

IASMIM XISTO CAMPOS

**AVALIAÇÃO DO USO DE KEFIR DE LEITE INTEGRAL EM CAMUNDONGOS
COM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL ESPONTÂNEA**

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 Gouveia Peluzio

Coorientadora: Bruna Cristina dos Santos Cruz

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

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

T

C198u
2023
Campos, Iasmim Xisto, 1997-
Avaliação do uso de kefir de leite integral em camundongos
com doença inflamatória intestinal espontânea / Iasmim Xisto
Campos. – Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (66 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

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.2023.635>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Probióticos. 2. Kefir. 3. Intestinos - Doenças. 4. Doença
de Crohn. 5. Colite ulcerativa. I. Pelúzio, Maria do Carmo
Gouveia, 1958-. 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


IASMIM XISTO CAMPOS

**AVALIAÇÃO DO USO DE KEFIR DE LEITE INTEGRAL EM CAMUNDONGOS
COM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL ESPONTÂNEA**


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: 24 de julho de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **IASMIM XISTO CAMPOS**
Data: 24/10/2023 16:03:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Iasmim Xisto Campos
Autora

Documento assinado digitalmente
 **MARIA DO CARMO GOUVEIA PELUZIO**
Data: 25/10/2023 11:50:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Maria do Carmo Gouveia Peluzio
Orientadora

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença em todos os momentos da minha vida e por me guiar e cuidar nas dificuldades;

Aos meus pais, por batalharem sem medir esforços para proporcionar apoio, conforto, segurança e amor incondicional;

Às minhas irmãs, Isabella e Isadora, por confiarem no meu potencial e serem incentivadoras de todas as minhas conquistas;

Ao Kheyffad, pelo apoio, amor, paciência, compreensão e carinho diário, por sonhar comigo e ser meu porto seguro;

Aos meus familiares, que me mostram sempre a riqueza de ser amada e a importância de uma grande rede de apoio;

Aos meus amigos, que enxugaram meu choro nos momentos de cansaço e fizeram esse período mais leve, celebrando as pequenas conquistas. Agradeço à Ana Helena, pelo convívio diário, pelos incentivos e por ser minha companheira de tudo;

À minha orientadora Profa. Maria do Carmo Gouveia Peluzio, pelos conselhos, amizade e confiança. Agradeço pelos ensinamentos e por garantir que concluísse mais uma etapa sob sua orientação;

À minha co-orientadora Profa. Bruna Cristina dos Santos Cruz, por ser minha referência de profissional e pela orientação;

Aos meus amigos de LABIN, Andressa, Gabi, Mari Albuquerque, Mari Moura, Vinicius, Pietra, Álvaro, Katya, Manu e Toninho pela acolhida, trocas, conversas, conselhos e amizade. Vocês tornaram os desafios mais tranquilos de serem enfrentados;

Aos professores que contribuíram para o desenvolvimento deste estudo, Mariáurea, Tiago e Leandro, agradeço pelo apoio técnico e científico;

Aos membros da banca, pela disponibilidade para contribuir com a conclusão dessa etapa;

Ao Departamento de Nutrição e Saúde e ao PPGCN pelo ensino de excelência e por todo suporte;

À Universidade Federal de Viçosa, por ser minha casa e meu caminho para um futuro muito esperado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG),
pela concessão da bolsa de estudos;

E a todos que, durante algum momento desse caminho, se fizeram presentes
para a concretização de um grande sonho, muito obrigada!

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

“Que maravilha é ninguém precisar esperar um único momento para melhorar o mundo”.

(Anne Frank)

RESUMO

CAMPOS, Iasmim Xisto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2023. **Avaliação do uso de kefir de leite integral em camundongos com doença inflamatória intestinal espontânea** Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Coorientadora: Bruna Cristina dos Santos Cruz.

Doença de Crohn e a Colite Ulcerativa são doenças que afetam o trato gastrointestinal, conhecidas como doença inflamatória intestinal. O uso de probióticos vem sendo estudado para a terapêutica das doenças, melhorando as desordens intestinais, reequilibrando a estrutura microbiana, aprimorando a função da barreira intestinal e melhorando a resposta imune local. Uma revisão na literatura à respeito das diferenças entre as formas de preparo do kefir, foi realizada, constatando-se uma diversidade de utilização de bebidas como substrato, diferenças quanto à caracterização do microbioma em função de fatores como: temperatura, concentração, pH, tempo de fermentação, composição de bactérias e leveduras. O objetivo do estudo foi determinar o efeito do uso do probiótico kefir de leite em camundongos knockout IL-10 com doença inflamatória intestinal espontânea. Foram utilizados camundongos (n=16), com 9 semanas de vida, divididos em dois grupos, controle e kefir. Ambos receberam diariamente via gavagem 0,4ml de leite (KOM) ou kefir (KOK; $2,4 \times 10^8$ UFC) por 4 semanas. Fezes e massa corporal foram avaliadas semanalmente. Ao final, os animais foram eutasiados e os órgãos coletados para análises. O grupo que recebeu kefir apresentou redução do gênero *Desulfovibrio*, apresentou o gênero *Lactobacillus*. Peso do cólon e índice somático foram menores no grupo kefir. Ao final do experimento, todos animais apresentaram perda de peso. O kefir parece ter efeito na modulação da microbiota dos animais com DII, entretanto percebe-se a necessidade de mais estudos utilizando a bebida a fim de elucidar os mecanismos da mesma no ambiente intestinal. Novos estudos são necessários para evidenciar o efeito de alimentos probióticos na terapêutica das doenças inflamatórias intestinais.

Palavras-chave: Kefir. Probióticos. Colite.

ABSTRACT

CAMPOS, Iasmim Xisto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2023. **The use of whole milk kefir in mice with spontaneous inflammatory bowel disease**
Adviser: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-adviser: Bruna Cristina dos Santos Cruz

Crohn's disease and ulcerative colitis are diseases that affect the gastrointestinal tract, known as inflammatory bowel disease. The use of probiotics has been studied for the treatment of diseases, improving intestinal disorders, rebalancing the microbial structure, improving the function of the intestinal barrier and improving the local immune response. A literature review regarding the differences between the ways of preparing kefir was carried out, noting a diversity of use of drinks as substrate, differences regarding the characterization of the microbiome depending on factors such as: temperature, concentration, pH, time fermentation process, composition of bacteria and yeast. The objective of the study was to determine the effect of using the probiotic milk kefir in IL-10 knockout mice with spontaneous inflammatory bowel disease. Mice (n=16), 9 weeks old, were used, divided into two groups, control and kefir. Both received daily via gavage 0.4ml of milk (KOM) or kefir (KOK; 2.4×10^8 CFU) for 4 weeks. Feces and body mass were assessed weekly. Finally, the animals were euthanized and the organs collected for analysis. The group that received kefir showed a reduction in the *Desulfovibrio* genus and the *Lactobaccillus* genus. Colon weight and somatic index were lower in the kefir group. At the end of the experiment, all animals showed weight loss. Kefir appears to have an effect on modulating the microbiota of animals with IBD, however, there is a need for further studies using the drink in order to elucidate its mechanisms in the intestinal environment. New studies are needed to demonstrate the effect of probiotic foods in the treatment of inflammatory bowel diseases.

Keywords: Kefir. Probiotics. Colitis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo 1

- Figure 1. Appearance of milk kefir grains (A) and water kefir grains (B).....21
- Figure 2. Different types of milk kefir.....22

Artigo 2

- Figura 1. Fluxograma para a produção de kefir de leite.....39
- Figura 2. Desenho experimental.....41
- Figura 3. Avaliação do intestino grosso.....47
- Figura 4. Análises taxonômicas da microbiota fecal ao nível de filo, família e gênero.....50
- Figura 5. Análises taxonômicas da microbiota fecal ao nível de família.....51
- Figura 6. Análises taxonômicas da microbiota fecal ao nível de gênero.....53

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Table 1. Bacterial and yeast species content of the kefir grains based shotgun metagenomic.....	25
---	----

Artigo 2

Tabela 1. Composição centesimal do kefir de leite e pH	44
--	----

Tabela 2. Massa corporal semanal e evolução.....	46
--	----

Tabela 3. Excreção urinária de lactulose e manitol pelos camundongos.....	47
---	----

Tabela 4. Concentração de ácidos graxos de cadeia curta fecal.....	48
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
AOM	Azoxymetano
CCB	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
CU	Colite Ulcerativa
DC	Doença de Crohn
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DNS	Departamento de Nutrição e Saúde
DSS	Dextran Sulfato de Sódio
<i>IBD</i>	<i>Inflammatory Bowel Disease</i>
IFN- γ	Interferon Gama
IIS	Índice Intestino Somático
IL	Interleucinas
IL-10-/-	<i>Knockout</i> para interleucina 10
KOK	<i>Knockout</i> Kefir
<i>KOM</i>	<i>Knockout Milk</i>
LAB	Lactic Acid Bacteria
MK	Milk Kefir
TCA	Ácido Tricarboxílico
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFC	Unidades Formadoras De Colônia
UFV	Universidade Federal de Viçosa
WK	Water Kefir

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
OBJETIVOS	16
Geral	16
Específicos	16
ARTIGO I.....	17
ARTIGO II.....	34
CONCLUSÕES GERAIS	65
APÊNDICE A – Cálculo amostral	66

INTRODUÇÃO GERAL

A Doença Inflamatória Intestinal (DII), clinicamente dividida em Colite Ulcerativa (CU) e Doença de Crohn (DC), consiste em uma doença crônica remittente-recorrente, que afeta o trato gastrointestinal (Mentella et al., 2020). Trata-se uma inflamação da mucosa intestinal que compromete a qualidade de vida dos indivíduos acometidos, que sofrem de dor abdominal, diarreia, sangue nas fezes e perda de peso (Guan, 2019).

Apesar dos diversos estudos sobre as DII, sua etiologia ainda não está bem esclarecida mas, já se sabe que esse distúrbio heterogêneo resulta de uma interação complexa entre a variabilidade genética, o sistema imunológico do hospedeiro e os fatores ambientais (Mentella et al., 2020). São mais prevalentes na América do Norte, Europa e Oceania, mas estudos demonstraram um aumento da incidência e prevalência também na Ásia e África, podendo ser então considerada uma patologia globalizada e não apenas ocasionada no ocidente, como era pensado (Chou et al., 2019; Ng et al., 2017; Sairenji et al., 2017). São poucos dados a respeito da epidemiologia na América Latina e as informações sobre o Brasil são escassas (Parra et al., 2019).

Um dos fatores envolvidos na fisiopatologia das DII são as citocinas (Friedrich; Pohin; Powrie, 2019), importantes moléculas regulatórias secretadas pelas células do sistema imune. Diversas citocinas estão aumentadas em ambas doenças, como as interleucinas (IL) IL-1B, IL-6, IL-8, IL-17, IL-18, IL-22, o fator de necrose tumoral (TNF) e o interferon gama (IFN- γ), considerados mediadores inflamatórios importantes, que são produzidos pelos macrófagos ao serem ativados por microrganismos patogênicos (Alagón et al., 2019).

Outro fator envolvido com as DII é a interação hospedeiro e microbiota intestinal, onde o processamento alterado de sinais derivados da microbiota, além da composição e função alteradas parecem ter impacto na patologia (Lavelle; Sokol, 2020). Há um constante interesse no estudo da microbiota de indivíduos com DII, visto sua atuação na fisiologia intestinal, absorção de nutrientes da alimentação e ativação e desenvolvimento do sistema imune (Van Malderen et al., 2020). O uso de probióticos vem sendo estudado para a terapêutica da DII, partindo do princípio de que estes irão melhorar as desordens intestinais, reequilibrando o balanço microbiológico intestinal,

aprimorando a função da barreira intestinal e melhorando a resposta imune local (Currò et al, 2017).

Entre os probióticos temos os Kefir, que é consumido há centenas de anos, o kefir é uma bebida probiótica produzida a partir da fermentação de leite de origem animal ou extratos vegetais, com diversos benefícios associados ao seu consumo, como melhora da digestão e tolerância à lactose, efeito antidislipidêmico, anti-hipertensivo, controle da glicose plasmática, entre outros (Peluzio et al., 2021; Rosa et al., 2017).

Apesar dos diversos benefícios à saúde, a forma de atuação do kefir ainda não foi elucidada, principalmente pelas variações que ocorrem de acordo com o modo de preparo. Entretanto, o uso de modelos animais tem auxiliado no estudo dos efeitos da bebida e seus possíveis impactos na saúde (Bourrie et al, 2016).

Para estudo de diversas patologias que acometem o trato gastrointestinal, os modelos animais de inflamação intestinal são utilizados há décadas e permitem uma variedade de informações a respeito da imunologia da mucosa, manutenção e perturbação da homeostase intestinal, além de possibilitar a avaliação da inflamação intestinal, como é observada nas DII (Kiesler, 2015).

Os camundongos knockout para IL-10 (IL-10^{-/-}) são utilizados nos estudos de DII, pois desenvolvem colite espontaneamente, apresentando lesões descontínuas que afetam toda a extensão do intestino delgado e grosso. Essas lesões ocorrem devido à ausência da citocina IL-10, que atua na regulação da homeostase intestinal. Sua deficiência é relacionada ao aparecimento de infiltrados inflamatórios, hiperplasia epitelial, úlceras, dentre outras alterações no epitélio intestinal (Keubler et al., 2015). Assim, esse estudo buscou avaliar o consumo do kefir em um modelo de DII.

Referências

- ALAGÓN, F. C. P. et al. The use of probiotic therapy to modulate the gut microbiota and dendritic cell responses in inflammatory bowel diseases. **Medical Sciences**, v. 7, n. 2, p. 33, 2019.
- BOURRIE, B. C. T; WILLING, B. P.; COTTER, P. D. The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. **Frontiers in microbiology**, p. 647, 2016.
- CHOU, J.-W. et al. Epidemiology and clinical outcomes of inflammatory bowel disease: a hospital-based study in central Taiwan. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2019, 2019.
- CURRÒ, D. et al. Probiotics, fibre and herbal medicinal products for functional and inflammatory bowel disorders. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1426-1449, 2017.
- GUAN, Q. A comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Journal of immunology research**, v. 2019, 2019.
- FRIEDRICH, M.; POHIN, M.; POWRIE, F. Cytokine networks in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 992-1006, 2019.
- KEUBLER, Lydia M. et al. A multihit model: colitis lessons from the interleukin-10–deficient mouse. **Inflammatory bowel diseases**, v. 21, n. 8, p. 1967-1975, 2015.
- KIESLER, P.; FUSS, I. J.; STROBER, W. Experimental models of inflammatory bowel diseases. **Cellular and molecular gastroenterology and hepatology**, v. 1, n. 2, p. 154-170, 2015.
- LAVELLE, A.; SOKOL, H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 17, n. 4, p. 223-237, 2020.
- MENTELLA, M. C. et al. Nutrition, IBD and gut microbiota: a review. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 944, 2020.
- NG, S. C. et al. 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.
- PARRA, R. S. et al. Quality of life, work productivity impairment and healthcare resources in inflammatory bowel diseases in Brazil. **World journal of gastroenterology**, v. 25, n. 38, p. 5862, 2019.
- PELUZIO, M. C. G. et al. Kefir and intestinal microbiota modulation: implications in human health. **Frontiers in nutrition**, v. 8, p. 638740, 2021.

