

VINICIUS FERNANDES PARIS

**AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE KEFIR SOBRE PARÂMETROS INTESTINAIS E
CEREBRAIS EM CAMUNDONGOS IL10^{-/-}**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Maria do Carmo G. Peluzio

Coorientadores: Mariana de Moura e Dias
Soraya T. Gaze Jangola

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus**

T

P232a
2023

Paris, Vinicius Fernandes, 1997-

Avaliação do consumo de kefir sobre parâmetros intestinais e cerebrais em camundongos IL-10 -/-: / Vinicius Fernandes Paris. - Viçosa, MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (69 f.): il.

Inclui anexo.

Orientador: Maria do Carmo Gouveia Pelúzio

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Nutrição e Saúde, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.263>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Probióticos; 2. Kefir; 3. Doenças inflamatórias intestinais; 4. Eixo encéfalo-intestino; 5. Microbioma gastrointestinal; 6. Ratos como animais de laboratório; I. Pelúzio, Maria do Carmo Gouveia II. Universidade Federal de Viçosa.. Departamento de Nutrição e Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição III. Título

CDD 22. ed. 615.329

Bibliotecário(a) responsável: BRUNA SILVA CRB-6/2552


VINICIUS FERNANDES PARIS

**AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE KEFIR SOBRE PARÂMETROS INTESTINAIS E
CEREBRAIS EM CAMUNDONGOS IL10^{-/-}**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de março de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 VINICIUS FERNANDES PARIS
Data: 15/05/2023 11:44:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Vinicius Fernandes Paris
Autor

Documento assinado digitalmente
 MARIA DO CARMO GOUVEIA PELUZIO
Data: 15/05/2023 12:06:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Maria do Carmo Gouveia Peluzio
Orientadora

*“Ninguém é tão sábio que não tenha algo para aprender
e nem tão tolo que não tenha algo para ensinar.”*

Blaise Pascal

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e resiliência.

Aos meus pais, Alceu Paris Junior e Alessandra Torres Fernandes Paris, por todo suporte e amor nesses anos.

Aos meus irmãos, Davi Fernandes Paris e Enzo Fernandes Paris, pelo companheirismo.

À minha orientadora Prof. Maria do Carmo Gouveia Peluzio pelos ensinamentos.

As minhas coorientadoras, Soraya Torres Gaze Jangola e Mariana de Moura e Dias, pelo suporte científico.

À Iasmim Xisto, por dividir este projeto comigo.

A todos do LABIN, pelos momentos compartilhados e ajuda quando solicitado.

Aos meus amigos, pela amizade e companheirismo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Universidade Federal de Viçosa por todas as experiências.

A todos que contribuíram para que essa etapa da minha vida fosse concluída. Muito obrigado!

RESUMO

PARIS, Vinicius Fernandes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2023. **Avaliação do consumo de kefir sobre parâmetros intestinais e cerebrais em camundongos IL10^{-/-}**. Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Coorientadoras: Soraya Torres Gaze Jangola e Mariana de Moura e Dias.

A microbiota intestinal é um ecossistema em que trilhões de microrganismos vivem de forma simbiótica com o corpo humano, sendo que suas funções estão intimamente relacionadas ao bom funcionamento metabólico, imunológico, estrutural e neurológico do organismo. Além disso, o impacto da microbiota intestinal na saúde pode ser muito mais relevante, uma vez que seu efeito no desenvolvimento cerebral e na neurogênese já foi demonstrado. Esse efeito ressalta a importância da conexão intestino-cérebro no bom funcionamento cerebral. O kefir é uma bebida probiótica que apresenta potencial terapêutico para modular a microbiota intestinal e atenuar o estresse oxidativo e a inflamação intestinal. Embora haja um número significativo de estudos avaliando a conexão intestino-cérebro, observa-se que o estudo dessa conexão, na presença de kefir, em modelo experimental de doença inflamatória intestinal (DII), na ausência de IL-10, ainda foi pouco elucidado. Diante disso, o objetivo desse estudo foi investigar os efeitos do consumo de kefir sobre o processo inflamatório intestinal e cerebral em camundongos C57BL/6J IL10^{-/-} com doença inflamatória intestinal espontânea. Para isso, foram utilizados 18 camundongos C57BL/6J IL10^{-/-} divididos em dois grupos experimentais, tratamento e controle. O tratamento consistiu em quatro semanas do uso de 0,4ml/d de kefir (6×10^8 UFC BAL/ml e 10^6 UFC leveduras totais/ml) e o controle 0,4ml/d de água via gavagem. Os resultados encontrados evidenciaram melhor preservação da fisiologia intestinal, com menor escore histopatológico e inflamação intestinal, maior concentração de ácido graxo de cadeia curta (AGCC) no intestino e redução do estresse oxidativo intestinal e cerebral no grupo tratado com kefir. Dessa forma, sugere-se a capacidade do kefir de preservar a morfometria intestinal controlando a inflamação e aumentando a contagem de células caliciformes, além de aumentar a concentração de AGCC no intestino e regular o estresse oxidativo no intestino e no cérebro, o que favoreceu a manutenção da barreira intestinal e o controle imune local.

Palavras-chave: Doença Inflamatória Intestinal. Kefir. Eixo Intestino-cérebro. Probiótico.

ABSTRACT

PARIS, Vinicius Fernandes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2023. **Evaluation of kefir consumption on intestinal and cerebral parameters in IL10^{-/-} mice.** Adviser: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-advisers: Soraya Torres Gaze Jangola and Mariana de Moura e Dias.

The intestinal microbiota is an ecosystem in which trillions of microorganisms live symbiotically with the human body, and their functions are intimately related to the proper metabolic, immunological, structural, and neurological functioning of the organism. In addition, the impact of the intestinal microbiota on health can be even more relevant, as its effect on brain development and neurogenesis has already been demonstrated. This effect highlights the importance of the gut-brain connection in proper brain function. Kefir is a probiotic beverage that presents therapeutic potential for modulating the intestinal microbiota and attenuating oxidative stress and intestinal inflammation. Although there are a significant number of studies evaluating the gut-brain connection, it is observed that the study of this connection, in the presence of kefir, in an experimental model of inflammatory bowel disease (IBD), in the absence of IL-10, has yet to be fully elucidated. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of kefir consumption on intestinal and cerebral inflammatory processes in C57BL/6J IL10^{-/-} mice with spontaneous inflammatory bowel disease. For this, 18 C57BL/6J IL10^{-/-} mice were divided into two experimental groups, treatment and control. Treatment consisted of four weeks of using 0.4ml/d of kefir (6x10⁸ CFU BAL/ml and 10⁶ CFU total yeasts/ml) and the control 0.4ml/d of water via gavage. The results found demonstrated better preservation of intestinal physiology, with lower histopathological scores and intestinal inflammation, higher concentration of short-chain fatty acids (SCFA) in the intestine, and reduction of intestinal and cerebral oxidative stress in the kefir-treated group. Thus, it is suggested that kefir has the ability to preserve intestinal morphology by controlling inflammation and increasing the count of goblet cells, as well as increasing the concentration of SCFA in the intestine and regulating oxidative stress in the intestine and brain, which favored the maintenance of the intestinal barrier and local immune control.

Keywords: Inflammatory Bowel Disease. Kefir. Gut-brain Axis. Probiotic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Preparo do kefir. (1) Inoculação dos grãos de kefir em leite. (2) Fermentação em estufa por 24h em temperatura média de 25°C. (3) Filtragem e separação dos grãos de kefir que serão re-inoculados em novo leite. A bebida fresca é oferecida aos animais e o processo é repetido diariamente.....25

Figura 2: Linha do tempo.....26

Figura 3 - Exemplo de fotomicrografia das vilosidades intestinais de ratos Wistar, coloração HE. As linhas indicam as medidas da altura da vilosidade, profundidade da cripta e largura da vilosidade, como aplicativo Image Pro-Plus®. Aumento 100x. Régua de ampliação: 30µm (ROSA, 2012).....28

ARTIGO ORIGINAL

Figura 1: Preparo do kefir. (1) Inoculação dos grãos de kefir em leite. (2) Fermentação em estufa por 24h em temperatura média de 25°C. (3) Filtragem e separação dos grãos de kefir que serão re-inoculados em novo leite. A bebida fresca é oferecida aos animais e o processo é repetido diariamente.....44

Figura 2: Linha do tempo.....46

Figura 3 – Escore histopatológico. A: pontuação total do escore histopatológico; B: gravidade da inflamação; C: dano de criptas e vilosidades; D: profundidade da lesão. Valores expressos em média ± erro padrão da média. * indica $p < 0,05$ demonstrando diferença estatística por Mann-Whitney ou teste t não pareado. Fotomicrografia do intestino delgado de camundongos C57BL/6J IL10^{-/-} coradas com HE. E: vilosidades e criptas preservadas; F: células caliciformes evidentes e ampliadas; G: vilosidade danificada e redução de células caliciformes; H: presença de infiltrado inflamatório. Seta amarela: células caliciformes. Seta vermelha: achatamento e dano a vilosidade. Círculo vermelho: infiltrado inflamatório. Objetiva 10X.....51

Figura 4 – Avaliação do uso de kefir nas variáveis histomorfométricas do intestino delgado de camundongos IL10^{-/-}. Céls: Células. (A) Área de superfície de vilosidade; (B) Contagem de células caliciformes; (C) Altura de vilosidade; (D) Largura de vilosidade; (E) Profundidade de criptas. Valores expressos em média ± erro padrão da média. * indica diferença estatística $p < 0,05$ diferença estatística por Mann-Whitney.52

Figura 5 – Avaliação do uso de kefir nas concentrações de AGCC no intestino delgado de camundongos IL10^{-/-}. (A) Acético; (B) Propiônico; (C) Butírico. Valores expressos em média ± erro padrão da média. * indica diferença estatística $p < 0,05$ diferença estatística por teste t não pareado.....54

Figura 6 – Avaliação do uso de kefir nas concentrações de AGCC no cérebro de camundongos IL10^{-/-}. (A) Acético; (B) Propiônico; (C) Butírico. Valores expressos em média ± erro padrão da média.....55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores utilizados para análises de expressão gênica por PCR.....29

ARTIGO ORIGINAL

Tabela 1. Iniciadores utilizados para análises de expressão gênica por PCR.....48

Tabela 2: Efeito do uso do kefir nos produtos de oxidação de macromoléculas no cérebro e atividade de enzimas antioxidantes no intestino delgado e cérebro de camundongos IL10^{-/-}53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC – ácidos graxos de cadeia curta
ANS – sistema nervoso autônomo
AP1 – proteína ativadora 1
arg – gene que codifica a proteína arginase
b-act – gene que codifica a proteína beta actina
BAL – bactérias fermentadoras de ácido lático
BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro
CAT – catalase
CBA – Cytometric Beads Array
CCL2 - ligante 2 de quimiocina
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CON – grupo controle
DCV – doença cardiovascular
DII – doença inflamatória intestinal
DM2 – diabetes mellitus tipo 2
DNA – ácido desoxirribonucleico
DNS – departamento de nutrição e saúde
DSS - Dextran sulfato de sódio
ENS – sistema nervoso entérico
GABA – ácido gama-aminobutírico
gapdh – gene que codifica a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPx – glutathione peroxidase
GRx – glutathione reductase
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HO• - radical hidroxila
HPA – eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
IFN γ – interferon gamma
IgA – Imunoglobulina A
IL - interleucina
inos – gene que codifica a proteína óxido nítrico sintase induzível
KEF – grupo kefir
MCP1 - proteína quimioatrativa de monócitos 1

MDA – malondialdeído
mTor – mammalian target of rapamycin
NFκB – fator nuclear kappa b
NPY – neuropeptídeo Y
Nrf2 – fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide
O₂⁻ - ânion superóxido
RNA – ácido ribonucleico
RNS – espécies reativas de nitrogênio
ROS – espécies reativas de oxigênio
RSS – espécies reativas de enxofre
rtPCR – reação da cadeia da polimerase em tempo real
SNC – sistema nervoso central
SOD – superóxido dismutase
TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF – fator de crescimento tumoral
TGI – trato gastrointestinal
TNF – fator de necrose tumoral
UFC – unidades formadoras de colônias
UFV – Universidade Federal de Viçosa

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	14
2.	OBJETIVOS	16
2.1.	OBJETIVO GERAL	16
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3.	REFERÊNCIAL TEÓRICO	17
3.1.	DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL	17
3.2.	CONEXÃO INTESTINO-CÉREBRO	18
3.3.	ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO	21
3.4.	KEFIR	22
4.	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1.	Aspectos éticos	24
4.2.	Cálculo amostral	24
4.3.	Desenho experimental	24
4.4.	Análise Histológica	26
4.4.1.	Escore Histopatológico	27
4.4.2.	Histomorfometria intestinal e contagem de células caliciformes	27
4.5.	Extração de RNA e reação de cadeia da polimerase (PCR) em tempo real do tecido do intestino delgado	28
4.6.	Análises de estresse oxidativo do intestino e cérebro	29
4.6.1.	Dosagem de proteínas totais do tecido do intestino delgado e no cérebro	30
4.6.2.	Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) do tecido do intestino delgado e no cérebro	30
4.6.3.	Atividade da enzima catalase (CAT) do tecido do intestino delgado e no cérebro	30
4.6.4.	Substância Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) no cérebro	31
4.6.5.	Proteína carbonilada no cérebro	31
4.7.	Citocinas Inflamatórias no cérebro	31
4.8.	Ácidos graxos de cadeia curta do intestino delgado e do cérebro	31
4.9.	Análises Estatísticas	32
5.	Referências	32
6.	RESULTADOS:	40
6.1.	ARTIGO ORIGINAL:	40
7.	CONCLUSÃO GERAL	68
8.	ANEXO 1: Certificado Comitê de Ética	69

1. INTRODUÇÃO GERAL

O intestino humano tem aproximadamente, 200-300m² de mucosa e seu bom funcionamento está diretamente associado às espécies da microbiota que vivem em seu interior. Essa microbiota exerce diversas funções relacionadas ao bom funcionamento metabólico, imunológico, estrutural e neurológico do ser humano (ADAK; KHAN, 2019; CAMPBELL *et al.*, 2023; YADAV; VERMA; CHAUHAN, 2018; ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2019).

A respeito do sistema imune, a microbiota intestinal pode modular a resposta inflamatória por indução de células Treg, citocinas IL(interleucina)-10 e TGF- β (fator de crescimento tumoral), reguladores do sistema imune. Sabe-se que um desequilíbrio intestinal pode acometer sua microbiota, aumentando os microrganismos patogênicos. Na disbiose, por exemplo, há um prejuízo na modulação imunológica que gera uma maior resposta pró-inflamatória (ADAK; KHAN, 2019; MOUSA; CHEHADEH; HUSBAND, 2022; WEISS; HENNET, 2017).

Essa maior resposta pró-inflamatória também está associada às doenças inflamatórias intestinais (DII). Todavia, esse grupo de doenças possuem etiologias complexas e multifatoriais, que podem envolver fatores ambientais, agentes infecciosos e susceptibilidade genética. Quanto à susceptibilidade genética, sabe-se que humanos e animais com polimorfismos no gene da IL-10 ou de seu receptor, por exemplo, podem desenvolver DII espontaneamente (IP *et al.*, 2017; LARABI; BARNICH; NGUYEN, 2020; SUN *et al.*, 2018).

Em condições de doenças intestinais que alteram a microbiota pode haver um desencadeamento de condições neurológicas como ansiedade, depressão (BHAMRE *et al.*, 2018; GAO *et al.*, 2021; HÄUSER *et al.*, 2011), doença de Alzheimer (ZINGEL; BOHLKEN; KOSTEV, 2021) e Parkinson (ZHANG *et al.*, 2021), por exemplo. Sugere-se que essa relação das DII com condições neurológicas seja pelo aumento do estresse oxidativo e da inflamação crônica do trato gastrointestinal (BERCIK *et al.*, 2010).

É sabido que probióticos possuem a capacidade de equilibrar a microbiota intestinal e, com isso, influenciar indiretamente muitas funções metabólicas,

neuroológicas, estruturais e imunológicas (ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2019). Probióticos contêm, além de microrganismos, substâncias que são produzidas no processo de fermentação, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Os AGCC possuem impactos positivos na saúde humana, incluindo a regulação neurogênica e do sistema imune após absorção intestinal, sendo importantes, também, para a manutenção da integridade da barreira intestinal, por estimular a expressão de proteínas de junções e células produtoras de muco (DALILE *et al.*, 2019; DIMIDI *et al.*, 2019; DU *et al.*, 2022).

Diante de todos os aspectos positivos dos probióticos, o kefir se destaca por ser uma bebida probiótica produzida a partir da fermentação do leite pelos grânulos de kefir. Foi originada nas montanhas do Cáucaso e consiste numa grande heterogeneidade de microrganismos como bactérias fermentadoras produtoras de ácido láctico, ácido acético e de leveduras (DIMIDI *et al.*, 2019). Essa bebida possui diversos compostos bioativos e peptídeos que podem modular a composição da microbiota intestinal, a inflamação crônica de baixo grau e a permeabilidade intestinal. Dessa forma, o kefir possui potencial de reduzir a resposta inflamatória e oxidativa pela diminuição da expressão de TNF- α , IL-1 β e TGF- β (PELUZIO *et al.*, 2021). Assim, esta bebida simples e de baixo custo pode ser uma importante aliada no tratamento das desordens inflamatórias intestinais.

