

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Engenharia de Alimentos

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM GRÃOS DE KEFIR
NO METABOLISMO DE CAMUNDONGOS DESNUTRIDOS**

Fabio Ribeiro dos Santos



Fabio Ribeiro dos Santos

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM GRÃOS DE KEFIR
NO METABOLISMO DE CAMUNDONGOS DESNUTRIDOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial, para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Henrique Sousa Santos

Montes Claros -
2019

Dedicatória

Dedico a Deus pelo dom da vida e por iluminar o meu caminho. Aos meus pais Maria Mendes e José Miguel. Aos meus irmãos e amigos.

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida, por ter me concedido Saúde, Fé, Esperança e Amor, e por todos os dias ter me dado mais do que mereço.

Aos meus pais, Maria Mendes e José Miguel, pelo enorme apoio, incentivo e compreensão.

Aos meus irmãos, Alisson, Wenesson, Rodrigo e Auria, pelo incentivo e companheirismo.

Ao meu orientador, Sergio Santos, pelo qual tenho admiração e respeito. Agradeço pela orientação, pelos seus ensinamentos, paciência e credibilidade em mim depositados.

Aos meus amigos Danielle, Handyara, Amanda Souto, Janaina e Natalia pelo cuidado e apoio para realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Saúde: Danielle, Magda, Emisael, Victor, Amanda, Dani, Jaci, Bere, Deborah, Luis, Janaina, Marcela, Sabrina, Rogério, Alana, Bárbara, Natália, Amanda Rodrigues, Mari e Sara, pela atenção, amizade e pelos valiosos momentos de convivência.

Aos amigos de turma e da universidade, Max Rodrigues, Kely Tatianne, Fábio Ribeiro, Fernanda Lopes, Marco Túlio, Laura Francielle, Lara Aguiar, Glauber Klaivert, Mônica Amorim e Gabriel Sthefano, Marta, Joanes, Daniela e Lucélio, agradeço pelo companheirismo, amizade e apoio durante todo o curso de graduação. Suas colaborações e paciência durante este período de convivência foram inesquecíveis na concretização dos meus estudos.

A banca avaliadora pelas correções, sugestões e contribuições para melhoria da minha formação e qualidade deste trabalho.

A Fundação Universitária Mendes Pimentel - FUMP, pela manutenção financeira e assistência estudantil durante todo o curso.

A Universidade Federal de Minas Gerais, pelo ensino público, gratuito e de qualidade. Agradeço pela oportunidade de realização e concluir o curso de

Engenharia de Alimentos.

Enfim, a todos os amigos e familiares que direta ou indiretamente, muito colaboraram para a concretização deste objetivo.

Meu muito obrigado!

Epígrafe

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”.

(Carl Jung)

RESUMO

A desnutrição induzida por restrição alimentar gera inúmeras mudanças metabólicas que podem afetar o peso corporal, sistema digestivo e outros órgãos, incluindo o fígado, conduzindo a um estado inflamatório e ao estresse oxidativo. O fígado é um órgão responsável por inúmeras vias bioquímicas na produção, modificação e utilização de nutrientes e de outras substâncias metabolicamente importantes, e também um dos órgãos vitais do nosso corpo, e, por esse motivo é necessário analisar o efeito dos grãos de kefir no reparo de possíveis alterações que possam ocorrer nesse órgão devido à desnutrição. Diante disso, objetivou-se avaliar os efeitos dos grãos de kefir na recuperação hepática em camundongos desnutridos com o foco na expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo e em parâmetros histológicos do fígado. Foram utilizados para o experimento camundongos *Swiss*, divididos em quatro grupos e submetidos a duas fases de tratamento: a fase de restrição alimentar, para o início da desnutrição, e a fase renutrição, com os camundongos sendo alimentados com diferentes dietas. Os resultados mostraram que a suplementação oral com os grãos de kefir melhorou o perfil metabólico dos animais desnutridos, aumentando a adiposidade, o HDL, diminuindo os níveis séricos da TGP e da fosfatase alcalina, diminuindo a inflamação hepática e aumentando a expressão das enzimas antioxidantes GPX e catalase. Em conclusão, o presente estudo, pela primeira vez, demonstrou a modulação da inflamação e do estresse oxidativo hepático pelos grãos de kefir em animais desnutridos. Esses achados podem contribuir para entender melhor os efeitos metabólicos mediados pelos grãos de kefir no contexto da desnutrição. No entanto, os mecanismos que envolvem o possível papel dos grãos de kefir na ação das enzimas GPX e CAT no fígado precisam ser melhor investigados.

Palavras-chave: Restrição alimentar. Fígado. Estresse oxidativo. Renutrição.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Peso corporal, consumo alimentar e energético de camundongos alimentados com dieta padrão e renutrídos.....23
- Figura 2 - Tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal, mesentérico e adiposidade de camundongos alimentados com dieta padrão e renutrídos.....24
- Figura 3 - Perfil glicêmico de camundongos alimentados com dieta padrão e renutrídos.....26
- Figura 4 - Parâmetros bioquímicos de camundongos alimentados com dieta padrão e renutrídos.....27
- Figura 5 - Infiltrado inflamatório no fígado e peso do fígado de camundongos alimentados com dieta padrão e desnutridos.....28
- Figura 6 - Expressão de mRNA das enzimas desativadoras de radicais livres, como glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) no fígado de camundongos alimentados com dieta padrão e renutrídos.....29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos de animais conforme tipo de dieta.....	26
Tabela 2 - Primers de camundongos específicos usados neste estudo.....	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Desnutrição	13
2.2 Doenças hepáticas na desnutrição.....	15
2.3 Grãos de kefir como uma alternativa para o tratamento em camundongos desnutridos.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Animais e dieta	19
3.2 Preparo do kefir	20
3.3 Protocolos de desnutrição e dietas de renutrição	20
3.4 Testes de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina (TTG e TSI).....	21
3.5 Análises bioquímicas	21
3.6 Avaliações histopatológicas.....	22
3.7 Transcriptase reversa (RT-PCR).....	22
3.8 Análise Estatística.....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1 Consumo alimentar, consumo energético, peso corporal, peso dos tecidos e adiposidade.....	24
4.2 Testes de tolerância, sensibilidade a insulina e análises bioquímicas.....	27

4.3 Peso do fígado, análise histológica e Real-time PCR	30
4.4 Discussão	32
5 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXO 1.....	41

1. INTRODUÇÃO

A desnutrição, em termos gerais, trata-se de uma deficiência ou desequilíbrio de ingestão de proteínas e outros nutrientes. Nesse sentido, esse transtorno pode manifestar-se de várias maneiras, por fator primário, consequente de uma ingestão insuficiente de alimentos, ou por fatores secundários, resultantes de suas complicações ou de uma doença (MEIER; STRATTON, 2008; VERBRUGGHE et al., 2013). É um problema prevalente, condição que atinge uma em cada três pessoas em todo o mundo (INSTITUTE, 2016). A desnutrição altera a composição corporal e está associado a um estado inflamatório sistêmico (SOETERS *et al.*, 2017). Além disso, a desnutrição pode acarretar o aumento dos genes relacionados ao estresse oxidativo (GHONE *et al.*, 2013) e afetar a expressão de enzimas com atividade antioxidante, como a glutationaperoxidase (GPx) e a catalase (PARTADIREDDA *et al.*, 2008).

Na desnutrição o fígado exerce um importante papel. Esse órgão é responsável por inúmeras vias bioquímicas na produção, modificação e utilização de nutrientes e de outras substâncias metabolicamente importantes, e também um dos órgãos vitais do nosso corpo, importante na desintoxicação de substâncias químicas tóxicas e drogas (NOMPLEGGI; BONKOVSKY, 1994; RUI, 2014).

Os grãos de kefir são descritos como uma associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas envoltas por uma matriz de polissacarídeos referidos como kefiran. O kefir é um alimento rico em ácido láctico, acético e glicônico, álcool etílico, gás carbônico, vitamina B12 e polissacarídeos que conferem ao produto características sensoriais singulares. O ácido láctico formado a partir da fermentação da lactose age como conservante natural, tornando o kefir um produto biologicamente seguro, combinando-se este com os nutrientes, cálcio e ferro, facilitando a absorção dos mesmos. O produto possui ainda, alta digestibilidade, que é atribuída à natureza da coalhada, cujas proteínas sofreram, durante a fermentação, desnaturação em vários graus, obtendo assim uma coalhada de partículas finamente divididas e facilmente penetradas pelos sucos gástricos (HERTZLER; CLANCY, 2003; SOUZA; GARCIA; VALLE, 1984). Diante disso, o trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação com grãos de kefir no metabolismo e na recuperação hepática de camundongos desnutridos

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Desnutrição

A desnutrição se manifesta de várias maneiras: no crescimento e no desenvolvimento infantil insatisfatório; em

peessoas que são extremamente magras ou estão propensas a contrair infecções; em quem tem excesso de peso ou que corre o risco de contrair doenças crônicas devido ao consumo de grandes quantidades de açúcar, sal ou gordura; ou naqueles que apresentam deficiência de vitaminas ou minerais essenciais. A alimentação inadequada, sem dúvidas, os maiores fatores de risco que contribuem para a carga mundial de morbidade: todos os países do mundo enfrentam sério desafio na área de saúde pública em decorrência desses problemas (INSTITUTE, 2016)

A desnutrição pode ser definida como um estado nutricional no qual há uma deficiência ou desequilíbrio de proteínas, energias e outros nutrientes, com impactos adversos na composição corporal, na função muscular, cognitiva, imune e no resultado clínico. Pode ocorrer tanto por um fator primário, resultante de uma ingestão insuficiente de alimentos, como por problemas secundários, resultantes de doenças e outras ocorrências (MEIER; STRATTON, 2008).

Muitos estudos com modelos animais de laboratório têm sido cada vez mais utilizados para avaliar os efeitos da desnutrição em uma série de alterações metabólicas que levam à redução do peso corporal, diminuição da imunocompetência, alterações das funções do aparelho digestivo, suscetibilidade a infecções, entre outras (MORRIS *et al.*, 2011; RANADE *et al.*, 2008). Desse modo, estudos que tratam desse tema constituem-se numa preocupante questão da atualidade e continuam a ser prioridade, sendo de grande interesse para toda a sociedade e

para comunidade científica.

2.2 Doenças hepáticas na desnutrição

Apesar dos avanços na avaliação e tratamento de pessoas com doenças hepáticas, existe ainda a falta de suporte nutricional adequado para esses pacientes. A desnutrição em pessoas com doença hepática continua sendo um enorme desafio para sociedade. Os problemas nutricionais desses pacientes são multifatoriais e geralmente incluem diminuição da ingestão devido à anorexia, aumento da perda de energia, hipermetabolismo e aumento das necessidades de energia (JESUS *et al.*, 2011).

A desnutrição é uma condição prevalente em pessoas com doença hepática. Devido à grande prevalência da má nutrição, a avaliação do estado nutricional e o acompanhamento da ingestão alimentar precisam ser realizados em todos os indivíduos com doença hepática. Uma vez que a desnutrição se configura como uma das causas que podem ser revertidas, melhorando a sobrevida e qualidade de vida dos pacientes, identificar rapidamente o paciente que necessita e pode ser beneficiado com uma intervenção nutricional precoce torna-se imprescindível. doença hepática resulta em um maior desajuste nutricional, e ao mesmo tempo leva a mau funcionamento do fígado. Esse é o principal órgão que exerce função essencial no metabolismo corporal, abrangendo as etapas como a regulação

do metabolismo proteico e energético (FERREIRA *et al.*, 2009).

Dessa forma, o fígado é o principal órgão metabólico que produz diversos complexos de fatores bioquímicos e fisiológicos. Processos que podem incluir a regulação de proteínas e metabolismo energético, mas também para desintoxicação de produtos químicos e drogas. Desse modo, não é surpreendente que pessoas com desnutrição apresentem doenças hepáticas (MCCULLOUGH; TAVILL, 1991; RUI, 2014).

A intervenção alimentar é uma estratégia cada vez mais eficiente. Desse modo, recomenda-se a realização de uma avaliação multidisciplinar na desnutrição, a fim de aperfeiçoar o suporte nutricional, especialmente para aqueles pacientes com risco elevado de desnutrição devido à gravidade de sua doença hepática (PLAETH *et al.*, 2009).

2.3 Grãos de kefir como uma alternativa para o tratamento em camundongos desnutridos

Um produto que vem sendo altamente estudado e que está relacionado com o tratamento de diversas complicações na saúde humana é o kefir. Essa bebida, leite fermentado ácido e ligeiramente alcoólico, originária das montanhas caucasianas é tradicionalmente produzida através da inoculação de grãos de kefir no leite (CHEN *et al.*, 2014).

Kefir, um leite fermentado obtido através da dupla

fermentação dos seus grãos, é de fácil preparo e apresenta consistência semelhante ao iogurte, sendo ligeiramente efervescente e espumoso. Os grãos de kefir são descritos como uma associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas envoltas por uma matriz de polissacarídeos referidos como kefiran. O kefir é um alimento rico em ácido láctico, acético e glicônico, álcool etílico, gás carbônico, vitamina B12 e polissacarídeos que conferem ao produto características sensoriais singulares. O ácido láctico formado a partir da fermentação da lactose age como conservante natural, tornando o kefir um produto biologicamente seguro, combinando-se este com os nutrientes, cálcio e ferro, facilitando a absorção dos mesmos. O produto possui ainda alta digestibilidade, que é atribuída à natureza da coalhada, cujas proteínas sofreram, durante a fermentação, desnaturação em vários graus, obtendo assim uma coalhada de partículas finamente divididas e facilmente penetradas pelos sucos gástricos (HERTZLER; CLANCY, 2003; SOUZA *et al.*, 1984).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados define kefir como:

Leite fermentado, adicionado ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros

produtos lácteos, cuja fermentação se realiza com cultivos de ácido-lácticos elaborados com grãos de Kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de Kefir são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus* e *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp e *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus*. Estabelece, ainda, que os microorganismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade com a contagem mínima de 10^7 (UFC/g) de bactérias lácticas totais e de 10^4 (UFC/g) de leveduras específicas e de 0,5 a 1,5 de Etanol (% v/m) (BRASIL, 2007).

Vários estudos demonstraram numerosas atividades biológicas do kefir, incluindo efeitos antibacterianos, antifúngicos, antioxidantes, antidiabéticos, antitumorais e imunoestimuladores (CHEN *et al.*, 2014). Além disso, foi considerado nutricionalmente benéfico, pois seu consumo promove a absorção de nutrientes e, além disso, aumenta a imunidade do indivíduo (PĂUCEAN; SOCACIU, 2008).

As atividades anti-inflamatórias do kefir em camundongos foram observadas após um tratamento de sete dias com gel de kefir (RODRIGUES *et al.*, 2005), bem como atividades anti-inflamatórias. (DINIZ *et al.*, 2003) em um modelo no qual o tecido granulomatoso e a contorção são

induzidos pelo ácido acético em camundongos.

Outro benefício do seu consumo é a melhora da síndrome do fígado gorduroso, inibindo a via da lipogênese em camundongos knockout para ob/ob com deficiência de leptina. O efeito positivo no tratamento de camundongos ob/ob com kefir diminuiu significativamente a expressão de genes lipogênicos (SREBP1, ACC e FAS) e modulou a síndrome do fígado gorduroso que é proposto (CHEN *et al.*, 2014). Deste modo, esse trabalho fornecerá evidências científicas de que os grãos de kefir podem ser uma opção alimentar segura e nutritiva para o tratamento em camundongos desnutridos e que posteriores análises clínicas poderão ser avaliadas para fins de alternativa viável no combate à desnutrição.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e dieta

O experimento foi conduzido com 32 camundongos, machos, *Swiss*, com 6 semanas de idade divididos em 4 grupos (n = 8 cada). Os animais foram mantidos em uma fase inicial de adaptação (período de 10 dias), com livre acesso água e a ração padrão Presence – Ração para ratos e camundongos contendo, 67.5% de carboidratos, 22.5% de proteínas e 10% de lipídeos. Todos os procedimentos realizados que envolveram os animais estavam de acordo com os padrões éticos da instituição

(CEEBEA - Universidade Estadual de Montes Claros – Anexo 1). Os animais foram mantidos sob condições controladas de luz e temperatura.

3.2 Preparo do kefir

Os grãos kefir serão inoculados (5%, peso / volume) e propagados em leite esterilizado a 20 ° C durante 20 h para ativá-los. Após a filtração dos grãos, o leite fermentados serão descartados e os grãos serão separados e refrigerado na temperatura de 20° C (CHEN *et al.*, 2014).

3.3 Protocolos de desnutrição e dietas de renutrição

Logo após o período de adaptação os animais foram submetidos a duas fases de tratamento as quais foram a fase de restrição calórica para conduzir à desnutrição (FOCK *et al.*, 2007) e fase de renutrição.

A restrição calórica de 20% em relação ao grupo controle foi mantida até o momento que os animais atingiram um déficit de peso de cerca de 20% em relação aos seus pesos originais. A partir de então, eles foram submetidos à renutrição pelo período de 30 dias. Os grupos com suas respectivas dietas de renutrição são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Grupos de animais conforme tipo de dieta.

Identificação dos grupos	Dieta de renutrição	Estimativa de consumo calórico por animal/dia (kcal)
Controle – Nutridos	Ração padrão* (7,5g)	25,67
Controle + Grãos de kefir**	Ração padrão (7,30g) + Grãos de Kefir (0,20g/mL)	25,67
Desnutrido	Ração padrão (6g)	19,75
Desnutrido + Grãos de kefir**	Ração padrão (5,80g) + Grãos de Kefir (0,20g/mL)	19,75

*Ração Presence: 3,95 kcal/1g; **Grãos de Kefir: 4,272 kcal/g

3.4 Testes de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina (TTG e TSI)

Para o teste de tolerância à glicose, 2mg glicose/g de peso corporal foi injetada por via intraperitoneal em camundongos após jejum noturno. Os níveis de glicose foram monitorados aos 0, 15, 30, 60 e 120 min após a injeção, utilizando-se amostras de sangue retiradas da cauda do animal. Testes de sensibilidade à insulina foram realizados com os animais no estado alimentado, após injeção intraperitoneal de insulina (0,75U/kg de peso corporal), onde amostras de sangue da cauda foram coletadas nos momentos 0, 15, 30 e 60 min após a injeção para a medição dos níveis de glicose no sangue.

3.5 Análises bioquímicas

O soro foi obtido após a centrifugação (3200 rpm por 10 minutos a 4 ° C). Colesterol total, triglicerídeos, lipoproteína de alta densidade (HDL), Alanina aminotransferase (TGP), Aspartato aminotransferase (TGO) e Fosfatase alcalina foram avaliados usando kits enzimáticos (Wiener®, Argentina). As medições foram realizadas em um Wiener BT-3000 plus ChemistryAnalyzer (Wiener®, Argentina).

3.6 Avaliações histopatológicas

Para avaliação microscópica, as amostras de fígado foram fixados em formalina tamponada 10% a 40°C durante a noite, desidratadas por graus crescentes de álcool, xileno e parafina, e depois embebidos em parafina, seccionados a 5 µm e subsequentemente corados com hematoxilina e eosina. para avaliar a arquitetura do tecido hepático e a infiltração de células inflamatórias (SCHNEIDER, 2013). As lâminas foram analisadas em um microscópio invertido FSX100 (São Paulo, Brasil). Contagens de células inflamatórias foram obtidas usando o software Image J (Wayne Rasband, Institutos Nacionais de Saúde, Bethesda, MD) (AGUIAR *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2013).

3.7 Transcriptase reversa (RT-PCR)

O RNA total extraído do fígado foi preparado usando o reagente TRIzol (Invitrogen Corp.®, San Diego, Califórnia, EUA), tratado com DNase e transcrito reversamente com M-MLV (Invitrogen Corp.®). A gliceraldeído endógeno 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), enzimas desativadoras de radicais livres, como glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) foram avaliadas usando primers específicos e reagente verde SYBR (Applied Biosystems®, EUA) em uma plataforma plus-one (Applied Biosystems®). O método CT comparativo relativo foi aplicado para comparar os níveis de expressão gênica entre os grupos, usando a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN), sequências de iniciadores descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Primers de camundongos específicos usados neste estudo

Gene	Forward	Reverse
GAPDH	AAGAAGGTGGTGAAGCAGGCATC	CGAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG
CAT	GTCTCACGTTCCGCAGCTCTGC	CTCCTATTGGGTTCCCGCCTCC
GPx	CGACATCGAACCCGATATAGA	ATGCCTTAGGGGTTGCTAGG

3.8 Análise Estatística

Todos os dados foram analisados com o software GraphPad Prism (Versão 5.0®, San Diego, Califórnia, EUA),

com 95% de confiança ($p < 0,05$). Os dados são expressos como a média \pm SEM. A significância estatística entre os grupos de camundongos foi avaliada por ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey e pelo teste t de Student. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

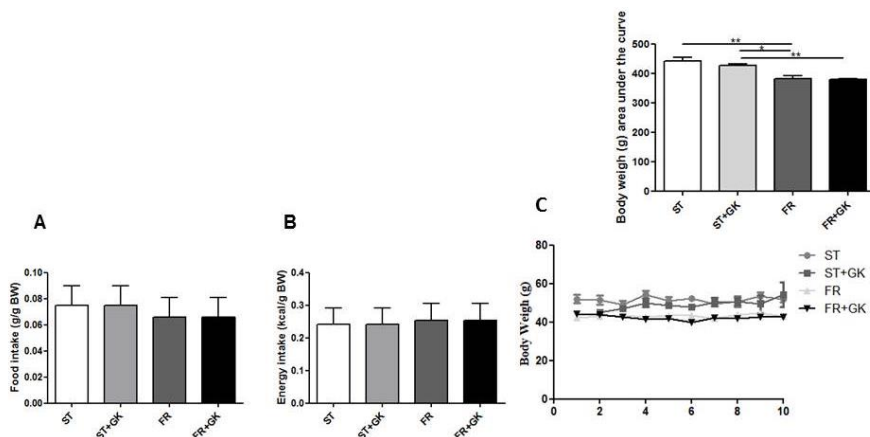
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Consumo alimentar, consumo energético, peso corporal, peso dos tecidos e adiposidade

O consumo alimentar (ST, $0,0750 \pm 0,015$; ST+GK, $0,0750 \pm 0,015$; FR, $0,0660 \pm 0,015$; FR+GK, $0,0660 \pm 0,015$) e energético (ST, $0,2420 \pm 0,050$; ST+GK, $0,2420 \pm 0,050$; FR, $0,2530 \pm 0,051$; FR+GK, $0,2530 \pm 0,051$) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os camundongos alimentados com o mesmo tipo de dieta (Figuras 1a e 1b). Na análise de peso corporal observamos como esperado uma redução do peso corporal do grupo de camundongos desnutridos quando comparado com o grupo controle não desnutrido (ST, $58,63 \pm 3,154$ vs. FR, $45,15 \pm 0,328$) (Figura 1c).

Na análise da área sobre a curva de peso corporal não apresentaram diferença significativa no grupo desnutrido comparado com o tratado com grãos de kefir. (FR, $381,1 \pm 9,429$ vs. FR+GK, $378,7 \pm 4,060$) (Figura 1c).

Figura 1 - Peso corporal, consumo alimentar e energético de camundongos alimentados com dieta padrão e renutridos.

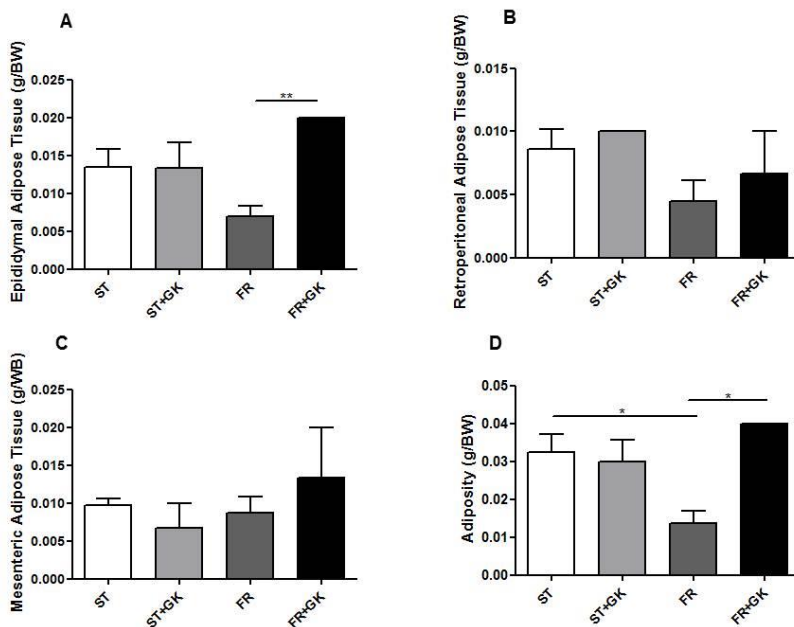


Legenda: Consumo alimentar (a), consumo energético (b), peso corporal diário e área sobre a curva (c). Os dados são apresentados como média \pm SEM. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos são indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em comparação com os grupos dieta padrão (ST) e grupos renutrição (ST, ST+GK, FR e FR+GK).

O peso do tecido adiposo epididimal foi maior no grupo de camundongos desnutridos tratados quando comparado ao controle desnutrido (FR, $0,0070 \pm 0,001$ vs. FR+GK, $0,0200 \pm 0,0$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no peso dos tecidos adiposos retroperitoneal (FR, $0,0045 \pm 0,002$ vs. FR+GK, $0,007 \pm 0,003$) e mesentérico (FR, $0,009 \pm 0,002$; FR+GK, $0,013 \pm 0,007$) entre os animais desnutridos tratados e o controle desnutrido. A análise de adiposidade demonstrou um aumento estatisticamente

significativo nos camundongos desnutridos que receberam kefir em relação ao grupo controle desnutrido (FR, 0.014 ± 0.003 vs. FR+GK, 0.040 ± 0.0) (Figura 2a-d).

Figura 2 - Tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal, mesentérico e adiposidade de camundongos alimentados com dieta padrão e renutridos

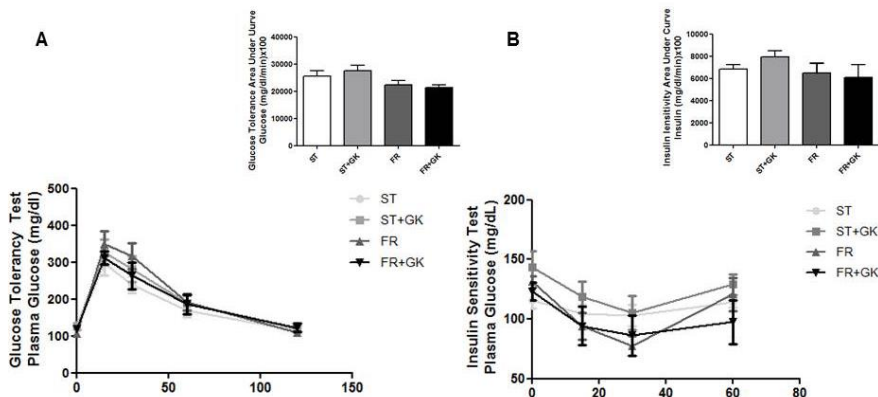


Legenda: Tecido adiposo epididimal (a), tecido adiposo retroperitoneal (b), tecido adiposo mesentérico (c), adiposidade (d). Os dados são apresentados como média \pm SEM. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos são indicadas como * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 em comparação com os grupos dieta padrão (ST) e grupos renutrição (ST, ST+GK, FR e FR+GK).

4.2 Testes de tolerância à glicose, sensibilidade à insulina e análises bioquímicas

A análise da área sob a curva do teste de tolerância a glicose não demonstrou diferenças estatisticamente significantes entre o grupo desnutrido e o desnutrido que recebeu kefir (FR, 22433 \pm 1506 vs. FR+GK, 21255 \pm 1054) (Figura 3a). Resultados semelhantes foram encontrados na análise de área sob a curva do teste de sensibilidade a insulina (FR, 6465 \pm 926.9 vs. FR+GK 6063 \pm 1164) (Figura 3b) Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos níveis séricos de glicemia de jejum (FR, 156,3 mg/dL \pm 10.31 vs. FR+GK, 150.7 mg/dL \pm 3.528) e triglicérides (FR, 294.4 mg/dL \pm 19.36 vs. FR+GK, 348.0 mg/dL \pm 24.68) entre os camundongos do grupo desnutrido tratado e o seu respectivo controle desnutrido (Figura 3c). Foi observado um aumento estatisticamente significativo nos níveis de HDL no grupo desnutrido tratado com kefir em comparação com seu controle desnutrido (FR, 54.57 mg/dL \pm 2.88 vs. FR+GK, 84.20 mg/dL \pm 9.035) (Figura 3d).

Figura 3 - Perfil glicêmico de camundongos alimentados com dieta padrão e renutridos

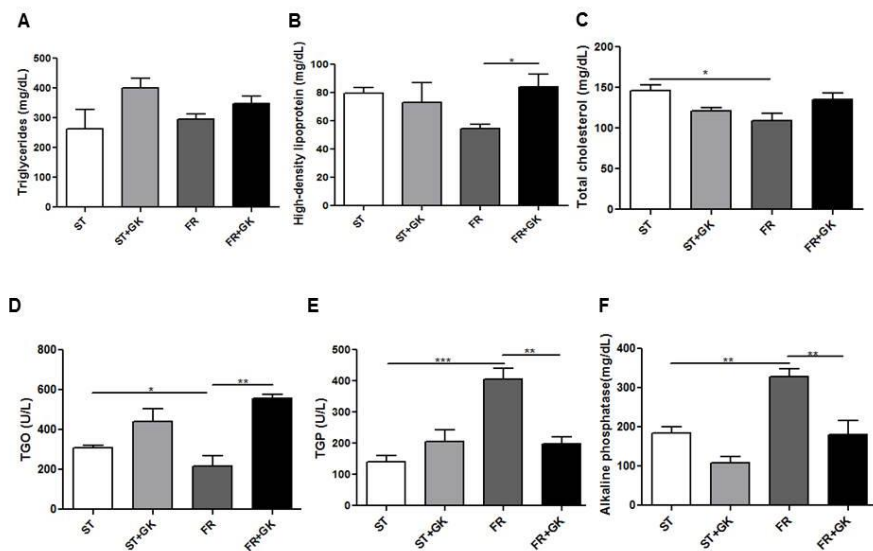


Legenda: Teste de tolerância à glicose e área sobre a curva (a), teste de sensibilidade à insulina e área sobre a curva (b). Os dados são apresentados como média \pm SEM. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos são indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em comparação com os grupos dieta padrão (ST) e grupos renutrição (ST, ST+GK, FR e FR+GK).

Os níveis de colesterol total foram estatisticamente menores nos animais desnutridos quando comparado ao controle não desnutrido (ST, 145.8 mg/dL \pm 7.351 vs. FR, 135.3 mg/dL \pm 7.860) (Figura 4e). Também foi observada uma melhora no perfil das enzimas hepáticas no grupo de camundongos desnutridos tratados quando comparado ao controle desnutrido, com redução dos níveis de TGP (FR, 406.7 mg/dL \pm 33.19 vs. FR+GK, 198.5 mg/dL \pm 21.95) e fosfatase alcalina (FR, 327.3 mg/dL \pm 20.54 vs. FR+GK, 181.3 mg/dL \pm 34.26) foram

observados no grupo de camundongos desnutridos tratado com kefir quando comparado ao controle desnutrido, bem como, níveis aumentados de TGO (FR, 215.3 mg/dL \pm 51.97 vs. FR+GK, 556.0 mg/dL \pm 20.00) (Figura 4f).

Figura 4 - Parâmetros bioquímicos de camundongos alimentados com dieta padrão e renutrídos

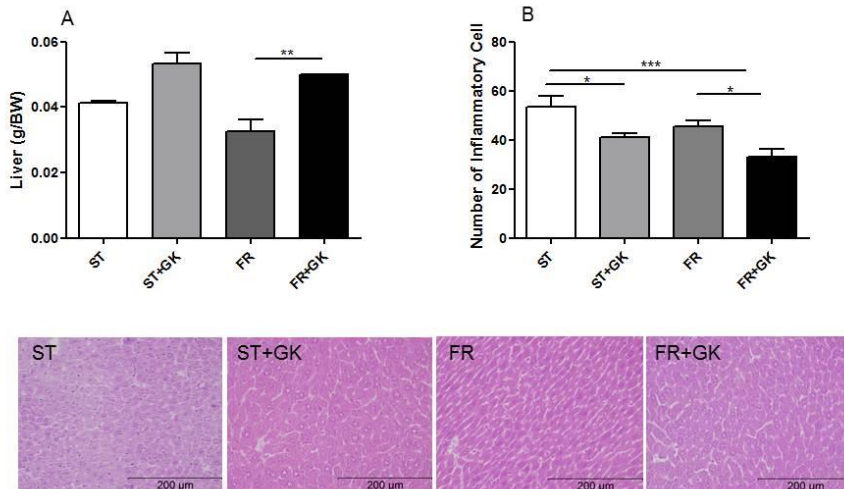


Legenda: Os grãos de kefir melhorou o colesterol total em camundongos desnutridos. triglicerídeos (a), HDL (b), colesterol total (c), TGO (d), TGP (e), fosfatase alcalina (f). Os dados são apresentados como média \pm SEM. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos são indicadas como * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 em comparação com os grupos dieta padrão (ST) e grupos renutrição (ST, ST+GK, FR e FR+GK).

4.3 Peso do fígado, análise histológica e Real-time PCR

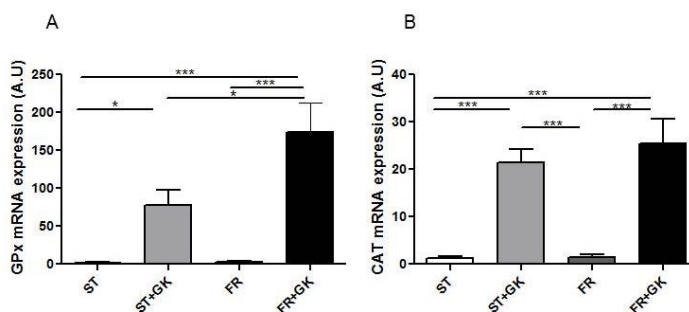
Os camundongos desnutridos que receberam kefir apresentaram um aumento significativo do peso do fígado quando comparado ao controle desnutrido (FR, 215.3 g/BW \pm 0.004 vs. FR+GK, 0.050 g/BW vs. 0.0) (Figura 5a). Foi observado uma redução estatisticamente significativa do infiltrado inflamatório no grupo de animais tratados com kefir quando comparado ao seu respectivo controle (ST, 53,63 \pm 4.136; ST+GK, 41,13 \pm 1.469; FR, 45,38 \pm 2,611; FR+GK, 33,00 \pm 3.343) (Figura 5b). Análises de RT-PCR demonstraram um aumento significativo da expressão das enzimas antioxidantes GPX (ST, 1,70 \pm 0, 858; ST+GK, 77,97 \pm 19,50; FR, 2,475 \pm 0,9; FR+GK, 173,7 \pm 38,66) (Fig. 6a) e CAT (ST, 1,146 \pm 0, 407; ST+GK, 21,35 \pm 2,823; FR, 1,408 \pm 0,674; FR+GK, 25,38 \pm 5,165) (Figura 6b) nos grupos de animais suplementados com o grão de kefir.

Figura 5 - Infiltrado inflamatório no fígado e peso do fígado de camundongos alimentados com dieta padrão e desnutridos



Legenda. Os grãos de kefir reduziu o Infiltrado inflamatório e aumentou o peso do fígado em camundongos desnutridos. Fígado (a) e número de células inflamatórias. Os dados são apresentados como média \pm SEM. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos são indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em comparação com os grupos dieta padrão (ST) e grupos renutrição (ST, ST+GK, FR e FR+GK).

Figura 6 - Expressão de mRNA das enzimas desativadoras de radicais livres, como glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) no fígado de camundongos alimentados com dieta padrão e renutridos



Legenda: Os grãos de kefir modulou a expressão das enzimas GPx e CAT em camundongos desnutridos. Expressão de mRNA da enzima GPx (a) e expressão de mRNA da enzima CAT (b). Os dados são apresentados como média \pm SEM. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos são indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em comparação com os grupos dieta padrão (ST) e grupos renutrição (ST, ST+GK, FR e FR+GK).

4.4 Discussão

O dano hepático causado pela desnutrição por restrição alimentar já foi descrito por outros estudos (MORRIS *et al.*, 2011), principalmente pelo fato do fígado ser um órgão central no metabolismo (COUTO *et al.*, 2008). Neste estudo, nos demonstramos que a desnutrição gera dano hepático. Foi observado aumento dos níveis séricos das enzimas TGP e

fosfatase alcalina, redução do peso do fígado, inflamação e redução da expressão das enzimas antioxidantes GPX e CAT. Estes resultados validam os achados de outros autores que também evidenciaram diminuição do peso corporal (18, 19) e do fígado em animais que foram submetidos à restrição alimentar.

As justificativas para comprovar algumas dessas alterações relacionadas à desnutrição são bem descritas na literatura. De acordo com Guzmán-Silva e colaboradores (2004) (GUZMÁN-SILVA *et al.*, 2004), a desnutrição relaciona à perda de massa hepática para assegurar a disponibilidade de energias a órgãos importantes, como cérebro e coração (DE ALMEIDA PINHEIRO *et al.*, 2017; GUZMÁN-SILVA *et al.*, 2004), o que fundamenta a diferença analisada.

Os danos do estresse oxidativo têm sido relacionados à desnutrição alterando os mecanismos de proteção antioxidantes (GAVIA-GARCÍA *et al.*, 2015). Normalmente os organismos são equipados com mecanismos para eliminar essas espécies reativas, envolvendo tanto vias não enzimáticas e enzimáticas. As vias enzimáticas envolvem algumas enzimas desativadoras de radicais livres como catalase, glutatiónperoxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) (FARDET; CHARDIGNY, 2013; LYKKE *et al.*, 2013).

Neste contexto, analisamos o efeito da desnutrição sobre as enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, observamos diminuição da expressão do mRNA nos genes catalase e da enzima glutatiónperoxidase (GPX) no grupo desnutrido (FR).

Isso demonstra que a modulação da expressão genica das referidas enzimas pode ser afetada pela desnutrição.

Resultados semelhantes foram encontrados em outro estudo realizado no timo de ratos lactantes desnutridos (GAVIA-GARCÍA *et al.*, 2015), com diminuição da expressão do gene da catalase e da GPx nos animais desnutridos (GAVIA-GARCÍA *et al.*, 2015). Além disso, foi demonstrado que a desnutrição protéico-energética resulta em uma redução expressão hepática da enzima antioxidante glutationa S-transferase, que pode aumentar a radicais e estresse oxidativo no fígado (CHO *et al.*, 2000). Estudos experimentais sugeriram que a desnutrição protéica produz alterações inflamatórias no fígado, incluindo um aumento da produção de interleucina-6 (LING *et al.*, 2004).

A Doença hepática gordurosa não hepática (DHGNA) também é caracterizada por um aumento no estresse oxidativo [60,61], a suplementação com um custo baixo e fácil de usar antioxidantes como a vitamina E podem ser úteis na prevenção da progressão de lesões no fígado (CHALASANI *et al.*, 2012; FARDET; CHARDIGNY, 2013; HERNÁNDEZ-AQUINO; MURIEL, 2018). Nesse seguimento, descrevemos pela primeira vez que a suplementação dos animais desnutridos com os grãos de kefir foi capaz de reverter o dano hepático, aumentar a adiposidade e a expressão da GPX e CAT.

O kefir, um componente importante do kefir, inibiu a inflamação pulmonar induzida pela ovalbumina em um

modelo murino de asma, inibindo a liberação de eosinófilos e outras células inflamatórias no líquido do lavado broncoalveolar (LBA) e no tecido pulmonar, e também os níveis das citocinas pró-inflamatórias interleucina-4 (IL-4) e a interleucina-5 (IL-5) (KWON *et al.*, 2008). Outro estudo descreveu o efeito antioxidante do kefir em ratos com lesão renal (PUNARO *et al.*, 2014). Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo com ratos expostos ao chumbo, neste caso o Kefir também demonstrou uma atividade antioxidante (OZCAN *et al.*, 2009).

5 CONCLUSÃO

Em resumo, mostramos que a suplementação oral com os grãos de kefir melhorou o perfil metabólico dos animais desnutridos, aumentando a adiposidade, o HDL, diminuindo os níveis séricos da TGP e da fosfatase alcalina, diminuindo a inflamação hepática e aumentando a expressão das enzimas antioxidantes GPX e catalase. Os resultados do presente estudo sugerem, pela primeira vez, a modulação da inflamação e do estresse oxidativo hepático pelos grãos de kefir em animais desnutridos. Esses achados podem contribuir para entender melhor os efeitos metabólicos mediados pelos grãos de kefir no contexto da desnutrição. No entanto, os mecanismos que envolvem o possível papel dos grãos de kefir na ação das enzimas GPX e CAT no fígado precisam ser melhor investigados.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, J. *et al.* Fluoxetine reduces periodontal disease progression in a conditioned fear stress model in rats. **Journal of periodontal research**, v. 48, n. 5, p. 632-637, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Brasília, DF, 2007.

CHALASANI, N. *et al.* The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. **Hepatology**, v. 55, n. 6, p. 2005-23, Jun 2012.

CHEN, H. *et al.* Kefir improves fatty liver syndrome by inhibiting the lipogenesis pathway in leptin-deficient ob/ob knockout mice. **International journal of obesity**, v. 38, n. 9, p. 1172, 2014.

CHO, M. K. *et al.* The effect of cysteine on the altered expression of class α and μ glutathione S-transferase genes in the rat liver during protein-calorie malnutrition. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1502, n. 2, p. 235-246, 2000.

COUTO, J. L. A. *et al.* Alterações da função hepática de camundongos desnutridos e infectados pelo *Schistosoma mansoni*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 4, p. 390-393, 2008.

DE ALMEIDA PINHEIRO, T. *et al.* Obesity and malnutrition similarly alter the renin-angiotensin system and inflammation in mice and human adipose. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 48, p. 74-82, 2017.

DINIZ, R. *et al.* Atividade antiinflamatória de quefir, um probiótico da medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 19-21, 2003.

FARDET, A.; CHARDIGNY, J.-M. Plant-based foods as a source of lipotropes for human nutrition: a survey of in vivo studies. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 53, n. 6, p. 535-590, 2013.

FERREIRA, L. G. *et al.* Desnutrição e inadequação alimentar de pacientes aguardando transplante hepático. **Rev Assoc Med Bras**, v. 55, n. 4, p. 389-93, 2009.

FOCK, R. A. *et al.* Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF- α in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. **Cytokine**, v. 40, n. 2, p. 105-114, 2007.

GAVIA-GARCÍA, G. *et al.* Oxidative damage and antioxidant defense in thymus of malnourished lactating rats. **Nutrition**, v. 31, n. 11-12, p. 1408-1415, 2015.

GHONE, R. A. *et al.* A study of oxidative stress biomarkers and effect of oral antioxidant supplementation in severe acute malnutrition. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 7, n. 10, p. 2146, 2013.

GOMES, E. *et al.* Diazepam reverses the alveolar bone loss and hippocampal interleukin-1beta and interleukin-6 enhanced by conditioned fear stress in ligature-induced periodontal disease in rats. **Journal of periodontal research**, v. 48, n. 2, p. 151-158, 2013.

GUZMÁN-SILVA, M. A. *et al.* Recuperação da desnutrição em ratos mediante rações adicionadas ou não de suplemento alimentar e de vitaminas e minerais durante o período de crescimento. **Revista de Nutrição**, 2004.

HERNÁNDEZ-AQUINO, E.; MURIEL, P. Beneficial effects of naringenin in liver diseases: Molecular mechanisms. **World journal of gastroenterology**, v. 24, n. 16, p. 1679, 2018.

HERTZLER, S. R.; CLANCY, S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 103, n. 5, p. 582-587, 2003.

INSTITUTE, I. F. P. R. Global Food Policy Report. **Washington, DC**, n. International Food Policy Research Institute., p. 154, 2016.

JESUS, R. *et al.* Terapia nutricional nas doenças hepáticas crônicas e insuficiência hepática. **São Paulo: Associação Médica Brasileira, Conselho Federal de Medicina**, p. 11-19, 2011.

KWON, O. K. *et al.* Inhibitory effect of kefiran on ovalbumin-induced lung inflammation in a murine model of asthma. **Arch Pharm Res**, v. 31, n. 12, p. 1590-6, Dec 2008.

LING, P.-R. *et al.* Effects of protein malnutrition on IL-6-mediated signaling in the liver and the systemic acute-phase response in rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 287, n. 4, p. R801-R808, 2004.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C (T)) Method. Methods [Internet]. 2001 Dec; 25 (4): 402–8.**

LYKKE, M. *et al.* Malnutrition induces gut atrophy and increases hepatic fat infiltration: studies in a pig model of childhood malnutrition. **American journal of translational research**, v. 5, n. 5, p. 543, 2013.

MCCULLOUGH, A. J.; TAVILL, A. S. Disordered energy and protein metabolism in liver disease. *Seminars in liver disease*, 1991. © 1991 by Thieme Medical Publishers, Inc. p.265-277.

MEIER, R.; STRATTON, R. Basic concepts in nutrition: epidemiology of malnutrition. **e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism**, v. 3, n. 4, p. e167-e170, 2008.

MORRIS, H. J. *et al.* Effect of starvation and refeeding on biochemical and immunological status of Balb/c mice: an experimental model of malnutrition. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 33, n. 3, p. 438-446, 2011.

NOMPLEGGI, D. J.; BONKOVSKY, H. L. Nutritional supplementation in chronic liver disease: an analytical review. **Hepatology**, v. 19, n. 2, p. 518-533, 1994.

OZCAN, A. *et al.* Effect of kefir on the oxidative stress due to lead in rats. **Journal of Applied Animal Research**, v. 35, n. 1, p. 91-93, 2009.

PARTADIREDDA, G. *et al.* Pre-weaning undernutrition alters the expression levels of reactive oxygen species enzymes but not their activity levels or lipid peroxidation in the rat brain. **Brain research**, v. 1222, p. 69-78, 2008.

PĂUCEAN, A.; SOCACIU, C. Probiotic activity of mixed cultures of kefir's lactobacilli and non-lactose fermenting yeasts. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture**, v. 65, n. 2, p. 329-334, 2008.

PLAUTH, M. *et al.* ESPEN guidelines on parenteral nutrition: hepatology. **Clinical nutrition**, v. 28, n. 4, p. 436-444, 2009.

PUNARO, G. R. *et al.* Kefir administration reduced progression of renal injury in STZ-diabetic rats by lowering oxidative stress. **Nitric Oxide**, v. 37, p. 53-60, 2014.

RANADE, S. *et al.* Different types of nutritional deficiencies affect different domains of spatial memory function checked in a radial arm maze. **Neuroscience**, v. 152, n. 4, p. 859-866, 2008.

RODRIGUES, K. L. *et al.* Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. **International journal of antimicrobial agents**, v. 25, n. 5, p. 404-408, 2005.

RUI, L. **Energy metabolism in the liver. Compr Physiol 4: 177–197** 2014.

SCHNEIDER, D. I. **An introduction to programming using visual basic 2012.** Prentice Hall Press, 2013. ISBN 0133378500.

SOETERS, P. *et al.* Defining malnutrition: a plea to rethink. **Clinical nutrition**, v. 36, n. 3, p. 896-901, 2017.

SOUZA, G.; GARCIA, S.; VALLE, J. Kefir e sua tecnologia-aspectos gerais. **Boletim Ital**, v. 21, 1984.

VERBRUGGHE, M. *et al.* Malnutrition and associated factors in nursing home residents: A cross-sectional, multi-centre study. **Clinical nutrition**, v. 32, n. 3, p. 438-443, 2013.

ANEXO 1 – Registro no Comitê de Ética



Universidade Estadual de Montes Claros
Comissão de Ética em Experimentação e Bem-Estar
Animal da Unimontes
CEEBEA



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 189, relativo ao projeto intitulado "*Efeitos do kefir no perfil inflamatório e metabolismo de camundongos desnutridos*" coordenação do Prof. Sérgio Henrique Sousa Santos está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pela Comissão de Ética em Experimentação e Bem-Estar Animal da Unimontes, e encontra-se APROVADO referente a reunião de 12/06/2019. A quantidade total de animais pelo CEEBEA para este projeto foi de 32 animais.

Este certificado é válido por cinco anos após sua aprovação.

Montes Claros, 08 de Agosto de 2019.

Profª Drª Antonia de Maria Filha Ribeiro
Coordenadora do CEEBEA/UNIMONTES