ROSA, D. D. et al. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. **Nutrition research reviews**, v. 30, n. 1, p. 82, 2017.

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, 2017.

VAN MALDEREN, K. et al. Volatomics in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. **EBioMedicine**, v. 54, p. 102725, 2020.

ZHU, S. et al. Effect of the interleukin 10 polymorphisms on interleukin 10 production and visceral hypersensitivity in Chinese patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. **Chinese Medical Journal**, v. 132, n. 13, p. 1524, 2019.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar o uso de kefir de leite integral em camundongos knockout IL-10 com doença inflamatória intestinal espontânea

Específicos

- a) Caracterizar do kefir quanto aos parâmetros microbiológicos, nutricionais e pH;
- b) Avaliar o consumo regular da bebida fermentada kefir na terapêutica do desenvolvimento da doença inflamatória intestinal nos animais experimentais (biometria);
- c) Avaliar o consumo regular da bebida fermentada kefir na produção dos ácidos graxos de cadeia curta e na permeabilidade intestinal;
- d) Caracterizar metataxonomicamente a diversidade bacteriana das fezes dos animais.

ARTIGO I**ARTIGO DE REVISÃO****Título: Probiotic beverage with health benefits: milk, water and non-dairy Kefir****Autores:** Iasmim Xisto Campos, Mariana de Fátima Albuquerque Pereira, Pietra Riguette Reis, Álvaro Luiz Miranda Piermatei and Maria do Carmo Gouveia Peluzio**Artigo submetido à revista International Journal of Dairy Technology****Abstract**

Traditionally consumed for thousands of years, milk kefir is a beverage originated from mountains of the Caucasus, located between Europe and Asia directly associated with human health improvement. The water kefir is also consumed for years, but its origin is still unknown. Both probiotic beverages are produced by fermenting a substrate with kefir grains, a matrix that holds together a complex mixture of yeast, acetic acid bacteria and lactic acid bacteria. Despite being similar in terms of structure, association of microorganisms and products generated by fermentation, the grains and the production of probiotic drinks are different. This review focuses on the nutritional and microbiological composition of kefir and the different ways to prepare this beverage with potential benefits to human health. The microorganisms found in water and milk kefir grains differ depending on external factors, such as geographic region, substrate and production conditions. Such differences reflect on the components produced during the fermentation process and consequently on the effects they will have on human health. New studies comparing the effects between the two types of kefir should be explored, as well as the standardization of production methods to facilitate commercialization and access.

Keywords: milk kefir; water kefir; probiotics

Introduction

The search for foods with health benefits have gained popularity, including probiotic foods (Spizzirri et al., 2023). Consumed for thousands of years, fermented products are present in food around the world, reaching 5 to 40% of all food consumed by humans (Cuamatzin-García et al., 2022). Kefir is one of them.

Kefir is a fermentable beverage and it can be prepared and consumed in two main ways: milk kefir (MK) and water or sugary kefir (WK). The first one is an acid creamy beverage, similar to yogurt, prepared with grains that looks like cauliflower (Sharifi et al., 2017). Differently, water kefir is a carbonated, slightly acidic beverage, a refreshing drink (Lynch et al., 2021).

Originated from mountains of the Caucasus, and consumed by thousands of years, milk kefir comes from an area between Europe and Asia and it is used and seen as an effective way to improve human health. Furthermore, the word derives from Slavic word keif, which means "well-being" or 'living well' (González-Orozco et al., 2022; Rosa et al., 2017).

The origin of water kefir grains is still not confirmed, however there are records of its use by soldiers in the Crimean War in 1855, relating kefir grains to ginger beer plants (Fiorda et al., 2017). Vayssier (1978) used the name water kefir grains in France for the first time although studies suggest that the origin of the grains are from Mexico (Yerlikaya et al., 2022).

Both probiotic beverages are produced by fermenting a substrate with kefir grains, a matrix that holds together a complex mixture of yeast, acetic acid bacteria and lactic acid bacteria (LAB), (Slattery, Cotter and O'toole, 2019; Wang et al., 2012). It is traditionally homemade and the grains are recovered after fermentation to be reused daily. Industrial production is not yet common (Spizzirri et al., 2023).

The consumption of kefir and others fermented foods are related with health benefits, such as antibacterial, anti-inflammatory and anti-hypertensive effect, antioxidant, anti-carcinogenic and anti-allergenic activity (Rosa et al., 2017). Therefore, this review focuses on the nutritional and microbiological composition of kefir and the different ways to prepare this beverage resulting in many benefits to the human health.

Methods

The review of this literature was conducted with the following method:

- A search was conducted on Pubmed and Scholar Google for all articles published up to May 2023 using key words such as “milk kefir” OR “water kefir” OR “sugary kefir” OR “kefir production” OR “kefir probiotic”.
- The abstract of each article was screened by the authors of this document. The articles selected based on the abstract were evaluated in full text.
- After evaluation of the full text, the articles were selected according to their pertinence in regards of the main topics of the article: role of probiotics, differences between milk and water kefir, health benefits of the consumption and microbiota.
- Others relevant articles found in the reference list of this article were evaluated in full text following the same criteria.

Characteristics of kefir grains

The process of forming kefir grains occurs in several stages, which justifies the difficulty of producing grains from pure or mixed cultures (Schoevers and Britz, 2003). The presence of proteins and polysaccharides, as well as the electric charge and affinity or not for water are determining factors for the formation of grains, biofilm and the aggregation of bacteria and yeasts. The formation of a biofilm by LAB and yeast seems to improve grain stability, showing the interaction of the microbiota present (Wang, 2012).

The symbiotic environment between bacteria and yeast are hold by the kefiran, representing between 24 and 25% of the dry weight of the MK grain, which is composed in almost equal ratio of d-glucose and d-galactose (glucogalactan), protecting the microorganisms (González-Orozco, 2022).

Milk kefir grains are yellowish white, with a non-uniform shape, elastic, similar to cauliflower (figure 1). In its cultivation in milk, the dry weight of the grains can increase from 5 to 7% per day (Libudzisz et al., 1990). In a study by Schoevers and Britz (2003), the best conditions for mass growth of grains in batches were evaluated. The optimum growth temperature is 25°C, with best growth under agitation. Milk fat content also appears to influence growth.

Despite being similar in terms of structure, association of microorganisms and products generated by fermentation (Magalhães et al., 2010), WK grains are translucent, gelatinous, with colors ranging from yellow to brown and with different shapes (figure 1) (Moretti et al., 2022). Microorganisms are integrated by an exopolysaccharide matrix composed of dextran (Fels et al., 2018).

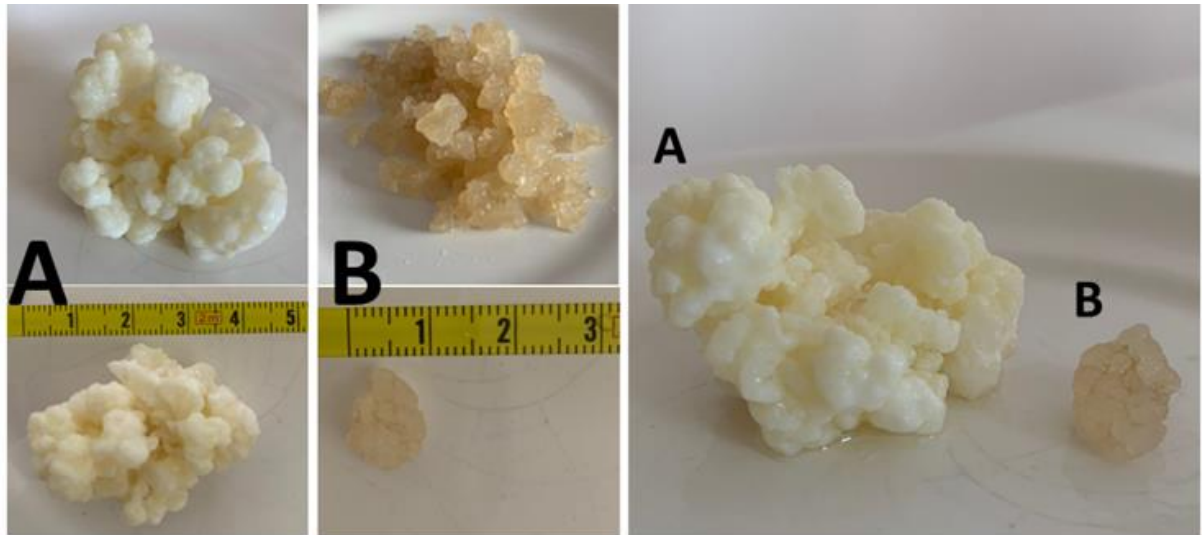


Figure 1. Appearance of milk kefir grains (A) and water kefir grains (B).

Production of milk kefir

The chemical composition of kefir varies according to some aspects, such as the origin and microbiological composition of the grains that will carry out the fermentation, geographic region, fermentation time and temperature, type and volume of milk or other substrate to be used (Farag et al., 2020).

Milk kefir has its most common fermentation using cow's milk (Rosa et al., 2017). However, its preparation can be performed with other milk of animal origin, such as sheep, goat (Cais-Sokolińska et al., 2015), camel (Kavas, 2015) and buffalo (Gul et al., 2015). The beverage can be produced from UHT, pasteurized or unpasteurized milk, whole fat, low fat, skim and no fat (Altay et al., 2013).

In an attempt to find new alternatives to milk of animal origin, plant extracts can also be used to produce the fermented drink, being accessible to individuals with dairy allergies and vegans (Van Wyk, 2019). Soymilk (Baú et al., 2015), nuts, peanuts

(Gocer and Koptagel, 2023), rice (Sugawara et al., 2019) and oats (Streimikyte et al., 2022) have been used to produce milk kefir (figure 2).

Traditional production takes place using kefir grains inoculated directly into milk, with a proportion of 2 to 10%, with a fermentation period of approximately 18 to 24 hours at 20 to 25°C, and can be matured for 15 to 20 hours from 8 to 10 °C (Leite et al., 2013; Farnworth et al., 2003). The kefir grains are then wash to prepare a new fermentation cycle.

Another form of production, mainly at an industrial level, consists of using lyophilized starter cultures containing LAB and yeast (Altay et al., 2013). In this method, activated starter culture (2 to 5%) is added to milk, which is kept at 20 to 25°C for 24 hours. Subsequently, the product is stored under conduction (Guzel-Seydim et al., 2010).

A third process called the “Russian method” can also be used, which consists of the back slopping method, a serial fermentation process where the fermented product is used as a starter, without the use of grains (Garofalo et al., 2020; Leite et al., 2013). However, this method does not produce an acceptable product, due to the imbalance of microorganisms (Garrote et al., 1999).

Due to the difficulty of separating kefir grains in industrial production, kefir from the Russian method and lyophilized cultures are more usual to find for commercialization (Altay et al., 2013). However, despite being processes that are easier to standardize in terms of production and microbiological content, the beneficial effects of the drink are associated with the use of grains in production, as done in the traditional method (Garofalo et al., 2020).

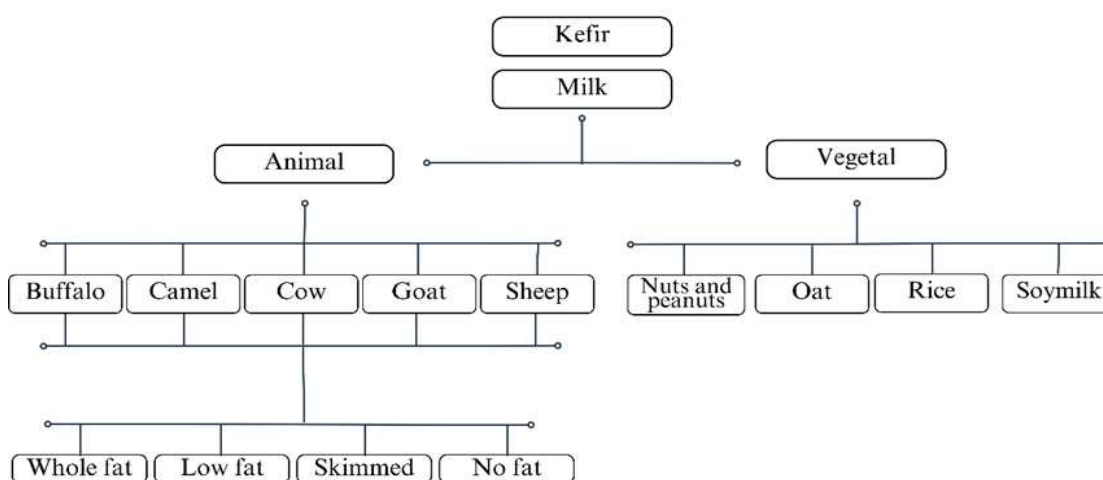


Figure 2. Different types of milk kefir.

Production of water kefir

Similar to milk Kefir, the production of water Kefir is mostly artisanal and at home (Patel et al., 2022). The fermented drink is produced from the addition of kefir grains in an aqueous solution containing sucrose (Fels et al., 2018), and can be added fresh or dried fruits (Yerlikaya et al., 2022).

Production at an industrial level does not yet have an established process, only a few small companies. This is due to the difficulty of transport and contamination of the initial microbiota, instability of the fermentation process, low water kefir grain growth and the necessity of appropriate equipment (Fiorda et al., 2017; Laureys et al., 2017).

Traditional fermentation can be performed by adding WK grains (6 to 30%) in a solution containing 6 to 10% sucrose, dried fruit and lemon slices may be added, for 1 to 3 days at room temperature (optimal temperature between 20 and 25 °C) (Moretti et al., 2022; Stadie et al., 2013; Gultiz et al., 2011). However, due to its home production, fermentation conditions can vary greatly (Verce et al., 2019).

The main energy sources for microbial growth are sucrose from brown sugar and dried figs, which provide glucose and fructose (Moretti et al., 2019; Gultiz et al., 2011). After the fermentation period, the grains are separated, washed and can be reused (Laureys et al., 2017). As with milk kefir, when a small aliquot of the fermented product is used for a new fermentation cycle, the process is called “back-slopping” (Moretti et al., 2022).

In a study by Yépez and collaborators (2019), WK grains was used to prepare a beverage based on cereals (oats, corn and barley). Fruit juices and extracts can also be used as substrates for fermentation, including apple, quince, grape, kiwi, pear, pomegranate (Randazzo et al., 2016), mango (Magalhães-Guedes et al., 2020), dragon fruit (Bueno et al., 2021), among others (Spizzirri et al., 2023).

Coconut water can also be used for fermentation, as it has sugars, proteins and minerals that can be used by microorganisms (Dwiloka et al., 2020). Russian olive, a product rich in phytochemicals with antioxidant properties, was also used to prepare a fermented drink with water kefir (Darvishzadeh et al., 2021). The fermented product can also be flavored for the development of new beverages, such as the isotonic drink proposed by Fernandes et al. (2022).

Nutritional and microbiological composition

The nutritional composition of MK varies, however its typical proximate composition consists of 89–90% moisture, 0.2% lipid, 3.0% protein, 6.0% sugar, 0.7% ash, in addition to 1.0% lactic acid and alcohol (Sarkar, 2007). Regarding micronutrients, the type of milk and the microorganisms present influence the amounts of vitamins and minerals. The drink may contain vitamins B1, B2, B5, C, A, K and carotene (Arslan, 2015). As far as mineral content is concerned, MK is abundant in calcium, magnesium and potassium, as well as iron, zinc and copper that are important in cellular metabolism and blood production. In addition, MK can be a good option for lactose intolerant people, as this sugar is reduced in the final product by the fermentation process, reducing it in the final product (Farang et al., 2020).

Regarding the chemical composition of WK, few researches present its evaluation, possibly because the substrate is only sugar. In a study by Rodrigues et al. (2022), they found 1.806 ± 0.05 mg/ml of carbohydrates, 0.017% of protein and $0.51 \pm 0.04\%$ w/v of. About micronutrients, sodium, potassium and magnesium were found.

The microbiota composition of kefir grains depends on their origin (Gao and Zhang, 2019) and it is shown in table 1. The microorganisms most commonly isolated from MK grains include the genera *Lactobacillus* (*L. brevis*, *L. casei*, *L. kefir*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. kefiranofaciens subsp. kefiranofaciens*, *L. kefiranofaciens subsp. kefirgranum*, *L. parakefir*), *Lactococcus* (*L. lactis subsp. Lactis*, *L. lactis subsp. cremoris*), *Leuconostoc* (*L. Mesenteroides and cremoris*), *Acetobacter*, and yeasts such as *Kluyveromyces* (*K. marxianus*), *Saccharomyces* (*S. Cerevisiae and turicensis*) (Farang et al., 2020; Leite et al., 2012; Rattray and O'Connell, 2011).

WK grains have a similar microbiota, consisting mainly of *Lactobacillus* species (*L. casei/paracasei*, *L. hilgardii*, and *L. nagelii*), *Bifidobacteria* (*B. aquikefiri*) and acetic acid bacteria, such as *Acetobacter fabarum*, in addition to yeasts, mainly *Saccharomyces cerevisiae* (Laureys et al., 2018, 2016; Laureys; De Vuyst, 2017, 2014; Zanirati et al., 2015; Marsh et al., 2013; Gulitz et al., 2011, 2013; Magalhães et al., 2010).

Table 1. Bacterial and yeast species content of the kefir grains based shotgun metagenomic.

Bacterium	MK grain	WK grain	Reference
<i>Acetobacter cibinongensis</i>	X		Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Acetobacter ghanensis</i>	X		Tenorio-Salgado et al., 2021
<i>Acetobacter lovaniensis</i>		X	Kumar et al., 2021
<i>Acetobacter okinawensis</i>	X		Tenorio-Salgado et al., 2021
<i>Acetobacter persici</i>		X	Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Acetobacter syzygii</i>	X		Tenorio-Salgado et al., 2021
<i>Acetobacter tropicalis</i>		X	Kumar et al., 2021
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>			Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Bifidobacterium aquikefiri</i>		X	Verce et al., 2019; Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Bifidobacterium crudilactis</i>			Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Bifidobacterium subtile</i>			Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Candidatus Oenococcus aquikefiri</i>		X	Verce et al., 2019
<i>Catelliglobospora koreensis</i>	X		Tenorio-Salgado et al., 2021
<i>Gluconobacter cerinus</i>	X	X	Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Gluconobacter kondonii</i>		X	Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Gluconobacter oxydans</i>		X	Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Gordonia sp. IITR100</i>	X		Tenorio-Salgado et al., 2021
<i>Gordonia sp. UCD-TK1</i>	X		Tenorio-Salgado et al., 2021
<i>Lactobacillus satsumensis</i>		X	Kumar et al., 2021
<i>Lactobacillus zae</i>		X	Kumar et al., 2021
<i>Lactobacillus hilgardii</i>		X	Verce et al., 2019; Kumar et al., 2021
<i>Lactobacillus hordei</i>		X	Verce et al., 2019; Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Lactobacillus mali</i>		X	Verce et al., 2019
<i>Lactobacillus nagelii</i>		X	Verce et al., 2019
<i>Lactobacillus paracasei</i>		X	Verce et al., 2019
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	X	X	Nalbantoglu et al., 2014; Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Lactobacillus brevis</i>		X	Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Lactobacillus buchneri</i>	X		Nalbantoglu et al., 2014
<i>Lactobacillus crispatus</i>	X		Nalbantoglu et al., 2014

<i>Lactobacillus diolivorans</i>	X	X	Nalbantoglu et al., 2014; Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Lactobacillus gallinarum</i>	X	X	Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Lactobacillus harbinensis</i>		X	Verce et al., 2019; Kumar et al., 2021; Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Lactobacillus heilongjiangensis</i>		X	Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Lactobacillus helveticus</i>	X		Nalbantoglu et al., 2014; Tenorio-Salgado et al., 2021
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	X		Nalbantoglu et al., 2014
<i>Lactobacillus kalixensis</i>	X		Nalbantoglu et al., 2014
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	X		Nalbantoglu et al., 2014; Tenorio-Salgado et al., 2021; Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Lactobacillus kefir</i>	X		Nalbantoglu et al., 2014; Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Lactobacillus kimchiensis</i>		X	Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Lactobacillus kisonensis</i>	X		Tenorio-Salgado et al., 2021
<i>Lactobacillus mudanjiangensis</i>	X		Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Lactobacillus nagelii</i>		X	Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Lactobacillus otakiensis</i>	X		Nalbantoglu et al., 2014
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	X		Tenorio-Salgado et al., 2021
<i>Lactobacillus parafarraginis</i>	X		Nalbantoglu et al., 2014
<i>Lactobacillus paralimentarius</i>		X	Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Lactobacillus plantarum</i>	X	X	Tenorio-Salgado et al., 2021; Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Lactobacillus rapi</i>	X		Nalbantoglu et al., 2014
<i>Lactobacillus reuteri</i>		X	Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Lactobacillus rogosae</i>	X	X	Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>		X	Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Lactobacillus satsumensis</i>		X	Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Lactobacillus sunkii</i>	X		Nalbantoglu et al., 2014
<i>Lactococcus lactis</i>	X	X	Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Lactococcus taiwanensis</i>	X		Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022

<i>Nocardia farcinica</i>	X		Tenorio-Salgado et al., 2021
<i>Oenococcus kitaharae</i>		X	Verce et al., 2019
<i>Oenococcus oeni</i>		X	Verce et al., 2019; Kumar et al., 2021
<i>Oenococcus alcoholitolerans</i>		X	Verce et al., 2019
<i>Pediococcus lolii</i>			Nalbantoglu et al., 2014
<i>Streptococcus mitis</i>		X	Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Streptococcus thermophilus</i>	X		Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Streptococcus vestibularis</i>		X	Gökirmakli; Güzel-Seydim, 2022
<i>Tetragenococcus halophilus</i>	X		Nalbantoglu et al., 2014
Fungi			
<i>Dekkera bruxellensis</i>		X	Verce et al., 2019
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	X	X	Verce et al., 2019; Tenorio-Salgado et al., 2021

MK: milk kefir; WK: water kefir

Health benefits

The potential benefit of consuming fermented foods for human well-being is already widely accepted by the scientific community, but in relation to kefir, it is believed that its consumption can result in benefits such as protection against pathogens, immunomodulation, antioxidant capacity and reduction of cholesterol levels (Kiousi et al., 2022; Slattery et al., 2019).

The microorganisms present in the drink act to improve the composition of the intestinal microbiota, contributing to the inhibition of gastrointestinal tract infection by enteric bacterial pathogens (Tan et al., 2022). Among the antagonistic properties of kefir against bacteria are competition for nutrients and space, adhesion of pathogens to yeast cell walls, production of organic acids, hydrogen peroxide, acetaldehyde carbon dioxide and bacteriocins (Gut et al., 2021).

The consumption of MK was related to the inhibition of the development of pathogenic microorganisms such as the bacteria *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus* and fungi such as *Candida albicans* and others (Tenorio-Salgado et al., 2021). In a study by Silva et al. (2019) with WK, the same microorganisms were affected.

The formation of free radicals and the oxidative stress caused by them is involved in the pathophysiology of several diseases, being a risk factor for health (Baniasadi et al., 2022). Antioxidant activity, in turn, is increased by the food fermentation process, in which the antioxidants formed act to capture free radicals (Ms et al., 2021). Kefir is a natural source of antioxidants and stimulates the production of enzymes involved in the antioxidant system (Azizi et al., 2021; Rosa et al., 2017).

Milk fermented with kefir has been shown to be a food with hypercholesterolemic properties, since the fermentation process reduces the amount of cholesterol present in the product (Bourrie et al., 2016). The improvement in the lipid profile with the use of probiotics is due to the increase in the excretion of bile acids in the feces, resulting in the reduction of blood cholesterol (Huang et al., 2013). In a study by Rocha-Gomes et al (2016) comparing the effects between water and milk kefir, it was observed that both had an effect, however water kefir showed better performance in improving the lipid profile.

In a meta-analysis carried out by Vieira et al. (2021), the bioactive compounds in milk kefir, such as kefiran, bioactive peptides and organic acids, showed antimicrobial, anticarcinogenic effects and immunomodulatory activity. Effects on neurodegenerative diseases, lipid profile, plasma glucose, osteoporosis and inflammation were also evaluated, but there is a need for further studies to evaluate these situations.

Futures perspectives

Despite the difficulty in consolidating information about kefir due to differences in its geographic origin, method of preparation and substrate used for fermentation, studies point to numerous beneficial effects associated with its consumption. The standardization of the preparation in an industrial way with species usually found in kefir could be an alternative for a greater dissemination of its consumption.

In addition, alternatives using non-dairy beverages have increased interest due to the increase in a vegan public and with lactose intolerance. Both water kefir and milk kefir using plant substrates should be explored and their health effects evaluated.

Most of the studies found are using milk kefir in vitro or in an experimental model, making necessary to explore more studies with water kefir, as well as studies

comparing the effects of drinks and their application in healthy humans or sick population groups.

Conclusion

The purpose of this review is to elucidate the differences between water kefir and milk kefir, comparing the grains, method of preparation, effects of their consumption and the microbiological profile. The numerous beneficial effects associated with the consumption of both beverages serve as a basis for encouraging their consumption, mainly due to the easy preparation at home and at a low cost. From an industrial point of view, beverages have excellent sales potential due to the increased demand for foods with functional claims.

Funding

The authors would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for granting scholarships to Iasmim Xisto Campos.

References

- ALTAY, F. et al. A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. **International journal of food microbiology**, v. 167, n. 1, p. 44-56, 2013.
- ARSLAN, S. A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. **CyTA-Journal of Food**, v. 13, n. 3, p. 340-345, 2015.
- AZIZI, N. F. et al. Kefir and its biological activities. **Foods**, v. 10, n. 6, p. 1210, 2021.
- BANIASADI, M et al. Comparative antioxidant potential of kefir and yogurt of bovine and non-bovine origins. **Journal of Food Science and Technology**, v. 59, n. 4, p. 1307-1316, 2022.
- BAÚ, T. R.; GARCIA, S.; IDA, E. I. Changes in soymilk during fermentation with kefir culture: Oligosaccharides hydrolysis and isoflavone aglycone production. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 66, n. 8, p. 845-850, 2015.
- BOURRIE, B. C. T.; WILLING, B. P.; COTTER, P. D. The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. **Frontiers in microbiology**, p. 647, 2016.
- BUENO, R. S. et al. Quality and shelf life assessment of a new beverage produced from water kefir grains and red pitaya. **Lwt**, v. 140, p. 110770, 2021.
- CAIS-SOKOLIŃSKA, D. et al. Formation of volatile compounds in kefir made of goat and sheep milk with high polyunsaturated fatty acid content. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 10, p. 6692-6705, 2015.
- CUAMATZIN-GARCÍA, L. et al. Traditional Fermented Foods and Beverages from around the World and Their Health Benefits. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, p. 1151, 2022.
- DARVISHZADEH, P.; ORSAT, V.; FAUCHER, S. P. Encapsulation of Russian olive water kefir as an innovative functional drink with high antioxidant activity. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 76, p. 161-169, 2021.
- DWILOKA, B.; RIZQIATI, H.; SETIANI, B. E. Physicochemical and sensory characteristics of green coconut (*Cocos nucifera* L.) water kefir. **International Journal of Food Studies**, v. 9, n. 2, 2020.
- FARAG, M. A. et al. The many faces of kefir fermented dairy products: Quality characteristics, flavour chemistry, nutritional value, health benefits, and safety. **Nutrients**, v. 12, n. 2, p. 346, 2020.
- FARNWORTH, E. R. et al. Kefir: a fermented milk product. In: **Handbook of fermented functional foods**, v. 2, p. 89-127, 2003.

FELS, L. et al. Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. **Carbohydrate polymers**, v. 189, p. 296-303, 2018.

FIORDA, F. A. et al. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation-A review. **Food Microbiology**, v. 66, p. 86-95, 2017.

GAROFALO, C. et al. Study of kefir drinks produced by backslopping method using kefir grains from Bosnia and Herzegovina: Microbial dynamics and volatilome profile. **Food research international**, v. 137, p. 109369, 2020.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Characteristics of kefir prepared with different grain [ratio] milk ratios. **Journal of Dairy Research**, v. 65, n. 1, p. 149-154, 1998.

GOCER, E. M. C.; KOPTAGEL, E. Production of milks and kefir beverages from nuts and certain physicochemical analysis. **Food Chemistry**, v. 402, p. 134252, 2023.

GONZÁLEZ-OROZCO, B. D. et al. Invited review: Milk kefir microbiota—Direct and indirect antimicrobial effects. **Journal of Dairy Science**, 2022.

GÖKIRMAKLI, Ç.; GÜZEL-SEYDIM, Z. B. Water kefir grains vs. milk kefir grains: Physical, microbial and chemical comparison. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 6, p. 4349-4358, 2022.

GUL, O. et al. Manufacture and characterization of kefir made from cow and buffalo milk, using kefir grain and starter culture. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 3, p. 1517-1525, 2015.

GULITZ, A. et al. The microbial diversity of water kefir. **International journal of food microbiology**, v. 151, n. 3, p. 284-288, 2011.

GUT, A. M. et al. Kefir characteristics and antibacterial properties-potential applications in control of enteric bacterial infection. **International Dairy Journal**, v. 118, p. 105021, 2021.

GUZEL-SEYDIM, Z.; KOK-TAS, T.; GREENE, A. K. Kefir and koumiss: microbiology and technology. In: **Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products**, v. 143, p. 164, 2010.

KAVAS, G. Kefirs manufactured from camel (*Camelus dromedarius*) milk and cow milk: comparison of some chemical and microbial properties. **Italian Journal of Food Science**, v. 27, n. 3, p. 357-365, 2015.

KIOUSI, D. E. et al. The Clash of Microbiomes: From the Food Matrix to the Host Gut. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 116, 2022.

KUMAR, M. R. et al. Metagenomic and phytochemical analyses of kefir water and its subchronic toxicity study in BALB/c mice. **BMC complementary medicine and therapies**, v. 21, n. 1, p. 1-15, 2021.

- HUANG, Y. et al. Characterization of *Lactobacillus plantarum* Lp27 isolated from Tibetan kefir grains: A potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p. 2816-2825, 2013.
- LAUREYS, D. et al. Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. **Food microbiology**, v. 73, p. 351-361, 2018.
- LAUREYS, D. et al. Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water kefir fermentation process. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, p. 2811-2819, 2017.
- LAUREYS, D. et al. *Bifidobacterium aquikefiri* sp. nov. isolated from water kefir. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1281-1286, 2016.
- LAUREYS, D.; DE VUYST, L. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 8, p. 2564-2572, 2014.
- LEITE, A. M. O. et al. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. **Brazilian journal of microbiology**, v. 44, p. 341-349, 2013.
- LIBUDZISZ, Z. et al. Kefir production in Poland. **Dairy Industries International**, v. 55, n. 7, p. 31-33, 1990.
- LOPITZ-OTSOA, F. et al. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Rev. Iberoam. Micol.** v. 23, n. 2, p. 67-74, 2006.
- LYNCH, K. M. et al. An update on water kefir: Microbiology, composition and production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 345, p. 109128, 2021.
- MAGALHÃES-GUEDES, K. T. et al. Effect of kefir biomass on nutritional, microbiological, and sensory properties of mango-based popsicles. **International Food Research Journal**, v. 27, n. 3, p. 536-545, 2020.
- MAGALHAES, K. T. et al. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1241-1250, 2010.
- MARSH, A. J. et al. Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. **FEMS microbiology letters**, v. 348, n. 1, p. 79-85, 2013.
- MORETTI, A. F. et al. Water kefir, a fermented beverage containing probiotic microorganisms: From ancient and artisanal manufacture to industrialized and regulated commercialization. **Future Foods**, v. 5, p. 100123, 2022.
- NALBANTOGLU, U. et al. Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains. **Food microbiology**, v. 41, p. 42-51, 2014.

- PATEL, S. H. et al. A temporal view of the water kefir microbiota and flavour attributes. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 80, p. 103084, 2022.
- RANDAZZO, W. et al. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. **Food Microbiology**, v. 54, p. 40-51, 2016.
- RATTRAY, F.P.; O'CONNELL, M.J. Fermented Milks Kefir. In: Fukay, J. W. (ed.), Encyclopedia of Dairy Sciences (2th ed). **Academic Press**, San Diego, USA, 2011. p.518-524.
- ROCHA-GOMES, A. et al. Chemical composition and hypocholesterolemic effect of milk kefir and water kefir in Wistar rats. **Revista de Nutrição**, v. 31, p. 137-145, 2018.
- RODRÍGUEZ, M. A. et al. Microbiological and chemical characterization of water kefir: An innovative source of potential probiotics for bee nutrition. **Revista Argentina de Microbiología**, 2022.
- ROSA, D. D. et al. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. **Nutrition research reviews**, v. 30, n. 1, p. 82-96, 2017.
- SARKAR, S. Potential of kefir as a dietetic beverage—a review. **British Food Journal**, 2007.
- SCHOEVERS, A.; BRITZ, T. J. Influence of different culturing conditions on kefir grain increase. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, n. 3, p. 183-187, 2003.
- SHARIFI, M. et al. Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties. **Medical Oncology**, v. 34, p. 1-7, 2017.
- SILVA, K. R. et al. Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 152, p. 316-325, 2009.
- SLATTERY, C.; COTTER, P. D.; W. O'TOOLE, P. Analysis of health benefits conferred by Lactobacillus species from kefir. **Nutrients**, v. 11, n. 6, p. 1252, 2019.
- SPIZZIRRI, U. G. et al. Non-dairy kefir beverages: formulation, composition, and main features. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 105130, 2023.
- STADIE, J. et al. Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. **Food microbiology**, v. 35, n. 2, p. 92-98, 2013.
- STREIMIKYTE, P. et al. The biochemical alteration of enzymatically hydrolysed and spontaneously fermented oat flour and its impact on pathogenic bacteria. **Foods**, v. 11, n. 14, p. 2055, 2022.

SUGAWARA, T. et al. Fermented product of rice with *Lactobacillus kefiranofaciens* induces anti-aging effects and heat stress tolerance in nematodes via DAF-16. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 83, n. 8, p. 1484-1489, 2019.

TAN, L. L. et al. Potential probiotic strains from milk and water kefir grains in Singapore—use for defense against enteric bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

TENORIO-SALGADO, S. et al. Metagenomic analysis and antimicrobial activity of two fermented milk kefir samples. **MicrobiologyOpen**, v. 10, n. 2, p. e1183, 2021.

VAN WYK, J. Kefir: The champagne of fermented beverages. **Fermented beverages**, p. 473-527, 2019.

VERCE, M.; DE VUYST, L.; WECKX, S. Shotgun metagenomics of a water kefir fermentation ecosystem reveals a novel *Oenococcus* species. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 479, 2019.

VIEIRA, C. P. et al. Bioactive compounds from kefir and their potential benefits on health: a systematic review and meta-analysis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.

WANG, S. et al. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. **Food microbiology**, v. 32, n. 2, p. 274-285, 2012.

YÉPEZ, A. et al. In situ riboflavin fortification of different kefir-like cereal-based beverages using selected Andean LAB strains. **Food microbiology**, v. 77, p. 61-68, 2019.

YERLIKAYA, O.; AKAN, E.; KINIK, Ö. The metagenomic composition of water kefir microbiota. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 30, p. 100621, 2022.

ZANIRATI, D. F. et al. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. **Anaerobe**, v. 32, p. 70-76, 2015.

ARTIGO II

ARTIGO ORIGINAL

Título: *Kefir de leite reduz desulfovibriacea em camundongos knockout IL-10*

Resumo

A doença inflamatória intestinal (DII) é um distúrbio crônico que pode envolver qualquer parte do trato gastrointestinal e possui patogênese multifatorial. Alterações na composição e funcionalidade do microbioma estão relacionadas à DII e a utilização de probióticos vem sendo estudada na terapêutica da doença. Foram utilizados camundongos knockout IL-10 (n=16), com 9 semanas de vida, divididos em dois grupos, controle e kefir. Ambos receberam diariamente via gavagem 0,4ml de leite ou kefir por 4 semanas, com coleta de fezes e avaliação da massa corporal semanalmente. Ao final, os animais foram eutasiados e os órgãos coletados para análises. O grupo que recebeu kefir apresentou redução do gênero *Desulfovibrio*, que está associado com a DII e *leaky gut*. Também foi encontrado a presença de *Lactobacillus*. Peso do cólon e índice somático foram menores no grupo kefir. Ao final do experimento, todos animais apresentaram perda de peso. O kefir parece ter efeito na modulação da microbiota dos animais com DII, entretanto percebe-se a necessidade de mais estudos utilizando a bebida a fim de elucidar os mecanismos da mesma no ambiente intestinal.

Palavras-chave: Kefir; Probióticos; Colite; microbiota intestinal.

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic disorder that can involve any part of the gastrointestinal tract and has a multifactorial pathogenesis. Changes in the composition and functionality of the microbiome are related to IBD and the use of probiotics has been studied in the treatment of the disease. IL-10 knockout mice (n=16) 9 weeks old were used, divided into two groups, control and kefir. Both received 0.4ml of milk or kefir daily via gavage for 4 weeks, with feces collection and body mass assessment weekly. Finally, the animals were euthanized and the organs collected for analysis. The group that received kefir showed a reduction in the genus *Desulfovibrio*, which is associated with IBD and leaky gut. The presence of *Lactobacillus* was also found. Colon weight and somatic index were lower in the kefir group. At the end of the experiment, all animals showed weight loss. Kefir appears to have an effect on modulating the microbiota of animals with IBD, however, there is a need for more studies using the drink in order to elucidate its mechanisms in the intestinal environment.

Keywords: Kefir; Probiotics; Colitis.

Introdução

A doença inflamatória intestinal (DII) é um distúrbio crônico que pode envolver qualquer parte do trato gastrointestinal e pode ser considerada uma patologia global (Ng et al., 2017, Sairenji et al., 2017, Chou et al., 2019). Este termo compreende os distúrbios da Doença de Crohn (DC) e Colite Ulcerativa (CU), que se diferem do ponto de vista anatômico e histológico (Hadji; Bouchemal, 2022), têm patogênese multifatorial com impacto da associação entre genética, fatores ambientais e microbiota intestinal (Dai et al., 2022; Ananthkrishnan, 2015). Em função disso, o desenvolvimento de terapias eficientes no combate da doença é um desafio (Parada Venegas et al., 2019).

A associação entre microbiota intestinal e DII tem sido extensivamente estudada. Isso porque os mesmos fatores que interferem a microbiota intestinal, como amamentação, antibióticos e dieta, também podem ter efeito no desenvolvimento das DII (Pittayanon et al., 2020), podendo ser uma importante alternativa na busca por novas formas de terapia. Alterações na composição e funcionalidade do microbioma estão relacionadas à DII, como redução da diversidade alfa bacteriana, diminuição da produção de ácidos graxos de cadeia curta e aumento do estresse oxidativo (Kostic et al., 2014; Russo et al., 2019).

Para estudo da fisiopatologia das doenças e desenvolvimento de novas terapêuticas, os modelos experimentais de inflamação intestinal são utilizados há décadas e permitem uma variedade de informações a respeito da imunologia da mucosa, manutenção e perturbação da homeostase intestinal (Kiesler et al., 2015). Os camundongos knockout para interleucina 10 (IL-10^{-/-}), desenvolvem uma inflamação crônica espontânea (Mizoguchi, 2012), afetando todo o trato gastrointestinal, mas principalmente a região do cólon, se assemelhando com a DII em humanos do ponto de vista histopatológico (Elson et al., 1995, Davidson et al., 1996).

Outra estratégia estudada no desenvolvimento das terapias da DII é o uso de probióticos (Selvamani et al., 2022). Um dos possíveis benefícios do consumo de probióticos no tratamento dessas doenças refere-se ao seu efeito imunomodulador e propriedades anti-inflamatórias (Lê et al., 2022). O Kefir é uma produzida através da fermentação do leite pelos grãos de kefir, que são compostos por uma mistura de bactérias e leveduras (Sevencan et al., 2019, Curciarello et al., 2021), oferecendo

efeito probiótico, além da produção de compostos bioativos, como os peptídeos bioativos, aminoácidos, ácidos graxos de cadeia curta, enzimas e bacteriocinas, que agregam ainda mais efeitos benéficos à bebida (Pihurov et al., 2021).

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do uso do kefir de leite nas manifestações da doença inflamatória intestinal, na composição da microbiota intestinal e na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) em modelo experimental de doença inflamatória intestinal.

Materiais e métodos

Preparo do kefir

Os grãos de kefir utilizados neste estudo foram obtidos de famílias que tradicionalmente fazem o seu consumo, na cidade de Viçosa, localizada na região da zona da Mata Mineira, Minas Gerais, Brasil. Optou-se pela utilização do kefir de leite em função do maior aprofundamento científico sobre o mesmo. A produção do leite fermentado foi realizada no Laboratório de Análise de Alimentos e Bioquímica Nutricional, do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS), Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Para a produção do kefir de leite, os grãos foram separados em porções, sendo inoculados 10% dos grãos de kefir no leite de vaca integral, UHT, obtido do comércio local, de uma única marca e mesmo lote. Após a inoculação, o leite contendo os grãos de kefir foram mantidos em estufa com temperatura controlada 25 ± 2 °C por 24 horas, sem agitação (Rosa et al., 2014). Os grãos foram separados do leite fermentado (kefir), lavados com água destilada e reutilizados para uma nova produção de kefir, sucessivamente (figura 1).

O produto obtido pela fermentação do leite foi denominado kefir e foi ofertado aos animais durante o período de intervenção.

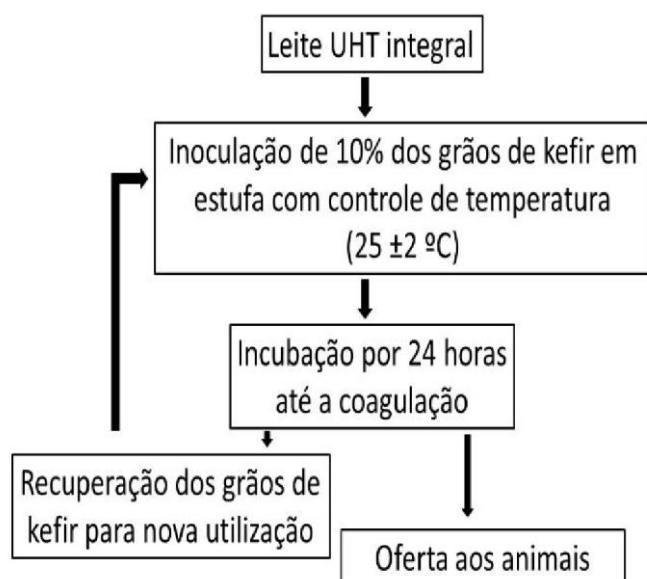


Figura 1. Fluxograma para a produção de kefir de leite

Composição centesimal do kefir e avaliação do pH

Foram realizadas as análises de composição centesimal, seguindo métodos descritos pela Association of Official Analytical Chemist – AOAC (2005, 1997, 1989). Nesta etapa, o kefir obtido através da fermentação do leite foi submetido ao processo de liofilização, que mantém alta preservação dos componentes do produto (Salcedo, 2015). O líquido foi congelado a -80 °C e posteriormente seco pela evaporação da água em condições de temperatura e pressão controladas, obtendo-se um pó. A diferença do peso entre o produto líquido e seco foi utilizada para cálculo da umidade. O produto em pó foi então utilizado para avaliação da composição centesimal, sendo a quantidade de carboidratos inferida por diferença.

O pH do kefir foi determinado com o auxílio de um pHmêtro (Instrutherm, modelo PH-1900, Brasil) previamente calibrado em temperatura ambiente (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

Contagem de Bactérias Ácido Láticas e leveduras do Kefir

A fim de determinar a viabilização do kefir como probiótico, foi necessário avaliar a quantidade de bactérias ácido láticas (BAL) da bebida a ser oferecida aos animais. Utilizando-se a técnica de microgotas, na superfície de cada placa contendo o meio ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS), foram inoculados 20 µL de diluições seriadas de kefir. As placas foram incubadas a 37 °C por 48h horas em estufa para a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC).

Da mesma forma, a contagem de leveduras ocorreu pelo método de plaqueamento em superfície com diluições seriadas. Na superfície de cada placa contendo ágar de batata e dextrose (BDA) acidificado com solução de 10 % de ácido tartárico, foram inoculados 100 µL das diluições decimais (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶) do kefir. As placas foram então incubadas a 25 °C em estufa incubadora durante 5 dias. A partir da fórmula: (média final da contagem de UFC x fator de diluição)/alíquota utilizada para o plaqueamento, determinou-se a quantidade de UFC/mL de kefir (Brasil, 2003).

Animais e desenho experimental

Os camundongos usados no experimento foram C57BL/6J IL-10^{-/-}, macho, com 8 semanas, foram obtidos do Biotério Central, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB), da UFV, com aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA/UFV) sob processo número 52/2019. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, em ciclos claro/escuro de 12 horas e temperatura média de 23 ± 2 °C, recebendo água e ração comercial *ad libitum* até o final do experimento.

Foram utilizados neste experimento 16 animais (apêndice 1). Esses, foram divididos em 2 grupos experimentais, controle (KOM, n=8) e kefir (KOK, n=8), distribuídos em função do peso. Após uma semana de aclimação, receberam via gavagem orogástrica, diariamente, 0,4 ml de leite UHT integral (KOM) e 0,4 ml de kefir (KOK, 2,4x10⁸ UFC), durante 4 semanas (adaptado de Du et al., 2022), conforme desenho experimental abaixo (figura 2).

Ao final de 13 semanas, os animais foram anestesiados com isoflurano 3% (Isoflorine®, Cristalia), seguido de exsanguinação total. Os tecidos foram removidos e lavados com solução tampão fosfato, pesados em balança semianalítica e armazenados a -80°C até o momento da análise.

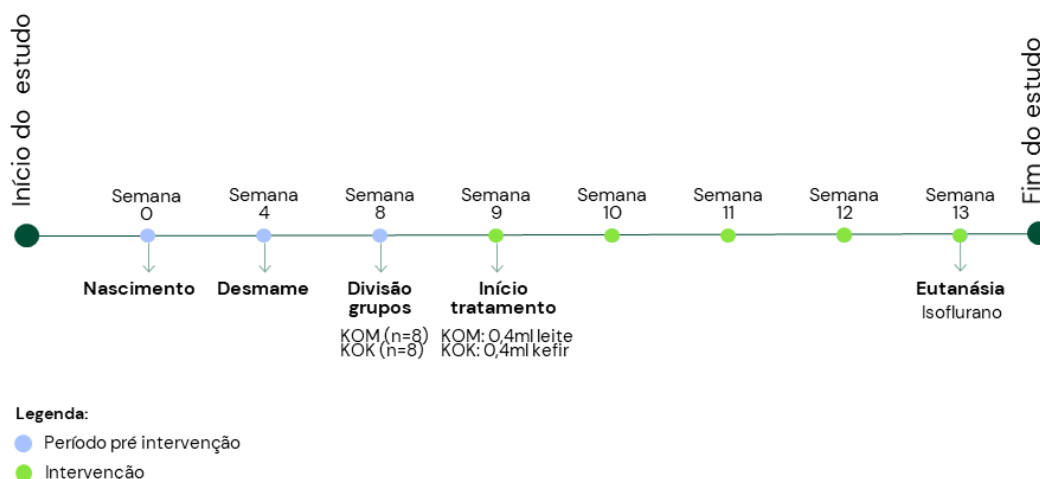


Figura 2. Desenho experimental

Massa corporal, urina e fezes

Semanalmente, os animais foram individualmente pesados para avaliação da massa corporal em balança digital. No mesmo momento, as fezes excretadas eram coletadas, armazenadas em eppendorf e rapidamente direcionadas ao -80°C .

Foi avaliado o peso e comprimento do intestino grosso, além do cálculo do índice intestino somático, obtido através da fórmula $\text{IS} = (\text{peso do órgão}/\text{peso do animal}) \times 100$. O comprimento foi avaliado utilizando régua graduada transparente.

Para coleta da urina, os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas por 24 horas, 1 dia antes da eutanásia, onde permaneceram em jejum e oferta de água *ad libitum* nas últimas 12 horas.

Permeabilidade intestinal

Para avaliação da permeabilidade, os animais receberam via gavagem, 0,2ml de uma solução contendo 11,8 mg de lactulose e 8,9 mg manitol. Após, foram alocados em gaiolas metabólicas para coleta de urina, onde permaneceram por 24 horas, com água *ad libitum* e jejum nas 12 horas finais. A urina coletada durante o período foi armazenada em freezer a -80°C até o momento da análise. As análises da concentração de lactulose e manitol foi avaliada utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Shimadzu®, Quito, Japan), utilizando uma curva de 220nm, com coluna de 300 mm \times 7.8 mm, fluxo médio de 1 ml/min, pressão de 54 Kgf. Utilizou-se

água acidificada com ácido sulfúrico como fase móvel. Os resultados foram expressos em mMol (Mendonça et al., 2009; Meddings et al., 1999).

Quantificação de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes totais

As fezes coletadas na última semana experimental foram utilizadas para avaliação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). As concentrações de acetato, propionato, butirato foram avaliadas em HPLC, com método adaptado (Smiricky-Tjardes et al., 2003). A leitura foi realizada no equipamento Ultimate 3000, Dionex®, coluna RezexROA- Organic Acid H+ (8%), Phenomenex®, com comprimento de 300mm e diâmetro de 7,8mm. A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico 5 mmolar, o fluxo de injeção 0,7mL/min, o volume de injeção 20µL e a temperatura do forno 45°C. O detector utilizado foi o Rid RH01, Shodex®. Curvas padrão dos ácidos acético, propiônico e butírico (Supelco®) foram construídas. Os resultados são expressos em µmol/g de fezes.

Sequenciamento do gene 16S rRNA

Para sequenciamento genético, foram utilizadas fezes da primeira e da última semana de intervenção. Os animais foram dispostos em recipientes sanitizados individualmente, onde permaneceram até que uma quantidade suficiente de fezes fosse expelida espontaneamente. As amostras foram mantidas a -80°C até o processamento. A extração de DNA fecal foi realizada conforme descrito por Zhang et al., 2006, utilizando-se 30±2 mg de fezes. As fezes coletadas dos animais (n=9/ cada grupo) foram distribuídas em 3 *pools* com 3 animais por *pool*. A concentração e integridade do DNA bacteriano foram avaliadas usando NanoDrop com cálculo da razão 260/230 e 260/280, ausência de esfregaço de degradação na eletroforese em agarose 0,8% e amplificação positiva por PCR utilizando primers 337F e 518R 16S rRNA para Região hipervariável V3 para detectar 16S rRNA (Park et al., 2021). As amostras foram então enviadas para a empresa Neopropecta (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil) para sequenciamento, em uma plataforma Illumina HiSeq 2500 (Caporaso et al., 2012).

Avaliação Metataxonômica

Os dados brutos (formato fastq) foram filtrados para remover leituras de baixa qualidade com pontuação de qualidade Phred menor que 30 usando o programa Trimmomatic v0.36 (Bolger et al., 2014). As leituras de alta qualidade foram inseridas no pacote DADA2 versão 1.8 implementado na plataforma R versão 3.6.1. Sequências quiméricas foram identificadas e deletadas. As sequências OTU representativas foram classificadas taxonomicamente usando o Silva 16S rRNA Database release 138 (Quast et al., 2013).

Análises estatísticas

A normalidade das variáveis foi determinada pelo teste de Shapiro Wilk. Para comparação entre os grupos experimentais, nos casos de distribuição paramétrica, foi utilizado o teste t de Student. Teste não paramétricos foram utilizados para valores que não apresentavam distribuição normal.

Os perfis de abundância bacteriana do top 50 foram calculados em níveis taxonômicos de filo para espécie em porcentagem de abundância e comparados usando um teste t de Student pareado ou teste de Wilcoxon para amostras dependentes e teste t de Student ou teste de Mann Whitney para amostras independentes.

As análises estatísticas foram realizadas no software Package Statistical System 28.0 for Windows Evaluation Version (SPSS), assumindo um $p < 0,05$. As análises da microbiota foram avaliadas utilizando o software *GraphPad Prism 5*. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão.

Resultados e discussão

Avaliação da composição centesimal e pH

Na Tabela 1 é possível verificar os resultados das análises relacionadas à composição de umidade, lipídios, proteínas, carboidratos, cinzas e pH, estabelecidas pela média de triplicatas, caracterizando a composição centesimal do leite fermentado pelos grãos de kefir.

Componentes	
Umidade (%)	89,0
Energia (kcal)	53,8
Carboidratos (%)	4,5
Proteína (%)	3,2 ± 1,00
Lipídeos (%)	2,6 ± 0,06
Cinzas (%)	0,7 ± 0,12
pH	4,03 ± 0,10

Obteve-se um teor de umidade de 89%, valor esperado por se tratar de uma bebida. Em revisão realizada Otles e Cagindi (2003), valor semelhante foi encontrado, com percentual de umidade de 87,5. Em outra análise realizada pelo nosso grupo, a umidade também foi o componente com maior percentual, atingindo 90% (Rosa et al., 2017).

Em relação aos macronutrientes, a cada 100g, em média 3,19g foi correspondente ao conteúdo de proteínas. Esse valor se encontra superior ao exigido na legislação pertinente de leites fermentados, que considera um teor mínimo de 2,9g a cada 100g de produto (Brasil, 2007). Valores semelhantes de diferentes amostras foram descritos por Farnworth e Mainville (2008), entre 3,16 a 3,18% de proteína.

Após a extração, obteve-se uma média de 2,58g de lipídeos para cada 100g do kefir. Considerando a utilização do leite integral como forma de substrato do kefir, o valor lipídico encontrado é inferior ao preconizado pela normativa de leites fermentados, que se encontra entre 3,0 a 5,0g de matéria gorda para cada 100g de produto (Brasil, 2007). De acordo com a mesma, o produto da fermentação seria classificado como parcialmente desnatado, com teor de gordura entre 0,6 a 2,9%.

A redução do teor de lipídeos pode ser resultado da ação de algumas espécies de leveduras presentes no kefir, com atividade lipolítica, que através da ação das lipases, assimilam o colesterol e aumentam a concentração de ácidos graxos livres, que podem ser então oxidados (Lopitz-Otsoa et al., 2006; Vujičić et al., 1992).

A média do valor de pH encontrado em 3 dias de aferição do kefir foi de 4,03, valor esse que o caracteriza como ácido, por estar abaixo de 7,0. Tal característica é obtida pelo processo de fermentação do leite, que provoca a produção de ácido láctico e contribui para a preservação do leite (Leite et al., 2013).

Avaliação microbiológica do kefir

A composição microbiológica do kefir pode variar de acordo com a origem dos grãos, o tipo de substrato utilizado para seu desenvolvimento e a forma como é cultivado (Prado et al., 2015). Sua composição química também sofre variação, com o tipo de leite, o processo de fermentação, as condições climáticas e o manejo dos grãos (Sarkar, 2008).

Após plaqueamento em diluições seriadas, obteve-se contagem de 10^8 (UFC/g) de bactérias lácticas totais e de 10^6 UFC/g de leveduras totais. Esse resultado permite inferir que o kefir analisado possui propriedades probióticas, visto que está de acordo com as características estabelecidas pelo MAPA (Brasil, 2007).

Avaliação da massa corporal dos animais

Ao final das 4 semanas, os animais foram pesados para avaliação da evolução da massa corporal. A média de peso dos animais diferiu apenas na segunda semana de intervenção, em que o grupo KOM ($26,6g \pm 1,08$) teve média superior ao KOK ($24,4g \pm 1,4$) (tabela 2). Ao avaliar a evolução da massa corporal, é possível observar que ao final do experimento, todos os animais perderam massa, indicando que desenvolveram a DII com sucesso, o que era esperado devido ao grau de inflamação que podem atingir. Na décima semana de experimento, os animais do grupo KOM ganharam massa, enquanto o grupo KOK perdeu ($p=0,0002$). Entretanto, na semana posterior, resultado inverso foi encontrado, com perda de massa no grupo KOM e ganho no grupo KOK. Na 11ª semana, ambos ganharam massa, sem diferenças entre os grupos.

Tabela 2. Massa corporal semanal e evolução

Semana	Grupo	Média massa corporal (g)	<i>p</i>	Evolução massa corporal (g)	<i>p</i>
8	KOM	24,77±0,74	0,0538		
	KOK	23,67±1,28			
9	KOM	25,65±0,89	0,1050		
	KOK	24,67±1,32			
10	KOM	26,60±1,08	0,0034*	0,96±0,42	0,0002*
	KOK	24,40±1,40		-0,27±0,39	
11	KOM	25,96±2,05	0,2233	-0,65±1,08	0,0232*
	KOK	24,84±1,33		0,46±0,59	
12	KOM	26,09±1,45	0,1459	0,33±0,87	0,6859
	KOK	25,04±1,18		0,18±0,53	
13	KOM	22,75±1,37	0,5200	-3,50±0,44	0,1867
	KOK	22,28±1,49		-2,76±1,34	

KOM: knockout leite; KOK: knockout kefir.
Resultados expressos em média e desvio padrão.

Em estudo de Chen e colaboradores (2017), também foi observado perda de massa dos animais IL-10 $-/-$, porém com melhora significativa no grupo tratado com probiótico em relação ao grupo não tratado. O mesmo resultado foi encontrado em estudo utilizando vesículas extracelulares de bactérias gram positivas presentes no kefir no tratamento de animais com indução de DII, com ganho significativo de massa corporal dos animais (Seo et al., 2018). Diferentemente, (Roller, 2004; Kuo, 2013) não encontraram diferenças no ganho de massa com a utilização de probióticos ou prebióticos.

Em relação ao intestino grosso (figura 3), o grupo KOK teve peso inferior ao KOM ($0,43\text{g}\pm 0,08$ vs $0,54\text{g}\pm 0,06$; $p=0,0124$). Resultado diferente do encontrado em estudo de Araki (2004), em que o peso do cólon não alterou com o uso de probiótico. Já em estudo utilizando prebióticos e simbióticos, o peso do ceco foi alterado, sendo maior nos grupos tratados, indicando o possível aumento de bactérias fermentadoras (Kuo, 2013). O índice somático também diferiu entre os grupos, sendo inferior no grupo KOK ($1,97\pm 0,45$ vs $2,37\pm 0,22$; $p=0,0403$). O comprimento do cólon não apresentou diferenças entre os grupos.

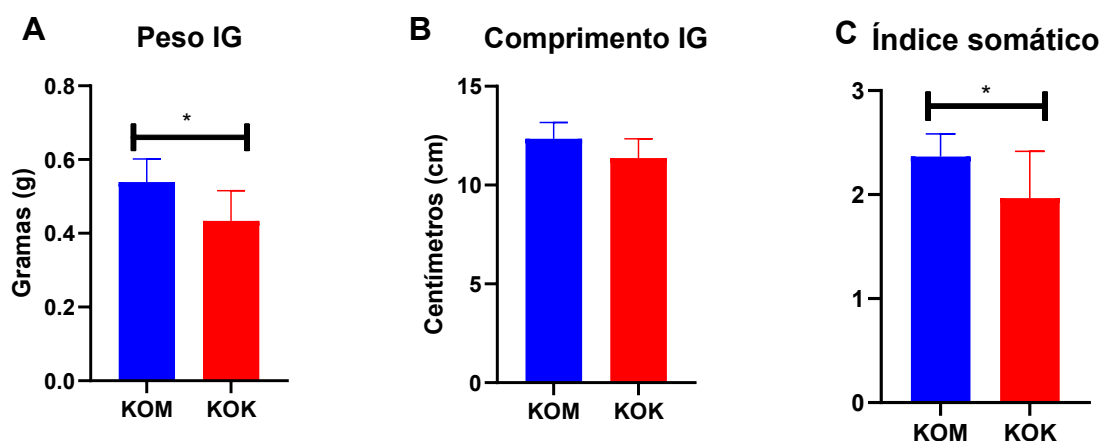


Figura 3. Avaliação do intestino grosso

Permeabilidade intestinal e AGCC

Não foram encontradas diferenças entre as concentrações de lactulose ($p=0,67$) e manitol ($p= 0,26$) (tabela 3), caracterizados como carboidratos não digeríveis e utilizados para avaliação da permeabilidade intestinal. Em estudo de Gomes e colaboradores (2023), o kefir também não alterou as concentrações de lactulose e manitol em ratos saudáveis. Em estudo de nosso grupo utilizando modelo de câncer colorretal, o uso do kefir reduziu a excreção dos açúcares na urina (Reis et al., 2019). A utilização de lactulose e manitol como marcadores de permeabilidade intestinal ocorre em função da passagem pela via paracelular do primeiro e via transcelular do segundo (Teixeira et al., 2014).

Tabela 3. Excreção urinária de lactulose e manitol pelos camundongos.

Variáveis	KOM	KOK
Lactulose (mMol)	8,68 ± 2,85	7,12 ± 2,65
Manitol (mMol)	8,98 ± 1,12	7,10 ± 1,28
Razão Lactulose/Manitol	0,75 ± 0,26	0,93 ± 0,34

A zonulina, um marcador de permeabilidade intestinal por alteração das *tigh junctions*, esteve reduzida em modelo de obesidade e esteatose hepática com a utilização do kefir ou de seus microrganismos isolados (Pražnikar et al., 2020; Kwon et al., 2019).

A atividade das bactérias intestinais foi avaliada pela concentração fecal dos AGCC acetato, butirato e proprianato. Os ácidos graxos de cadeia curta são um importante substrato influenciador nas vias de sinalização, tanto para a microbiota

intestinal, quanto para o sistema imune, ambos envolvidos no desenvolvimento da DII (Deleu et al., 2021). Entretanto, não foram encontradas diferenças entre acetato, propianato e butirato nos grupos experimentais ($p= 0,11; 0,39; 0,39$) (tabela 4).

Tabela 4. Concentração de ácidos graxos de cadeia curta fecal.

Variáveis	KOM	KOK
Acetato ($\mu\text{mol/g}$ de fezes)	0,012 \pm 0,002	0,007 \pm 0,001
Propianato ($\mu\text{mol/g}$ de fezes)	0,002 \pm 0,001	0,002 \pm 0,000
Butirato ($\mu\text{mol/g}$ de fezes)	0,030 \pm 0,007	0,028 \pm 0,012

O consumo de probióticos pode modular a microbiota intestinal, favorecendo bactérias produtoras de AGCC (Dalile et al., 2019). O kefir possui bactérias ácido lácticas, que produzem AGCC no intestino grosso (Gomes et al., 2023).

O mesmo resultado também foi encontrado em estudo de Silva et al. (2023), em que não foram encontradas diferenças em animais induzidos para colite com o uso de kefir. Em estudo do nosso grupo também utilizando kefir de leite, o mesmo aumentou a produção de butirato fecal e cerebral em animais saudáveis (Pereira et al., 2023). Em estudo de Du et al. (2022), o uso do kefir em animais induzidos para injúria cecal manteve as concentrações de AGCC, bem como apoiou as bactérias produtoras dos mesmos (*Lachnospiraceae*, *Blautia* e *Ruminococcus*).

O butirato promove a função da barreira intestinal, se ligando a células específicas do epitélio, o que depende das suas concentrações locais (Venegas et al., 2019). Assim, as baixas concentrações de butirato encontradas poderiam justificar a ausência de efeito positivo na permeabilidade, possivelmente em função do curto período de intervenção.

Análise Metataxonômica

Os resultados da análise de metataxonomia foram avaliados de 2 formas: intragrupo e intergrupo. As fezes coletadas de um grupo na primeira semana (A) de intervenção foram comparadas com as fezes do mesmo grupo na última semana (B). Além disso, as fezes da última semana foram comparadas entre os dois grupos.

Os filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Proteobacteria* estiveram presentes nos dois grupos e nos dois momentos de avaliação (figura 4). Os dois primeiros filos são os

mais presentes no trato gastrointestinal (Procházková et al., 2023). A disbiose pode ser avaliada através da razão entre *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (razão F:B), sendo utilizada como um fator de predisposição para doenças (Jandhyala et al., 2015).

Em indivíduos com DII, é observado uma redução da razão F:B, bem como uma redução da abundância de *Firmicutes* na fase ativa da doença (Stojanov et al., 2020). Comprovando, um aumento de *Bacteroidetes* foi encontrado por Walker e colaboradores (2011) de pacientes com DC e CU. Em nosso estudo, a intervenção com kefir aumentou a razão, enquanto o grupo controle diminuiu a razão F:B, o que poderia indicar um desequilíbrio na microbiota do último. Em estudo de Qu et al. (2021), animais induzidos para DII com dextran sulfato de sódio (DSS) tiveram uma redução da abundância de *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, enquanto a suplementação com o flavonoide Kaempferol preveniu a redução da razão. Já em estudo utilizando Parthenolide, um composto natural, não houve diferença na razão entre os animais induzidos com DSS (Liu et al., 2020).

Um aumento da abundância de *Proteobacteria* está relacionada com a colite. Shin e colaboradores (2015) sugerem a hipótese de que a resposta desregulada do sistema imune leva ao aumento de *Proteobacteria* que, em contrapartida, promove a inflamação intestinal, sendo respaldado por estudos em animais e humanos. Em nosso estudo, não foram observadas diferenças na abundância de *Proteobacterias* (figura 4) entre os grupos experimentais, mas é notório a importante presença do filo na microbiota fecal dos animais.

O filo *Actinobacteria*, esteve presente no grupo tratado com kefir na última semana de intervenção. O filo foi encontrado em amostras de kefir nos estudos de (Tenorio-Salgado et al., 2021; Marsh et al., 2013; Dobson et al., 2011). Da mesma forma, o filo *Patescibacteria* também foi encontrado no grupo KOK. No grupo controle, o filo esteve presente nos animais na primeira semana de intervenção, mas não foi encontrado ao final. Em estudo de Zhu (2022), o filo estava aumentado em pacientes na fase ativa da colite em comparação aos indivíduos saudáveis. As bactérias do filo não apresentam um ciclo de ácido tricarbóxico (TCA), o que sugere serem fermentadoras anaeróbicas estritas (Chang et al., 2022). Segundo o autor, a presença do filo poderia estar associada negativamente aos camundongos com colite induzidos com DSS.

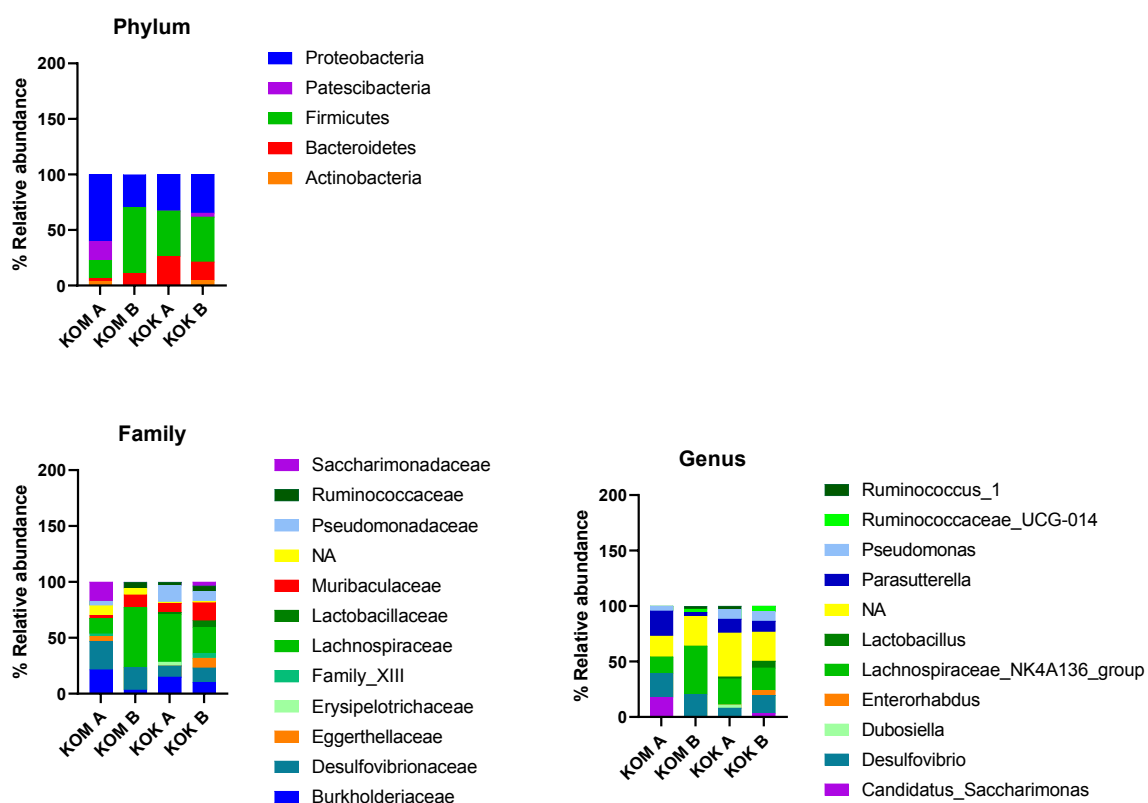


Figura 4. (A) Análises taxonômicas da microbiota fecal ao nível de filo, família e gênero.

KOK: knockout kefir; KOM knockout leite; A: primeira semana de intervenção B: quarta semana de intervenção.

Ao avaliar a família *Burkholderiaceae*, não foi observado diferença entre os grupos, entretanto houve uma redução no grupo KOM ($p=0,0207$) (figura 5). Em estudo de Ma e colaboradores (2021), animais que receberam azoxymetano (AOM) e DSS para indução de câncer tiveram redução da família em comparação ao grupo controle. Ao receberem um exopolissacarídeo produzido por *Lactiplantibacillus plantarum-12*, a abundância relativa aumentou.

A família *Desulfovibrionaceae* esteve aumentada no grupo KOM em comparação ao grupo KOK ($p=0,0428$). A família produz um metabólito (sulfato de hidrogênio) que pode quebrar a barreira da mucosa intestinal e induzir DII (Zhai et al., 2021) e é mais prevalente em indivíduos com DII em comparação com indivíduos saudáveis (Nagao-Kitamoto; Kamada, 2017). Em camundongos obesos com tolerância a glicose diminuída, a família esteve aumentada (Zhang et al., 2010). Já em estudo com

indivíduos obesos, a perda de peso promoveu redução da família, além da redução das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 (Xiao et al., 2004).

A família *Saccharimonadaceae* esteve presente ao final da intervenção com kefir (figura 5) e reduziu no grupo controle ($p=0,03$). Saccharibacterias apresentam metabolismo limitado, sendo consideradas epibiontes obrigatórias da superfície de outras bactérias. Produzem diversas enzimas catabólicas que degradam moléculas complexas (Zhukov et al., 2022).

A família *Lactobacillaceae* foi identificada apenas no grupo KOK (figura 5). Sua presença foi identificada já na primeira semana de intervenção, entretanto o aumento ao final não foi estatisticamente superior. Diversas espécies de *Lactobacillus* já foram encontradas em amostras de kefir (Rosa et al., 2017), estando entre os microrganismos mais comumente encontrados no mesmo (Slattery et al., 2019).

Não houveram diferenças entre as famílias *Erysipelotrichaceae*, *Familia_XIII*, *Lachnospiraceae*, *Muribaculaceae*, *Pseudomonadaceae* e *Ruminococcaceae*.

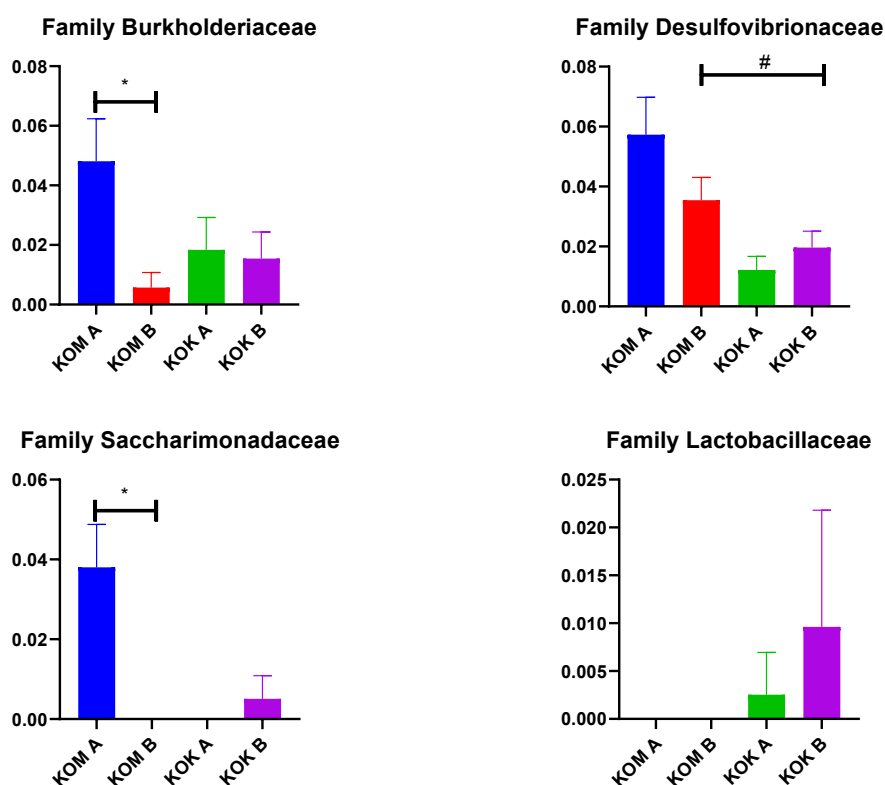


Figura 5. Análises taxonômicas da microbiota fecal ao nível de família.

O gênero *Parasutterella* reduziu no grupo KOM ($p=0,0207$). Apesar do gênero ser caracterizado como um componente central da microbiota intestinal humana e de

camundongos (Ju et al., 2019), esse foi associado a inflamação crônica intestinal em pacientes portadores de síndrome do intestino irritável (Chen et al., 2018).

O gênero esteve aumentado em indivíduos com DC em comparação à indivíduos saudáveis (Yan et al., 2023). Em estudo de Sharma e colaboradores (2022), que avaliou associação entre similaridade genética e microbioma em famílias com DII, 12 regiões cromossômicas foram associadas com sete gêneros microbianos, dentre eles o *Parasutterella*, indicando que o componente genético da doença está relacionado com a composição microbiana.

O uso de um coquetel probiótico reduziu a abundância do gênero em camundongos induzidos para colite com DSS (Zhu et al., 2022). Em estudo de Feng et al. (2022), o gênero esteve presente nos animais induzidos para colite com DSS, havendo redução com uso de crocetina, um dos compostos bioativos presentes no açafrão. Já em trabalho utilizando uma dieta balanceada em aminoácidos utilizando o mesmo modelo experimental, o gênero também reduziu, além de apresentar uma correlação positiva com TNF- α , IL-1 β , e IL-6 e uma correlação negativa com a citocina anti-inflamatória IL-10 (Li et al., 2022).

Desulfovibrio, o único gênero da família *Desulfovibrionaceae* identificado, estava mais abundante no grupo KOM em comparação com o grupo KOK ($p=0,0428$) (figura 6). Este tem se mostrado presente em biópsias de pacientes com CU (Rowan et al., 2010). Bactérias anaeróbicas redutoras de sulfato usam compostos orgânicos como fonte de energia e carbono, através de um processo que é denominado redução dissimilatória de sulfato. São formados então sulfeto de hidrogênio (H_2S) tóxico, que em altas concentrações, pode provocar inflamação do epitélio intestinal e consequentemente o desenvolvimento de colite (Kushkevych et al., 2020).

Os efeitos do H_2S podem ser estimulatórios e inibitórios em vários processos gastrointestinais, como inflamação, respostas contráteis, câncer e apoptose (Singh; Lin, 2015). A conversão de H_2S para tiosulfato poderia ser um mecanismo de proteção da mucosa intestinal para prevenção dos efeitos tóxicos que poderiam levar a injúrias no epitélio, sendo então um defeito no processo de detoxificação uma possível causa de doenças intestinais, como a colite (Levitt et al., 1999).

O aumento de *Desulfovibrio*, a bactéria mais prevalente redutora de sulfato, está associada com a DII, além de bolsite, uma inflamação que ocorre no revestimento de uma bolsa criada durante cirurgia para tratar a colite ulcerosa ou outras doenças;

periodontite e doença de Parkinson e outras doenças que estão relacionadas com um aumento da permeabilidade intestinal, conhecido como *leaky gut* (Singh et al., 2022).

Outro fator importante é o consumo do sulfato na alimentação, que pode ser encontrado em alguns pães, farinha de soja, frutas secas, vegetais do grupo das brassicas e algumas bebidas, como cervejas e vinhos (Kushkevych et al., 2019). Como as bactérias do gênero *Desulfovibrio* utilizam o sulfato como receptor terminal de elétrons e compostos orgânicos em seu metabolismo, a ingestão de uma dieta contendo sulfato aumentaria a sua abundância, que está relacionada com o desenvolvimento da DII.

O consumo de *Lactobacillus plantarum* P-8 Lp-8 provocou redução do gênero em voluntários humanos em estudo de Wang et al. (2013). Quando utilizou-se o prebiótico glicomacropéptido (Sawin et al., 2015), a concentração fecal do gênero também reduziu, bem como citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , e IL-1 β).

Este achado leva-nos à constatação que o processo inflamatório da DII já estava instalado desde o início da intervenção e que a utilização do kefir foi capaz de reduzir a abundância do mesmo.

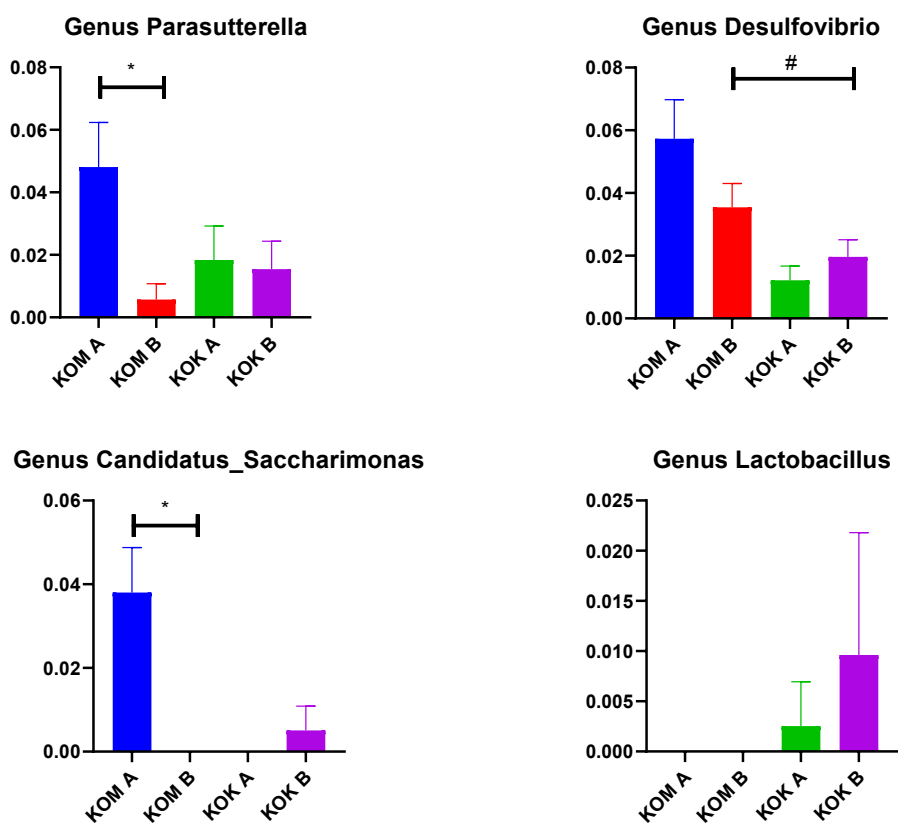


Figura 6. Análises taxonômicas da microbiota fecal ao nível de gênero.

O gênero *Candidatus_Saccharimonas* do filo *Patescibacteria* foi reduzido no grupo controle ($p=0,03$), com um discreto aumento ao final da intervenção com kefir (figura 6).

Foi observada redução do gênero em camundongos induzidos ao câncer colorretal com AOM/DSS, com aumento da abundância utilizando-se Corilin, um composto com efeitos farmacológicos em função das suas propriedades antioxidantes, extraído do fruto e sementes da *Psoralea corylifolia* L. (Chang et al., 2022). O mesmo modelo foi utilizado para avaliar a utilização de celulose, com aumento da abundância do gênero e uma correlação negativa com IL-6, IL-1b e TNF- α , tendo um efeito benéfico (Li et al., 2021). Em modelo de colite induzido por DSS, a utilização de peptídeos da clara de ovo aumentou a abundância do gênero. Encontraram também uma correlação negativa do gênero nos animais induzidos com IL-6, IL-1 β , TNF- α e IL-8, sugerindo que o gênero pode participar na imunomodulação e no reparo intestinal (Ge et al., 2021).

A utilização de *Lacticaseibacillus paracasei* aumentou a abundância do gênero *Candidatus_Saccharimonas* em camundongos SAMP8 idosos (Chen et al., 2021), sendo negativamente correlacionado com as concentrações de IgE e IgM na mucosa intestinal.

Diferentemente, em estudo do nosso grupo, utilizando simbiótico com animais IL-10 $-/-$ induzidos a lesões pré neoplásicas com 1,2-dimethylhydrazina, o grupo tratado teve sua abundância reduzida em comparação ao grupo controle (Cruz et al., 2020). Os autores sugerem que o gênero *Candidatus_Saccharimonas* pode influenciar diretamente a resposta inflamatória responsável pelo desenvolvimento do câncer colorretal.

A maioria dos probióticos utilizados para tratamento da DII são do filo *Firmicutes*, como apresentado por Stojanov e colaboradores (2020). Diversas espécies de *Lactobacillus* são utilizadas, dentre elas *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. fermentum* e *L. casei*. Com exceção do *L. fermentum*, todas as espécies de *Lactobacillus* já foram encontradas ou estão relacionadas ao consumo de kefir em diversos desfechos, como perda de peso, redução de citocinas pró inflamatórias, alterações no perfil colesterolêmico e redução do estresse oxidativo (Peluzio et al.,

2021). Em modelos animais, o gênero afeta direta ou indiretamente a inflamação, promovendo a restauração da integridade da barreira intestinal (Rastogi; Singh, 2022).
Figura 9. Análises taxonômicas da microbiota fecal ao nível de gênero.

Os resultados encontrados apontam que o grupo controle e o kefir tiveram alteração na microbiota intestinal. O uso do kefir, quando comparado ao grupo controle, reduziu a abundância relativa de *Desulfovibrio*, um gênero presente em biópsias de indivíduos com CU, que está associada com a *leaky gut*, um comprometimento na integridade da barreira intestinal (Singh et al., 2022). Também foi encontrado redução das bactérias *Candidatus_Saccharimonas* e *Parasutterella* no grupo controle. A primeira é produtora de AGCC, com importante influência na manutenção do pH intestinal (Ma et al., 2023) e tendo uma correlação negativa com citocinas pró-inflamatórias (Wang et al., 2022). Já a segunda está associada com a inflamação intestinal (Chen et al., 2018) e apresenta correlação positiva com citocinas pró-inflamatórias (Li et al., 2022). Além disso, a presença de *Lactobacillus*, um gênero conhecido por seus efeitos benéficos, também mostra a modulação da microbiota com a utilização do kefir. Entretanto, o tempo de administração não foi suficiente para que seu aumento fosse significativo.

Conclusão

Os resultados encontrados utilizando o modelo IL-10 -/- se mostrou similar aos disponíveis na literatura, com perda de massa corporal pelos animais. Observou-se alteração da composição da microbiota intestinal, com aumento do gênero *Desulfovibrio* e presença de *Lactobacillus* com a utilização do kefir em comparação ao grupo controle. *Candidatus_Saccharimonas* e *Parasutterella* foram reduzidas no grupo controle ao final do período de intervenção. Os resultados encontrados sugerem que a intervenção com kefir aumentou a diversidade bacteriana, além de reduzir a abundância de *Desulfovibrio*. Não foram encontradas diferenças em relação à massa corporal, permeabilidade intestinal e AGCC. Apesar de ter sido utilizado como um controle, o leite foi capaz de reduzir a abundância de alguns gêneros. Mais estudos são necessários a fim de se elucidar os possíveis efeitos da utilização das bebidas de leite e kefir na terapêutica da doença, enfatizando-se os estudos com maior tempo de intervenção.

Referências

- ANANTHAKRISHNAN, A. N. Epidemiology and risk factors for IBD. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 12, n. 4, p. 205-217, 2015.
- ANTONISSEN, Gunther et al. Microbial shifts associated with necrotic enteritis. **Avian Pathology**, v. 45, n. 3, p. 308-312, 2016.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemistry. Official methods of analysis of A.O.A.C. 14^a ed. Washington; 1989.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemistry. **Official Methods of Analysis**. 16^a ed. Gaithersburg; 1997.
- AOAC - Official Methods of Analysis: Association of Official Analytical Chemists, 18th ed. Gaithersburg, M.D, USA, 2005.
- ARAKI, Y. et al. Clostridium butyricum, a probiotic derivative, suppresses dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in rats. **International journal of molecular medicine**, v. 13, n. 4, p. 577-580, 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 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, 26 de agosto de 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução nº 46, de 23 de outubro de 2007. Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados.
- CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME journal**, v. 6, n. 8, p. 1621-1624, 2012.
- CHANG, Z. et al. Modulation of gut microbiota combined with upregulation of intestinal tight junction explains anti-inflammatory effect of corylin on colitis-associated cancer in mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, p. 2667, 2022.
- CHEN, H. et al. 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, 2017.
- CHEN, H.-Q et al. Lactobacillus plantarum ameliorates colonic epithelial barrier dysfunction by modulating the apical junctional complex and PepT1 in IL-10 knockout mice. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 299, n. 6, p. G1287-G1297, 2010.

CHEN, L.-H. et al. Lacticaseibacillus paracasei PS23 effectively modulates gut microbiota composition and improves gastrointestinal function in aged SAMP8 mice. **Nutrients**, v. 13, n. 4, p. 1116, 2021.

CHEN, Y.-J. et al. Parasutterella, in association with irritable bowel syndrome and intestinal chronic inflammation. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 33, n. 11, p. 1844-1852, 2018.

CHOU, J.-W. et al. Epidemiology and clinical outcomes of inflammatory bowel disease: a hospital-based study in central Taiwan. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2019, 2019.

CRUZ, B. C. S. et al. Use of the synbiotic VSL# 3 and yacon-based concentrate attenuates intestinal damage and reduces the abundance of Candidatus Saccharimonas in a colitis-associated carcinogenesis model. **Food research international** (Ottawa, Ont.), v. 137, p. 109721-109721, 2020.

CURCIARELLO, R. et al. Probiotic lactobacilli isolated from kefir promote down-regulation of inflammatory lamina propria t cells from patients with active IBD. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 658026, 2021.

DAI, C. et al. The incidence, clinical characteristics and serological characteristics of anti-tumor necrosis factor-induced lupus in patients with inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. **International Immunopharmacology**, v. 112, p. 109269, 2022.

DALILE, B. et al. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 16, n. 8, p. 461-478, 2019.

DAVIDSON, N. J. et al. T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 1, p. 241-251, 1996.

DELEU, S. et al. Short chain fatty acids and its producing organisms: An overlooked therapy for IBD?. **EBioMedicine**, v. 66, p. 103293, 2021.

DOBSON, A. et al. High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain. **FEMS microbiology letters**, v. 320, n. 1, p. 56-62, 2011.

DONG, F. et al. Pediococcus pentosaceus CECT 8330 protects DSS-induced colitis and regulates the intestinal microbiota and immune responses in mice. **Journal of translational medicine**, v. 20, n. 1, p. 33, 2022.

DU, G. et al. Protective effects of Tibetan kefir in mice with ochratoxin A-induced cecal injury. **Food Research International**, v. 158, p. 111551, 2022.

ELSON, C. O. et al. Experimental models of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 109, n. 4, p. 1344-1367, 1995.

FENG, P. et al. Crocetin prolongs recovery period of DSS-induced colitis via altering intestinal microbiome and increasing intestinal permeability. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 7, p. 3832, 2022.

HADJI, H.; BOUCHEMAL, K. Advances in the treatment of inflammatory bowel disease: Focus on polysaccharide nanoparticulate drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, p. 114101, 2022.

GE, H. et al. Egg white peptides ameliorate dextran sulfate sodium-induced acute colitis symptoms by inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines and modulation of gut microbiota composition. **Food Chemistry**, v. 360, p. 129981, 2021.

GOMES, A. F. et al. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and kefir improved intestinal and bone health but without symbiotic benefits in rats. **Nutrition Research**, v. 118, p. 85-93, 2023.

HILL, C. et al. 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 & hepatology**, 2014.

HUANG, W.-C. et al. *Lactobacillus plantarum* PS128 improves physiological adaptation and performance in triathletes through gut microbiota modulation. **Nutrients**, v. 12, n. 8, p. 2315, 2020.

Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 25- 27.

JANDHYALA, S. M. et al. Role of the normal gut microbiota. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 21, n. 29, p. 8787, 2015.

JU, T. et al. Defining the role of *Parasutterella*, a previously uncharacterized member of the core gut microbiota. **The ISME journal**, v. 13, n. 6, p. 1520-1534, 2019.

KWON, Ji-Hye et al. Combination of whole grapeseed flour and newly isolated kefir lactic acid bacteria reduces high-fat-induced hepatic steatosis. **Molecular nutrition & food research**, v. 63, n. 4, p. 1801040, 2019.

KIESLER, P.; FUSS, I. J.; STROBER, W. Experimental models of inflammatory bowel diseases. **Cellular and molecular gastroenterology and hepatology**, v. 1, n. 2, p. 154-170, 2015.

KOSTIC, A. D.; XAVIER, R. J.; GEVERS, D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. **Gastroenterology**, v. 146, n. 6, p. 1489-1499, 2014.

KUO, S.; MERHIGE, P. M.; HAGEY, L. R. The effect of dietary prebiotics and probiotics on body weight, large intestine indices, and fecal bile acid profile in wild type and *IL10^{-/-}* mice. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e60270, 2013.

- KUSHKEVYCH, I. et al. Hydrogen sulfide as a toxic product in the small–large intestine axis and its role in IBD development. **Journal of clinical medicine**, v. 8, n. 7, p. 1054, 2019.
- KUSHKEVYCH, I. et al. Recent advances in metabolic pathways of sulfate reduction in intestinal bacteria. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 698, 2020.
- LÊ, A. et al. Inflammatory bowel disease therapeutic strategies by modulation of the microbiota: how and when to introduce pre-, pro-, syn-, or postbiotics?. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 323, n. 6, p. G523-G553, 2022.
- LEITE, A. M. O. et al. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 341-349, 2013.
- LEVITT, M. D. et al. Detoxification of hydrogen sulfide and methanethiol in the cecal mucosa. **The Journal of clinical investigation**, v. 104, n. 8, p. 1107-1114, 1999.
- LI, D.-P. et al. High red meat intake exacerbates dextran sulfate-induced colitis by altering gut microbiota in mice. **Frontiers in nutrition**, v. 8, p. 646819, 2021.
- LI, Q. et al. The effects of cellulose on AOM/DSS-treated C57BL/6 colorectal cancer mice by changing intestinal flora composition and inflammatory factors. **Nutrition and Cancer**, v. 73, n. 3, p. 502-513, 2021.
- LI, Q. et al. Effects of dietary phosphatidylcholine and sphingomyelin on DSS-induced colitis by regulating metabolism and gut microbiota in mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 105, p. 109004, 2022.
- LI, S. et al. Amino acid-balanced diets improved DSS-induced colitis by alleviating inflammation and regulating gut microbiota. **European Journal of Nutrition**, v. 61, n. 7, p. 3531-3543, 2022.
- LI, W.-B. et al. VSL# 3 can prevent ulcerative colitis-associated carcinogenesis in mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 37, p. 4254, 2018.
- LIU, Bin et al. Two-sample mendelian randomization analysis investigates causal associations between gut microbial genera and inflammatory bowel disease, and specificity causal associations in ulcerative colitis or Crohn's disease. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 921546, 2022.
- LIU, Y.-J. et al. Parthenolide ameliorates colon inflammation through regulating Treg/Th17 balance in a gut microbiota-dependent manner. **Theranostics**, v. 10, n. 12, p. 5225, 2020.
- LOPITZ-OTSOA, F. et al. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Rev Iberoam Micol**, v. 23, n. 2, p. 67-74, 2006.

- MA, F. et al. Exopolysaccharide produced by lactiplantibacillus plantarum-12 alleviates intestinal inflammation and colon cancer symptoms by modulating the gut microbiome and metabolites of C57BL/6 mice treated by azoxymethane/dextran sulfate sodium salt. **Foods**, v. 10, n. 12, p. 3060, 2021.
- MA, Z. et al. Integrated 16S rRNA sequencing and nontargeted metabolomics analysis to reveal the mechanisms of Yu-Ye Tang on type 2 diabetes mellitus rats. **Frontiers in Endocrinology**, v. 14, 2023.
- MARKOWIAK-KOPEĆ, P.; ŚLIŻEWSKA, K. The effect of probiotics on the production of short-chain fatty acids by human intestinal microbiome. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 1107, 2020.
- MARSH, A. J. et al. Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. **FEMS microbiology letters**, v. 348, n. 1, p. 79-85, 2013.
- MEDDINGS, J. B. et al. Increased gastrointestinal permeability is an early lesion in the spontaneously diabetic BB rat. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 276, n. 4, p. G951-G957, 1999.
- MENDONÇA, J. N. et al. Padronização e validação de metodologia para verificação de permeabilidade intestinal utilizando cromatografia gasosa. 2009.
- MIZOGUCHI, A. Animal models of inflammatory bowel disease. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 105, p. 263-320, 2012.
- NAGAO-KITAMOTO, H.; KAMADA, N. Host-microbial cross-talk in inflammatory bowel disease. **Immune network**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 2017.
- NG, S. C. et al. 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.
- OTLES, S.; CAGINDI, O. Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. **Pakistan journal of nutrition**, v. 2, n. 2, p. 54-59, 2003.
- PARADA VENEGAS, D. et al. Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. **Frontiers in immunology**, p. 277, 2019.
- PELUZIO, M. C. G. et al. Kefir and intestinal microbiota modulation: implications in human health. **Frontiers in nutrition**, v. 8, p. 638740, 2021.
- PEREIRA, M. F. A. Milk kefir alters fecal microbiota impacting gut and brain health in mice. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 107, n. 16, p. 5161-5178, 2023.
- PIHUROV, M. et al. Novel Insights for Metabiotics Production by Using Artisanal Probiotic Cultures. **Microorganisms**, v. 9, n. 11, p. 2184, 2021.

PITTAYANON, R. et al. Differences in gut microbiota in patients with vs without inflammatory bowel diseases: a systematic review. **Gastroenterology**, v. 158, n. 4, p. 930-946. e1, 2020.

PRADO, M. R. et al. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1177, 2015.

PRAŽNIKAR, Z. J. et al. Effects of kefir or milk supplementation on zonulin in overweight subjects. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 5, p. 3961-3970, 2020.

PROCHÁZKOVÁ, N. et al. Advancing human gut microbiota research by considering gut transit time. **Gut**, v. 72, n. 1, p. 180-191, 2023.

QIU, X. et al. Identification of gut microbiota and microbial metabolites regulated by an antimicrobial peptide lipocalin 2 in high fat diet-induced obesity. **International Journal of Obesity**, v. 45, n. 1, p. 143-154, 2021.

QU, Y. et al. Kaempferol alleviates murine experimental colitis by restoring gut microbiota and inhibiting the LPS-TLR4-NF- κ B axis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 679897, 2021.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, v. 41, n. D1, p. D590-D596, 2012.

RASTOGI, S.; SINGH, A. Gut microbiome and human health: Exploring how the probiotic genus *Lactobacillus* modulate immune responses. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 1042189, 2022.

REIS, S. A. et al. Kefir reduces the incidence of pre-neoplastic lesions in an animal model for colorectal cancer. **Journal of Functional Foods**, v. 53, p. 1-6, 2019.

ROLLER, M.; RECHKEMMER, G.; WATZL, B. Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* modulates intestinal immune functions in rats. **The journal of Nutrition**, v. 134, n. 1, p. 153-156, 2004.

ROSA, D. D. Evaluation of kefir consumption on metabolic, immune, hormonal and histological parameters in spontaneously hypertensive rats with induced metabolic syndrome. 2014.

ROSA, D. D. et al. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. **Nutrition research reviews**, v. 30, n. 1, p. 82-96, 2017.

ROWAN, F. et al. *Desulfovibrio* bacterial species are increased in ulcerative colitis. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 53, n. 11, p. 1530-1536, 2010.

RUSSO, E. et al. Immunomodulating activity and therapeutic effects of short chain fatty acids and tryptophan post-biotics in inflammatory bowel disease. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 2754, 2019.

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, 2017.

SALCEDO, J. et al. Human milk bactericidal properties: Effect of lyophilization and relation to maternal factors and milk components. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 60, n. 4, p. 527-532, 2015.

SARKAR, S. Biotechnological innovations in kefir production: a review. **British Food Journal**, 2008.

SAWIN, E. A. et al. Glycomacropeptide is a prebiotic that reduces *Desulfovibrio* bacteria, increases cecal short-chain fatty acids, and is anti-inflammatory in mice. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 309, n. 7, p. G590-G601, 2015.

SELVAMANI, S. et al. Efficacy of probiotics-based interventions as therapy for inflammatory bowel disease: A recent update. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2022.

SEO, M. K. et al. Therapeutic effects of kefir grain *Lactobacillus*-derived extracellular vesicles in mice with 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced inflammatory bowel disease. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 10, p. 8662-8671, 2018.

SEVENCAN, N. O. et al. Dose-dependent effects of kefir on colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid in rats. **Food Science & Nutrition**, v. 7, n. 9, p. 3110-3118, 2019.

SHARMA, A. et al. Linkage analysis identifies novel genetic modifiers of microbiome traits in families with inflammatory bowel disease. **Gut Microbes**, v. 14, n. 1, p. 2024415, 2022.

SHIN, N.-R.; WHON, T. W.; BAE, J.-W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends in biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 496-503, 2015.

SILVA, K. N. et al. Effects of kefir fermented milk beverage on sodium dextran sulfate (DSS)-induced colitis in rats. **Heliyon**, v. 9, n. 1, 2023.

SINGH, S. B.; LIN, H. C. Hydrogen sulfide in physiology and diseases of the digestive tract. **Microorganisms**, v. 3, n. 4, p. 866-889, 2015.

SINGH, S. B. et al. Intestinal alkaline phosphatase prevents sulfate reducing bacteria-induced increased tight junction permeability by inhibiting snail pathway. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, p. 627, 2022.

SLATTERY, C.; COTTER, P. D.; W. O'TOOLE, P. Analysis of health benefits conferred by *Lactobacillus* species from kefir. **Nutrients**, v. 11, n. 6, p. 1252, 2019.

SMIRICKY-TJARDES, M. R. et al. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal

fermentative characteristics of growing pigs. **Journal of animal science**, v. 81, n. 10, p. 2535-2545, 2003.

STOJANOV, S.; BERLEC, A.; ŠTRUKELJ, B. The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1715, 2020.

SUN, M. et al. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. **Journal of gastroenterology**, v. 52, p. 1-8, 2017.

TEIXEIRA, T. F. S. et al. Intestinal permeability measurements: general aspects and possible pitfalls. **Nutricion hospitalaria**, v. 29, n. 2, p. 269-281, 2014.

TENORIO-SALGADO, S. et al. Metagenomic analysis and antimicrobial activity of two fermented milk kefir samples. **MicrobiologyOpen**, v. 10, n. 2, p. e1183, 2021.

VUJIČIĆ, I. F.; VULIĆ, M.; KÖNYVES, T. Assimilation of cholesterol in milk by kefir cultures. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 9, p. 847-850, 1992.

XIAO, S. et al. A gut microbiota-targeted dietary intervention for amelioration of chronic inflammation underlying metabolic syndrome. **FEMS microbiology ecology**, v. 87, n. 2, p. 357-367, 2014.

WALKER, A. W. et al. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. **BMC microbiology**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2011.

WANG, C. et al. *Saccharomyces boulardii* alleviates ulcerative colitis carcinogenesis in mice by reducing TNF- α and IL-6 levels and functions and by rebalancing intestinal microbiota. **BMC microbiology**, v. 19, p. 1-12, 2019.

WANG, J. et al. Short-and Long-Term Effects of Different Antibiotics on the Gut Microbiota and Cytokines Level in Mice. **Infection and Drug Resistance**, p. 6785-6797, 2022.

WANG, L. et al. Effect of oral consumption of probiotic *Lactobacillus planatarum* P-8 on fecal microbiota, SIgA, SCFAs, and TBAs of adults of different ages. **Nutrition**, v. 30, n. 7-8, p. 776-783. e1, 2013.

WU, Y. et al. Deferasirox alleviates DSS-induced ulcerative colitis in mice by inhibiting ferroptosis and improving intestinal microbiota. **Life Sciences**, v. 314, p. 121312, 2023.

YAN, P. et al. Integrating the serum proteomic and fecal metaproteomic to analyze the impacts of overweight/obesity on IBD: a pilot investigation. **Clinical Proteomics**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2023.

YANG, J. et al. RhoB affects colitis through modulating cell signaling and intestinal microbiome. **Microbiome**, v. 10, n. 1, p. 1-22, 2022.

YILMAZ, İ.; DOLAR, M. E.; ÖZPINAR, H. Effect of administering kefir on the changes in fecal microbiota and symptoms of inflammatory bowel disease: A randomized controlled trial. **The Turkish Journal of Gastroenterology**, v. 30, n. 3, p. 242, 2019.

ZHAI, Z. et al. Cecropin A alleviates inflammation through modulating the gut microbiota of C57BL/6 mice with DSS-induced IBD. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1595, 2019.

ZHANG, B.-W. et al. A widely applicable protocol for DNA isolation from fecal samples. **Biochemical genetics**, v. 44, p. 494-503, 2006.

ZHANG, C. et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. **The ISME journal**, v. 4, n. 2, p. 232-241, 2010.

ZHUKOV, I. S. et al. Gut Microbiota Alterations in Trace Amine-Associated Receptor 9 (TAAR9) Knockout Rats. **Biomolecules**, v. 12, n. 12, p. 1823, 2022.

ZHU, S. et al. Composition and diverse differences of intestinal microbiota in ulcerative colitis patients. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, p. 1200, 2022.

ZHU, Y. et al. Probiotic cocktail alleviates intestinal inflammation through improving gut microbiota and metabolites in colitis mice. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 886061, 2022.

ZUO, W. et al. 16S rRNA and metagenomic shotgun sequencing data revealed consistent patterns of gut microbiome signature in pediatric ulcerative colitis. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 6421, 2022.

CONCLUSÕES GERAIS

No nosso estudo, foi observado que o kefir utilizado possuía características de efeito probiótico. Em relação à composição microbiológica fecal, foi possível observar maior diversidade no grupo kefir, com redução de *Desulfovibrio* e a presença de *Lactobacillus* logo na primeira semana de análise da microbiota fecal, o que reforça a utilização da bebida na terapêutica da DII. Ao final do experimento, todos os animais apresentaram perda de massa corporal, comum ao modelo experimental. Houve diferença no peso do cólon dos animais, sendo maior no grupo controle. A avaliação da permeabilidade intestinal e ácidos graxos de cadeia curta não demonstrou diferenças entre os grupos.

A utilização de bebidas probióticas como kefir na terapêutica da DII deve ser amplamente estudada, uma vez que fazem parte da cultura alimentar de diversos países e podem ter efeitos positivos nos indivíduos acometidos com as doenças. Entretanto mais estudos são necessários a fim de se elucidar os possíveis efeitos da utilização do kefir, bem como estudos com maior tempo de intervenção.

APÊNDICE A – Cálculo amostral

Fórmula proposta (Mera, Thompson et al. 1998):

$$N = \frac{2 \times (t_{\alpha/2} \times DP)^2}{E^2}$$

Em que:

$t_{\alpha/2}$ = valor da tabela de distribuição t (*two-tailed*)

DP = desvio padrão

E = diferença que se deseja detectar no estudo

Tabela X – Variáveis a serem utilizadas para cálculo amostral, segundo estudo de (Chen et al. 2010).

	Grupo controle	Grupo tratado	Média <u>C – T</u>
Peso (g)	20,26 ± 1,7	22,08 ± 1,78	1,82
N	20	20	-

$$t_{\alpha/2} = 2,5$$

$$N = \frac{2 \times (2,5 \times 1,78)^2}{1,82^2} = 5,98$$

20% de perda → 7,18 animais

A partir do valor encontrado, serão necessários **8 animais por grupo experimental**.