Embora haja um número significativo de estudos nos últimos anos avaliando a conexão intestino-cérebro, observa-se que muitas questões ainda necessitam de respostas. A utilização do kefir no modelo experimental de DII, na ausência de IL-10, pode ser uma importante ferramenta para elucidar mecanismos da conexão intestino-cérebro e sua influência sobre o sistema imune. Quanto mais informações a respeito deste modelo melhor o entendimento de como o kefir age para auxiliar no equilíbrio da microbiota intestinal, na melhora da função intestinal, do sistema imune e, por consequência, na saúde intestinal e do sistema nervoso central.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Investigar os efeitos do kefir sobre o processo inflamatório intestinal e cerebral em camundongos C57BL/6J IL10^{-/-} com doença inflamatória intestinal espontânea.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do consumo de kefir:
 - No escore histopatológico do intestino delgado;
 - Na avaliação histomorfométrica e contagem de células caliciformes do intestino delgado;
 - Na expressão gênica dos marcadores inflamatórios intestinais (*arg*, *ccl2*, *inos*, *nf-kb* e *tnf*);
 - Na expressão de marcadores de estresse oxidativo (SOD, CAT, MDA e proteína carbonilada) no intestino e no cérebro;
 - Na concentração de citocinas (IL-12p70, IFN γ , TNF, MCP-1, IL-10, IL-6) envolvidas na inflamação cerebral;
 - Na composição dos ácidos graxos de cadeia curta no intestino delgado e no cérebro.

3. REFERÊNCIAL TEÓRICO

3.1. DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são um conjunto de doenças caracterizadas por uma inflamação crônica e persistente do trato gastrointestinal. As principais são a Retocolite Ulcerativa e a Doença de Crohn. Embora a etiologia das DII seja complexa, na patogênese estão envolvidas a susceptibilidade genética, o ambiente externo, a microbiota intestinal e a resposta imune. Dentre vários fatores, o mal funcionamento da IL-10, ou seu receptor, tem sido associado ao aparecimento e agravamento dessas doenças (SAIRENJI; COLLINS; EVANS, 2017; YU; CHEON, 2022; ZHANG; LI, 2014).

O modelo do nosso estudo, camundongo $IL10^{-/-}$, desenvolve espontaneamente DII, esse desenvolvimento acontece pelo fato da deficiência da IL10 levar a falha do controle imune do intestino, exibindo uma resposta pró-inflamatória acentuada contra antígenos o que gera uma inflamação crônica pela contínua produção de IL-6, IL-1 β , e TNF- α . Além disso, esses animais apresentam DII que compartilha aspectos histológicos, fisiológicos e bioquímicos com as DII em humanos (COHEN; MOORE; WARD, 2004; IP et al., 2017; KENNEDY et al., 2000).

A incidência e prevalência das DII têm aumentado no mundo, sendo mais alta no ocidente (NG *et al.*, 2017). Países do ocidente possuem melhor distribuição de renda, saneamento básico e educação e, por isso, teriam menos contatos com microrganismos e parasitos e assim maior índice de doenças inflamatórias, incluindo DII (CHOLAPRANEE; ANANTHAKRISHNAN, 2016; YE *et al.*, 2015).

Doenças inflamatórias intestinais acometem primeiramente órgãos do sistema digestório. Entretanto, é muito prevalente a presença de sintomas extra-intestinais, relacionados principalmente à inflamação crônica (SAIRENJI; COLLINS; EVANS, 2017). Um dos sintomas no intestino é a indução de disbiose, sendo observado uma redução na biodiversidade do microbioma fecal em pacientes acometidos (JOOSSENS *et al.*, 2011).

A disbiose, juntamente com a inflamação induzida pelas DII, pode aumentar a permeabilidade e a degradação da camada de mucina, diminuindo a barreira de muco protetor na superfície do trato gastrointestinal. Essa barreira possui um importante

papel na proteção da inflamação intestinal, e esse dano é uma das possíveis explicações fisiopatológicas da sintomatologia da inflamação (JOOSSENS *et al.*, 2011; MOUSA; CHEHADEH; HUSBAND, 2022; PAONE; CANI, 2020). Com um aumento da permeabilidade, pode ocorrer a translocação de substâncias e microrganismos, o que potencializa a inflamação e o dano ao tecido intestinal (MICHIELAN; D'INCA, 2015; STEPHENS; VON DER WEID, 2020).

A modulação da microbiota intestinal tem se mostrado muito importante nas DII, como observado em um estudo com a suplementação com 400ml/dia de kefir em humanos com DII no qual o tratamento, além de modular a microbiota, reduziu o surgimento de sintomas no curto prazo (YILMAZ; ENVER DOLAR; ÖZPINAR, 2019).

Ademais, as DII são associadas a função cerebral prejudicada e comportamentos patológicos, podendo a administração de probióticos melhorar esses sintomas por modular a via imune periférica (FUNG; OLSON; HSIAO, 2017). Por fim, a ansiedade e depressão são condições frequentes em desordens intestinais, incluindo as DII. Quando comparado à população geral, indivíduos com desordens intestinais apresentam três vezes mais risco de desenvolverem depressão e outras alterações neurológicas (BERCIK *et al.*, 2010). Neste contexto, torna-se cada vez mais pertinente a avaliação dos mecanismos pelos quais os probióticos podem atuar na modulação da inflamação intestinal e extra-intestinal.

3.2. CONEXÃO INTESTINO-CÉREBRO

O corpo humano é um complexo ambiente que abrange um número de bactérias que excede o número de células do corpo humano. A maioria destes microrganismos estão localizados na região intestinal, um ecossistema onde trilhões de microrganismos vivem de forma simbiótica (MÖRKL *et al.*, 2020). Esses organismos consistem em bactérias, protozoários, archae, fungos e vírus que, somados, possuem cerca de 150 vezes mais genes do que o próprio genoma humano (MILOSEVIC *et al.*, 2019; MOUSA; CHEHADEH; HUSBAND, 2022). A heterogeneidade desse conjunto de microrganismos deve-se a diversos fatores como o comportamento, idade, alimentação, integridade da barreira intestinal e função imune do hospedeiro (CLARK; MACH, 2016).

Entretanto, o impacto da microbiota intestinal sobre a saúde tem se mostrado cada vez mais importante. Esses microrganismos atuam no desenvolvimento cerebral e na neurogênese, sendo, então, reconhecida uma conexão entre esses dois segmentos, comumente chamada de conexão intestino-cérebro (WANG; WANG, 2016). Os mecanismos potenciais propostos para essa comunicação são através do nervo vago, do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA), sistema imune, além da produção de alguns neurotransmissores, como a dopamina, serotonina e ácido gama-aminobutírico (GABA) pelos microrganismos (CARABOTTI *et al.*, 2015; STRANDWITZ, 2018).

A inflamação gastrointestinal em modelo murino de colite pode cursar com neuroinflamação no cérebro causando respostas imunológicas pela alteração da resposta da micróglia (SROOR *et al.*, 2019). Os microrganismos podem modular células imunes periféricas as quais podem controlar neuroinflamação, injúria cerebral, neurogênese e autoimunidade contribuindo para desordens inflamatórias no sistema nervoso central (SNC), o que por sua vez está associado a diversas doenças. Animais com alteração da microbiota intestinal por uso de antibióticos, por exemplo, exibem alterações no comportamento com desordens neurodegenerativas, de desenvolvimento cerebral e psiquiátrico (FUNG; OLSON; HSIAO, 2017).

O termo psicobióticos surgiu depois da descoberta por meio de intervenções com o uso de probióticos e prebióticos da ação de bactérias, como *Lactobacillus* e *Bifidobactérias*, em doenças por meio do eixo intestino-cérebro (MÖRKL *et al.*, 2020). Sabe-se que a comunicação é bidirecional entre o sistema nervoso autônomo (ANS) e o sistema nervoso entérico (ENS) no trato gastrointestinal (GI), sendo sugerido como principal agente dessa comunicação o nervo vago. Todavia, existem também outras maneiras de comunicação, como moléculas produzidas pela microbiota intestinal, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), triptofano e neurotransmissores como o ácido gama-aminobutírico (GABA), neuropeptídeo Y (NPY) e dopamina, por exemplo (CARABOTTI *et al.*, 2015; CRYAN *et al.*, 2019; WANG; WANG, 2016).

Uma das condições que leva ao desenvolvimento de doenças é o aumento da permeabilidade intestinal. Entre as causas destacam-se o aumento da inflamação e do estresse oxidativo intestinal, os quais podem gerar uma oxidação dos lipídeos da membrana plasmática e conseqüentemente um aumento da permeabilidade. Outra causa é a perda de proteínas estruturais, como as junções apertadas. Essas junções

são formadas por proteínas transmembranas responsáveis por manter o controle sobre a passagem paracelular, sendo elas: ocludina, claudina, zonulina, moléculas de adesão juncional e tricelulina que interagem na formação das zonas ocludentes estruturais. A alteração dessas proteínas aumenta a permeabilidade deflagrando um quadro de disbiose, que tem uma série de consequências como a piora da inflamação intestinal (CLARK; MACH, 2016; WEISS; HENNET, 2017).

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são importantes para a integridade da barreira intestinal, estimulando a proliferação e diferenciação celular. Essas substâncias são capazes de afetar o sistema nervoso central por alterar a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*) (MÖRKL *et al.*, 2020), além de modular a função cerebral por vias imunes, endócrinas, vagal e humoral (DALILE *et al.*, 2019; SILVA; BERNARDI; FROZZA, 2020). Na situação de inflamação com alterações na barreira intestinal e piora da permeabilidade, as concentrações de AGCC são reduzidas (TAKAHASHI *et al.*, 2016), podendo afetar a saúde do SNC. Em camundongos, o estresse e a inflamação crônica do trato gastrointestinal por uma alteração da microbiota podem contribuir para o comportamento ansioso, sugerindo uma ligação entre a composição da microbiota intestinal e alterações de função GI e/ou comportamento ansioso (BERCIK *et al.*, 2010).

A plasticidade neuronal é a capacidade do cérebro de formar novas conexões sinápticas, novos neurônios e células da glia (GRIESBACH; HOVDA, 2015; SANCHO; CONTRERAS; ALLEN, 2021). O estresse é um importante inibidor desse mecanismo, podendo levar a atrofia cerebral (BREMNER *et al.*, 2007; DOUGLAS BREMNER, 2006). Um estudo com tratamento de 2 semanas de suplementação de uma formulação de probióticos (*Lactobacillus helveticus* R0052 e *Bifidobacterium longum* R0175) em modelo murino induzido ao estresse crônico foi capaz de atenuar a ativação do eixo HPA e ANS em resposta ao estresse, sugerindo uma melhor preservação da neuroplasticidade, devido ao aumento da expressão de BDNF nos animais suplementados (AIT-BELGNAOUI *et al.*, 2014). Resultado semelhante foi observado com a suplementação de *Lactobacillus casei* strain Shirota também em modelo experimental (TAKADA *et al.*, 2016). Esses estudos juntos indicaram a importância da preservação do microambiente intestinal para a saúde cerebral.

3.3. ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO

O estresse oxidativo e a inflamação são mecanismos usuais de defesa imunológica. Os radicais livres, como espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS) e espécies reativas de enxofre (RSS) são produzidos por todas as células e modulam processos celulares como inflamação, sobrevivência celular e resposta ao estresse (ABDELHAMID; NAGANO, 2023; LAURIDSEN, 2019).

A principal fonte de espécies reativas é a mitocôndria pela cadeia transportadora de elétrons (EL ASSAR; ANGULO; RODRÍGUEZ-MAÑAS, 2013; LAURIDSEN, 2019), sendo o radical hidroxila ($\text{HO}\cdot$), o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) os principais radicais livres. Em condições normais, os níveis de ROS são mantidos baixos por vários sistemas enzimáticos que participam dessa homeostase (FISCHER; MAIER, 2015; LAURIDSEN, 2019). Quando há um aumento na produção de ROS, esses mecanismos antioxidantes são ativados para imediatamente controlá-los (KANG; KIM, 2023).

Os sistemas de defesa endógenos são divididos em dois tipos, os antioxidantes enzimáticos e os não enzimáticos. As principais enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathiona peroxidase (GPx) e a glutathiona redutase (GRx), já os antioxidantes não enzimáticos compreendem antioxidantes endógenos e exógenos (HE *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2021). Essa maquinaria existe para proteger da produção excessiva de ROS, visto que o excesso pode culminar em danos a macromoléculas, como os lipídeos e o DNA por exemplo (KANG; KIM, 2023).

Diante disso, o estresse oxidativo só se torna um problema quando os mecanismos neutralizantes, enzimáticos e não enzimáticos, são insuficientes para equilibrá-los. O desequilíbrio na regulação do estresse oxidativo e da inflamação pode levar a um aumento na produção de citocinas inflamatórias. Nessa ocasião, há ativação do fator nuclear kappa beta ($\text{NF}\kappa\beta$) e da proteína ativadora 1 (AP1), que regulam a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória resultando na liberação de citocinas pró-inflamatórias como o $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6. Além disso, inibe o fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2 (Nrf2), o qual está relacionado à regulação das respostas antioxidantes, o que potencializa ainda mais a inflamação (FISCHER;

MAIER, 2015; HUSSAIN *et al.*, 2016; KANG; KIM, 2023; RAJARAM *et al.*, 2023; RUTHIRAKUHAN *et al.*, 2020).

A consequência fisiológica da ativação dessas vias é extensa, culminando num maior risco para o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas e neurodegenerativas pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-8 e TNF, além de moléculas de adesão que favorece a migração celular e o estado inflamatório persistente. Além disso, o próprio TNF é um gene de resposta da via NF κ B amplificando ainda mais as respostas inflamatórias via feedback positivo (FISCHER; MAIER, 2015).

Vale ressaltar que o estresse oxidativo e a inflamação crônica de baixo grau quando não controlados são mediadores comuns na fisiopatologia de muitas doenças não transmissíveis relacionadas à idade, incluindo obesidade, hipertensão, doenças cardiovasculares (DCV), diabetes tipo 2 (DM2), alguns tipos de câncer e doenças neurodegenerativas (DANDEKAR; MENDEZ; ZHANG, 2015; GARCÍA; ZAZUETA; AGUILERA-AGUIRRE, 2017; RAJARAM *et al.*, 2023). Diante disso, se faz necessário entender como o kefir pode modular o estresse oxidativo e a inflamação para reduzir o risco de condições associadas ao desequilíbrio desses mecanismos.

3.4. KEFIR

Os probióticos, de acordo com a definição da Organização Mundial da Saúde, são microrganismos vivos que quando consumidos em quantidade suficiente proporcionam benefícios à saúde de quem os consome (HILL *et al.*, 2014). No intestino, a suplementação de probióticos promove uma competição com bactérias patogênicas sendo capaz de estimular a produção de imunoglobulina A (IgA) e inibir a resposta inflamatória Th1 e Th17, reduzindo a expressão de citocinas inflamatórias, como Fatores de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e IL-1 β (GALDEANO *et al.*, 2019). Inclusive, alguns probióticos de cepas mistas mostram-se mais efetivos que drogas anti-inflamatórias (sulfalazina) para reduzir a inflamação, restabelecer a função da barreira intestinal e o ambiente microecológico na doença inflamatória intestinal (DII) (WANG *et al.*, 2020).

Dentre os probióticos, o kefir se destaca por ser uma bebida fermentada originada das montanhas do Cáucaso que contém mais de 50 espécies de microrganismos. É formada por uma simbiose de bactérias fermentadoras produtoras de ácido láctico, acético e leveduras (KIM *et al.*, 2017; PELUZIO *et al.*, 2021). Grande parte das espécies de *Lactobacillus* presentes nos grãos de kefir podem ser potencialmente usadas como probióticos, e por conta disso, estudos com probióticos isolados apresentaram cepas eventualmente presentes no kefir (ZANIRATI *et al.*, 2015). Entre suas características sensoriais, a textura é ligeiramente viscosa com sabor azedo e ácido. Tradicionalmente utiliza-se o leite de vaca para fermentação, mas também pode ser feito com leite de outras fontes, como cabra, ovelha ou búfala (BOURRIE; WILLING; COTTER, 2016).

Os benefícios do kefir estão relacionados tanto aos microrganismos presentes na bebida fermentada como aos metabólitos produzidos durante o processo de fermentação do leite. Dentre os metabólitos produzidos pelo processo de fermentação, destaca-se um exopolissacarídeo chamado kefiran. Os benefícios do consumo dessa bebida fermentada compreendem uma melhora da microbiota intestinal, efeitos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes, atividade antimicrobiana, supressão de tumor, imunomodulação, anti-inflamatório e antioxidante (BENGOA *et al.*, 2019; MEDRANO *et al.*, 2011; PELUZIO *et al.*, 2021; ROSA *et al.*, 2017).

Todavia, a composição microbiológica do kefir é muito variável pois depende da matriz inicial do kefir e da origem geográfica, já que diferentes condições climáticas podem favorecer diferentes microrganismos simbióticos. Além disso, condições da fermentação como tempo, temperatura e proporção dos grãos adicionados também influenciam o produto (AZIZI *et al.*, 2021; ROSA *et al.*, 2017). Dessa forma, os estudos sobre kefir devem considerar sua grande heterogeneidade. No entanto, já foi demonstrado que o tratamento com 0,2ml de kefir (2x/d) apresentou um aumento da concentração de *Lactobacillus* e *Lactococcus* nas fezes dos animais suplementados (KIM *et al.*, 2017), o que indicou a capacidade do kefir consumido por via oral chegar até o intestino e modular a microbiota intestinal.

Já existe estudo demonstrando a capacidade psicobiótica do tratamento com kefir (TON *et al.*, 2020). Em camundongos, por exemplo, a ingestão de kefir reduziu a inflamação e o estresse oxidativo cerebral, além de apresentar resposta semelhante

a antidepressivos no comportamento e expressão de BDNF (CHEN *et al.*, 2021). Além disso, melhorou a integridade estrutural e funcional da barreira intestinal, reduzindo a ativação de micróglia e protegendo contra a neuroinflamação (SILVA *et al.*, 2020). Esses estudos, demonstram a importante relação do kefir com o SNC. Entretanto, ainda faltam estudos para esclarecer como o tratamento com kefir impacta o SNC em modelo de DIIs.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

O presente estudo é parte integrante do projeto guarda-chuva intitulado “**Efeito do consumo de kefir de leite integral no desenvolvimento de doença inflamatória intestinal em camundongos knockout IL-10**”, previamente submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), aprovado no dia 19 de novembro de 2019, sob o número do processo 52/2019 - **Anexo 01**.

4.2. Cálculo amostral

O tamanho amostral foi calculado, conforme proposto por Mera *et al* (1998), previamente no projeto guarda-chuva. Para o cálculo foi considerado poder estatístico de 99% ($\alpha \leq 0,01$).

4.3. Desenho experimental

A produção da bebida fermentada foi realizada diariamente com a inoculação de 10% de grânulos de kefir em leite integral UHT, de uma mesma marca e mesmo lote. Posteriormente, foi mantido em estufa com temperatura controlada de 25°C por 24h. Após esse período, os grãos foram separados e o kefir fresco foi ofertado aos animais. Os grãos separados foram lavados com água destilada e inoculados sucessivamente até o fim do estudo (Figura 1).

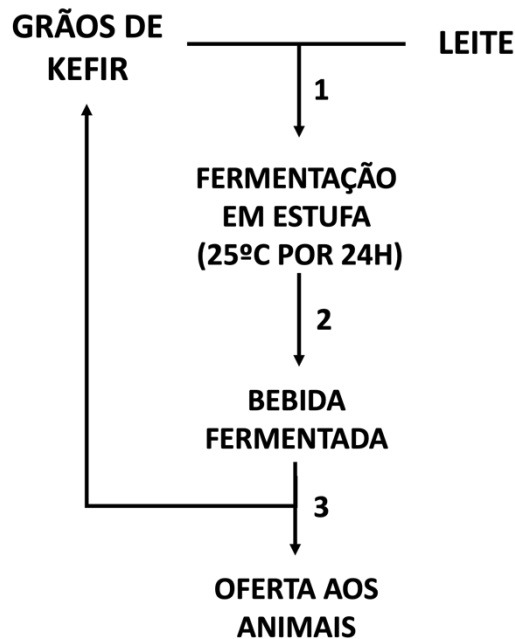


Figura 1: Preparo do kefir. (1) Inoculação dos grãos de kefir em leite. (2) Fermentação em estufa por 24h em temperatura média de 25°C. (3) Filtragem e separação dos grãos de kefir que serão re-inoculados em novo leite. A bebida fresca é oferecida aos animais e o processo é repetido diariamente.

O perfil microbiológico do kefir no estudo foi determinado antes do início do experimento através da contagem de bactérias ácido lácticas totais (BAL) e de leveduras totais pelo método de plaqueamento em superfície (SILVA *et al.*, 2017). Para a contagem de BAL a amostra foi inoculada em meio MRS e posteriormente os foi incubada em estufa na temperatura de 37°C por 48 horas (REIS, 2015). Para a contagem de leveduras totais a amostra foi inoculada em meio BAD. As placas foram incubadas em estufa na temperatura de 28°C por 7 dias (BRASIL, 2003). As análises foram realizadas no laboratório de Bioquímica Nutricional do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). O kefir foi mantido na concentração mínima de 6×10^8 UFC/ml de BAL e 10^6 UFC/ml de leveduras totais. Esses valores foram utilizados por ser a quantidade necessária de UFC para que o produto tenha alegação de probiótico no Brasil (ANVISA, 2008).

Os camundongos foram divididos em 2 grupos experimentais e alojados coletivamente em caixas de polipropileno cobertas com grades metálicas, em ambiente controlado e ciclo claro/escuro de 12 horas. Após 4 semanas de vida, os camundongos foram desmamados e mantidos por 5 semanas para ambientação e

envelhecimento. Após esse período, quando os camundongos estavam com 9 semanas, os animais foram randomizados e o tratamento iniciado, realizando a suplementação diariamente por 4 semanas. Em todo o período do experimento os animais receberam dieta comercial e água *ad libitum* e o peso corporal dos animais foi monitorado semanalmente. Os dois grupos foram divididos em: (1) grupo tratado (KEF – n=9): dieta comercial + gavagem com kefir (0,4ml; 6×10^8 UFC BAL/ml e 10^6 UFC/ml de leveduras totais); (2) grupo controle (CON – n=9): dieta comercial + gavagem com leite integral UHT (0,4ml).

Foram utilizados tecido cerebral e do intestino delgado de 18 camundongos machos C57BL/6J nocaute IL10^{-/-} provenientes do laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Ao final das quatro semanas ocorreu a eutanásia por isoflurano a 3% (Isoflorine®, Cristália) inalatório. Após a eutanásia os órgãos foram lavados com solução salina fisiológica e congelados para análises posteriores em ultra freezer a -80°C. Uma parte do intestino delgado foi separada no momento da eutanásia para análise histológica e conservado conforme tópico 4.4.



Figura 2: Linha do tempo

4.4. Análise Histológica

Parte do intestino delgado foi removido e, após lavagem com solução salina fisiológica, foi fixado em formalina de Carson (CARSON; MARTIN; LYNN, 1973). Após desidratação em gradiente crescente de etanol, o material foi diafanizado em xilol e incluído em parafina. Foram realizados cortes com espessura de 5µm por meio de micrótomo rotativo (Olympus America Inc., CUT 4055) e corados na sequência com hematoxilina e eosina (HE).

4.4.1. Escore Histopatológico

O escore histopatológico foi utilizado para avaliação de características histológicas do tecido intestinal. O escore foi composto pela média de três parâmetros diferentes: dano na cripta (0: nenhum; 1: 1/3 danificada; 2: 2/3 danificada; 3: apenas o epitélio superficial intacto; 4: epitélio perdido); gravidade da inflamação (0: nenhuma; 1: leve; 2: moderada; 3: grave) e profundidade da lesão (0: nenhuma; 1: mucosa; 2: submucosa; 3: transmural). Para cada parâmetro foi atribuída uma pontuação e o escore foi obtido pela soma dos pontos de cada parâmetro (CRUZ, 2018).

4.4.2. Histomorfometria intestinal e contagem de células caliciformes

As imagens das secções histológicas foram capturadas com objetiva de 10x diretamente no microscópio de luz LEICA DM750 (Leica®, Suíça), por meio de câmera de vídeo LEICA 170HD (Leica®, Suíça). As medidas foram realizadas com auxílio do aplicativo Image Pro-Plus® versão 4.5 (Media Cybernetics), seguindo metodologia proposta por Rosa e colaboradores (2012), conforme exemplificado na figura 3 e (AGARWAL *et al.*, 2022).

Altura das vilosidades - foram medidas 70 vilosidades por grupo experimental. Apenas as vilosidades com epitélio definido e conjuntivo visível foram utilizadas.

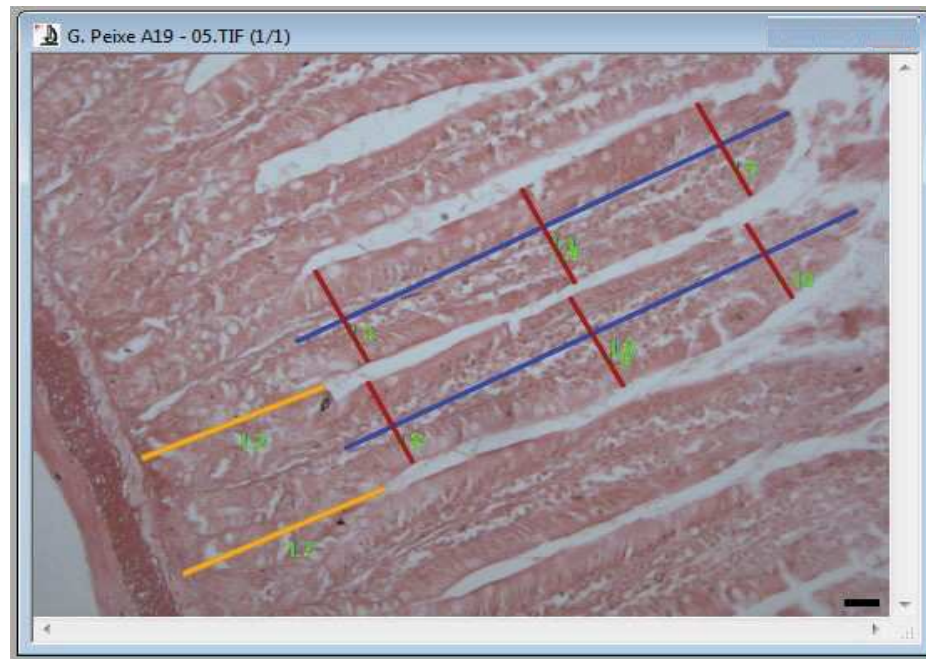
Largura das vilosidades: nas mesmas vilosidades utilizadas na análise de altura foi realizada 3 medidas (região apical, média e basal) e a largura foi considerada o valor médio destas três medidas;

Profundidade das criptas – foram analisadas 70 criptas por grupo experimental, só foram consideradas criptas intactas.

Contagem de células caliciformes – as células caliciformes foram contadas manualmente de 70 vilosidades para cada grupo experimental.

Área das vilosidades – para o cálculo da área foi utilizado a fórmula abaixo, foram avaliadas 70 vilosidades por grupo experimental.

$$\text{Área de superfície de vilosidade} = 2\pi \times \frac{\text{Média da Largura}}{2} \times \text{Altura}$$



- Altura das Vilosidades;
- Largura das Vilosidades (região apical, média e basal)
- Profundidade de Cripta

Figura 3 - Exemplo de fotomicrografia das vilosidades intestinais de ratos Wistar, coloração HE. As linhas indicam as medidas da altura da vilosidade, profundidade da cripta e largura da vilosidade, como aplicativo Image Pro-Plus®. Aumento 100x. Régua de ampliação: 30 μ m (ROSA, 2012).

4.5. Extração de RNA e reação de cadeia da polimerase (PCR) em tempo real do tecido do intestino delgado

Os tecidos cerebrais foram homogeneizados em reagente Trizol® e o RNA foi extraído seguindo instruções do fabricante (Invitrogen, Massachusetts). Ao final do protocolo, a concentração do RNA obtido foi estimada por leitura em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts). As razões 260/280 foram avaliadas com intuito de verificar a pureza do RNA, foram observadas razões maiores do que 1,8.

Na sequência, as amostras foram tratadas com DNase (RQI, Promega) para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico. Em seguida, a reação de transcrição reversa foi realizada utilizando todo o volume de RNA tratado com DNase

(10µl), enzima transcriptase reversa (Super Script II, Invitrogen) e iniciadores aleatórios (Promega, Madison, Wisconsin), em um volume final de 20µl. As etapas de incubação, bem como os ciclos e suas temperaturas foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante.

Após transcrição do cDNA das amostras, o ensaio de rtPCR foi realizado utilizando iniciadores específicos para o modelo experimental (tabela 1).

Tabela 1. Iniciadores utilizados para análises de expressão gênica por PCR.

Gene	Forward Primer	Reverse Primer	Bp
<i>β-act</i>	TTGTTACCAACTGGGACGAC	ACGTTGGCCTTAGGGTT	125
<i>tnf</i>	TCAGCCGATTTGCTATCTCA	CGGACTCCGCAAAGTCTAAG	204
<i>inos</i>	TGGCTGTGCTCCATAGTTTC	TTCAACATCTCCTGGTGGAA	187
<i>il-10</i>	TAAGGGTACTTGGGTTGCC	TCACTCTTACCTGCTCCAC	213
<i>arg</i>	GGTTCTGGGAGGCCTATCTT	AAGCAAGCCAAGGTAAAGC	171
<i>nf-kb</i>	AACCTGGGAATACTTCATGTG ACTAA	GCACCAGAAGTCCAGGATTA TAGC	103
<i>ccl2</i>	TTAAGGCATCACAGTCCGAG	TGAATGTGAAGTTGACCCGT	129

As amplificações foram feitas em duplicata, usando 10ng de cDNA por reação. Ao cDNA, foram adicionados os iniciadores específicos, o reagente SyBR Green para PCR em tempo real, num volume final de 15µl por reação.

As condições da reação foram 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos e 40 repetições de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. As leituras de fluorescência foram realizadas pelo equipamento Step One Plus (Applied Biosystems) e, posteriormente, analisadas pelo Step One Software (Applied Biosystems). As expressões foram normalizadas pela expressão de *β-act* mas também foi testado o gene *gapdh*.

4.6. Análises de estresse oxidativo do intestino e cérebro

O estresse oxidativo no intestino e no cérebro foi avaliado por meio da atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e a oxidação de macromoléculas no cérebro foi avaliada pela quantificação de malondialdeído (MDA) e proteína carbonilada. Para essas análises foi preparado um homogenato na concentração de 1:10 de tecido:tampão fosfato pH 7. O sobrenadante foi utilizado para

as análises de proteínas totais, SOD, CAT e MDA e o precipitado formado nesse processo foi utilizado para a quantificação de proteína carbonilada.

4.6.1. Dosagem de proteínas totais do tecido do intestino delgado e no cérebro

As proteínas totais foram quantificadas pela metodologia de Lowry (1951) usando-se a albumina sérica bovina como padrão para realização da curva. Após o preparo da reação a placa foi lida em espectrofotômetro a 700nm. O valor de absorbância encontrado foi utilizado na equação da reta da curva padrão para quantificação das proteínas totais na amostra. Essa quantificação foi utilizada para normalização das análises de estresse oxidativo subsequentes.

4.6.2. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) do tecido do intestino delgado e no cérebro

A atividade de SOD foi avaliada segundo Dieterich *et al.*, (2000). A SOD atua metabolizando o ânion superóxido formando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Nessa metodologia é possível avaliar a atividade de SOD pela habilidade em diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol. Nessa análise é formado um composto de coloração azul/roxo claro que é medido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. O valor encontrado foi normalizado pela concentração de proteína da amostra e apresentado em U SOD/mg de proteína.

4.6.3. Atividade da enzima catalase (CAT) do tecido do intestino delgado e no cérebro

A atividade da enzima catalase foi avaliada seguindo metodologia de Aebi (1984). Essa variável foi determinada através do decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no espectrofotômetro com comprimento de onda 240 nm. Esse decaimento foi analisado pelo valor da absorbância nos intervalos T0", T30" e T60". A partir dos valores de delta (T0"-T60") foram então calculados a atividade da catalase utilizando o valor de proteína da amostra para normalização. O resultado foi expresso como U catalase/mg de proteína.

4.6.4. Substância Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) no cérebro

A peroxidação lipídica no cérebro foi avaliada pelo ensaio de TBARS segundo Wallin (1993). Nessa análise o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da lipoperoxidação formando um composto de coloração rosada que foi avaliado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 535 nm. O valor encontrado foi utilizado na equação da reta da curva padrão. A concentração final de TBARS foi normalizada pelos valores de proteína da amostra e foi então expressa em nmol TBARS/mg de proteína.

4.6.5. Proteína carbonilada no cérebro

O dano oxidativo às proteínas foi determinado por meio da avaliação da carbonilação de acordo com o método de Levine *et al.*, (1990). Para essa análise foi utilizado o precipitado sólido do preparo do homogenato. Os precipitados foram tratados de acordo com a metodologia proposta e no final o sobrenadante foi lido em espectrofotômetro no comprimento de onda 370nm.

4.7. Citocinas Inflamatórias no cérebro

Para análise das citocinas no homogenato de cérebro foi utilizado o Kit CBA (BD Cytometric Beads Array Mouse Inflammation) seguindo as instruções do fabricante. As citocinas quantificadas foram a IL-12p70, IFN γ , TNF, MCP-1, IL-10, IL-6 em uma mesma amostra. A determinação da concentração das citocinas foi realizada através da citometria de fluxo na quantificação de intensidades de fluorescência distintas (FACSVERSE, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). A quantificação em pg/ml de cada citocina foi baseada em uma curva padrão realizada com as concentrações conhecidas. Os dados gerados pela análise foram analisados no software FlowJo v.10.

4.8. Ácidos graxos de cadeia curta do intestino delgado e do cérebro

Os ácidos orgânicos foram extraídos segundo metodologia proposta por Siegfried (1984) e a concentração foi quantificada por HPLC em cromatógrafo UltiMate 3000 (DIONEX, Alemanha). Vinte microlitros de amostra foram injetados e passaram

por uma coluna de troca iônica Rezex (00H-0138-K0 300 × 7,8 mm, Phenomenex) com H₂SO₄ 5 mM como eluente a 0,7 mL/min, a 40°C. O detector usado foi de índice de refração a 40°C (RI-101, Shodex). A concentração dos ácidos graxos foi determinada de acordo com a curva padrão dos ácidos acético, propiônico e butírico e o resultado expresso em µmol do ácido graxo/g de tecido.

4.9. Análises estatísticas

A análise estatística dos dados foi realizada primeiramente pela determinação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparação entre os grupos experimentais nos casos de distribuição paramétrica foi utilizado o teste t não pareado. Nos casos de distribuição não paramétrica foi realizado o teste de Mann-Whitney.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism* (GraphPad Software, San Diego, CA), versão 6.0, assumindo um $p < 0,05$ para diferenças estatísticas. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão da média.

5. Referências

- ABDELHAMID, R. F.; NAGANO, S. Crosstalk between Oxidative Stress and Aging in Neurodegeneration Disorders. **Cells**, v. 12, n. 5, p. 753, 27 fev. 2023.
- ADAK, A.; KHAN, M. R. An insight into gut microbiota and its functionalities. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 3, p. 473–493, 2019.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods of Enzymology**, v. 105, p. 121–127, 1984.
- AGARWAL, N.; SHUKLA, V.; KOLBA, N.; JACKSON, C.; CHENG, J.; PADILLA-ZAKOUR, O. I.; TAKO, E. Comparing the Effects of Concord Grape (*Vitis labrusca* L.) Puree, Juice, and Pomace on Intestinal Morphology, Functionality, and Bacterial Populations In Vivo (*Gallus gallus*). **Nutrients**, v. 14, n. 17, 1 set. 2022.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Ministério da Saúde. **Resolução RDC Nº 2, de 7 de janeiro de 2002**. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticas isoladas com alegação de propriedades funcional ou de saúde. Brasília, 2008.
- AIT-BELGNAOUI, A.; COLOM, A.; BRANISTE, V.; RAMALHO, L.; MARROT, A.; CARTIER, C.; HOUDEAU, E.; THEODOROU, V.; TOMPKINS, T. Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 26, n. 4, p. 510–520, 2014.

AZIZI, N. F.; KUMAR, M. R.; YEAP, S. K.; ABDULLAH, J. O.; KHALID, M.; OMAR, A. R.; OSMAN, M. A.; MORTADZA, S. A. S.; ALITHEEN, N. B. Kefir and its biological activities. **Foods**, v. 10, n. 6, 2021.

BENGOA, A. A.; IRAPORDA, C.; GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G. Kefir microorganisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 686–700, 1 mar. 2019.

BERCIK, P.; VERDU, E. F.; FOSTER, J. A.; MACRI, J.; POTTER, M.; HUANG, X.; MALINOWSKI, P.; JACKSON, W.; BLENNERHASSETT, P.; NEUFELD, K. A.; LU, J.; KHAN, W. I.; CORTHESTHEULAZ, I.; CHERBUT, C.; BERGONZELLI, G. E.; COLLINS, S. M. Chronic gastrointestinal inflammation induces anxiety-like behavior and alters central nervous system biochemistry in mice. **Gastroenterology**, v. 139, n. 6, p. 2102–2112, 2010.

BHAMRE, R.; SAWRAV, S.; ADARKAR, S.; SAKARIA, R.; J BHATIA, S. Psychiatric comorbidities in patients with inflammatory bowel disease. **Indian Journal of Gastroenterology**, v. 37, n. 4, p. 307–312, 2018.

BOURRIE, B. C. T.; WILLING, B. P.; COTTER, P. D. The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 647, 2016.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (DISPOA). **Instrução Normativa nº 62**, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União, Brasília, 2003.

BREMNER, J. D.; ELZINGA, B.; SCHMAHL, C.; VERMETTEN, E. Structural and functional plasticity of the human brain in posttraumatic stress disorder. **Progress in Brain Research**, v. 167, p. 171–186, 2007.

CAMPBELL, C.; KANDALGAONKAR, M. R.; GOLONKA, R. M.; YEOH, B. S.; VIJAY-KUMAR, M.; SAHA, P. Crosstalk between Gut Microbiota and Host Immunity: Impact on Inflammation and Immunotherapy. **Biomedicines**, v. 11, n. 2, p. 294, 20 jan. 2023.

CARABOTTI, M.; SCIROCCO, A.; ANTONIETTA MASELLI, M.; SEVERI, C. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. **Annals of gastroenterology: quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology**, v. 28, n. 2, p. 203–209, 2015.

CARSON, F. L.; MARTIN, J. H.; LYNN, J. A. Formalin Fixation for Electron Microscopy: A Re-evaluation. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 59, n. 3, p. 365–373, 1973.

CHEN, H. L.; LAN, Y. W.; TU, M. Y.; TUNG, Y. T.; CHAN, M. N. Y.; WU, H. S.; YEN, C. C.; CHEN, C. M. Kefir peptides exhibit antidepressant-like activity in mice through the BDNF/TrkB pathway. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 6, p. 6415–6430, 1 jun. 2021.

CHOLAPRANEE, A.; ANANTHAKRISHNAN, A. N. Environmental Hygiene and Risk of Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review and Meta-analysis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 22, n. 9, p. 2191–2199, 2016.

CLARK, A.; MACH, N. Exercise-induced stress behavior, gut-microbiota-brain axis and diet: A systematic review for athletes. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 13, n. 1, p. 1–21, 2016.

COHEN, S. L.; MOORE, A. M.; WARD, W. E. Interleukin-10 Knockout Mouse: A Model for Studying Bone Metabolism During Intestinal Inflammation. **Inflamm Bowel Dis**, v. 10, n. 5, p. 557–563, 2004.

CRUZ, B. C. dos Santos. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO USO DE PROBIÓTICO E SIMBIÓTICO NA CARCINOGENÊSE COLORRETAL INDUZIDA POR 1,2-DIMETILHIDRAZINA EM CAMUNDONGOS. 2018.

CRYAN, J. F.; O, K. J.; M COWAN, C. S.; SANDHU, K. v; S BASTIAANSEN, T. F.; BOEHME, M.; CODAGNONE, M. G.; CUSSOTTO, S.; FULLING, C.; GOLUBEVA, A. v; GUZZETTA, K. E.; JAGGAR, M.; LONG-SMITH, C. M.; LYTE, J. M.; MARTIN, J. A.; MOLINERO-PEREZ, A.; MOLONEY, G.; MORELLI, E.; MORILLAS, E.; CRUZ-PEREIRA, J. S.; PETERSON, V. L.; REA, K.; RITZ, N. L.; SHERWIN, E.; SPICHAK, S.; TEICHMAN, E. M.; VAN DE WOUW, M.; PAULA VENTURA-SILVA, A.; WALLACE-FITZSIMONS, S. E.; HYLAND, N.; CLARKE, G.; DINAN, T. G. The Microbiota-Gut-Brain Axis. **Physiol Rev**, v. 99, p. 1877–2013, 2019.

DALILE, B.; VAN OUDENHOVE, L.; VERVLIET, B.; VERBEKE, K. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 8, p. 461–478, 2019.

DANDEKAR, A.; MENDEZ, R.; ZHANG, K. Cross talk between ER stress, oxidative stress, and inflammation in health and disease. **Methods in Molecular Biology**, v. 1292, p. 205–214, 2015.

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, p. 33–39, 2000.

DIMIDI, E.; COX, S.; ROSSI, M.; WHELAN, K. Fermented foods: definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1806, 2019.

DOUGLAS BREMNER, J. Stress and Brain Atrophy. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 5, n. 5, p. 503–512, 2006.

DU, G.; CHANG, S.; GUO, Q.; YAN, X.; CHEN, H.; SHI, K.; YUAN, Y.; YUE, T. Protective effects of Tibetan kefir in mice with ochratoxin A-induced cecal injury. **Food Research International**, v. 158, 1 ago. 2022.

FISCHER, R.; MAIER, O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: Role of TNF. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, 2015.

FUNG, T. C.; OLSON, C. A.; HSIAO, E. Y. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 145–155, 2017.

GALDEANO, C.; CAZORLA MALDONADO, S. I.; DUMIT, J. M.; VÉLEZ, E.; PERDIGÓN, G. Beneficial effects of probiotic consumption on the immune system. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 74, n. 2, p. 115–124, 2019.

GAO, X.; TANG, Y.; LEI, N.; LUO, Y.; CHEN, P.; LIANG, C.; DUAN, S.; ZHANG, Y. Symptoms of anxiety/depression is associated with more aggressive inflammatory bowel disease. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2021.

GARCÍA, N.; ZAZUETA, C.; AGUILERA-AGUIRRE, L. Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

GRIESBACH, G. S.; HOVDA, D. A. Cellular and molecular neuronal plasticity. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 128, p. 681–690, 2015.

HÄUSER, W.; JANKE, K. H.; KLUMP, B.; HINZ, A. Anxiety and depression in patients with inflammatory bowel disease: Comparisons with chronic liver disease patients and the general population. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 17, n. 2, p. 621–632, 2011.

HE, L.; HE, T.; FARRAR, S.; JI, L.; LIU, T.; MA, X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 532–553, 1 dez. 2017.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

HUSSAIN, T.; TAN, B.; YIN, Y.; BLACHIER, F.; TOSSOU, M. C. B.; RAHU, N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

IP, W. K. E.; HOSHI, N.; SHOUVAL, D. S.; SNAPPER, S.; MEDZHITOV, R. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. **Science**, v. 356, n. 6337, p. 513–519, 2017.

JOOSSENS, M.; HUYS, G.; CNOCKAERT, M.; DE PRETER, V.; VERBEKE, K.; RUTGEERTS, P.; VANDAMME, P.; VERMEIRE, S. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. **Gut**, v. 60, n. 5, p. 631–637, maio 2011.

KANG, H.; KIM, B. Bioactive Compounds as Inhibitors of Inflammation, Oxidative Stress and Metabolic Dysfunctions via Regulation of Cellular Redox Balance and Histone Acetylation State. **Foods**, v. 12, n. 5, p. 925, 22 fev. 2023.

- KENNEDY, R. J.; HOPER, M.; DEODHAR, K.; ERWIN, P. J.; KIRK, S. J.; GARDINER, K. R. Interleukin 10-deficient colitis: new similarities to human inflammatory bowel disease. **British Journal of Surgery**, v. 87, p. 1346–1351, 2000.
- 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. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 44, p. 35–43, 1 jun. 2017.
- LARABI, A.; BARNICH, N.; NGUYEN, H. T. T. New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD. **Autophagy**, v. 16, n. 1, p. 38–51, 2020.
- LAURIDSEN, C. From oxidative stress to inflammation: Redox balance and immune system. Em: Poultry Science, 10., 2019, [...]. Oxford University Press, 2019. v. 98, p. 4240–4246.
- LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.-G.; AHN, B.-W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 464–478, 1990.
- LOWRY, H. , R. N. J. , F. A. L. , & R. R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.
- MEDRANO, M.; RACEDO, S. M.; ROLNY, I. S.; ABRAHAM, A. G.; PÉREZ, P. F. Oral administration of kefir induces changes in the balance of immune cells in a murine model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5299–5304, 25 maio 2011.
- MERA, R.; THOMPSON, H.; PRASAD, C. How to Calculate Sample Size for an Experiment: A Case-Based Description. **Nutritional Neuroscience**, v. 1, n. 1, p. 87–91, 1998.
- MICHIELAN, A.; D'INCÀ, R. Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.
- MILOSEVIC, I.; VUJOVIC, A.; BARAC, A.; DJELIC, M.; KORAC, M.; SPURNIC, A. R.; GMIZIC, I.; STEVANOVIC, O.; DJORDJEVIC, V.; LEKIC, N.; RUSSO, E.; AMEDEI, A. Gut-liver axis, gut microbiota, and its modulation in the management of liver diseases: A review of the literature. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, p. 395, 2019.
- MÖRKL, S.; BUTLER, M. I.; HOLL, A.; CRYAN, J. F.; DINAN, T. G. Probiotics and the Microbiota-Gut-Brain Axis: Focus on Psychiatry. **Current Nutrition Reports**, v. 9, n. 3, p. 171–182, 2020.
- MOUSA, W. K.; CHEHADEH, F.; HUSBAND, S. Microbial dysbiosis in the gut drives systemic autoimmune diseases. **Frontiers in Immunology**, 20 out. 2022.
- NG, S. C.; SHI, H. Y.; HAMIDI, N.; UNDERWOOD, F. E.; TANG, W.; BENCHIMOL, E. I.; PANACCIONE, R.; GHOSH, S.; WU, J. C. Y.; CHAN, F. K. L.; SUNG, J. J. Y.;

KAPLAN, G. G. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. **The Lancet**, v. 390, n. 10114, p. 2769–2778, 2017.

PAONE, P.; CANI, P. D. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: The expected slimy partners? **Gut**, v. 69, n. 12, p. 2232–2243, 1 dez. 2020.

PELUZIO, M. do C. G.; DIAS, M. de M. e.; MARTINEZ, J. A.; MILAGRO, F. I. Kefir and Intestinal Microbiota Modulation: Implications in Human Health. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, 2021.

RAJARAM, S.; DAMASCENO, N. R. T.; BRAGA, R. A. M.; MARTINEZ, R.; KRIS-ETHERTON, P.; SALA-VILA, A. Effect of Nuts on Markers of Inflammation and Oxidative Stress: A Narrative Review. **Nutrients**, v. 15, n. 5, p. 1099, 22 fev. 2023.

REIS, S. A. Efeito do consumo de kefir de leite integral sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas intestinais em ratos Wistar. 2015.

ROSA, D. D. Lesões pré-neoplásicas, perfil lipídico, marcadores inflamatórios e aspecto histológico intestinal de ratos Wistar alimentados com dietas à base de diferentes óleos. Viçosa, 2012.

ROSA, D. D.; DIAS, M. M. S.; GRZEŚKOWIAK, Ł. M.; REIS, S. A.; CONCEIÇÃO, L. L.; PELUZIO, M. D. C. G. Milk kefir: Nutritional, microbiological and health benefits. **Nutrition Research Reviews**, v. 30, n. 1, p. 82–96, 1 jun. 2017.

RUTHIRAKUHAN, M.; HERRMANN, N.; ANDREAZZA, A. C.; VERHOEFF, N. P. L. G.; GALLAGHER, D.; BLACK, S. E.; KISS, A.; LANCTÔT, K. L. Agitation, Oxidative Stress, and Cytokines in Alzheimer Disease: Biomarker Analyses From a Clinical Trial With Nabilone for Agitation. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, v. 33, n. 4, p. 175–184, 1 jul. 2020.

SAIRENJI, T.; COLLINS, K. L.; EVANS, D. V. An Update on Inflammatory Bowel Disease. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, v. 44, n. 4, p. 673–692, 1 dez. 2017.

SANCHO, L.; CONTRERAS, M.; ALLEN, N. J. Glia as sculptors of synaptic plasticity. **Neuroscience Research**, v. 167, p. 17–29, 2021.

SIEGFRIED, R. ; R. H. ; S. G. Method for the determination of organic-acids in silage by high-performance liquid-chromatography. **Landwirtschaftliche Forschung**, v. 37, n. 3–4, p. 298–304, 1984.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. de A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. v. Blucher, p. 570, 2017.

SILVA, M. de A.; MOWRY, F. E.; PEADEN, S. C.; ANDRADE, T. U.; BIANCARDI, V. C. Kefir ameliorates hypertension via gut–brain mechanisms in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 77, 1 mar. 2020.

SILVA, Y. P.; BERNARDI, A.; FROZZA, R. L. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 25, 2020.

SROOR, H. M.; HASSAN, A. M.; ZENZ, G.; VALADEZ-COSMES, P.; FARZI, A.; HOLZER, P.; EL-SHARIF, A.; GOMAA, F. A. Z. M.; KARGL, J.; REICHMANN, F. Experimental colitis reduces microglial cell activation in the mouse brain without affecting microglial cell numbers. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

STEPHENS, M.; VON DER WEID, P. Y. Lipopolysaccharides modulate intestinal epithelial permeability and inflammation in a species-specific manner. **Gut Microbes**, v. 11, n. 3, p. 421–432, 2020.

STRANDWITZ, P. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. **Brain Research**, v. 1693, p. 128–133, 2018.

SUN, M.; WU, W.; CHEN, L.; YANG, W.; HUANG, X.; MA, C.; CHEN, F.; XIAO, Y.; ZHAO, Y.; MA, C.; YAO, S.; CARPIO, V. H.; DANN, S. M.; ZHAO, Q.; LIU, Z.; CONG, Y. Microbiota-derived short-chain fatty acids promote Th1 cell IL-10 production to maintain intestinal homeostasis. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2018.

TAKADA, M.; NISHIDA, K.; KATAOKA-KATO, A.; GONDO, Y.; ISHIKAWA, H.; SUDA, K.; KAWAI, M.; HOSHI, R.; WATANABE, O.; IGARASHI, T.; KUWANO, Y.; MIYAZAKI, K.; ROKUTAN, K. Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota relieves stress-associated symptoms by modulating the gut–brain interaction in human and animal models. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 28, n. 7, p. 1027–1036, 2016.

TAKAHASHI, K.; NISHIDA, A.; FUJIMOTO, T.; FUJII, M.; SHIOYA, M.; IMAEDA, H.; INATOMI, O.; BAMBA, S.; ANDOH, A.; SUGIMOTO, M. Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn's Disease. **Digestion**, v. 93, n. 1, p. 59–65, 1 jan. 2016.

TON, A. M. M.; CAMPAGNARO, B. P.; ALVES, G. A.; AIRES, R.; CÔCO, L. Z.; ARPINI, C. M.; GUERRA E OLIVEIRA, T.; CAMPOS-TOIMIL, M.; MEYRELLES, S. S.; PEREIRA, T. M. C.; VASQUEZ, E. C. Oxidative Stress and Dementia in Alzheimer's Patients: Effects of Synbiotic Supplementation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.

WALLIN, B. et al. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. **Analytical Biochemistry**, v. 208, n. 1, p. 10–15, 1993.

WANG, H. X.; WANG, Y. P. Gut microbiota-brain axis. **Chinese Medical Journal**, v. 129, n. 19, p. 2373–2380, 2016.

WANG, Y.; XIE, Q.; ZHANG, Y.; MA, W.; NING, K.; XIANG, J. Y.; CUI, J.; XIANG, H. Combination of probiotics with different functions alleviate DSS-induced colitis by regulating intestinal microbiota, IL-10, and barrier function. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 1, p. 335–349, 2020.

WEISS, G. A.; HENNET, T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 16, p. 2959–2977, 2017.

WU, M.; LUO, Q.; NIE, R.; YANG, X.; TANG, Z.; CHEN, H. Potential implications of polyphenols on aging considering oxidative stress, inflammation, autophagy, and gut microbiota. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 13, p. 2175–2193, 2021.

YADAV, M.; VERMA, M. K.; CHAUHAN, N. S. A review of metabolic potential of human gut microbiome in human nutrition. **Archives of Microbiology**, v. 200, n. 2, p. 203–217, 1 mar. 2018.

YE, Y.; PANG, Z.; CHEN, W.; JU, S.; ZHOU, C. The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease. **Int J Clin Exp Med**, v. 8, n. 12, p. 22529–22542, 2015.

YU, J.; CHEON, J. H. Microbial Modulation in Inflammatory Bowel Diseases. **Immune Network**, v. 22, n. 6, 1 dez. 2022.

ZANIRATI, D. F.; ABATEMARCO, M.; SANDES, S. H. de 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, p. 70–76, 1 abr. 2015.

ZHANG, B.; WANG, H. E.; BAI, Y. M.; TSAI, S. J.; SU, T. P.; CHEN, T. J.; WANG, Y. P.; CHEN, M. H. Inflammatory bowel disease is associated with higher dementia risk: A nationwide longitudinal study. **Gut**, v. 70, n. 1, p. 85–91, 1 jan. 2021.

ZHANG, Y. Z.; LI, Y. Y. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 1, p. 91–99, 7 jan. 2014.

ZINGEL, R.; BOHLKEN, J.; KOSTEV, K. Association between Inflammatory Bowel Disease and Dementia: A Retrospective Cohort Study. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 80, n. 4, p. 1471–1478, 2021.

ZMORA, N.; SUEZ, J.; ELINAV, E. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 1, p. 35–56, 1 jan. 2019.

6. RESULTADOS:

6.1. ARTIGO ORIGINAL:

Intervenção com kefir preserva a histomorfologia intestinal e melhora marcadores de estresse oxidativo intestinal e cerebral em camundongos IL10^{-/-}

Resumo:

Doenças inflamatórias intestinais (DIIs) são conhecidas por condições que geram uma inflamação no trato gastrointestinal. A Retocolite Ulcerativa e a Doença de Crohn são as duas principais condições que geram essa inflamação. Nas DIIs existe um quadro de desequilíbrio da microbiota intestinal gerado pela inflamação. Pelo fato da microbiota intestinal possuir uma série de funções relacionadas a homeostase corporal esse desequilíbrio tem um impacto na saúde geral, incluindo a do sistema nervoso central. O kefir apresenta potencial terapêutico para modular a microbiota intestinal e atenuar a inflamação da DII, o que pode contribuir com o retorno ao equilíbrio nessas condições. Diante desse contexto, o objetivo do presente estudo é avaliar se o consumo do kefir influencia na morfologia intestinal e em marcadores da inflamação e estresse oxidativo no tecido intestinal e cerebral de camundongos C57BL/6J IL10^{-/-}. Para isso foi realizado o tratamento de 4 semanas com 0,4ml/dia da bebida fermentada a base de kefir de leite (6×10^8 UFC/ml de BAL e 10^6 UFC/ml de leveduras totais) ou água em camundongos IL10^{-/-}. Os resultados observados mostraram uma redução no escore histopatológico e na inflamação, uma maior preservação da histomorfometria intestinal e um aumento na contagem de células calciformes, além de uma redução do estresse oxidativo no intestino e no cérebro. Houve também um aumento nas concentrações de ácido butírico e acético no intestino do grupo tratado. Com base nos resultados obtidos, sugere-se que o kefir foi capaz de reduzir a ativação da DII por meio da redução do dano tecidual e modulação da inflamação intestinal, evitando a depleção de células calciformes. Associado a isso, o kefir foi capaz de aumentar a concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e regular o estresse oxidativo no intestino e no cérebro pela modulação de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e a catalase. Dessa forma, os resultados indicam o potencial do uso do kefir na redução do risco de DII e em condições que aumentam o estresse oxidativo no cérebro.

Palavras chaves: *doença inflamatória intestinal, kefir, eixo intestino-cérebro, probiótico*

Intervention with kefir preserves intestinal histomorphology and improves intestinal and cerebral oxidative stress markers in mice IL10^{-/-}.

Abstract:

Inflammatory bowel diseases (IBDs) are conditions known to cause inflammation in the gastrointestinal tract. Ulcerative colitis and Crohn's disease are the two main conditions that cause this inflammation. In IBDs, there is a disturbance in the intestinal microbiota caused by inflammation. As the intestinal microbiota has several functions related to body homeostasis, this disturbance has an impact on overall health, including the central nervous system. Kefir has therapeutic potential to modulate the intestinal microbiota and attenuate inflammation in IBD, which can contribute to restoring balance in these conditions. In this context, the objective of the present study is to evaluate whether kefir consumption influences intestinal morphology and markers of inflammation and oxidative stress in the intestinal and cerebral tissues of C57BL/6J IL10^{-/-} mice. For this purpose, a 4-week treatment with 0.4 ml/day of fermented beverage of milk kefir (6x10⁸ CFU/ml of LAB and 10⁶ CFU/ml of total yeasts) or water was administered to IL10^{-/-} mice. The results showed a reduction in histopathological score and inflammation, greater preservation of intestinal histomorphometry, an increase in goblet cell count, as well as a reduction in oxidative stress in the intestine and brain. There was also an increase in the concentrations of butyric and acetic acid in the intestine of the treated group. Based on the obtained results, it is suggested that kefir was able to reduce IBD activation by reducing tissue damage and modulating intestinal inflammation, thereby preventing depletion of goblet cells. In addition, kefir was able to increase the concentration of short-chain fatty acids (SCFAs) and regulate oxidative stress in the intestine and brain by modulating antioxidant enzymes such as superoxide dismutase and catalase. Thus, the results indicate the potential use of kefir in reducing the risk of IBDs and conditions that increase oxidative stress in the brain.

Keywords: *inflammatory bowel disease, kefir, gut-brain axis, probiotic.*

Introdução

Doenças inflamatórias intestinais (DII) são conhecidas por condições que geram uma inflamação no trato gastrointestinal. A Retocolite Ulcerativa e a Doença de Crohn são os dois principais tipos dessas doenças. A etiologia e patogênese dessas condições é complexa e ainda precisa ser elucidada. Todavia, sabe-se que a incidência está aumentando no mundo, inclusive na América do Sul. Sendo esse aumento relacionado com uma série de fatores do estilo de vida ocidental, além de outros fatores genéticos, ambientais e imunológicos (HANEISHI *et al.*, 2023; KAPLAN; NG, 2017; NISHIDA *et al.*, 2018).

Dentre os fatores de risco para as DII, ressalta-se o desequilíbrio da microbiota intestinal (LARABI; BARNICH; NGUYEN, 2020). No trato gastrointestinal humano há mais de 100 trilhões de microrganismo que possuem, juntos, aproximadamente 3 milhões de genes (SWER *et al.*, 2022) e, por isso, o equilíbrio desses microrganismos está relacionado a homeostase corporal e cerebral (WEISS; HENNET, 2017). Já se sabe, por exemplo, que o desequilíbrio, como a ausência de microbiota intestinal induz comportamento semelhante a depressão em camundongos (ZHENG *et al.*, 2016). Entretanto, o retorno à homeostase pode ser facilitado pela suplementação de probióticos (PELUZIO *et al.*, 2021; VERA-SANTANDER *et al.*, 2023).

O modelo do nosso estudo desenvolve espontaneamente DII pelo fato da deficiência da IL10 gerar uma inflamação crônica pela contínua produção de IL-6, IL-1 α , e TNF- α . Além disso, esses animais apresentam DII que compartilha aspectos histológicos, fisiológicos e bioquímicos com as DII em humanos (COHEN; MOORE; WARD, 2004; IP *et al.*, 2017; KENNEDY *et al.*, 2000).

Segundo a definição da Organização Mundial da Saúde e a Instrução Normativa nº 44 de 2015 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil, os probióticos são cepas de micro-organismos vivos e viáveis, que agem como auxiliares na recomposição da microbiota do trato digestório contribuindo para o seu equilíbrio (HILL *et al.*, 2014; MAPA, 2015). No Brasil, além disso, para um produto poder ter alegação probiótica, ele deve conter no mínimo 10⁸ UFC no produto para consumo (ANVISA, 2008).

O kefir é uma bebida probiótica originada das montanhas do Cáucaso que possui em sua composição microbiológica bactérias fermentadoras de ácido lático,

acético e leveduras (ROSA *et al.*, 2017). Apresenta potencial terapêutico para modular a microbiota intestinal e atenuar o processo inflamatório que ocorre na DII (YILMAZ; ENVER DOLAR; ÖZPINAR, 2019). O benefício que essa modulação gera na preservação da morfologia intestinal (CHEN *et al.*, 2012), na redução da inflamação crônica e do estresse oxidativo no cérebro (DU *et al.*, 2022; TON *et al.*, 2020) já vem sendo estudada. Porém, esclarecimentos a respeito de mecanismos precisam ser elucidados, especialmente em modelo nocaute de IL10.

A relação do intestino com o cérebro envolve várias moléculas, como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), componentes estruturais das bactérias e moléculas sinalizadoras. A microbiota intestinal produz metabólitos como AGCC, neurotransmissores e hormônios intestinais que possuem função de regulação do sistema imune, na saúde neurológica, na integridade da barreira intestinal e hematoencefálica, contribuindo como fator protetivo para saúde do indivíduo (DOROSZKIEWICZ; GROBLEWSKA; MROCZKO, 2021; MIRZAEI *et al.*, 2021).

Diante desse contexto, o presente estudo busca investigar a relação intestino-cérebro com a utilização de bebida fermentada à base de kefir no tratamento das DII e suas implicações em condições neurológicas relacionadas à inflamação e ao estresse oxidativo. Desta forma, o objetivo é avaliar se o consumo do kefir influencia na morfologia intestinal e em marcadores da inflamação e do estresse oxidativo no tecido intestinal e cerebral de camundongos C57BL/6J IL10^{-/-}.

Material e Método

Aspectos éticos

O presente projeto é parte integrante do projeto guarda-chuva intitulado “**Efeito do consumo de kefir de leite integral no desenvolvimento de doença inflamatória intestinal em camundongos knockout IL-10**”, previamente submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), aprovado no dia 19 de novembro de 2019, sob o número do processo 52/2019.

Kefir

A produção da bebida fermentada de kefir foi realizada diariamente com a inoculação de 10% de grânulos de kefir em leite integral UHT, de uma mesma marca e mesmo lote. Após inoculação foi mantido em estufa com temperatura controlada de 25°C por 24h. Após esse período, os grãos de kefir previamente inoculados eram separados e o kefir fresco ofertado aos animais. Os grãos separados eram lavados com água destilada e inoculados em uma nova amostra de leite. A etapa de fermentação aconteceu sucessivamente até o fim do estudo (figura 1).

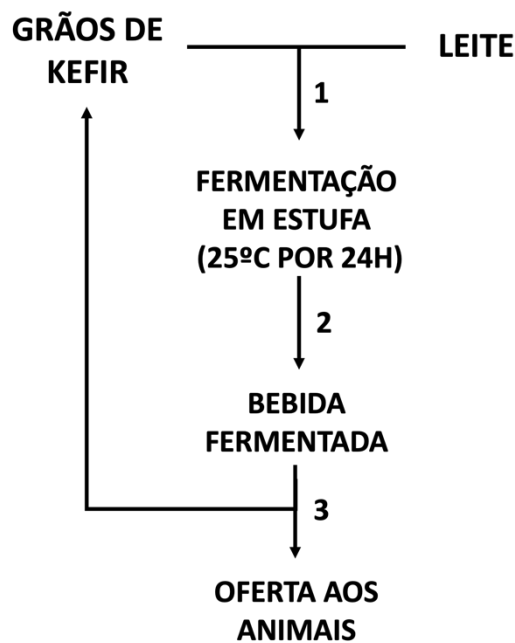


Figura 1: Preparo do kefir. (1) Inoculação dos grãos de kefir em leite. (2) Fermentação em estufa por 24h em temperatura média de 25°C. (3) Filtragem e separação dos grãos de kefir que serão re-inoculados em novo leite. A bebida fresca é oferecida aos animais e o processo é repetido diariamente.

O perfil microbiológico do kefir preparado no estudo foi determinado antes do início do experimento através da contagem de bactérias ácido lácticas totais (BAL) e de leveduras totais através do método de plaqueamento em superfície (SILVA *et al.*, 2017). Para a contagem de BAL a amostra foi inoculada em meio MRS e posteriormente os foi incubada em estufa na temperatura de 37°C por 48 horas (REIS, 2015). Para a contagem de leveduras totais a amostra foi inoculada em meio BAD. As placas foram incubadas em estufa na temperatura de 28°C por 7 dias (BRASIL, 2003). As análises foram realizadas no laboratório de Bioquímica Nutricional do

Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). O kefir possuiu concentração mínima de 6×10^8 UFC de BAL/ml e 10^6 UFC/ml de leveduras totais para este estudo e esses valores foram utilizados por ser a quantidade necessária de UFC para que o produto tenha alegação de probiótico no Brasil (ANVISA, 2008).

Desenho Experimental

Um total de 18 animais foram randomizados por peso corporal em dois grupos: (1) grupo controle (CON): dieta comercial e gavagem com leite integral; (2) grupo kefir (KEF): dieta comercial e gavagem com kefir (0,4ml; 6×10^8 UFC BAL/ml e 10^6 UFC/ml de leveduras totais). O tratamento foi iniciado quando os animais possuíam 9 semanas, recebendo diariamente 0,4ml de kefir via gavagem por 4 semanas. O tamanho amostral foi calculado previamente no projeto guarda-chuva, conforme proposto por Mera *et al* (1998). Para o cálculo foi considerado poder estatístico de 99% ($\alpha \leq 0,01$).

Os animais foram alojados coletivamente em caixas de polipropileno coberto por grade metálicas, em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro e escuro de 12 horas. As dietas e água foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento. A ingestão foi avaliada diariamente e o peso corporal dos animais foi monitorado semanalmente, sendo considerada a média do peso semanal para fins de cálculo estatístico.

Foram utilizados tecido cerebral e do intestino delgado de 18 camundongos machos C57BL/6J nocaute IL10^{-/-} provenientes do laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

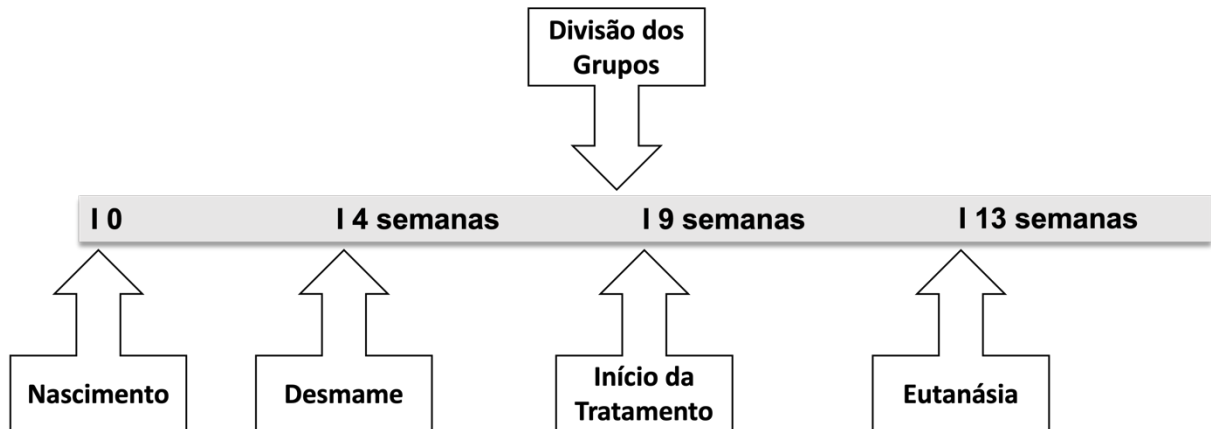


Figura 2: Linha do tempo.

Processamento e Análises Histológicas no Intestino Delgado

O intestino delgado no momento da eutanásia foi lavado com solução salina fisiológica e fixado em formalina de Carson (CARSON; MARTIN; LYNN, 1973). Após desidratação em gradiente crescente de etanol, o intestino foi diafanizado em xilol e incluído em parafina. Para análise histológica foram realizados cortes com espessura de 5µm por meio de micrótomo rotativo (Olympus America Inc., CUT 4055) e corados na sequência com hematoxilina e eosina (HE).

As imagens das secções histológicas foram capturadas com objetiva de 10x diretamente no microscópio de luz LEICA DM750 (Leica®, Suíça), por meio de câmera de vídeo LEICA 170HD (Leica®, Suíça). As análises e medidas foram realizadas com auxílio do aplicativo Image Pro-Plus® versão 4.5 (Media Cybernetics).

O escore histopatológico foi utilizado para avaliação de características histológicas do tecido intestinal. O escore foi composto pela média de três parâmetros diferentes: dano na cripta (0: nenhum; 1: 1/3 danificada; 2: 2/3 danificada; 3: apenas o epitélio superficial intacto; 4: epitélio perdido); gravidade da inflamação (0: nenhuma; 1: leve; 2: moderada; 3: grave) e profundidade da lesão (0: nenhuma; 1: mucosa; 2: submucosa; 3: transmural). O escore foi obtido pela média dos pontos dos três parâmetros (CRUZ, 2018).

Para as análises histomorfométricas foi seguido metodologia proposta por Rosa e colaboradores (2012) e AGARWAL *et al.*, (2022).

Altura das vilosidades - foram medidas 70 vilosidades por grupo experimental. Apenas as vilosidades com epitélio definido e conjuntivo visível foram utilizadas;

Largura das vilosidades: nas mesmas vilosidades utilizadas na análise de altura foi realizada 3 medidas (região apical, média e basal) e a largura foi considerada o valor médio destas três medidas;

Profundidade das criptas – foram medidas 70 criptas por grupo, apenas criptas onde é possível ver a base e o ápice da cripta foram utilizadas.

Área de superfície de vilosidade – para o cálculo da área foi utilizado a fórmula abaixo, foram avaliadas 70 vilosidades por grupo experimental.

$$\text{Área de superfície de vilosidade} = 2\pi \times \frac{\text{Média da Largura}}{2} \times \text{Altura}$$

Contagem de células caliciformes – as células caliciformes foram contadas manualmente de 70 vilosidades para cada grupo experimental.

Análise de genes via rtPCR no Intestino Delgado

Os tecidos cerebrais foram homogeneizados em reagente Trizol® e o RNA foi extraído seguindo instruções do fabricante (Invitrogen, Massachusetts). Ao final do protocolo, a concentração do RNA obtido foi estimada por leitura em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts). As razões 260/280 foram avaliadas com intuito de verificar a pureza do RNA, foram observadas razões maiores do que 1,8.

Após transcrição do cDNA das amostras, o ensaio de rtPCR foi realizado utilizando os iniciadores específicos para o modelo experimental (tabela 1):

Tabela 1. Iniciadores utilizados para análises de expressão gênica por PCR.

Gene	Forward Primer	Reverse Primer	Bp
<i>β-act</i>	TTGTTACCAACTGGGACGAC	ACGGTTGGCCTTAGGGTT	125
<i>tnf</i>	TCAGCCGATTTGCTATCTCA	CGGACTCCGCAAAGTCTAAG	204
<i>inos</i>	TGGCTGTGCTCCATAGTTTC	TTC AACATCTCCTGGTGGAA	187
<i>il-10</i>	TAAGGGTTACTTGGGTTGCC	TCACTCTTCACCTGCTCCAC	213
<i>arg</i>	GGTTCTGGGAGGCCTATCTT	AAGCAAGCCAAGGTTAAAGC	171
<i>nf-kb</i>	AACCTGGGAATACTTCATGTG ACTAA	GCACCAGAAGTCCAGGATTA TAGC	103
<i>ccl2</i>	TTAAGGCATCACAGTCCGAG	TGAATGTGAAGTTGACCCGT	129

As amplificações foram realizadas em duplicata, usando 10ng de cDNA por reação. Além desses, foram adicionados os iniciadores específicos e o reagente SyBR Green para PCR em tempo real, num volume final de 15µl por reação. As expressões foram normalizadas pela expressão de *β-act* mas também foi testado o gene *gapdh*.

Avaliação do Estresse Oxidativo no Intestino Delgado e no Cérebro

O estresse oxidativo no intestino e no cérebro foi avaliado por meio da atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e a oxidação de macromoléculas no cérebro foi avaliada pela quantificação de malondialdeído (MDA) e proteína carbonilada. A concentração de proteínas totais na amostra foi quantificada pela metodologia de (LOWRY, 1951) para normalização das análises de estresse oxidativo por mg de proteína. Foi preparado um homogenato na concentração de 1:10 de tecido:tampão fosfato pH 7 para as análises de proteínas totais, SOD, CAT e MDA, o precipitado formado nesse processo foi utilizado para quantificação de proteína carbonilada.

A atividade de SOD foi avaliada segundo Dieterich *et al.*, (2000). O composto formado foi avaliado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. O valor encontrado foi apresentado em U SOD/mg de proteína. A atividade da catalase foi determinada segundo metodologia de Aebi, (1984) através do decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A leitura foi realizada no espectrofotômetro com comprimento de onda 240 nm. O resultado foi expresso como U catalase/mg de proteína. O MDA foi avaliado pelo ensaio de TBARS segundo Wallin, (1993). O resultado foi expresso em nmol MDA/mg de proteína. Já para o dano

oxidativo às proteínas foi determinado a avaliação da carbonilação proteica de acordo pelo método de Levine *et al.*, (1990). O sobrenadante formado foi lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 370nm. O resultado foi expresso em nmol de proteína carbonilada/mL.

Análise marcadores inflamatórios no cérebro (CBA)

Para análise das citocinas no homogenato de cérebro foi utilizado o Kit CBA (BD Cytometric Beads Array Mouse Inflammation) seguindo as instruções do fabricante. As citocinas quantificadas foram a IL-12p70, IFN γ , TNF, MCP-1, IL-10, IL-6. A determinação da concentração das citocinas foi realizada através da citometria de fluxo na quantificação de intensidades de fluorescência distintas (FACSVERSE, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). A quantificação em pg/ml de cada citocina foi baseada em uma curva padrão realizada com concentrações conhecidas. Os dados gerados pela análise foram analisados no software FlowJo v.10.

Extração e Dosagem dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta no Intestino Delgado e no Cérebro

Os ácidos orgânicos foram extraídos segundo metodologia proposta por Siegfried (1984) e a concentração foi quantificada por HPLC em cromatógrafo UltiMate 3000 (DIONEX, Alemanha). Vinte microlitros de amostra foram injetados e passaram por uma coluna de troca iônica Rezex (00H-0138-K0 300 \times 7,8 mm, Phenomenex) com H₂SO₄ 5 mM como eluente a 0,7 mL/min, a 40 °C. O detector usado foi de índice de refração a 40°C (RI-101, Shodex). A concentração dos ácidos graxos foi determinada de acordo com a curva padrão dos ácidos acético, propiônico e butírico e o resultado expresso em μ mol do ácido graxo/g de tecido.

Análises Estatísticas

A análise estatística dos dados foi realizada primeiramente pela determinação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparação entre os grupos experimentais nos casos de distribuição paramétrica foi utilizado o teste t não pareado. Nos casos de distribuição não paramétrica foi realizado o teste de Mann-Whitney.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism* (*GraphPad Software, San Diego, CA*), versão 6.0, assumindo um $p < 0,05$ para diferenças estatísticas. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão da média.

Resultados

Peso corporal e tecidual dos animais experimentais

Os animais dos dois grupos experimentais demonstraram uma perda de peso média de $1,73 \pm 0,39$ g (KEF) e $1,87 \pm 0,28$ g (CON) quando se compara o início e o final da intervenção. Entretanto, essa perda de peso não obteve significância estatística entre os grupos experimentais. Da mesma forma, em relação aos tecidos utilizados, cérebro e intestino delgado, também não houve diferença no peso entre os grupos (dados não mostrados).

Avaliação do uso do kefir no escore histopatológico

Na avaliação do escore histopatológico do intestino delgado (Figura 3A) e no parâmetro gravidade da inflamação (Figura 3B) houve diferença significativa entre os grupos experimentais. Nas fotomicrografias avaliadas pode-se observar que o tratamento com kefir preservou o aspecto fisiológico tecidual (Figura 3E/F) mantendo as vilosidades homogêneas e menores focos de infiltrados inflamatórios. Em contrapartida, no grupo controle verifica-se a presença de danos teciduais e grandes focos de infiltrado inflamatório entre o epitélio intestinal e a lâmina própria (Figura 3G/H).

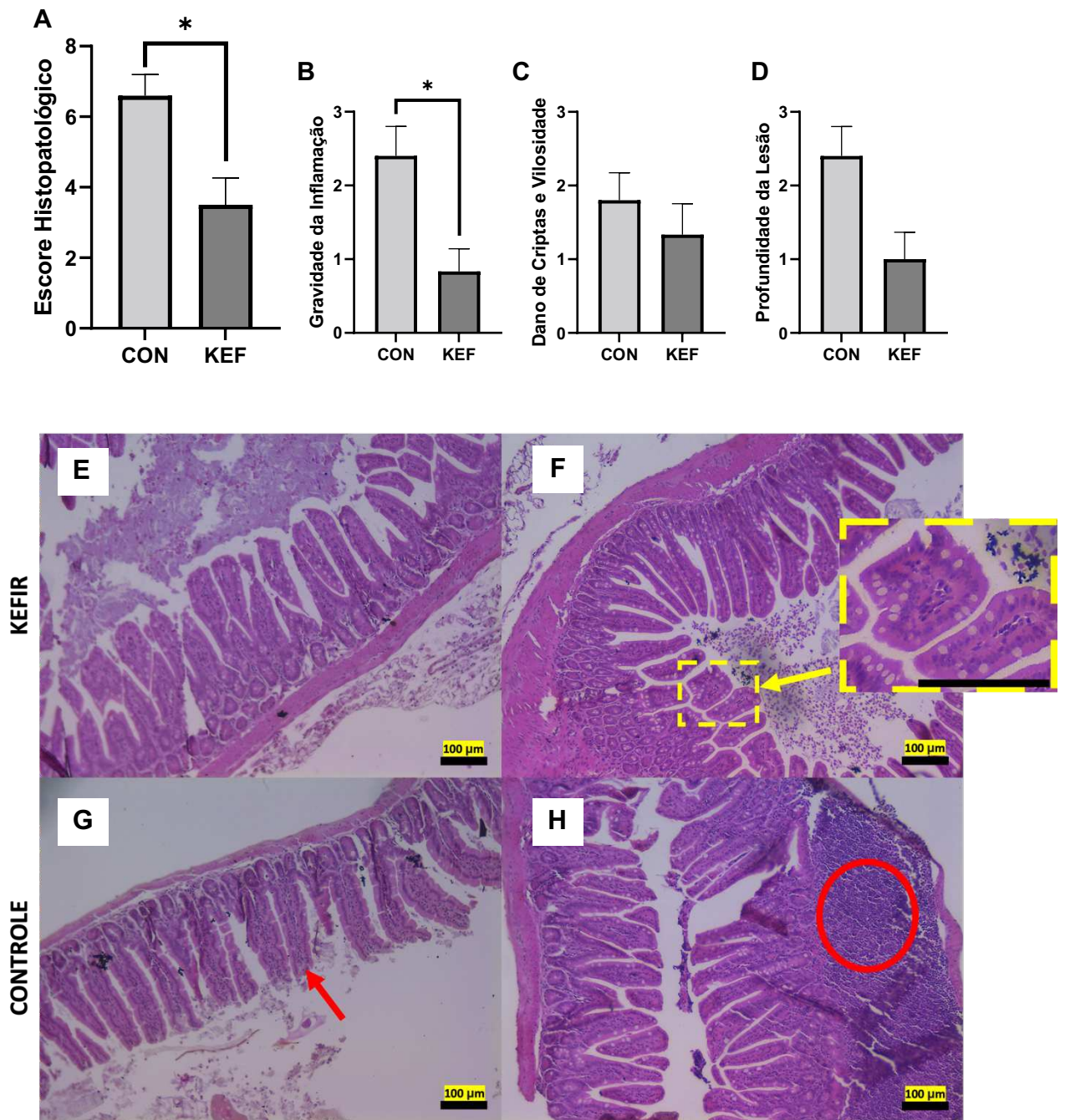


Figura 3 – Escore histopatológico. A: pontuação total do escore histopatológico; B: gravidade da inflamação; C: dano de criptas e vilosidades; D: profundidade da lesão. Valores expressos em média \pm erro padrão da média. * indica $p < 0,05$ demonstrando diferença estatística por Mann-Whitney ou teste t não pareado. Fotomicrografia do intestino delgado de camundongos C57BL/6J IL10^{-/-} coradas com HE. E: vilosidades e criptas preservadas; F: células caliciformes evidentes e ampliadas; G: vilosidade danificada e redução de células caliciformes; H: presença de infiltrado inflamatório. Seta amarela: células caliciformes. Seta vermelha: achatamento e dano a vilosidade. Círculo vermelho: infiltrado inflamatório. Objetiva 10X.

Efeito do uso do kefir na histomorfometria intestinal e na contagem de células caliciformes

Todas as variáveis histomorfométricas apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 4). A área de superfície de vilosidade, $55928 \pm 3112 \mu\text{m}^2$ e $41354 \pm 1856 \mu\text{m}^2$; altura de vilosidade, $275,1 \pm 9,95 \mu\text{m}$ e $234,3 \pm 7,01 \mu\text{m}$; largura de vilosidade, $62,64 \pm 1,69 \mu\text{m}$ e $55,45 \pm 1,39 \mu\text{m}$; profundidade de cripta, $90,09 \pm 2,59 \mu\text{m}$ e $68,99 \pm 2,63 \mu\text{m}$ nos grupos kefir e controle, respectivamente. A contagem de células caliciformes foi outra variável avaliada entre os grupos e que também demonstrou diferença estatística. O grupo KEF possuiu média de contagem de $10,26 \pm 0,32$ células caliciformes por vilosidade, já o grupo CON apresentou uma média de $6,02 \pm 0,1$ (Figura 4B).

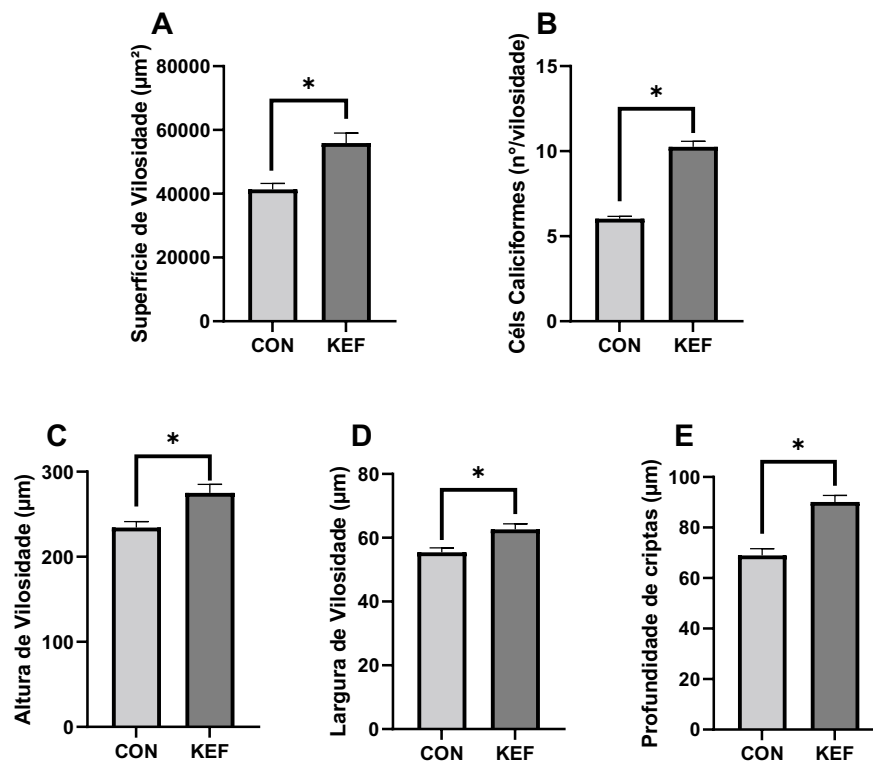


Figura 4 – Avaliação do uso de kefir nas variáveis histomorfométricas do intestino delgado de camundongos $\text{IL10}^{-/-}$. Célis: células. (A) Área de superfície de vilosidade; (B) Contagem de células caliciformes; (C) Altura de vilosidade; (D) Largura de vilosidade; (E) Profundidade de criptas. Valores expressos em média \pm erro padrão da média. * indica diferença estatística $p < 0,05$ por Mann-Whitney.

Expressão dos genes inflamatórios no intestino delgado por análise rtPCR

As expressões dos genes *arg*, *ccl2*, *inos*, *nf-kb* e *tnf* não apresentaram diferença estatística entre os grupos experimentais.

Efeito do uso do kefir na modulação do estresse oxidativo no intestino delgado e no cérebro

Houve uma redução da atividade de SOD e CAT no intestino delgado e no cérebro dos animais tratados com kefir (Tabela 2). No entanto, não foi identificada diferença entre os grupos experimentais nas concentrações dos produtos de oxidação de macromoléculas, MDA e proteína carbonilada, no tecido cerebral dos animais.

Tabela 2: Efeito do uso do kefir nos produtos de oxidação de macromoléculas no cérebro e atividade de enzimas antioxidantes no intestino delgado e cérebro de camundongos IL10^{-/-}.

	CON	KEF	<i>p</i>
<i>SOD (U/mg de proteína)</i>			
Intestino Delgado	22,78±1,75	15,82±1,57	0,0147 [§]
Cérebro	4,34±0,48	3,09±0,37	0,0206*
<i>CAT (U/mg de proteína)</i>			
Intestino Delgado	2,58±0,45	1,52±0,29	0,0499*
Cérebro	0,27±0,02	0,17±0,01	0,0046 [§]
<i>MDA (nmol/mg de proteína)</i>			
Cérebro	4,37±0,68	4,65±0,53	0,9314*
<i>Ptn Carbonilada (nmol/mL)</i>			
Cérebro	5,15±0,69	5,52±0,77	0,7278 [§]

MDA: malondialdeído; Ptn: proteína; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase. Valores expressos em média ± erro padrão da média. *p*<0,05 indica diferença estatística. *Mann-Whitney test [§]teste t não pareado.

Avaliação do uso do kefir nas concentrações de citocinas inflamatórias cerebrais (BD™ Cytometric Bead Array Mouse Inflammation)

As concentrações das citocinas IL-12p70, IFN γ , TNF, IL-10, IL-6 e MCP1 no cérebro não foram detectadas na amostra (dados não mostrados).

Efeito do uso do kefir nas concentrações de AGCC no intestino delgado e cérebro

O grupo que recebeu kefir apresentou aumento significativo nas concentrações de ácido acético e butírico no intestino delgado em comparação ao grupo controle (Figura 5).

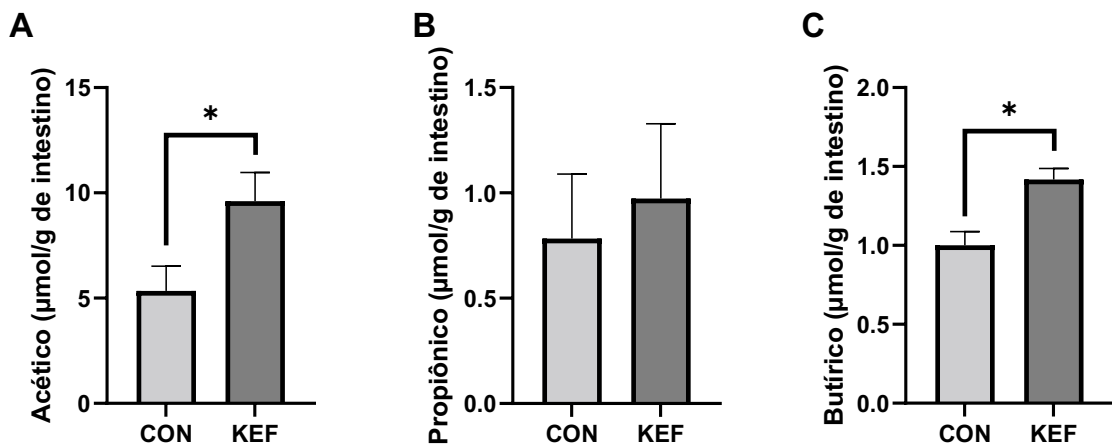


Figura 5 – Avaliação do uso de kefir nas concentrações de AGCC no intestino delgado de camundongos IL10^{-/-}. (A) Acético; (B) Propiônico; (C) Butírico. Valores expressos em média \pm erro padrão da média. * indica diferença estatística $p < 0,05$ diferença estatística por teste t não pareado.

Entretanto, não foi encontrada diferença entre os grupos experimentais na concentração de ácidos graxos de cadeia curta no cérebro (Figura 6).

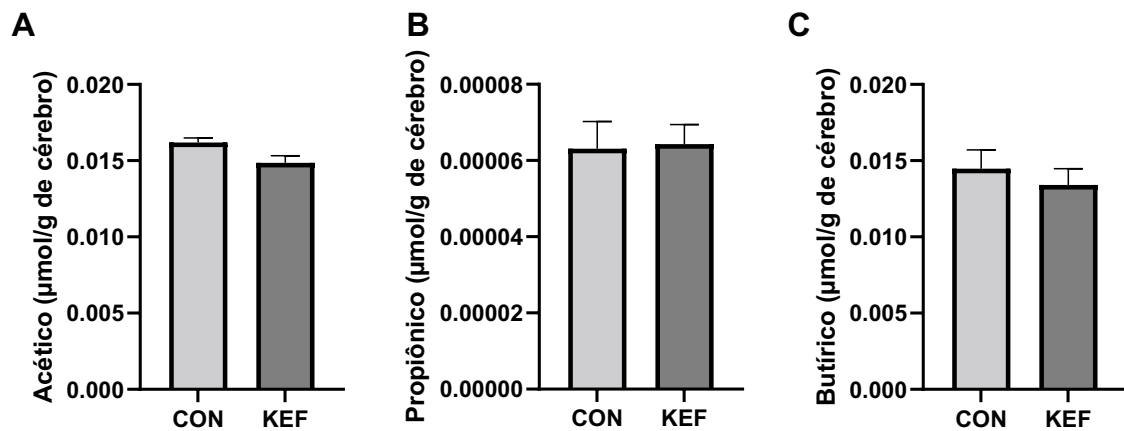


Figura 6 – Avaliação do uso de kefir nas concentrações de AGCC no cérebro de camundongos $IL10^{-/-}$. (A) Acético; (B) Propiônico; (C) Butírico. Valores expressos em média \pm erro padrão da média.

Discussão

A microbiota intestinal possui relação com o cérebro através do eixo intestino-cérebro, já sendo essa relação demonstrada em condições neurológicas como doença de Alzheimer, Parkinson, ansiedade e depressão. Essa relação se dá pela capacidade da microbiota intestinal modular direta e indiretamente a morfologia e função cerebral (CALVANI *et al.*, 2018; WRONKA *et al.*, 2023).

Os probióticos com capacidade de atuar no SNC são chamados psicobióticos (SARKAR *et al.*, 2016). Atualmente, o kefir já é considerado um psicobiótico com atividade moduladora central, evidenciado num estudo em idosos com Alzheimer, onde o tratamento reduziu a inflamação e o estresse oxidativo (TON *et al.*, 2020). Além disso, o uso de peptídeos do kefir em camundongo apresentou resposta semelhante a antidepressivos no comportamento e expressão de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (CHEN *et al.*, 2021).

Em modelo animal, já tenta-se desvendar a conexão do kefir nesse eixo. Em modelo experimental de hipertensão espontânea, o kefir melhorou a integridade estrutural e funcional da barreira intestinal, reduzindo a ativação de micróglia e protegendo contra a neuroinflamação (SILVA *et al.*, 2020). Em modelo experimental

de desordem do espectro autista, o uso de kefir obteve melhora das disfunções comportamentais pela modulação da imunidade periférica, principalmente por aumentar células Treg nos nódulos linfáticos mesentéricos (VAN DE WOUW *et al.*, 2020).

Entretanto, existe uma carência de estudos quando se investiga o uso do kefir como psicobiótico em modelo de doença inflamatória intestinal espontânea pela ausência de IL10. Por isso, nesse estudo pretendeu-se preencher essa lacuna utilizando camundongos IL10^{-/-} tratados por 4 semanas com kefir de leite.

Após as 4 semanas de intervenção os animais mesmo com dieta e água *ad libitum* apresentaram uma redução do peso corporal independente do grupo. O que não corrobora com um estudo utilizando levedura isolada do kefir em modelo de colite induzido por dextran sulfato de sódio (DSS) desafiado infecciosamente. Na colite induzida por DSS o tratamento reduziu a perda de peso, diminuiu o índice de atividade da doença e aumentou o número de células de caliciformes por vilosidade (ZENG *et al.*, 2022). Além disso, um outro estudo utilizando uma espécie de *Lactobacillus plantarum* em camundongo IL10^{-/-} observou aumento do peso e redução do escore de inflamação em comparação ao grupo controle IL10^{-/-} (CHEN *et al.*, 2017). O tratamento com essa mesma espécie, *L. plantarum*, também aumentou o peso, reduziu o escore de inflamação e aumentou a expressão de proteínas de junções (ZO-1, claudin-1 e occludin) (CHEN *et al.*, 2010). Uma outra combinação de probiótico, também em modelo IL10^{-/-}, reduziu o escore de ativação da colite e preveniu a perda de peso (SHI *et al.*, 2014).

Nesse estudo, entretanto, embora não tenha sido observado alteração de peso entre os grupos, ressalta-se que o grupo experimental apresentou redução do escore histopatológico, principalmente relacionado com redução dos focos inflamatórios intestinais (figura 3A e 3B), melhor integridade intestinal com maior contagem de células caliciformes (figura 4) e maior concentração de ácidos graxos de cadeia curta no intestino (figura 5). Esses parâmetros correspondem ao aspecto fisiológico intestinal normal, o que é frequentemente associado a melhor absorção e controle imune local por reduzir a susceptibilidade a infecção e translocação de antígenos (DU *et al.*, 2022).

Um estudo utilizando probióticos em camundongo IL10^{-/-} atenuou a colite pela redução do escore histopatológico, resultado semelhante ao encontrado no nosso estudo (MCCARTHY *et al.*, 2003). Em camundongo C57BL/6J IL10^{-/-}, a suplementação de 1x10⁹ *Lactobacillus salivarius ssp. salivarius* UCC118 por dia por 16 semanas foi associado com uma menor atividade inflamatória da doença intestinal (O'MAHONY *et al.*, 2001). Este estudo, corrobora com os achados no nosso estudo, mesmo com período mais curto de tratamento.

Outro estudo com a suplementação por 14 dias de *Lactobacillus kefiranofaciens* M1, isolado do kefir de leite, em modelo experimental de colite induzido por DSS, demonstrou um melhor resultado histológico, redução da inflamação, reduziu a depleção de células caliciformes e preveniu distúrbios na arquitetura da mucosa, prevenindo o aumento da permeabilidade do epitélio, reduzindo o escore histológico e melhorando a regeneração epitelial. Esses resultados foram correlacionados com o aumento da expressão de IL10 e uma diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias mediadas através do TLR2 (CHEN *et al.*, 2012).

A IL10 é uma citocina regulatória chave tanto no intestino como no SNC, inibindo a resposta inflamatória excessiva, além de possuir interferência no comportamento dos animais (YANG *et al.*, 2021). Apesar de não haver encontrado resultado significativo nas análises das citocinas inflamatórias, nosso grupo demonstrou anteriormente que em camundongos selvagens (C57BL/6J) houve diferença nos resultados da expressão gênica de marcadores inflamatórios apenas quando comparado animais que possuíam a IL10 com os animais nocautes, demonstrando a função da IL10 na regulação dessa homeostase (dados ainda não publicados).

No que se refere às enzimas antioxidantes, houve uma redução similar no intestino e no cérebro, demonstrando um menor estresse oxidativo pela redução da atividade de CAT e SOD em comparação ao grupo controle (tabela 2). Espécies reativas de oxigênio e radicais livres podem causar danos a macromoléculas por conta da sua reatividade (GHONEUM; ABDULMALEK; PAN, 2020). Essa reatividade se dá por essas substâncias possuírem um elétron desemparelhado em sua última camada, conferindo-as alto poder de oxidação de macromoléculas, como proteínas, gorduras e ácidos nucleicos. Uma das consequências mais bem descritas do aumento do estresse oxidativo é o aumento da peroxidação lipídica (CLARKSON; THOMPSON,

2000). Vale ressaltar que o estresse oxidativo é um indicador da inflamação no intestino delgado afetado por DII (FRANZOSA *et al.*, 2019; LIH-BRODY *et al.*, 1996).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) resulta em destruição tecidual nas DII, submetendo a mucosa intestinal a um estado pró-oxidante contínuo (KRUIDENIER *et al.*, 2003). Neste estudo, não foi observado aumento de MDA e proteína carbonilada no cérebro quando comparado aos grupos experimentais. Todavia, a produção de MDA em outros órgãos foi reduzida em camundongos tratados com kefir (GÜ VEN; VEN; GÜ LMEZ, 2003). Outro estudo corroborando com essa ideia encontrou um aumento da capacidade antioxidante total no soro e redução de MDA no intestino delgado no grupo tratado com kefir (ERDOGAN *et al.*, 2019).

Demonstrou-se nesse estudo que o grupo tratado com kefir apresentou uma redução da atividade de SOD e CAT no intestino delgado e no cérebro dos animais. A justificativa por trás dessa redução é a de que sistemas antioxidantes se tornam ativados quando há um aumento de ROS (CLARKSON; THOMPSON, 2000; SATISH KUMAR *et al.*, 2012). Portanto, pelo grupo tratado com kefir apresentar uma redução da atividade de SOD e CAT considera-se que obteve maior efeito antioxidante proveniente do kefir, não havendo necessidade da ativação da maquinaria enzimática. O que corrobora com dados na literatura que demonstra como o kefir possui função antioxidante com potencial de reduzir a produção de radicais livres (TON *et al.*, 2020). Resultado semelhante foi encontrado por Satish Kumar *et al.*, (2012) onde o probiótico utilizado foi associado com uma menor atividade de SOD e CAT por sua capacidade não enzimática de eliminação de ROS.

Outro resultado interessante deste estudo foi o aumento na concentração de ácido acético e butírico no intestino, o que traz indícios de que o kefir conseguiu reverter a disbiose presente na DII e, conseqüentemente, revelar todos os benefícios relacionados ao butirato e ao estado de eubiose. A disbiose presente em indivíduos com DII reduz a diversidade bacteriana e prevalência de bactérias produtoras de butirato (MASANETZ *et al.*, 2022; TAKAHASHI *et al.*, 2016). Os AGCC podem modular a atividade inibitória de histonas desacetilases, a expressão gênica, a proliferação celular e a resposta imune. O butirato, especialmente, pode proteger contra a colite, regulando a produção de células Treg e aumentando a atividade antibacteriana dos macrófagos. Nas fezes de pacientes com DII há uma diminuição de AGCC (HANEISHI *et al.*, 2023), em especial de bactérias produtoras de butirato e, conseqüentemente,

de butirato, importante na modulação do sistema imunológico (ANDOH; NISHIDA, 2023; FRANZOSA *et al.*, 2019).

Sabe-se que um dos eixos de comunicação da microbiota intestinal com o SNC é via AGCC (FUNG; OLSON; HSIAO, 2017). Essas substâncias possuem funções intra e extra-intestinais já descritas. No intestino, suas funções vão desde a preservação da barreira e epitélio intestinal até a regulação da resposta inflamatória e da produção de muco (SWER *et al.*, 2022). No SNC, seu papel em manter uma boa saúde cerebral se dá pela capacidade de modular a maturação e função das células imunes residentes (DALILE *et al.*, 2019), em especial na maturação, morfologia e função da micróglia (ERNY *et al.*, 2015) além de atuar, também, na estabilidade da barreira hematoencefálica (MIRZAEI *et al.*, 2021).

Além disso, o estudo de Du e colaboradores em 2022 demonstrou que a suplementação com kefir foi capaz de modular a microbiota intestinal, aumentando principalmente a diversidade de bactérias produtoras de AGCC, proteínas de junções e mucinas (DU *et al.*, 2022). Em nosso estudo, o grupo tratado com kefir apresentou concentrações superiores de AGCC no intestino delgado, provavelmente pelo aumento na produção dessas substâncias no intestino. O fato dos AGCC serem fatores tróficos de enterócitos (MARTIN-GALLAUSIAUX *et al.*, 2021) pode ter sido o principal motivo pelo qual observamos um menor escore de inflamação, um epitélio mais íntegro, uma função histológica mais bem preservada e uma maior quantidade de células caliciformes.

Vale ressaltar que não foi observado diferença nas concentrações de AGCC cerebral. Entretanto, acredita-se que a maior parte dos AGCC produzidos no intestino são utilizados pelos enterócitos, o pouco restante é direcionado para o músculo e fígado. Além disso, permanece incerto, também, se os AGCC conseguem atravessar a barreira hematoencefálica (SARKAR *et al.*, 2016). Outro ponto que também pode ser considerado é o tempo de intervenção, talvez um maior período de intervenção poderia levar às alterações no sistema nervoso central.

A doença inflamatória intestinal afeta a regulação do sistema imune produzindo uma resposta imune anormal, a qual gera um aumento da permeabilidade intestinal e, portanto, gatilho para inflamação em indivíduos susceptíveis (MAH *et al.*, 2023). A inflamação intestinal pode resultar em disfunção por meio de mecanismos envolvendo

a microbiota intestinal, o que resulta em resposta inflamatória e estresse oxidativo no SNC, culminando em dano neuronal (BERCIK *et al.*, 2010; MASANETZ *et al.*, 2022; MICHIELAN; D'INCÀ, 2015). No nosso estudo, o tratamento com kefir conseguiu preservar a histomorfometria intestinal, a contagem de células caliciformes e reduzir o estresse oxidativo tanto no intestino como no cérebro, em modelo de DII espontâneo, por mecanismo independente da IL10. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar qual o mecanismo exato pelo qual o kefir gerou esses resultados.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos sugere-se que o kefir, em modelo de doença inflamatória intestinal espontânea na ausência de IL10, foi capaz de (1) reduzir a ativação da DII, pela redução do dano tecidual e modulação da inflamação intestinal; (2) preservar a morfometria intestinal estimulando o trofismo tecidual e evitando a depleção de células caliciformes por aumentar a concentração de AGCC; (3) regular o estresse oxidativo no intestino e no cérebro pela redução da atividade de SOD e CAT o qual está relacionado com o menor risco de diversas doenças no SNC. Assim, verifica-se o potencial do uso do kefir na redução do risco de doenças inflamatórias intestinais e em condições que aumentam o estresse oxidativo no cérebro.

Agradecimentos

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, (<http://www.nmm.ufv.br/>) pela disponibilidade dos equipamentos e suporte técnico para experimentos envolvendo Citometria de Fluxo. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) pela bolsa do mestrado (processo nº 132064/2021-9) e bolsa de produtividade em pesquisa (processo nº 303511/2019-2).

Referências Bibliográficas

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods of Enzimology**, v. 105, p. 121–127, 1984.

AGARWAL, N.; SHUKLA, V.; KOLBA, N.; JACKSON, C.; CHENG, J.; PADILLA-ZAKOUR, O. I.; TAKO, E. Comparing the Effects of Concord Grape (*Vitis labrusca* L.) Puree, Juice, and Pomace on Intestinal Morphology, Functionality, and Bacterial Populations In Vivo (*Gallus gallus*). **Nutrients**, v. 14, n. 17, 1 set. 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Ministério da Saúde. **Resolução RDC Nº 2, de 7 de janeiro de 2002**. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticas isoladas com alegação de propriedades funcional ou de saúde. Brasília, 2008.

ANDOH, A.; NISHIDA, A. Alteration of the Gut Microbiome in Inflammatory Bowel Disease. **Digestion**, v. 104, n. 1, p. 16–23, 1 jan. 2023.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (DISPOA). **Instrução Normativa nº 62**, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União, Brasília, 2003.

BERCIK, P.; VERDU, E. F.; FOSTER, J. A.; MACRI, J.; POTTER, M.; HUANG, X.; MALINOWSKI, P.; JACKSON, W.; BLENNERHASSETT, P.; NEUFELD, K. A.; LU, J.; KHAN, W. I.; CORTHESTHEULAZ, I.; CHERBUT, C.; BERGONZELLI, G. E.; COLLINS, S. M. Chronic gastrointestinal inflammation induces anxiety-like behavior and alters central nervous system biochemistry in mice. **Gastroenterology**, v. 139, n. 6, p. 2102–2112, 2010.

CALVANI, R.; PICCA, A.; LO MONACO, M. R.; LANDI, F.; BERNABEI, R.; MARZETTI, E. Of microbes and minds: A narrative review on the second brain aging. **Frontiers in Medicine**, 1 mar. 2018.

CARSON, F. L.; MARTIN, J. H.; LYNN, J. A. Formalin Fixation for Electron Microscopy: A Re-evaluation. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 59, n. 3, p. 365–373, 1973.

CHEN, H. L.; LAN, Y. W.; TU, M. Y.; TUNG, Y. T.; CHAN, M. N. Y.; WU, H. S.; YEN, C. C.; CHEN, C. M. Kefir peptides exhibit antidepressant-like activity in mice through the BDNF/TrkB pathway. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 6, p. 6415–6430, 1 jun. 2021.

CHEN, H.; XIA, Y.; ZHU, S.; YANG, J.; YAO, J.; DI, J.; LIANG, Y.; GAO, R.; WU, W.; YANG, Y.; SHI, C.; HU, D.; QIN, H.; WANG, Z. *Lactobacillus plantarum* LP-Only alters the gut flora and attenuates colitis by inducing microbiome alteration in interleukin-10 knockout mice. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 5, p. 5979–5985, 1 nov. 2017.

CHEN, H.-Q.; YANG, J.; ZHANG, M.; ZHOU, Y.-K.; SHEN, T.-Y.; CHU, Z.-X.; ZHANG, M.; HANG, X.-M.; JIANG, Y.-Q.; QIN, H.-L.; LACTOBACILLUS, Q. H. *Lactobacillus plantarum* ameliorates colonic epithelial barrier dysfunction by modulating the apical

junctional complex and PepT1 in IL-10 knockout mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 299, p. 1287–1297, 2010.

CHEN, Y. P.; HSIAO, P. J.; HONG, W. S.; DAI, T. Y.; CHEN, M. J. Lactobacillus kefiranofaciens M1 isolated from milk kefir grains ameliorates experimental colitis in vitro and in vivo. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 1, p. 63–74, jan. 2012.

CLARKSON, P.; THOMPSON, H. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **Am J Clin Nutr**, v. 72(suppl), p. 637S–46S, 2000.

CRUZ, B. C. dos Santos. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO USO DE PROBIÓTICO E SIMBIÓTICO NA CARCINOGENESE COLORRETAL INDUZIDA POR 1,2-DIMETILHIDRAZINA EM CAMUNDONGOS. 2018.

COHEN, S. L.; MOORE, A. M.; WARD, W. E. Interleukin-10 Knockout Mouse: A Model for Studying Bone Metabolism During Intestinal Inflammation. **Inflamm Bowel Dis**, v. 10, n. 5, p. 557–563, 2004.

DALILE, B.; VAN OUDENHOVE, L.; VERVLIET, B.; VERBEKE, K. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 8, p. 461–478, 2019.

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, p. 33–39, 2000.

DOROSZKIEWICZ, J.; GROBLEWSKA, M.; MROCZKO, B. The role of gut microbiota and gut–brain interplay in selected diseases of the central nervous system. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, 2 set. 2021.

DU, G.; CHANG, S.; GUO, Q.; YAN, X.; CHEN, H.; SHI, K.; YUAN, Y.; YUE, T. Protective effects of Tibetan kefir in mice with ochratoxin A-induced cecal injury. **Food Research International**, v. 158, 1 ago. 2022.

ERDOGAN, F. S.; OZARSLAN, S.; GUZEL-SEYDIM, Z. B.; KÖK TAŞ, T. The effect of kefir produced from natural kefir grains on the intestinal microbial populations and antioxidant capacities of Balb/c mice. **Food Research International**, v. 115, p. 408–413, 1 jan. 2019.

ERNY, D.; DE ANGELIS, A. L. H.; JAITIN, D.; WIEGHOFER, P.; STASZEWSKI, O.; DAVID, E.; KEREN-SHAUL, H.; MAHLAKOIV, T.; JAKOBSHAGEN, K.; BUCH, T.; SCHWIERZECK, V.; UTERMÖHLEN, O.; CHUN, E.; GARRETT, W. S.; MCCOY, K. D.; DIEFENBACH, A.; STAEHELI, P.; STECHER, B.; AMIT, I.; PRINZ, M. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 965–977, 25 jun. 2015.

FRANZOSA, E. A.; SIROTA-MADI, A.; AVILA-PACHECO, J.; FORNELOS, N.; HAISER, H. J.; REINKER, S.; VATANEN, T.; HALL, A. B.; MALLICK, H.; MCIVER, L. J.; SAUK, J. S.; WILSON, R. G.; STEVENS, B. W.; SCOTT, J. M.; PIERCE, K.; DEIK, A. A.; BULLOCK, K.; IMHANN, F.; PORTER, J. A.; ZHERNAKOVA, A.; FU, J.; WEERSMA, R. K.; WIJMENGA, C.; CLISH, C. B.; VLAMAKIS, H.; HUTTENHOWER,

C.; XAVIER, R. J. Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 293–305, 1 fev. 2019.

FUNG, T. C.; OLSON, C. A.; HSIAO, E. Y. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 145–155, 2017.

GHONEUM, M.; ABDULMALEK, S.; PAN, D. Reversal of age-associated oxidative stress in mice by PFT, a novel kefir product. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 34, 2020.

GÜ VEN, A.; VEN, A. G.; GÜ LMEZ, M. The Effect of Kefir on the Activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO Levels in Carbon Tetrachloride-Induced Mice Tissues. **J. Vet. Med. B**, v. 50, p. 412–416, 2003.

HANEISHI, Y.; FURUYA, Y.; HASEGAWA, M.; PICARELLI, A.; ROSSI, M.; MIYAMOTO, J. Inflammatory Bowel Diseases and Gut Microbiota. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, p. 3817, 14 fev. 2023.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

IP, W. K. E.; HOSHI, N.; SHOUVAL, D. S.; SNAPPER, S.; MEDZHITOV, R. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. **Science**, v. 356, n. 6337, p. 513–519, 2017.

KAPLAN, G. G.; NG, S. C. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, v. 152, n. 2, p. 313- 321.e2, 1 fev. 2017.

KENNEDY, R. J.; HOPER, M.; DEODHAR, K.; ERWIN, P. J.; KIRK, S. J.; GARDINER, K. R. Interleukin 10-deficient colitis: new similarities to human inflammatory bowel disease. **British Journal of Surgery**, v. 87, p. 1346–1351, 2000.

KRUIDENIER, L.; KUIPER, I.; VAN DUIJN, W.; MARKLUND, S. L.; VAN HOGZAND, R. A.; LAMERS, C. B. H. W.; VERSPAGET, H. W. Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. **Journal of Pathology**, v. 201, n. 1, p. 7–16, 1 set. 2003.

LARABI, A.; BARNICH, N.; NGUYEN, H. T. T. New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD. **Autophagy**, v. 16, n. 1, p. 38–51, 2020.

LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.-G.; AHN, B.-W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 464–478, 1990.

LIH-BRODY, L.; POWELL, S. R.; COLLIER, K. P.; REDDY, G. M.; CERCHIA, R.; KAHN, E.; WEISSMAN, G. S.; KATZ, S.; FLOYD, R. A.; MCKINLEY, M. J.; FISHER,

S. E.; MULLIN, G. E. Increased Oxidative Stress and Decreased Antioxidant Defenses in Mucosa of Inflammatory Bowel Disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 41, n. 10, p. 2078–2086, 1996.

LOWRY, H. , R. N. J. , F. A. L. , & R. R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

MAH, C.; JAYAWARDANA, T.; LEONG, G.; KOENTGEN, S.; LEMBERG, D.; CONNOR, S. J.; ROKKAS, T.; GRIMM, M. C.; LEACH, S. T.; HOLD, G. L. Assessing the Relationship between the Gut Microbiota and Inflammatory Bowel Disease Therapeutics: A Systematic Review. **Pathogens**, v. 12, n. 2, p. 262, 6 fev. 2023.

MAPA. Ministério do Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Resolução RDC nº 44, de 15 de dezembro de 2015**. Altera o Art. 1º Os Anexos I, II e III da Instrução Normativa nº 13, de 30 de novembro de 2004. Brasília, 2015.

MARTIN-GALLAUSIAUX, C.; MARINELLI, L.; BLOTTIÈRE, H. M.; LARRAUFIE, P.; LAPAQUE, N. SCFA: Mechanisms and functional importance in the gut. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 80, n. 1, p. 37–49, 1 fev. 2021.

MASANETZ, R. K.; WINKLER, J.; WINNER, B.; GÜNTHER, C.; SÜSS, P. The Gut–Immune–Brain Axis: An Important Route for Neuropsychiatric Morbidity in Inflammatory Bowel Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, 1 out. 2022.

MCCARTHY, J.; SHEIL, B.; VAUGHAN, E. E.; FITZSIMONS, N.; FITZGIBBON, J.; KIELY, B.; COLLINS, J. K.; SHANAHAN, F. Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. **Gut**, v. 53, p. 975–980, 2003.

MERA, R.; THOMPSON, H.; PRASAD, C. How to Calculate Sample Size for an Experiment: A Case-Based Description. **Nutritional Neuroscience**, v. 1, n. 1, p. 87–91, 1998.

MICHIELAN, A.; D’INCÀ, R. Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

MIRZAEI, R.; BOUZARI, B.; HOSSEINI-FARD, S. R.; MAZAHERI, M.; AHMADYUSEFI, Y.; ABDI, M.; JALALIFAR, S.; KARIMITABAR, Z.; TEIMOORI, A.; KEYVANI, H.; ZAMANI, F.; YOUSEFIMASHOUF, R.; KARAMPOOR, S. Role of microbiota-derived short-chain fatty acids in nervous system disorders. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 139, 1 jul. 2021.

NISHIDA, A.; INOUE, R.; INATOMI, O.; BAMBA, S.; NAITO, Y.; ANDOH, A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Clinical Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 1, 1 fev. 2018.

O’MAHONY, L.; FEENEY, M.; O’HALLORAN, S.; MURPHY, L.; KIELY, B.; FITZGIBBONÀ, J.; LEEÀ, G.; O’SULLIVAN, G.; SHANAHAN±, F.; COLLINS, J. K. Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 15, p. 1219–1225, 2001.

PELUZIO, M. do C. G.; DIAS, M. de M. e.; MARTINEZ, J. A.; MILAGRO, F. I. Kefir and Intestinal Microbiota Modulation: Implications in Human Health. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, 2021.

REIS, S. A. Efeito do consumo de kefir de leite integral sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas intestinais em ratos Wistar. 2015.

ROSA, D. D. Lesões pré-neoplásicas, perfil lipídico, marcadores inflamatórios e aspecto histológico intestinal de ratos Wistar alimentados com dietas à base de diferentes óleos. Viçosa, 2012.

ROSA, D. D.; DIAS, M. M. S.; GRZEŚKOWIAK, Ł. M.; REIS, S. A.; CONCEIÇÃO, L. L.; PELUZIO, M. D. C. G. Milk kefir: Nutritional, microbiological and health benefits. **Nutrition Research Reviews**, v. 30, n. 1, p. 82–96, 1 jun. 2017.

SARKAR, A.; LEHTO, S. M.; HARTY, S.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F.; BURNET, P. W. J. Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria–Gut–Brain Signals. **Trends in Neurosciences**, v. 39, n. 11, p. 763–781, 1 nov. 2016.

SATISH KUMAR, R.; KANMANI, P.; YUVARAJ, N.; PAARI, K. A.; PATTUKUMAR, V.; THIRUNAVUKKARASU, C.; ARUL, V. Lactobacillus plantarum AS1 isolated from South Indian fermented food Kallappam suppress 1,2-dimethyl hydrazine (DMH)-induced colorectal cancer in male wistar rats. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 3, p. 620–631, fev. 2012.

SHI, C. Z.; CHEN, H. Q.; LIANG, Y.; XIA, Y.; YANG, Y. Z.; YANG, J.; ZHANG, J. D.; WANG, S. H.; LIU, J.; QIN, H. L. Combined probiotic bacteria promotes intestinal epithelial barrier function in interleukin-10-gene-deficient mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 16, p. 4636–4647, 28 abr. 2014.

SIEGFRIED, R. ; R. H. ; S. G. Method for the determination of organic-acids in silage by high-performance liquid-chromatography. **Landwirtschaftliche Forschung**, v. 37, n. 3–4, p. 298–304, 1984.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. de A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. v. Blucher, p. 570, 2017.

SILVA, M. de A.; MOWRY, F. E.; PEADEN, S. C.; ANDRADE, T. U.; BIANCARDI, V. C. Kefir ameliorates hypertension via gut–brain mechanisms in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 77, 1 mar. 2020.

SWER, N. M.; VENKIDESH, B. S.; MURALI, T. S.; MUMBREKAR, K. D. Gut microbiota-derived metabolites and their importance in neurological disorders. **Molecular Biology Reports**, 1 fev. 2022.

TAKAHASHI, K.; NISHIDA, A.; FUJIMOTO, T.; FUJII, M.; SHIOYA, M.; IMAEDA, H.; INATOMI, O.; BAMBA, S.; ANDOH, A.; SUGIMOTO, M. Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn's Disease. **Digestion**, v. 93, n. 1, p. 59–65, 1 jan. 2016.

TON, A. M. M.; CAMPAGNARO, B. P.; ALVES, G. A.; AIRES, R.; CÔCO, L. Z.; ARPINI, C. M.; GUERRA E OLIVEIRA, T.; CAMPOS-TOIMIL, M.; MEYRELLES, S. S.;

PEREIRA, T. M. C.; VASQUEZ, E. C. Oxidative Stress and Dementia in Alzheimer's Patients: Effects of Synbiotic Supplementation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.

VAN DE WOUW, M.; WALSH, A. M.; CRISPIE, F.; VAN LEUVEN, L.; LYTE, J. M.; BOEHME, M.; CLARKE, G.; DINAN, T. G.; COTTER, P. D.; CRYAN, J. F. Distinct actions of the fermented beverage kefir on host behaviour, immunity and microbiome gut-brain modules in the mouse. **Microbiome**, v. 8, n. 1, 18 maio 2020.

VERA-SANTANDER, V. E.; HERNÁNDEZ-FIGUEROA, R. H.; JIMÉNEZ-MUNGUÍA, M. T.; MANI-LÓPEZ, E.; LÓPEZ-MALO, A. Health Benefits of Consuming Foods with Bacterial Probiotics, Postbiotics, and Their Metabolites: A Review. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1230, 27 jan. 2023.

WALLIN, B. et al. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. **Analytical Biochemistry**, v. 208, n. 1, p. 10–15, 1993.

WEISS, G. A.; HENNET, T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 16, p. 2959–2977, 2017.

WRONKA, D.; KARLIK, A.; MISIOREK, J. O.; PRZYBYL, L. What the Gut Tells the Brain—Is There a Link between Microbiota and Huntington's Disease? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, p. 4477, 24 fev. 2023.

YANG, L.; LIU, C.; LI, W.; MA, Y.; HUO, S.; OZATHALEY, A.; REN, J.; YUAN, W.; NI, H.; LI, D.; ZHANG, J.; LIU, Z. Depression-like behavior associated with E/I imbalance of mPFC and amygdala without TRPC channels in mice of knockout IL-10 from microglia. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 97, p. 68–78, 1 out. 2021.

ZENG, X.; LI, X.; YUE, Y.; WANG, X.; CHEN, H.; GU, Y.; JIA, H.; HE, Y.; YUAN, Y.; YUE, T. Ameliorative Effect of *Saccharomyces cerevisiae* JKSP39 on *Fusobacterium nucleatum* and Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis Mouse Model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 9 nov. 2022.

ZHENG, P.; ZENG, B.; ZHOU, C.; LIU, M.; FANG, Z.; XU, X.; ZENG, L.; CHEN, J.; FAN, S.; DU, X.; ZHANG, X.; YANG, D.; YANG, Y.; MENG, H.; LI, W.; MELGIRI, N. D.; LICINIO, J.; WEI, H.; XIE, P. Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. **Molecular Psychiatry**, v.

7. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos nesse trabalho corroboram com diversos estudos que vêm elucidando a cada dia mais a importância do kefir na saúde do intestino e do sistema nervoso central. Foi possível observar que o tratamento de 4 semanas com 0,4ml/d kefir de leite (6×10^8 UFC/ml de BAL e 10^6 UFC/ml de leveduras totais) em camundongos IL10^{-/-} proporcionou um maior benefício no escore histopatológico, na inflamação e histomorfometria intestinal, na contagem de células caliciformes e menor estresse oxidativo no intestino e no cérebro do que o grupo controle. Além disso, houve um aumento das concentrações de ácido butírico e acético no intestino, o que possivelmente foi um dos principais mecanismos que contribuiu com a melhora histomorfométrica e inflamatória do intestino.

Dessa forma, diante dos resultados obtidos, e pensando que essa bebida possui um baixo custo, encoraja-se o consumo regular de kefir nas doenças inflamatórias intestinais e em condições que aumentam o estresse oxidativo no cérebro. Deve-se ressaltar que esse estudo possui algumas limitações pelo fato de ser um estudo experimental, com um período curto de tratamento e sem análises comportamentais. Assim, mais estudos são necessários com o intuito de explorar melhor quais os mecanismos independentes de IL10 pelo qual o kefir proporcionou o efeito protetor no modelo de doença inflamatória intestinal.

8. ANEXO 1: Certificado Comitê de Ética

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 52/2019, intitulado “**Efeito do consumo de kefir de leite integral no desenvolvimento de doença inflamatória intestinal em camundongos Knockout IL-10**”, coordenado pela professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio do Departamento de Nutrição e Saúde, 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 19/11/2019, com validade de 4 anos.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 52/2019, named “**Effect of whole milk kefir consumption on the development of inflammatory bowel disease in Knockout IL-10 mice**”, 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 November 19, 2019 valid for 4 years.


Prof.ª Silvia Almeida Cardoso

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV