72, p. 94-108, 2017.

REYNÉS, B.; GARCÍA-RUIZ, E.; DÍAZ-RÚA, R.; PALOU, A.; OLIVER, P. Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet. **Food Research International**, v. 64, p. 839-848, 2014.

SAMPEY, B. P.; VANHOOSE, A. M.; WINFIELD, H. M.; FREEMERMAN, A. J.; MUEHLBAUER, M. J.; FUEGER, P. T.; NEWGARD, C. B.; MAKOWSKI, L. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity (Silver Spring)**, v. 19, n. 6, p. 1109-1117, 2011.

SHAFAT, A.; MURRAY, B.; RUMSEY, D. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. **Appetite**, v. 52, n. 1, p. 34-38, 2009.

SINGH, G. M.; DANAEI, G.; FARZADFAR, F.; STEVENS, G. A.; WOODWARD, M.; WORMSER, D.; KAPTOGE, S.; WHITLOCK, G.; QIAO, Q.; LEWINGTON, S.; DI ANGELANTONIO, E.; VANDER HOORN, S.; LAWES, C. M. M.; ALI, M. K.; MOZAFFARIAN, D.; EZZATI, M. The Age-Specific Quantitative Effects of Metabolic Risk Factors on Cardiovascular Diseases and Diabetes: A Pooled Analysis. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, p. e65174, 2013.

SONG, H.; LAI, J.; TANG, Q.; ZHENG, X. Mulberry ethanol extract attenuates hepatic steatosis and insulin resistance in high-fat diet-fed mice. **Nutrition research**, v. 36, n. 7, p. 710-718, 2016.

SU, G. L. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 283, n. 2, p. 256-265, 2002.

TOSCANO, M.; DE GRANDI, R.; MINIELLO, V. L.; MATTINA, R.; DRAGO, L. Ability of *Lactobacillus kefir* LKF01 (DSM32079) to colonize the intestinal environment and modify the gut microbiota composition of healthy individuals. **Digestive and liver disease**, v. 49, n. 3, p. 261-267, 2017.

URDANETA, E.; BARRENETXE, J.; ARANGUREN, P.; IRIGOYEN, A.; MARZO, F.; IBÁÑEZ, F. C. Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats. **Nutrition Research**, v. 27, n. 10, p. 653-658, 2007.

WALDHERR, F. W.; DOLL, V. M.; MEISSNER, D.; VOGEL, R. F. Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. **Food Microbiology**, v. 27, n. 5, p. 672-678, 2010.

WANG, X. H.; LI, C. Y.; MUHAMMAD, I.; ZHANG, X. Y. Fatty acid composition in serum correlates with that in the liver and non-alcoholic fatty liver disease activity scores in mice fed a high-fat diet. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 44, p. 140-50, 2016.

WANG, Y.; LIU, Y.; KIRPICH, I.; MA, Z.; WANG, C.; ZHANG, M.; SUTTLES, J.; MCCLAIN, C.; FENG, W. *Lactobacillus rhamnosus* GG reduces hepatic TNF $\alpha$  production and inflammation in chronic alcohol-induced liver injury. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 24, n. 9, p. 1609-1615, 2013.

WANG, Y.; XU, N.; XI, A.; AHMED, Z.; ZHANG, B.; BAI, X. Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 341-347, 2009.

XUE, L.; HE, J.; GAO, N.; LU, X.; LI, M.; WU, X.; LIU, Z.; JIN, Y.; LIU, J.; XU, J.; GENG, Y. Probiotics may delay the progression of nonalcoholic fatty liver disease by restoring the gut microbiota structure and improving intestinal endotoxemia. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-13, 2017.

YOUNOSSI, Z. M.; KOENIG, A. B.; ABDELATIF, D.; FAZEL, Y.; HENRY, L.; WYMER, M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology**, v. 64, n. 1, p. 73-84, 2016.

ZANIRATI, D. F.; ABATEMARCO, M.; SANDES, S. H. D. C.; NICOLI, J. R.; NUNES, Á. C.; NEUMANN, E. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. **Anaerobe**, v. 32, n. Supplement C, p. 70-76, 2015.

ZHANG, M.; WANG, C.; WANG, C.; ZHAO, H.; ZHAO, C.; CHEN, Y.; WANG, Y.; MCCLAIN, C.; FENG, W. Enhanced AMPK phosphorylation contributes to the beneficial effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG supernatant on chronic-alcohol-induced fatty liver disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 4, p. 337-344, 2015.

ZHANG, W.; GU, Y.; CHEN, Y.; DENG, H.; CHEN, L.; CHEN, S.; ZHANG, G.; GAO, Z. Intestinal flora imbalance results in altered bacterial translocation and liver function in rats with experimental cirrhosis. **European journal of gastroenterology & hepatology**, v. 22, n. 12, p. 1481-1486, 2010.

ZHANG, X.-L.; WU, Y.-F.; WANG, Y.-S.; WANG, X.-Z.; PIAO, C.-H.; LIU, J.-M.; LIU, Y.-L.; WANG, Y.-H. The protective effects of probiotic-fermented soymilk on high-fat diet-induced hyperlipidemia and liver injury. **Journal of Functional Foods**, v. 30, n. Supplement C, p. 220-227, 2017.

ZHONG, Z.; ZHANG, W.; DU, R.; MENG, H.; ZHANG, H. Lactobacillus casei Zhang stimulates lipid metabolism in hypercholesterolemic rats by affecting gene expression in the liver. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, n. 3, p. 244-252, 2012.

ZHUKOVA, N. V.; NOVGORODTSEVA, T. P.; DENISENKO, Y. K. Effect of the prolonged high-fat diet on the fatty acid metabolism in rat blood and liver. **Lipids in health and disease**, v. 13, p. 49-57, 2014.

ZOLLER, H.; TILG, H. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. **Metabolism**, v. 65, n. 8, p. 1151-1160, 2016.

**CAPÍTULO 2: O KEFIR DE ÁGUA MODULA A EXPRESSÃO DE GENES  
ENVOLVIDOS NA INFLAMAÇÃO E NA ADIPOGÊNESE EM RATOS *WISTAR*  
OBESOS**

## **Kefir de água modula a expressão de genes envolvidos na inflamação e na adipogênese em ratos *Wistar* obesos**

Water kefir modulates the expression of genes involved in inflammation and adipogenesis in obese *Wistar* rats

### **RESUMO**

O kefir de água é uma bebida fermentada, levemente ácida, e que contém microorganismos com ação probiótica. O presente estudo avaliou o efeito do kefir de água no estresse oxidativo sérico e na expressão gênica de marcadores da inflamação e do metabolismo lipídico em ratos obesos. O kefir de água aumentou a atividade da enzima glutathione acyl transferase (GST) e reduziu a concentração de malondialdeído quando administrado após a indução da obesidade na dose de 2 mL. Também reduziu a expressão dos genes da ácido graxo sintase (Fas) e do fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), e aumentou a expressão dos genes da lipase lipoproteica (LpL) e da adiponectina no tecido adiposo em todos os grupos de ratos obesos. Os resultados demonstram potencial probiótico do kefir de água na obesidade, reduzindo o estresse oxidativo sérico e modulando a expressão de genes envolvidos na inflamação e no acúmulo de lipídeos no tecido adiposo.

**Palavras chave:** Probióticos, obesidade, bebida fermentada, inflamação, adipogênese

## ABSTRACT

Water kefir is a beverage fermented, slightly acidic, home-made beverage that contains microorganisms with probiotic action. The present study evaluated the effect of water kefir on serum oxidative stress and on the gene expression of markers of inflammation and lipid metabolism in obese rats. Water kefir increased the activity of the enzyme glutathione acyl transferase (GST) and reduced the concentration of malondialdehyde when administered after the induction of obesity at the dose of 2 mL. It also reduced the expression of the fatty acid synthase (Fas) and tumour necrosis factor (TNF genes) genes, and increased the expression of lipoprotein lipase (LpL) and adiponectin genes in adipose tissue in all groups of obese rats. The results showed that the water kefir has probiotic potential in obesity, reducing serum oxidative stress, and modulating the expression of genes involved in inflammation and accumulation of lipids in adipose tissue.

**Key words:** Probiotics, obesity, fermented drink, inflammation, adipogenesis

## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade já é considerada como uma epidemia do século XXI, que atinge todas as faixas etárias em diversas populações. Dados do *Institute for Health Metrics and Evaluation – IMHE (2017)*, apontaram que cerca de 2,2 bilhões (30% da população mundial) estavam com sobrepeso ou com obesidade em 2015. Destes, 603 milhões de adultos e 107 milhões de crianças são obesos, equivalendo a 12% da população adulta e 5% da população infantil. Na obesidade, o acúmulo excessivo de gordura caracteriza-se como um fator de risco para doenças cardiovasculares, aterosclerose, *diabetes mellitus* tipo 2, doença hepática gordurosa não alcoólica e alguns tipos de câncer (Singh *et al.*, 2013).

O tecido adiposo apresenta atividade metabólica produzindo citocinas e adipocinas. A hipertrofia do adipócito que ocorre na obesidade, ocasiona um desequilíbrio no metabolismo lipídico, com alterações na expressão de genes relacionados à adipogênese, como a ácido graxo sintase (Fas) e a lipase lipoprotéica (LpL) (Gomes Natal *et al.*, 2016). Além disso, ocorre aumento na expressão de genes relacionados à síntese de citocinas pró inflamatórias, como o TNF $\alpha$  e a IL6, e a redução na expressão de genes anti-inflamatórios, responsáveis pela síntese de citocinas e adipocinas anti-inflamatórias, como a adiponectina (Balistreri *et al.*, 2010; Fuentes *et al.*, 2013). Evidências sugerem que a inflamação crônica desempenha um papel crítico no desenvolvimento das disfunções metabólicas relacionadas à obesidade (Jung e Choi, 2014).

A obesidade também está associada à alteração da composição (disbiose) e funções metabólicas da microbiota intestinal em humanos e animais (Tilg e Kaser, 2011; Cotillard *et al.*, 2013), e que a disbiose estaria relacionada à

inflamação e ao acúmulo lipídico na obesidade (Zhang *et al.*, 2012; Guida e Venema, 2015; Kobylak *et al.*, 2016).

Recentes publicações têm evidenciado a capacidade dos micro-organismos probióticos, como as bactérias lácticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, em modular a microbiota intestinal, e a expressão de genes relacionados à inflamação e ao metabolismo lipídico na obesidade (Park *et al.*, 2013; Novotny Nunez *et al.*, 2015; Alard *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017; Shin *et al.*, 2017). Neste contexto, o kefir de água torna-se uma alternativa viável, e de baixo custo, por conter micro-organismos potencialmente probióticos na sua composição. O kefir de água é uma bebida caseira, fermentada e levemente ácida. Os grãos de kefir são compostos por um polímero de glicose (dextrana), e por uma simbiose de bactérias lácticas, acéticas e leveduras (Magalhães *et al.*, 2010). Bactérias lácticas, dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estão presentes no kefir de água (Magalhães *et al.*, 2010; Marsh *et al.*, 2013).

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar se o kefir de água tem efeito na obesidade induzida pela dieta de cafeteria em ratos *wistar*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Preparação do kefir de água**

Os grãos de kefir foram obtidos por doação na cidade de Viçosa - MG, e o açúcar mascavo, de mesma marca e lote, foi adquirido no comércio local. Foram inoculados 10 g de grãos de kefir em 100 mL de solução de açúcar mascavo (5% m/v) em água destilada, e realizada a fermentação em incubadora (B.O D MA 415, Marconi) a 28 °C por 24 horas. Após este período, os grãos foram separados do kefir de água com o auxílio de uma peneira (Urdaneta *et al.*,

2007). O processo de fermentação foi repetido diariamente durante todo o período experimental.

## **2.2. Modelo experimental**

O experimento foi conduzido de acordo com os Princípios Éticos para Experimentação Animal, e aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, MG, sob o protocolo 79/2014.

Ratos machos *Wistar* recém desmamados, com 21 dias de idade e pesando aproximadamente 69 g foram recebidos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV. Até o 60º dia de idade (fase adulta) os animais foram mantidos em caixas de polietileno consumindo ração comercial (Presence/In Vivo® Nutrição Animal) e água destilada *ad libitum*. A temperatura da sala de experimentação foi controlada em  $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , com ciclo claro/escuro de 12 horas.

No 61º dia, os animais foram pesados e alocados em gaiolas individuais, de aço inoxidável e divididos aleatoriamente em seis grupos ( $n = 7$ ), de forma que a diferença entre as médias de peso dos grupos não ultrapassasse 3 g (Natal *et al.*, 2017): G1 (dieta Comercial e 1 mL de soro fisiológico), G2 (dieta comercial e 1 mL de kefir de água), G3, G5 e G6 (dieta de cafeteria e 1 mL de soro fisiológico) e G4 (dieta de cafeteria e 1 mL de kefir de água). Após 6 semanas de intervenção com a dieta de cafeteria, foram realizadas as medidas de peso, perímetro abdominal (PA) e comprimento para o cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC) e confirmação da indução da obesidade -  $\text{PA} \geq 17 \text{ cm}$  e  $\text{IMC} \geq 0,68 \text{ g/cm}^2$  - (Novelli *et al.*, 2007; Reynés *et al.*, 2014) nos grupos G3, G5 e G6. Logo em seguida, os animais obesos (média  $\text{IMC} = 0,72 \pm 0,02$  e  $\text{PA} = 19,4 \pm 0,7 \text{ cm}$ ) foram realocados, mantendo a similaridade de peso entre os grupos (Natal

*et al.*, 2017). Os animais dos grupos G3 continuaram recebendo soro fisiológico, e os grupos G5 e G6 passaram a receber 1 mL e 2 mL de kefir de água respectivamente.

A dieta de cafeteria foi composta pelos seguintes alimentos: Patê de presunto, batata palha frita, bacon, mortadela, biscoito de maisena, achocolatado em pó, leite integral em pó e ração comercial na proporção de 2:1:1:1:1:1:1:1:1. A administração do soro fisiológico e do kefir de água foi realizada uma vez ao dia por gavagem. A dose de kefir administrada por gavagem forneceu  $3,87 \times 10^7$  UFC/mL de bactérias lácticas e  $2,20 \times 10^{13}$  UFC/mL de leveduras totais. Os animais consumiram as dietas comercial e de cafeteria, e água destilada *ad libitum*. O peso e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente.

Ao final do experimento, os ratos ficaram em jejum por 12 horas, foram anestesiados (Isoflurano 100%, Isoforine, Cristália<sup>®</sup>, em aparelho de anestesia inalatória) e submetidos à eutanásia por punção cardíaca. O sangue foi coletado em tubos com anticoagulante (heparina) para obtenção do plasma. O tecido adiposo epididimal foi retirado, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em ultra freezer à -80 °C. O tecido adiposo abdominal foi retirado, fixado em formaldeído tamponado 10% por 24 horas e armazenado em álcool 70%.

### **2.3. Dados Biométricos e de ingestão alimentar**

O IMC foi calculado pela razão entre o peso corporal (g) e o comprimento naso-anal (cm) ao quadrado. O Índice de adiposidade abdominal foi calculado pela razão entre a gordura abdominal e o peso corporal, e foi multiplicado por 100. O coeficiente de eficiência alimentar foi calculado pela razão entre o ganho de peso corporal e a ingestão total de dieta (média semanal). O coeficiente de

eficiência energética foi obtido pela razão entre o ganho de peso corporal e a ingestão energética total (média semanal), e multiplicado por 1000 Kcal.

## **2.4. Análise do Estresse oxidativo**

### *2.4.1. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)*

A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método proposto por Dieterich et al (2000). A metodologia baseia-se na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido ( $O_2^-$ ) à peróxido de hidrogênio, reduzindo a auto-oxidação do pirogalol. A determinação da atividade de SOD foi expressa em U SOD / mL de plasma, onde 1 U = 50% de inibição da auto-oxidação do pirogalol. Foram pipetados em microplaca (96 poços) 60  $\mu$ l de plasma, 219  $\mu$ L de tampão Tris HCl 50 mM, pH 8,2, contendo 1 mM de EDTA, 6  $\mu$ L de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (1,25 mM), 15  $\mu$ L de pirogalol (100  $\mu$ MA). A placa foi incubada por 5 minutos a 37°C, sendo a leitura feita no comprimento de onda a 570 nm.

### *2.4.2. Atividade da Glutathione S – transferase (GST)*

A atividade da enzima Glutathione S-transferase (GST) foi determinada de acordo com o método proposto por Habig et al (1976) usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CNDNB) (Sigma) como substrato. Uma solução de reação (1000  $\mu$ L) contendo 950  $\mu$ L de tampão fosfato de potássio (0,1 M pH 7,0), 10  $\mu$ L de CNDNB 0,1 M (em etanol PA 80%) e 10  $\mu$ L de GSH 100 mM (em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0) foi adicionada a 30  $\mu$ L de plasma. A leitura da absorvância foi realizada em cubeta de quartzo (1,5 mL) utilizando-se espectrofotômetro (T70+ UV/VIS), no qual foi avaliado o aumento linear da absorvância a 340 nm durante 60 segundos. Os dados foram expressos em  $\mu$ Mol GST/min/mL de plasma.

### *2.4.3. Malondialdeído (MDA)*

A concentração de malondialdeído foi medida pelo método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), de acordo com metodologia proposta por Buege & Aust (1978). Em tubos Eppendorf de 2 mL foram acrescentados 200  $\mu$ L de plasma, e 400  $\mu$ L de solução TBARS (ácido tricloroacético 15 %, de ácido tiobarbitúrico 0,375 % e HCl 0,25 M). Os tubos foram agitados em vórtex por 10 segundos, e logo em seguida, colocados em banho maria a 95°C por 40 minutos. Após este período, os tubos foram resfriados em banho de gelo, e foram acrescentados 600  $\mu$ L de n-butanol. Os tubos foram novamente agitados em vórtex por 2 minutos e centrifugados a 3500 g por 5 minutos. Foi coletado um volume de 200  $\mu$ L do sobrenadante para leitura da absorvância em leitor de microplaca (Multiskan Go) a 535 nm. A concentração de MDA foi obtida por meio de uma curva padrão de TMPO (1,1,3,3 tetrametoxipropano) nas concentrações de 0; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0  $\mu$ M. Os dados foram expressos em  $\mu$ Mol MDA / mL de plasma.

### ***2.5. Análise da expressão gênica pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT - PCR)***

O RNA foi extraído do tecido adiposo epididimal usando o reagente Trizol (Invitrogen™, USA), sendo a sua concentração e pureza avaliados em espectrofotômetro Multiskan Go (ThermoScientific, DE, USA), e a integridade do RNA por eletroforese em gel de agarose. Para a síntese do cDNA, utilizou-se o kit M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen Brasil Ltda.), seguindo o protocolo do fabricante. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada por reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real (RT-PCR) utilizando o equipamento AB StepOne Real Time PCR System e o reagente 2X SYBR Green Máster Mix (Applied Biosystems, CA, USA). Os parâmetros

utilizados na corrida foram 15 min a 95°C e em seguida 40 ciclos de 95°C (15s), 60°C (30s) e 72°C (30s), seguido pela análise da curva de melting. As análises foram realizadas em duplicata, sendo expressos os valores médios de cada grupo. Os níveis relativos de expressão de cada gene foram determinados pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  no AB SepOne Real Time PCR System (Applied Biosystem) software. A  $\beta$ -Actina foi utilizada como gene endógeno de referência. Foram utilizados os seguintes iniciadores:

| Iniciadores                      | Forward              | Reverse                |
|----------------------------------|----------------------|------------------------|
| <b>Fas</b>                       | AGCCCCTCAAGTGCACAGTG | TGCCA ATGTGTTTTCCCTGA  |
| <b>LpL</b>                       | CAGCTGGGCCTAACTTT    | CCTCTCTGCAATCACACGAA   |
| <b>Adiponectina</b>              | AATCCTGCCAGTCATGAAG  | CATCTCCTGGGTCACCCCTTA  |
| <b>TNF<math>\alpha</math></b>    | ACAAGGCTGCCCGACTA    | TGGAAGACTCCTCCCAGGTATG |
| <b><math>\beta</math>-actina</b> | AGGGGAAGGGTGAAAAGATG | GAGAGGGTGGATGGGTAGGG   |

## **2.6. Análise histomorfométrica do tecido adiposo**

Fragmentos do tecido adiposo abdominal de cada grupo foram fixados em formalina 10% e incluídos em parafina. Foram obtidos cortes semi-seriados com 5  $\mu$ m de espessura e, posteriormente, os cortes foram laminados e corados com Hematoxilina/Eosina (HE). As lâminas foram montadas com Entellan (Merck®) e analisadas em microscópio de luz (OLYMPUS BX 60). As imagens foram obtidas em câmera digital (Q COLOR 3 OLYMPUS® AMERICA INC.) com auxílio do software Q COLOR OLYMPUS®. As imagens das secções histológicas foram capturadas com objetiva de 10X, sendo medidos o diâmetro, o perímetro e a área dos adipócitos com auxílio do aplicativo ImagePro-Plus® versão 4.5.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Efeitos do kefir de água nas medidas biométricas e de consumo alimentar**

Os dados biométricos de peso inicial e final, ganho de peso, índice de massa corporal (IMC), gordura abdominal e percentual de adiposidade, e do

consumo alimentar (CA), consumo de gordura (CG), coeficiente de eficiência alimentar (CEA) e coeficiente de eficiência energética (CEE) dos diferentes grupos experimentais estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Medidas biométricas e de ingestão alimentar dos grupos de animais ao final do experimento.

| Medidas                      | Grupos (n = 7)            |                             |                           |                             |                             |                             |
|------------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                              | G1                        | G2                          | G3                        | G4                          | G5                          | G6                          |
| Peso inicial (g)             | 381,14±13,45 <sup>b</sup> | 385,42±8,58 <sup>b</sup>    | 424,85±16,30 <sup>a</sup> | 425,14±16,20 <sup>a</sup>   | 424,28±27,21 <sup>a</sup>   | 424,85±27,14 <sup>a</sup>   |
| Peso final (g)               | 421,89±23,71 <sup>c</sup> | 438,56±20,38 <sup>b,c</sup> | 500,56±34,66 <sup>a</sup> | 483,78±39,06 <sup>a,b</sup> | 485,78±51,14 <sup>a,b</sup> | 482,67±29,43 <sup>a,b</sup> |
| Ganho de peso (g)            | 43,50±5,92 <sup>b</sup>   | 45,66±8,23 <sup>b</sup>     | 80,83±9,45 <sup>a</sup>   | 79,50±6,53 <sup>a</sup>     | 81,66±17,69 <sup>a</sup>    | 78,00±12,69 <sup>a</sup>    |
| IMC (g/cm <sup>2</sup> )     | 0,60±0,02 <sup>b</sup>    | 0,65±0,03 <sup>b</sup>      | 0,74±0,03 <sup>a</sup>    | 0,73±0,03 <sup>a</sup>      | 0,72±0,03 <sup>a</sup>      | 0,72±0,02 <sup>a</sup>      |
| CA (g)                       | 179,45±11,91 <sup>a</sup> | 178,11±10,70 <sup>a</sup>   | 156,71±8,56 <sup>b</sup>  | 158,33±7,58 <sup>b</sup>    | 152,07±9,29 <sup>b</sup>    | 152,05±7,86 <sup>b</sup>    |
| CG (g)                       | 3,20±0,13 <sup>b</sup>    | 3,17±0,10 <sup>b</sup>      | 34,94±2,55 <sup>a</sup>   | 34,93±2,13 <sup>a</sup>     | 33,46±2,91 <sup>a</sup>     | 33,40±1,92 <sup>a</sup>     |
| CEA                          | 0,02±0,00 <sup>b</sup>    | 0,03±0,00 <sup>b</sup>      | 0,06±0,01 <sup>a</sup>    | 0,05±0,00 <sup>a</sup>      | 0,06±0,01 <sup>a</sup>      | 0,05±0,01 <sup>a</sup>      |
| CEE (g.1000/Kcal)            | 8,36±1,17 <sup>b</sup>    | 8,71±2,46 <sup>b</sup>      | 13,53±2,33 <sup>a</sup>   | 13,86±0,83 <sup>a</sup>     | 15,65±2,92 <sup>a</sup>     | 13,57±3,10 <sup>a</sup>     |
| Gordura abdominal            | 14,55±7,45 <sup>b</sup>   | 15,41±3,84 <sup>b</sup>     | 41,98±12,17 <sup>a</sup>  | 34,27±8,13 <sup>a</sup>     | 40,79±14,16 <sup>a</sup>    | 35,02±9,25 <sup>a</sup>     |
| Adiposidade (%) <sup>*</sup> | 1,96±0,19 <sup>b</sup>    | 2,19±0,90 <sup>b</sup>      | 5,91±1,80 <sup>a</sup>    | 5,07±0,72 <sup>a</sup>      | 5,66±0,85 <sup>a</sup>      | 5,07±1,10 <sup>a</sup>      |

G1 = Dieta comercial; G2 = Dieta comercial e 1 mL de kefir de água; G3 = Dieta de Cafeteria; G4 = Dieta de Cafeteria e 1 mL de kefir de água; G5 = Dieta de Cafeteria e 1 mL de kefir de água; G6 = Dieta de Cafeteria e 2 mL de kefir de água;

IMC = Índice de massa corpórea; CA = Consumo alimentar (média semanal); CG = Consumo de gordura; CEA = Coeficiente de Eficiência Alimentar; CEE = Coeficiente de Eficiência Energética;

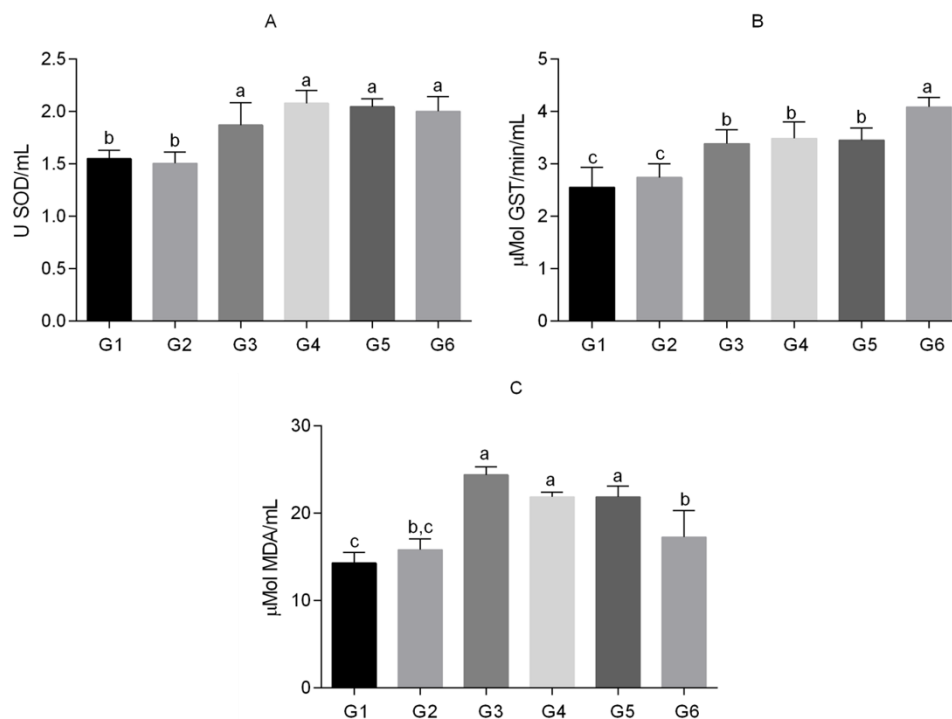
Médias em uma mesma linha seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Bonferroni ( $\alpha = 5\%$ )

<sup>#</sup>Adiposidade (%) = ((tec. adiposo epididimal + tec. adiposo visceral) / peso corporal) x 100

Os grupos de animais obesos, com e sem kefir de água, apresentaram médias similares de peso, ganho de peso, IMC, gordura abdominal e adiposidade, e superiores ( $P < 0,05$ ) às médias no grupo que recebeu dieta comercial (G1). O consumo alimentar foi menor nos grupos de ratos obesos, em relação ao consumo alimentar nos grupos com dieta comercial. Entretanto, os grupos de animais alimentados com dieta de cafeteria apresentaram coeficientes de eficiência alimentar (CEA) e energética (CEE), e consumo de gordura (CG) semelhantes, e superiores aos dos grupos com dieta comercial, demonstrando a maior eficácia da dieta de cafeteria em promover maiores ganho de peso e adiposidade nos animais.

### ***3.2. Efeitos do kefir de água no estresse metabólico no plasma***

Na Figura 8 estão apresentadas as atividades das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD) e Glutathione S-transferase (GST), e a concentração do produto de peroxidação lipídica Malondialdeído (MDA) no plasma dos diferentes grupos experimentais.

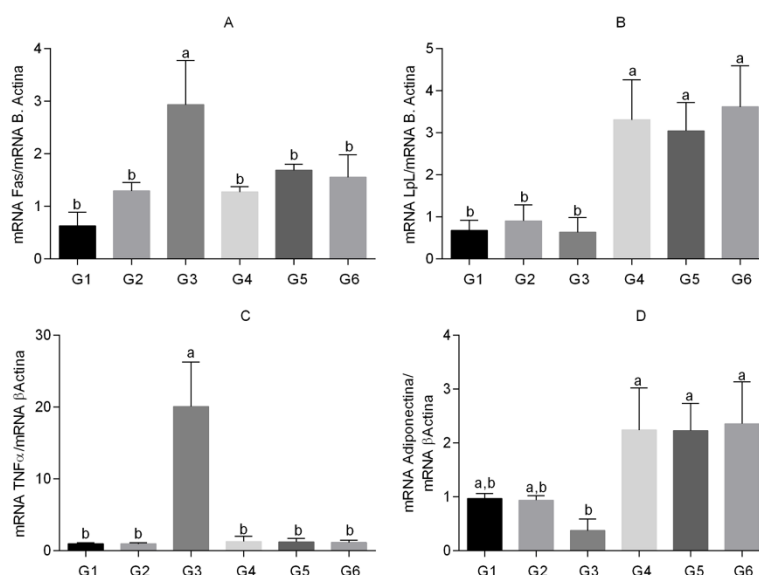


**Figura 8.** Efeito do kefir de água na atividade de A - Superóxido Dismutase – SOD e B - Glutaciona S-transferase (GST), e na concentração de C - Malondialdeído (MDA) no plasma de ratos dos grupos experimentais: G1 - Dieta comercial; G2 - Dieta comercial e 1 mL de kefir de água; G3 - Dieta de cafeteria; G4 - Dieta de cafeteria e 1 mL de kefir de água; G5 - Dieta de cafeteria e 1 mL de kefir de água e G6 - Dieta de cafeteria e 2 mL de kefir de água. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 7). Médias dos diferentes grupos comparadas pelo teste de Bonferroni ( $\alpha = 5\%$ ).

O kefir de água não influenciou na atividade de SOD nos grupos alimentados com dieta comercial e com dieta de cafeteria (Fig.8A). Entretanto, houve aumento na atividade de GST (Fig. 8B) e redução na concentração de MDA (Fig. 8C) quando o kefir de água foi administrado após a indução da obesidade, na dose de 2 mL (G6).

### **3.3. Efeitos do kefir de água na expressão gênica no tecido adiposo**

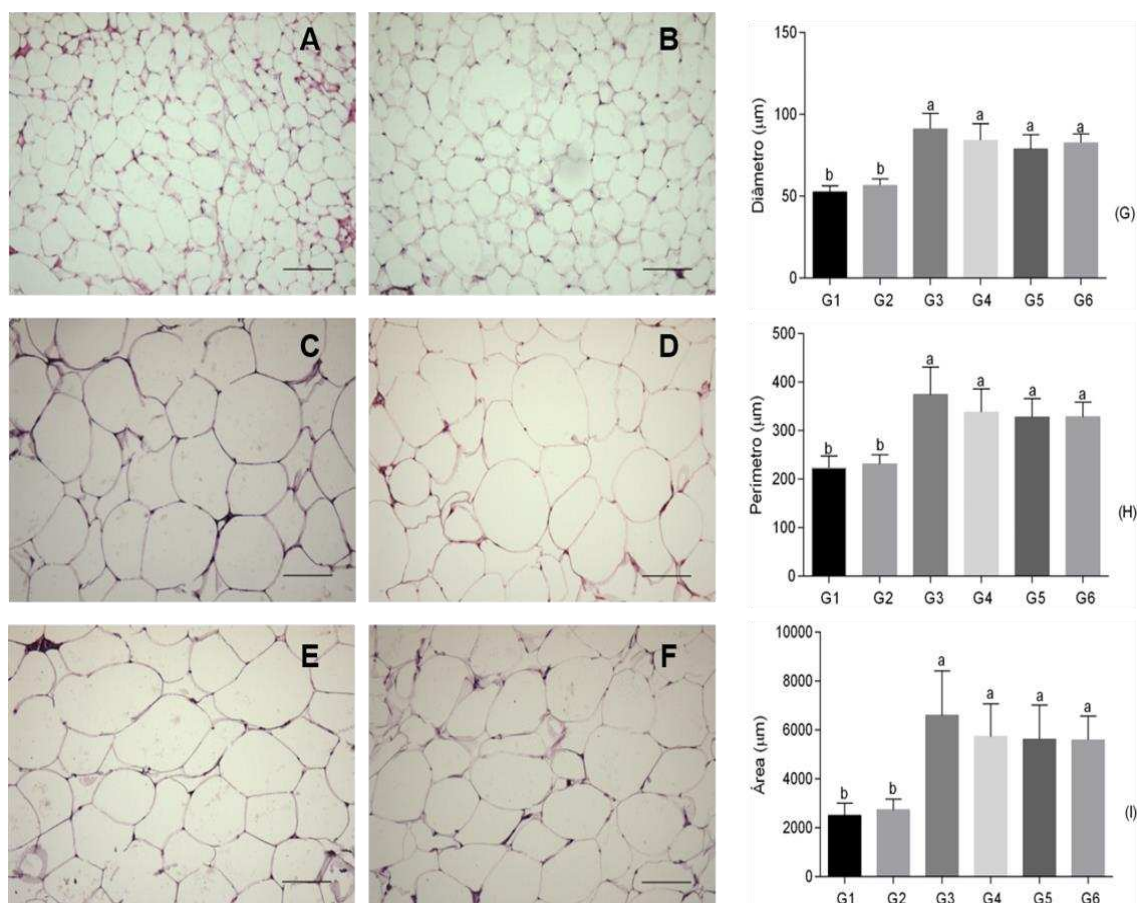
Os efeitos do kefir de água na expressão dos genes ácido graxo sintase (Fas), lipase lipoprotéica (LpL), fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) e adiponectina estão apresentados na Figura 9. Nos grupos de animais obesos, o kefir de água reduziu a expressão dos genes Fas (Fig. 9A) e TNF $\alpha$  (Fig. 9C), e aumento as expressões dos genes LpL (Fig. 9B) e adiponectina (Fig. 9D).



**Figura 9.** Efeito do kefir de água na expressão gênica de A – Fas, B – LpL, C - TNF $\alpha$  e D – Adiponectina no tecido adiposo epididimal de ratos dos grupos experimentais: G1 - Dieta comercial; G2 - Dieta comercial e 1 mL de kefir de água; G3 - Dieta de cafeteria; G4 - Dieta de cafeteria e 1 mL de kefir de água; G5 - Dieta de cafeteria e 1 mL de kefir de água e G6 - Dieta de cafeteria e 2 mL de kefir de água. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 4). Médias dos diferentes grupos comparadas pelo teste de Bonferroni ( $\alpha = 5\%$ ).

### 3.4. Efeito do kefir de água na histomorfometria do tecido adiposo

O efeito do kefir de água nos parâmetros histomorfométricos relacionados ao diâmetro, perímetro e área dos adipócitos, estão apresentados na Figura 10. O diâmetro (Fig. 10G), o perímetro (Fig. 10H) e a área dos adipócitos (Fig. 10I) foram similares entre os grupos de animais obesos, com e sem kefir de água, e superiores aos mesmos parâmetros dos grupos com dieta comercial.



**Figura 10.** Efeito do kefir de água na histomorfometria do tecido adiposo abdominal e nas medidas celulares em relação ao G - diâmetro, H - perímetro e I – Área de ratos dos grupos experimentais: G1 - Dieta comercial; G2 - Dieta comercial e 1 mL de kefir de água; G3 - Dieta de cafeteria, G4 - Dieta de cafeteria e 1 mL de kefir de água; G5 - Dieta de cafeteria e 1 mL de kefir de água e G6 - Dieta de cafeteria e 2 mL de kefir de água. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 8). # Médias seguidas por uma mesma letra nos gráficos (G, H e I) não diferem pelo teste de Bonferroni ( $\alpha = 5\%$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

O kefir de água é uma bebida fermentada, de baixo custo, e que pode apresentar benefícios à saúde por conter micro-organismos probióticos como os Lactobacilos e Bifidobacterias, sendo produzido e consumido de forma caseira por diferentes populações (Waldherr *et al.*, 2010; Laureys *et al.*, 2017). Nesse estudo, nós investigamos os potenciais benefícios do kefir de água no estresse oxidativo plasmático, e na expressão gênica inflamatória e do metabolismo lipídico no tecido adiposo de ratos obesos, alimentados com dieta de cafeteria. Os nossos resultados demonstraram que o kefir de água apresentou efeito na

atividade enzimática antioxidante e na expressão de genes inflamatórios e do metabolismo lipídico nos animais obesos. Efeitos no estresse oxidativo, e na modulação da expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico e na inflamação por outros micro-organismos probióticos já foram previamente relatados (Zhang *et al.*, 2010; Arora *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2014; Novotny Nunez *et al.*, 2015; Qiao *et al.*, 2015; Kim, B. *et al.*, 2016; Shin *et al.*, 2017).

A dieta de cafeteria é um modelo robusto de dieta indutora de obesidade em animais, a qual inclui alimentos altamente palatáveis, típicos de uma dieta ocidental, ricos em açúcares e gorduras. Esta dieta induz alta ingestão calórica, aumento da massa lipídica e rápido ganho de peso (Shafat *et al.*, 2009). Em nosso estudo, a dieta de cafeteria induziu a obesidade nos animais, e um maior percentual de adiposidade em relação aos animais que receberam dieta comercial.

A obesidade está relacionada a um aumento do estresse oxidativo e desordens metabólicas (Ozata *et al.*, 2002; Savini *et al.*, 2013). O kefir de água não influenciou na atividade da Superóxido Dismutase (SOD) nos grupos de ratos obesos. No entanto, a atividade da enzima Glutathione S-transferase (GST) foi aumentada no grupo de ratos que receberam 2 mL de kefir de água após a indução da obesidade, com consequente redução da concentração do produto de peroxidação lipídica malondialdído (MDA). A SOD é uma enzima antioxidante de primeira fase, que catalisa a conversão do superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio. A GST é uma enzima relacionada às reações antioxidantes de segunda fase, atuando na neutralização e eliminação de compostos tóxicos às células (Hayes *et al.*, 2005; Ray *et al.*, 2012). O kefir de água apresentou melhor ação antioxidante sérica, relacionada a um aumento na

atividade da enzima GST, quando administrado numa maior dose. Zhang et al. (2010) encontraram no fígado e não no plasma, um efeito dose dependente relacionado à atividade antioxidante de *Lactobacillus*.

No presente estudo o kefir de água alterou a expressão dos genes adipogênicos Fas e LpL. Nos grupos de ratos obesos a administração do kefir de água reduziu a expressão do gene Fas e aumentou a expressão do gene LpL. O gene Fas têm sua expressão aumentada no tecido adiposo de ratos obesos (Guichard *et al.*, 1992) e catalisa a síntese de ácidos graxos de cadeia longa. A enzima LpL age na hidrólise e captação de ácidos graxos das lipoproteínas séricas (quilomícrons e VLDL), podendo melhorar o metabolismo da glicose na obesidade (Walton *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016). Entretanto, apesar da diferença nas expressões de Fas e de LpL entre os grupos de ratos obesos, com e sem kefir, não foi observada diferença nas medidas histomorfométricas relacionadas ao diâmetro, circunferência e área dos adipócitos entre estes grupos. Este resultado pode ser explicado pelo envolvimento dos genes Fas e Lpl no processo de acúmulo de triacilgliceróis e consequente hipertrofia dos adipócitos (adipogênese). Nos grupos de ratos obesos que receberam kefir de água pode ter havido maior captação de triacilgliceróis das lipoproteínas séricas, enquanto no grupo obeso e não tratado, pode ter ocorrido maior síntese de ácidos graxos. Alterações na captação, síntese (lipogênese) e oxidação (lipólise) de ácidos graxos no adipócito, ocasiona acúmulo de triacilgliceróis (Kim *et al.*, 2016).

Em nosso estudo, a dieta de cafeteria promoveu a hipertrofia do tecido adiposo e aumentou a expressão da citocina pró inflamatória  $TNF\alpha$  nos ratos obesos. Estes resultados corroboram com Sampey *et al.* (2011). O  $TNF\alpha$  é um dos principais mediadores da resposta inflamatória na obesidade, sendo expresso por macrófagos infiltrados e adipócitos no tecido adiposo hipertrofiado

(Brahma Naidu *et al.*, 2016). A expressão elevada de  $TNF\alpha$  aumenta a expressão de outras citocinas inflamatórias como IL6 e IL1 $\beta$ , por meio da ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), e reduz a expressão de adiponectina, aumentando a resistência insulínica e inibindo a atividade de LpL (Balistreri *et al.*, 2010; Fuentes *et al.*, 2013; Lee, 2013; Gomes Natal *et al.*, 2016).

O tratamento com kefir de água reduziu a expressão de  $TNF\alpha$  no tecido adiposo dos grupos de ratos obesos, e aumentou a expressão da adiponectina, uma adipocina antiinflamatória. A adiponectina age no metabolismo lipídico (oxidação de ácidos graxos) e no aumento da sensibilidade à insulina. Além disso, esta adipocina reduz a expressão da citocina pró-inflamatória  $TNF\alpha$ , inibindo a via do NF $\kappa$ B (Balistreri *et al.*, 2010). Os micro-organismos probióticos podem agir na sinalização celular e na expressão gênica, reduzindo a produção de citocinas inflamatórias e modulando a inflamação (Latvala *et al.*, 2011; Bondia-Pons *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2016).

A microbiota intestinal pode estar envolvida na homeostase energética, no metabolismo lipídico e na modulação do sistema imune, e alterações no perfil desta microbiota (disbiose), relacionadas a dietas hiperlipídicas e ao excesso de peso, podem desempenhar um papel importante nas desordens metabólicas e inflamatórias na obesidade e suas comorbidades (Tilg e Kaser, 2011; Requena *et al.*, 2013; Guida e Venema, 2015). Assim, a modulação desta microbiota pelos micro-organismos probióticos ganha importância como medida terapêutica na obesidade (Arora *et al.*, 2013; Walsh *et al.*, 2014; Kobylak *et al.*, 2016), e neste sentido, o kefir de água pode melhorar os desequilíbrios metabólicos e inflamatórios, característicos da obesidade. O kefir de água contém micro-organismos capazes de colonizar o lúmen intestinal e modular a microbiota local (Magalhães *et al.*, 2010; Toscano *et al.*, 2017). Assim, os resultados encontrados

indicam uma potencial ação probiótica dos micro-organismos presentes no kefir de água

## 5. CONCLUSÃO

O kefir de água apresentou efeitos no estresse oxidativo sérico, e na modulação de genes envolvidos na inflamação e no metabolismo lipídico na obesidade. O kefir de água aumentou a atividade da GST e reduziu o MDA séricos quando administrado após a indução da obesidade, na dose de 2 mL. O kefir de água aumentou a expressão dos genes LpL e adiponectina, e reduziu a expressão dos genes Fas e TNF $\alpha$  nos grupos de ratos obesos, quando administrado antes e após a indução da obesidade. Estes resultados, inéditos, indicam que o kefir de água apresenta potencial ação probiótica no controle da inflamação e da adipogênese nos animais com obesidade induzida pela dieta de cafeteria.

### Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver nenhum conflito de interesse

### Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais por financiar parte da pesquisa.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALARD, J.; LEHRTER, V.; RHIMI, M.; MANGIN, I.; PEUCELLE, V.; ABRAHAM, A. L.; MARIADASSOU, M.; MAGUIN, E.; WALIGORA-DUPRIET, A. J.; POT, B.; WOLOWCZUK, I.; GRANGETTE, C. Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. **Environmental microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1484-1497, 2016.

ARORA, T.; SINGH, S.; SHARMA, R. K. Probiotics: Interaction with gut microbiome and antiobesity potential. **Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 591-596, 2013.

BALISTRERI, C. R.; CARUSO, C.; CANDORE, G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. **Mediators of inflammation**, v. 2010, p. 1-19, 2010.

BONDIA-PONS, I.; RYAN, L.; MARTINEZ, J. A. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 68, n. 4, p. 701-711, 2012.

BRAHMA NAIDU, P.; UDDANDRAO, V. V.; RAVINDAR NAIK, R.; SURESH, P.; MERIGA, B.; BEGUM, M. S.; PANDIYAN, R.; SARAVANAN, G. Ameliorative potential of gingerol: Promising modulation of inflammatory factors and lipid marker enzymes expressions in HFD induced obesity in rats. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 419, p. 139-147, 2016.

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

COLLABORATORS, T. G. O. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 1, p. 13-27, 2017.

COTILLARD, A.; KENNEDY, S. P.; KONG, L. C.; PRIFTI, E.; PONS, N.; LE CHATELIER, E.; ALMEIDA, M.; QUINQUIS, B.; LEVENEZ, F.; GALLERON, N.; GOUGIS, S.; RIZKALLA, S.; BATTO, J.-M.; RENAULT, P.; CONSORTIUM, A. N. R. M.; DORE, J.; ZUCKER, J.-D.; CLEMENT, K.; EHRLICH, S. D.; MEMBERS, A. N. R. M. C. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. **Nature**, v. 500, n. 7464, p. 585-588, 2013.

DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K.; HASENFUSS, G.; PRESTLE, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, v. 101, n. 1, p. 33-39, 2000.

FUENTES, E.; FUENTES, F.; VILAHUR, G.; BADIMON, L.; PALOMO, I.; #XE1. Mechanisms of Chronic State of Inflammation as Mediators That Link Obese Adipose Tissue and Metabolic Syndrome. **Mediators of Inflammation**, p. 1-11, 2013.

GOMES NATAL, D. I.; DE CASTRO MOREIRA, M. E.; SOARES MILIAO, M.; DOS ANJOS BENJAMIN, L.; DE SOUZA DANTAS, M. I.; MACHADO ROCHA RIBEIRO, S.; STAMPINI DUARTE MARTINO, H. Uba mango juices intake decreases adiposity and inflammation in high-fat diet-induced obese Wistar rats. **Nutrition**, v. 32, n. 9, p. 1011-1018, 2016.

GUICHARD, C.; DUGAIL, I.; LE LIEPVRE, X.; LAVAU, M. Genetic regulation of fatty acid synthetase expression in adipose tissue: overtranscription of the gene in genetically obese rats. **Journal of lipid research**, v. 33, n. 5, p. 679-687, 1992.

GUIDA, S.; VENEMA, K. Gut microbiota and obesity: Involvement of the adipose tissue. **Journal of Functional Foods**, v. 14, n. Supplement C, p. 407-423, 2015.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferase AA from rat liver. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 175, n. 2, p. 710-716, 1976.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione Transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 51-88, 2005.

JUNG, U. J.; CHOI, M. S. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 4, p. 6184-6223, 2014.

KIM, B.; PARK, K. Y.; JI, Y.; PARK, S.; HOLZAPFEL, W.; HYUN, C. K. Protective effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG against dyslipidemia in high-fat diet-induced obese mice. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 473, n. 2, p. 530-536, 2016.

KIM, D. H.; KIM, H.; JEONG, D.; KANG, I. B.; CHON, J. W.; KIM, H. S.; SONG, K. Y.; SEO, K. H. Kefir alleviates obesity and hepatic steatosis in high-fat diet-fed mice by modulation of gut microbiota and mycobiota: targeted and untargeted community analysis with correlation of biomarkers. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 44, p. 35-43, 2017.

KIM, J. H.; KIM, O. K.; YOON, H. G.; PARK, J.; YOU, Y.; KIM, K.; LEE, Y. H.; CHOI, K. C.; LEE, J.; JUN, W. Anti-obesity effect of extract from fermented *Curcuma longa* L. through regulation of adipogenesis and lipolysis pathway in high-fat diet-induced obese rats. **Food & nutrition research**, v. 60, p. 1-9, 2016.

KOBYLIAK, N.; CONTE, C.; CAMMAROTA, G.; HALEY, A. P.; STYRIAK, I.; GASPAR, L.; FUSEK, J.; RODRIGO, L.; KRUZLIAK, P. Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. **Nutrition & metabolism**, v. 13, p. 1-14, 2016.

LATVALA, S.; MIETTINEN, M.; KEKKONEN, R. A.; KORPELA, R.; JULKUNEN, I. *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Streptococcus thermophilus* induce suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) gene expression directly and indirectly via interleukin-10 in human primary macrophages. **Clinical and experimental immunology**, v. 165, n. 1, p. 94-103, 2011.

LAUREYS, D.; VAN JEAN, A.; DUMONT, J.; DE VUYST, L. Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water kefir fermentation process. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 7, p. 2811-2819, 2017.

LEE, J. Adipose tissue macrophages in the development of obesity-induced inflammation, insulin resistance and type 2 Diabetes. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 2, p. 208-222, 2013.

MAGALHÃES, K.; DE M. PEREIRA, G. V.; DIAS, D.; SCHWAN, R. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 1241-1250, 2010.

MARSH, A. J.; O'SULLIVAN, O.; HILL, C.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D. Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. **FEMS Microbiol Lett**, v. 348, n. 1, p. 79-85, 2013.

NATAL, D. I. G.; RODRIGUES, K. C. D. C.; MOREIRA, M. E. D. C.; DE QUEIRÓZ, J. H.; BENJAMIN, L. D. A.; DOS SANTOS, M. H.; SANT'ANA, H. M. P.; MARTINO, H. S. D. Bioactive compounds of the Ubá mango juices decrease inflammation and hepatic steatosis in obese Wistar rats. **Journal of Functional Foods**, v. 32, n. Supplement C, p. 409-418, 2017.

NOVELLI, E. L. B.; DINIZ, Y. S.; C M GALHARDI, C. M.; G M X EBAID, G. M.; RODRIGUES, H. G.; MANI, F.; FERNANDES, A. A. H.; CICOGNA, A. C.; NOVELLI FILHO, J. L. V. B. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, p. 111-119, 2007.

NOVOTNY NUNEZ, I.; MALDONADO GALDEANO, C.; DE MORENO DE LEBLANC, A.; PERDIGON, G. *Lactobacillus casei* CRL 431 administration

decreases inflammatory cytokines in a diet-induced obese mouse model. **Nutrition**, v. 31, n. 7-8, p. 1000-1007, 2015.

OZATA, M.; MERGEN, M.; OKTENLI, C.; AYDIN, A.; SANISOGLU, S. Y.; BOLU, E.; YILMAZ, M. I.; SAYAL, A.; ISIMER, A.; OZDEMIR, I. C. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. **Clinical biochemistry**, v. 35, n. 8, p. 627-31, 2002.

PARK, D. Y.; AHN, Y. T.; PARK, S. H.; HUH, C. S.; YOO, S. R.; YU, R.; SUNG, M. K.; MCGREGOR, R. A.; CHOI, M. S. Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 in diet-induced obese mice is associated with gut microbial changes and reduction in obesity. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. 1-12, 2013.

QIAO, Y.; SUN, J.; XIA, S.; LI, L.; LI, Y.; WANG, P.; SHI, Y.; LE, G. Effects of different *Lactobacillus reuteri* on inflammatory and fat storage in high-fat diet-induced obesity mice model. **Journal of Functional Foods**, v. 14, n. Supplement C, p. 424-434, 2015.

RAY, P. D.; HUANG, B.-W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 5, p. 981-990, 2012.

REQUENA, T.; COTTER, P.; SHAHAR, D. R.; KLEIVELAND, C. R.; MARTÍNEZ-CUESTA, M. C.; PELÁEZ, C.; LEA, T. Interactions between gut microbiota, food and the obese host. **Trends in Food Science & Technology**, v. 34, n. 1, p. 44-53, 2013.

REYNÉS, B.; GARCÍA-RUIZ, E.; DÍAZ-RÚA, R.; PALOU, A.; OLIVER, P. Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet. **Food Research International**, v. 64, p. 839-848, 2014.

SAMPEY, B. P.; VANHOOSE, A. M.; WINFIELD, H. M.; FREEMERMAN, A. J.; MUEHLBAUER, M. J.; FUEGER, P. T.; NEWGARD, C. B.; MAKOWSKI, L. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity (Silver Spring)**, v. 19, n. 6, p. 1109-1117, 2011.

SAVINI, I.; CATANI, M. V.; EVANGELISTA, D.; GASPERI, V.; AVIGLIANO, L. Obesity-Associated Oxidative Stress: Strategies Finalized to Improve Redox State. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 10497-10538, 2013.

SHAFAT, A.; MURRAY, B.; RUMSEY, D. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. **Appetite**, v. 52, n. 1, p. 34-38, 2009.

SHIN, J. H.; NAM, M. H.; LEE, H.; LEE, J. S.; KIM, H.; CHUNG, M. J.; SEO, J. G. Amelioration of obesity-related characteristics by a probiotic formulation in a high-fat diet-induced obese rat model. **European journal of nutrition**, p. 1-10, 2017.

SINGH, G. M.; DANAEI, G.; FARZADFAR, F.; STEVENS, G. A.; WOODWARD, M.; WORMSER, D.; KAPTOGE, S.; WHITLOCK, G.; QIAO, Q.; LEWINGTON, S.; DI ANGELANTONIO, E.; VANDER HOORN, S.; LAWES, C. M. M.; ALI, M. K.; MOZAFFARIAN, D.; EZZATI, M. The Age-Specific Quantitative Effects of Metabolic Risk Factors on Cardiovascular Diseases and Diabetes: A Pooled Analysis. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1-10, 2013.

- SUN, J.; QIAO, Y.; QI, C.; JIANG, W.; XIAO, H.; SHI, Y.; LE, G. W. High-fat-diet-induced obesity is associated with decreased antiinflammatory *Lactobacillus reuteri* sensitive to oxidative stress in mouse Peyer's patches. **Nutrition**, v. 32, n. 2, p. 265-272, 2016.
- TILG, H.; KASER, A. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 6, p. 2126-2132, 2011.
- TOSCANO, M.; DE GRANDI, R.; MINIELLO, V. L.; MATTINA, R.; DRAGO, L. Ability of *Lactobacillus kefir* LKF01 (DSM32079) to colonize the intestinal environment and modify the gut microbiota composition of healthy individuals. **Digestive and liver disease**, v. 49, n. 3, p. 261-267, 2017.
- TSAI, Y. T.; CHENG, P. C.; PAN, T. M. Anti-obesity effects of gut microbiota are associated with lactic acid bacteria. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 1, p. 1-10, 2014.
- URDANETA, E.; BARRENETXE, J.; ARANGUREN, P.; IRIGOYEN, A.; MARZO, F.; IBÁÑEZ, F. C. Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats. **Nutrition Research**, v. 27, n. 10, p. 653-658, 2007.
- WALDHERR, F. W.; DOLL, V. M.; MEISSNER, D.; VOGEL, R. F. Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. **Food Microbiology**, v. 27, n. 5, p. 672-678, 2010.
- WALSH, C. J.; GUINANE, C. M.; O'TOOLE, P. W.; COTTER, P. D. Beneficial modulation of the gut microbiota. **FEBS Letters**, v. 588, n. 22, p. 4120-4130, 2014.
- WALTON, R. G.; ZHU, B.; UNAL, R.; SPENCER, M.; SUNKARA, M.; MORRIS, A. J.; CHARNIGO, R.; KATZ, W. S.; DAUGHERTY, A.; HOWATT, D. A.; KERN, P. A.; FINLIN, B. S. Increasing adipocyte lipoprotein lipase improves glucose metabolism in high fat diet-induced obesity. **The Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 18, p. 11547-11556, 2015.
- WANG, J.; TANG, H.; ZHANG, C.; ZHAO, Y.; DERRIEN, M.; ROCHER, E.; VAN-HYLCKAMA VLIEG, J. E. T.; STRISSEL, K.; ZHAO, L.; OBIN, M.; SHEN, J. Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. **The ISME Journal**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2015.
- ZHANG, C.; ZHANG, M.; PANG, X.; ZHAO, Y.; WANG, L.; ZHAO, L. Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. **ISME J**, v. 6, n. 10, p. 1848-1857, 2012.
- ZHANG, Y.; DU, R.; WANG, L.; ZHANG, H. The antioxidative effects of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang on the hyperlipidemic rats. **European Food Research and Technology**, v. 231, n. 1, p. 151-158, 2010.

## CONCLUSÃO GERAL

O kefir de água apresentou efeitos modulatórios na atividade enzimática antioxidante no plasma, e na expressão de genes envolvidos nos processos inflamatórios e no metabolismo lipídico do fígado e do tecido adiposo de ratos obesos.

No plasma, o kefir de água aumentou a expressão da enzima antioxidante glutathione S transferase e reduziu a concentração de malondialdeído quando administrado após a indução da obesidade, na dose de 2 mL.

No fígado, o kefir de água reduziu a expressão do gene  $TNF\alpha$ , aumentou a expressão dos genes ADIPO R2,  $PPAR\alpha$  e CPT 1A, principalmente quando administrado após a indução da obesidade, na dose de 2 mL. O kefir de água também reduziu o teor de triacilgliceróis, quando administrado antes da indução da obesidade, na dose de 1 mL, e reduziu o teor de colesterol em todos os grupos de ratos obesos.

No tecido adiposo, o kefir de água reduziu a expressão dos genes  $TNF\alpha$  e Fas, e aumentou a expressão dos genes adiponectina e LpL nos grupos de ratos obesos.

Tomados em conjunto, os resultados demonstram que o kefir de água apresenta potenciais benefícios na redução do estresse oxidativo plasmático, da inflamação e do acúmulo de lipídeos no tecido adiposo e no fígado dos ratos obesos. Tais benefícios podem estar relacionados à atividade probiótica de micro-organismos presentes na bebida fermentada.


## ANEXO 1

### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 79/2014, intitulado "Caracterização química, microbiológica e avaliação de propriedades funcionais do kefir de água em ratos Wistar alimentados com dieta indutora de obesidade", coordenado pelo professor José Humberto de Queiroz do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 04/12/2014, com validade de 12 meses.

### CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 79/2014, named "Chemical and microbiological characterization, and evaluation of functional properties of water kefir in Wistar rats fed with obesity-induces diet", is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on December 04, 2014 valid for 12 months.

  
Prof. Atima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV