

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITOS DO JEJUM INTERMITENTE ASSOCIADO AO PROBIÓTICO
KEFIR EM ANIMAIS COM SOBREPESO INDUZIDO POR DIETA DE
CAFETERIA**

RAIANA MARIA PRUCOLI FALSONI

VILA VELHA
MARÇO / 2019

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITOS DO JEJUM INTERMITENTE ASSOCIADO AO PROBIÓTICO
KEFIR EM ANIMAIS COM SOBREPESO INDUZIDO POR DIETA DE
CAFETERIA.**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

RAIANA MARIA PRUCOLI FALSONI

VILA VELHA
MARÇO / 2019

F197e Falsoni, Raiana Maria Prucoli.
Efeitos do jejum intermitente associado ao probiótico kefir
em animais com sobrepeso induzido por dieta de cafeteria /
Raiana Maria Prucoli Falsoni . – 2019.
46 f. : il.

Orientadora: Ewelyne Miranda de Lima.
Coorientadora: Girlandia Alexandre Brasil.
Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Vila Velha, 2019.
Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Dieta. 3. Kefir
I. Lima, Ewelyne Miranda de. II. Brasil, Girlandia Alexandre.
III. Universidade Vila Velha. IV. Título.

CDD 615

RAIANA MARIA PRUCOLI FALSONI

**EFEITOS DO JEJUM INTERMITENTE ASSOCIADO AO
PROBIÓTICO KEFIR EM ANIMAIS COM SOBREPESO INDUZIDO
POR DIETA DE CAFETEIRA**

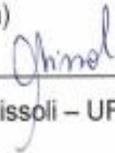
Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciências
Farmacêuticas, para obtenção do
grau de Mestra em Ciências
Farmacêuticas.

Aprovada em 14 de março de 2019,

Banca examinadora:



Profa. Dra. Girlandia Alexandre Brasil – UVV
(Coorientadora)



Profa. Dra. Nazaré Souza Bissoli – UFES



Profa. Dra. Christiane Mileib Vasconcelos – UVV

AGRADECIMENTOS

Àqueles que não vieram à memória, me desculpem e se sintam agradecidos.

Primeiro lugar é Deus, sempre! Obrigado ao Deus maravilhoso, ao Pai que nunca nos desampara e todos os dias mostra provas do seu grandioso amor. Obrigada, meu Deus! Obrigada por ser companhia quando me sentia sozinha, longe da família. As coisas se tornaram mais fáceis quando percebi sua presença e me dei conta de que a primeira família vem dos céus. Também Nossa Senhora e meu Anjo de Guarda, que rogam por mim e nunca me deixaram só.

Em segundo lugar – e não menos importante -, devo agradecer à família da Terra. Aos meus pais, irmãos, cunhados e noivo. Obrigada mãe, por sair tantas vezes de casa para depositar dinheiro pra mim e ter paciência quando eu não era a filha que a senhora merecia. Obrigada pelas vezes que deixou de ter algum conforto para proporcionar-lo a mim e por dar força quando pensei em fazer o mestrado. Metade da minha coragem vem da senhora. Obrigada! Obrigada, Pápatika, por tentar entender que suas filhas deveriam estudar. Sei que é muito difícil compreender isso quando se vem de uma criação tão simples e que pregava outros valores. Obrigada pelos olhinhos cheios de água no momento da despedida, eles revelavam todo o amor que sei que tem por nós, e esse amor foi a justificativa para não desistir nas diversas vezes que passou pela cabeça ir embora. Obrigada! Obrigada, Quel e Rai, por serem amigos e irmãos. Que injusto deve ser filho único... Irmãos confortam o coração e são amigos que temos certeza que nunca iremos perder. Obrigada pelo apoio, meus queridos! Agradeço também ao amor da minha vida. Renan, você é paz, você é incentivo, conforto nos dias ruins e alegria para os momentos de solidão. Esse título também é seu! Sem você com certeza eu não teria conseguido terminar. Obrigada, meu amor! Você é um grande companheiro!

Muito obrigada também à UVV! Que instituição linda! Nunca pensei que fosse admirar tanto uma universidade! Aqui as pessoas trabalham com alegria e compromisso. As coisas funcionam e os alunos jamais ficam desamparados. Farei todo o esforço para conseguir o doutorado e uma das razões é para continuar aqui. Obrigado aos professores tão queridos, em especial aos queridos: Ewelyne,

Girlandia e Tadeu. Obrigada por terem aberto as portas do laboratório com tanto amor e por compartilhar seus conhecimentos. Tenho muito orgulho em ter mestres como vocês! Agradeço ainda a CAPES, que tornou possível que eu fizesse o mestrado. Muito obrigada! Minha gratidão também para os excelentes doutores e professores que participarão da minha banca. Nazaré e Chris, é uma honra compartilhar o projeto com vocês. Obrigada ainda aos demais laboratórios do Biopráticas, que sempre ajudaram; a união de todos com certeza resulta em projetos muito melhores. Todos os laboratórios têm parte nesse trabalho. Agradeço também aos senhores da portaria, às amigas da limpeza e aos técnicos (em especial: Ana, Bianca, Jean, Roberta, Dona Zenaida, Débora, Daniel e seu Antônio).

Minha eterna gratidão à melhor amiga que poderia ter conhecido em Vila Velha. Flavinha. Você é, sem dúvida, uma das melhores pessoas que já conheci e foi meu maior apoio em todo esse período. Obrigada por mostrar o melhor caminho todos os dias e não me deixar desviar. Obrigada pela paciência e pelo carinho que tem por mim. Obrigada pelas caronas. Pelos cafés. Pelos conselhos. Enfim, por estender a mão, obrigada, minha amiga!

Agradeço aos meus queridos amigos de vida e de laboratório. Placy, por ter dividido sua casa e por me apresentar o mestrado; sem você eu não estaria aqui, migs! Obrigada Lina, Anelise, Monique, Luana e Valéria, pela paciência quando eu não respondia às mensagens e por não estar tão presente quanto deveria no último ano. Obrigada por entenderem! Aos meus eternos amigos e parceiros de laboratório: Mahira, Raylton, Cris, Mirian, Átila, Silas, Lauro, Ávila, Camila, Daniel, Dionísio, Elisiane, Júlia, Kamila, Karynna, Letícia, Marcela, Mikaella, Rafael, Roberta, Silvia e Thainá. Quero que saibam que eu sempre observei o esforço de cada um para fazer a iniciação científica e que os admiro muito (muito mesmo!). Contem comigo sempre! Nosso trabalho está pronto e cada um de vocês foi muito importante para construção dele. Obrigada, meninos!

Finalizo compartilhando o maior aprendizado que tive nesses dois anos: A vida é muito melhor quando se compartilha as alegrias e quando ajudamos ao próximo. Quando estamos inseridos em uma verdadeira equipe, tudo o que buscamos se torna 50 % mais possível e o sucesso passa a ser uma consequência natural.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Animais	15
3.2. Grupos experimentais.....	15
3.3. Preparo do Kefir.....	16
3.4. Dieta de Cafeteria.....	16
3.5. Teste de tolerância à glicose e insulina.....	17
3.6. Avaliação corporal.....	17
3.7. Coleta de sangue e perfusão.....	17
3.8. Gordura corporal.....	18
3.9. Hipertrofia dos órgãos.....	18
3.10. Dosagens bioquímicas.....	18
3.11. Determinação de proteínas totais - Bradford.....	18
3.12. Determinação da peroxidação lipídica por Tbars.....	19
3.13. Avaliação dos produtos protéicos de oxidação avançada	19
3.14. Ensaio de superóxido dismutase.....	20
3.15. Ensaio de catalase	20
3.16. Análise Estatística	20
4. RESULTADOS	21

5. DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÃO	32
7. REFERÊNCIAS	33
8. APÊNDICE	41
9. ANEXO.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de Variância de Uma Via

AOPP - Produtos Proteicos de Oxidação Avançada

AL - *Ad Libitum*

CAT - Catalase

CEUA - Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CT - Colesterol Total

DC – Dieta de Cafeteria

DCV - Doenças Cardiovasculares

DCNT - Doenças Crônico Não Transmissíveis

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

EPM - Erro Padrão da Média

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

HDL - Lipoproteína de Alta Densidade

JI - Jejum Intermitente

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

MDA - Malonaldeído

RC - Restrição calórica

SOD - Superoxidodismutase

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TCA - Ácido Tricloroacético

VLDL - Lipoproteína de Densidade Muito Baixa

RESUMO

FALSONI, R.M.P., M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2019.
Efeitos do jejum intermitente associado ao probiótico kefir em animais com sobrepeso induzido por dieta de cafeteria. Orientadora: Ewelyne Miranda de Lima. Co-orientadora: Girlandia Alexandre Brasil.

O Kefir tem demonstrado exercer importantes bioatividades, tais como efeitos anti-inflamatório e antioxidante, podendo auxiliar em protocolo dietético como Jejum intermitente (JI). O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da intervenção com o Kefir associado com JI em ratos com sobrepeso induzido por dieta de cafeteria (DC). Os animais foram separados em quatro grupos: Controle (C), recebendo apenas ração; (SK) tratados com kefir; (SJK) tratados com kefir e JI; (SJI) não tratados e submetidos apenas ao JI. Foi ofertado DC por 60 dias e logo após o JI foi realizado junto ao tratamento com probiótico (22 mL/kg) por 60 dias. Após a eutanásia, o sangue foi coletado para análises bioquímicas. A gordura foi extraída em aparelho de Soxhlet. A atividade das enzimas antioxidantes e espécies oxidativas foram avaliadas no fígado. O tratamento com kefir isoladamente melhorou o perfil metabólico (LDL) (SK: $36,97 \pm 6,814$ vs. C: $52,84 \pm 1,826$; $p < 0,05$) (HDL) (SK: $29,99 \pm 4,638$ vs. C: $18,95 \pm 0,8055$; $p < 0,05$) e a associação entre o Kefir e JI foi capaz de promover redução de gordura (SK: $17,73 \pm 4,132$; SJI: $15,84 \pm 1,781$; SJK: $11,35 \pm 0,6137$ vs. C: $21,78 \pm 1,627$, $p < 0,05$), glicose (SK: $90,07 \pm 9,736$; SJI: $103,6 \pm 22,34$; SJK: $113,5 \pm 22,61$ vs. C: $158 \pm 17,54$; $p < 0,05$) e oxidação proteica no fígado (SK: $0,01116 \pm 0,0008533$; SJI: $0,01004 \pm 0,0006054$; SJK: $0,01160 \pm 0,001640$ vs. C: $0,01518 \pm 0,001018$ cloramina T/mg de proteína, $p < 0,05$). Entretanto, apesar dos efeitos positivos na gordura corporal, o JI promoveu distensão gástrica, redução da atividade da enzima catalase e apresentou prejuízos ao tratamento com kefir sobre o padrão lipídico dos animais submetidos a DC. Em conclusão, o Kefir pode ser utilizado como alternativa na perda de peso e melhora de parâmetros associados a doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: Emagrecimento. Alimento funcional. Dieta aterogênica. Obesidade.

ABSTRACT

FALSONI, R.M.P., M.Sc, University of Vila Velha – ES, March de 2019. **EFFECTS OF THE INTERMITTENT FASTING ASSOCIATED WITH THE PROBIOTIC KEFIR IN ANIMALS WITH OVERWEIGHT INDUCED BY CAFETERIA DIET** Advisor: Ewelyne Miranda de Lima, Girlandia Alexandre Brasil.

Kefir has been shown to exert important bioactivities, such as anti-inflammatory and antioxidant effects, and may help in the dietary protocol as intermittent fasting (JI). The aim of this study was to evaluate the effects of intervention with Kefir associated with JI in overweight rats induced by cafeteria diet (DC). The animals were separated into four groups: Control (C), receiving only ration; (SK) compound with kefir; (SJK) integrated with kefir and JI; (SJI) did not create and created only to JI. He was submitted to CD for 60 days and soon after the JI was performed together with probiotic treatment (22 mL / kg) for 60 days. After euthanasia, blood was collected for biochemical analysis. The fat was extracted on the Soxhlet apparatus. The activity of antioxidant enzymes and oxidative species were evaluated in the liver. Treatment with kefir alone improved the metabolic profile (LDL) (SK: 36.97 ± 6.814 vs. C: 52.84 ± 1.826 ; $p < 0.05$) (HDL) (SK: 29.99 ± 4.638 vs. C : 18.95 ± 0.8055 ; $p < 0.05$) and the association between Kefir and JI was able to promote fat reduction (SK: 17.73 ± 4.132 ; SJI: 15.84 ± 1.781 ; SJK: 11.35 ± 0.6137 vs. C: 21.78 ± 1.627 , $p < 0.05$), glucose (SK: 90.07 ± 9.736 ; SJI: 103.6 ± 22.34 ; SJK: 113.5 ± 22.61 vs. C: 158 ± 17.54 ; $p < 0.05$) and protein oxidation in the liver (SK: 0.01116 ± 0.0008533 ; SJI: 0.01004 ± 0.0006054 ; SJK: $0.01160 \pm 0, 001640$ vs. C: 0.01518 ± 0.001018 chloramine T / mg protein, $p < 0.05$). However, despite the positive effects on body fat, or JI promotes abdominal distension, reduced catalytic enzyme activity and damage to kefir treatment on the lipid pattern of animals used in CD. In conclusion, Kefir can be used as an alternative in weight loss and improvement of parameters associated with cardiovascular disease.

Keywords: Intermittent Fasting, Kefir, Probiotic, Cafeteria Diet, Overweight.

1. INTRODUÇÃO

O excesso de peso e as doenças metabólicas relacionadas com o sobrepeso e a obesidade, a síndrome metabólica, diabetes e aterosclerose, são resultados de um estado crônico de inflamação de baixo grau e geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) ^{1,2}, assim a perda de peso induzida pela dieta é um fator importante na redução desses marcadores ^{1, 3, 4, 5}.

Nos últimos anos, a suplementação da dieta com a adição de alimentos funcionais tem sido amplamente pesquisada, demonstrando efeitos benéficos para o organismo e mecanismos promotores da saúde ^{6,7,8}. Dentre as variedades de alimentos funcionais cientificamente validados, tem destaque os chamados probióticos, incluindo o Kefir, que é uma bebida láctea fermentada que apresenta semelhanças com o iogurte ^{9,10}. Possui em sua composição uma complexa mistura de bactérias e leveduras em uma matriz de polissacarídeos ^{9,11}.

O Kefir tem sido descrito por exercer importantes bioatividades, tais como efeitos anti-inflamatório ¹², antioxidante ¹³, imunoreguladores, e antígenotóxicos ¹⁴. Além disso, dados revelam que esse produto pode auxiliar no controle dos níveis de colesterol sérico e redução de EROS, parâmetros importantes envolvidos na progressão da obesidade ^{8, 15,16}.

Adicionalmente, Kim *et al.* (2017), observaram o efeito do consumo do Kefir em animais submetidos a dieta hiperlipídica, e concluíram que a intervenção promoveu redução do ganho de peso e colesterol, assim como melhora da esteatose e da inflamação sistêmica dos animais, dados importantes na associação deste probiótico na obesidade ¹⁷. Liu *et al.* (2006), também verificaram os efeitos benéficos do Kefir sobre o metabolismo do colesterol endógeno em animais, por meio da redução do colesterol no fígado, e aumento nos níveis de secreção de ácido biliar e colesterol fecal ⁸.

Dentre as opções dietéticas utilizadas, um novo padrão alimentar tem se destacado: o Jejum Intermitente (JI) ¹⁸. O JI é uma abordagem nutricional frequentemente utilizada por indivíduos que objetivam, sobretudo, a perda de peso. Apesar de serem observadas evidências contraditórias quanto ao seu efeito a longo prazo ^{19, 20}, o JI demonstrou resultados positivos após ser utilizado em animais de laboratório, como redução da obesidade e distúrbios metabólicos associados ao

envelhecimento ²¹. Estudos verificaram que o JI afeta o estresse, o metabolismo energético e as vias de sinalização associadas às melhorias à saúde ^{22, 23}. Trata-se de um protocolo dietético onde a restrição de energia é induzida por períodos alternados de alimentação *ad libitum* (AL) e jejum, que podem variar de acordo com o protocolo utilizado ²⁴.

Por outro lado, há estudos que contradizem os benefícios do JI. Trepanowski *et al.* (2017) demonstraram que o JI não apresentou perda de peso superior, manutenção do peso ou melhora nos indicadores de risco para doença cardiovascular como colesterol total, HDL, LDL, glicose e insulina em jejum, em indivíduos obesos, quando comparado à restrição calórica (RC) normal ²⁵. Cerqueira e colaboradores (2011) também apresentaram controvérsias em relação aos benefícios do JI. Os depósitos de gordura abdominal dos animais submetidos do JI foram maiores em comparação ao grupo de restrição calórica e, em longo prazo, o JI desencadeou intolerância à glicose e maior produção de EROS ²³.

É importante ressaltar que apesar de existirem diversos modelos genéticos de obesidade, alguns autores defendem a utilização de dieta hipercalórica, pois ela reflete bem a gênese e respostas metabólicas decorrentes da obesidade em humanos, visto que esta é a consequência de um balanço energético positivo gerado também por fatores ambientais ^{26,27}. Um exemplo de modelo experimental vantajoso por provocar obesidade semelhante à humana é a Dieta de Cafeteria (DC) ^{28,29}. Essa dieta é fornecida concomitantemente à ração padrão de biotério e baseia-se em livre escolha de itens que possuem um alto índice de gordura e carboidratos, o que a torna altamente calórica ^{28,29}.

Diante do exposto, estudos têm demonstrado efeitos benéficos tanto do probiótico quanto do JI isoladamente, entretanto, não se sabe sobre os impactos metabólicos do uso associado. Portanto, a hipótese do estudo foi de que o tratamento com Kefir em associação com o JI, poderia diminuir o peso corporal, assim como melhorar o perfil metabólico, através, sobretudo da diminuição do perfil inflamatório e estresse oxidativo, promovendo benefícios adicionais ao organismo e o objetivo envolveu verificar os efeitos da associação do Kefir com um protocolo específico de JI na perda de peso, assim como seus benefícios para o metabolismo desses animais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a associação da intervenção crônica com probiótico Kefir e o JI sobre o perfil metabólico e oxidante em ratos com sobrepeso induzido por DC.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito da intervenção crônica com kefir associado ao JI em ratos com sobrepeso sobre:

Perfil lipídico (colesterol total (CT), colesterol HDL (HDLC), colesterol LDL (LDL C));

Nível de glicose e teste de tolerância à glicose e insulina;

Gordura corporal;

“Hipertrofia” do estômago;

Produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP) (fígado);

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (fígado);

Atividade de enzimas do sistema redox (SOD e CAT) (fígado).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Animais*

Este estudo utilizou ratos Wistar machos com quatro semanas de idade e peso entre 40 e 60 g, criados e mantidos na unidade sob os cuidados do Laboratório de Monitoramento Experimental da Universidade de Vila Velha (UVV). Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a resolução normativa nº12 de 20 de Setembro de 2013 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética, Bioética e Bem estar animal (CEUA-UVV) sob o parecer de número 445/2017. Os ratos foram mantidos em cestos IVC (Individually Ventilated Caged) Alesco© com temperatura e umidade controlada (23°C) e foram expostos a um ciclo claro / escuro de 12 / 12h com acesso ad libitum a alimentos e água durante o período de adaptação (sete dias). Posteriormente receberam dieta específica de cafeteria por oito semanas e logo após foram submetidos ao JI por oito semanas, sendo ofertada ração (ração normal Probiotério, Moinho Primor, S.A.) por três horas ao dia ³⁰.

3.2. *Grupos experimentais*

As intervenções foram iniciadas após o período de indução ao sobrepeso, confirmado através da diferença estatística entre os grupos controle e “tratado”. Após este tempo, os animais foram submetidos ao JI ³⁰ e receberam Kefir ou leite (Veículo) por via oral (gavagem), na dose de 22 mL/kg, uma vez ao dia, durante a janela alimentar, onde foi ofertado ração padrão (três horas) por oito semanas ^{15,30}. Quarenta ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos com dez animais por grupo, como segue: (i) submetido à dieta padrão por sessenta dias sem nenhum tratamento (C); (ii) submetido a DC por sessenta dias e tratado com Kefir (SK) (iii) submetido a DC por sessenta dias, tratado com Kefir e JI (SJK); (iv) submetido a DC por sessenta dias e submetido ao JI (SJI). Após os 60 dias, os animais foram mantidos em jejum por 24 h com livre acesso a água e em seguida foram eutanasiados por overdose de anestésico, seguida da retirada imediata do sangue e órgãos.

3.3. Preparo do kefir

O kefir foi preparado no Laboratório de Técnica e Dietética da Universidade Vila Velha – UVV. Os grãos de kefir foram adicionados em leite integral pasteurizado Fiore®, posteriormente inoculado com 4% dos grãos de kefir e incubado à temperatura de 20-23°C, durante aproximadamente 24 horas, até a formação de um fino coágulo. Após a coagulação, os grãos foram recuperados por meio de filtração. O filtrado foi mantido sob refrigeração (aproximadamente 15 °C) e, após 24 horas de incubação, o produto estava pronto para ser utilizado no experimento ¹⁵. A dose oferecida aos animais foi de 22 mL/kg, uma vez ao dia ¹⁵.

3.4. Dieta de cafeteria

O protocolo utilizado foi descrito anteriormente por Shafat e colaboradores (2009) com modificações. Foram utilizados três cardápios (A, B, C) (Apêndice 1), ofertados sequencialmente e substituídos diariamente, compostas por alimentos frescos, refrigerante de cola sem gás, ração padrão e água (Apêndice 2). As porções de cada alimento foram estabelecidas diariamente conforme o padrão de consumo, por meio do controle diário da ingestão e do controle hídrico, quando no dia posterior à oferta não havia sobra de algum dos itens, a oferta desse item era aumentada no dia correspondente. Desta maneira, sempre foi ofertada uma quantidade superior ao consumido.

Os alimentos embutidos foram cortados em pedaços com aproximadamente 5 cm de espessura e os demais foram disponibilizados em tamanho integral. Eles foram dispostos na grade da gaiola, junto à água e à bebida gaseificada (ambas ofertadas *Ad Libitum*). Cada item era previamente pesado e o excedente alimentar recolhido e mensurado 24 horas após a apresentação. Todo o resto alimentar era meticulosamente coletado da gaiola e a contaminação fecal cuidadosamente removida. O percentual de umidade perdido pela evaporação foi calculado e a quantidade alimentar ingerida foi convertida em energia usando os dados dos fabricantes ou tabelas alimentares. Os ratos foram pesados diariamente, os valores anotados e os alimentos coletados e repostos entre as 09h00min e 10h00min diariamente. O consumo alimentar dos animais foi medido por meio da quantidade pesada inicialmente menos o peso da quantidade restante ³¹.

3.5. *Teste de tolerância à glicose (ttg) e insulina (tti)*

Para todos dois testes, foram colhidas amostras de sangue da cauda e a glicemia medida pelo glicosímetro à base de tira (On Call® - MedLevensohn). Os testes foram realizados no início e final das oito semanas de tratamento com Kefir e/ou JI.

O teste de tolerância à glicose foi realizado após jejum de 12 horas. Injetou-se glicose por via intraperitoneal (2g/Kg), seguido de aferição da glicemia basal e nos tempos de 5, 10, 20, 30, 60, 90 e 120 minutos, segundo Jørgensen, Tornqvist & Hvid, (2017), com modificações.

Para realização do teste de tolerância à insulina (TTI), os animais ficaram em jejum por seis horas. Após esse período, foi administrada insulina por via intraperitoneal (1 U/Kg) e as amostras de sangue foram colhidas sequencialmente nos intervalos de 0, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos ³².

3.6. *Avaliação corporal*

A ingestão calórica média foi calculada a partir da diferença entre a quantidade disponível e quantidade de alimentos recolhidos da gaiola, 24 horas após oferta. A avaliação da massa corpórea foi realizada pelo cálculo da diferença entre as massas finais e iniciais dos animais ³¹.

3.7. *Coleta de sangue e perfusão*

Após os tratamentos os animais foram eutanasiados por meio de overdose de anestésico (Cetamina e Xilazina) e as amostras de sangue foram coletadas por meio de punção cardíaca para a realização das análises bioquímicas. As amostras foram transferidas para tubos secos com anticoagulante EDTA, e logo após a centrifugação o plasma foi retirado e as amostras armazenadas a -80 °C. Os órgãos foram perfundidos com tampão fosfato PBS (pH 7,4) para retirada do sangue remanescente.

3.8. Gordura corporal

O índice de adiposidade foi avaliado pela gordura corporal total sobre o peso corporal final multiplicado por 100, adaptado de Boustany e Cols (2004). As carcaças foram secas a $105 \pm 5^\circ\text{C}$ durante 72 horas em estufa (Fanem, Guarulhos, SP, Brasil), envolvidas em papel filtro e a gordura extraída em aparelho Extrator de Soxhlet (Corning Incorporated Life Sciences, Lowell, MA, USA). A porcentagem de gordura na carcaça foi determinada pela seguinte fórmula: $\text{PP-PSSG/PPr} \times 100\%$, onde PP = peso pós-secagem, PSSG= peso seco após extração da gordura, e PPr = peso pré secagem^{33,34}.

3.9. Hipertrofia dos órgãos

Os órgãos (coração, rim, fígado e estômago) foram retirados, o excesso de líquido removido e pesado. A razão da massa do estômago pelo tamanho da tibia (ÓRGÃO/T) foi utilizada como índice de hipertrofia³⁵.

3.10. Dosagens bioquímicas

Dosagens de glicose, colesterol total (CT) e HDL-C foram determinados usando Kits comerciais (LABTEST, Rio de Janeiro, Brasil). O colesterol não HDL-C (nHDL-C) foi calculado como a diferença entre CT e HDL-C³⁶. A determinação do colesterol LDL foi realizada por meio da equação de Friedewald (Friedewald, 1972): $\text{LDL} = \text{Colesterol Total} - \text{HDL} - (\text{Triglicerídeos}/5)$.

3.11. Determinação de proteínas totais - Bradford

O método de Bradford é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de "Coomassie brilliant blue" BG-250. O método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas³⁷. A interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm³⁸. A determinação das proteínas totais foi realizada por espectrofotometria em leitora de microplacas (Filter Max F5 Multi-Mode Microplate Readers). Os resultados foram

expressos em mg/mL de proteína. Nessa medida, as amostras foram diluídas em 1:50.

3.12. *Determinação da peroxidação lipídica por TBARS*

O ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) visa avaliar o dano celular causado pelo estresse oxidativo, por meio da quantificação do malonaldeído (MDA) produzido pela quebra de ácidos graxos poli-insaturados durante a peroxidação lipídica da membrana celular. O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando produto de coloração rósea e sua concentração é determinada por meio de espectrofotometria³⁹. O ensaio foi realizado utilizando 250 µL das amostras homogeneizadas e 500 µL da solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1%. O branco foi preparado com 50 µl de água deionizada e 200 µl de TBA 1%. Em seguida, as amostras e o branco foram levados ao banho maria a 100 °C, por 15 minutos. A determinação dos metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico foi realizada por meio da leitura da absorbância em 532 nm em espectrofotômetro (Filter Max F5 Multi-Mode Microplate Readers). O resultado final foi expresso em nmol de malondialdeído/mg de proteínas. A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford³⁷.

3.13. *Avaliação dos produtos protéicos de oxidação avançada – AOPP*

Os produtos protéicos de oxidação avançada (AOPP) são formados pela ação do estresse oxidativo sobre proteínas e aminoácidos, pelos oxidantes clorados, principalmente ácido hipocloroso e cloraminas⁴⁰. A determinação dos AOPP's foi realizada por espectrofotometria em leitora de microplacas (Filter Max F5 Multi-Mode Microplate Readers) e as análises do conteúdo de AOPP foram realizadas de acordo com Witko-Sarsat *et al.* (1996). Para tanto, foram utilizadas amostras de tecidos homogeneizados. A absorbância da reação foi imediatamente realizada em 340 nm contra o branco contendo 200 µL de PBS, 20 µL de ácido acético e 10 µL de KI. O conteúdo de AOPP foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 µM, realizadas com equivalentes de cloramina T. Os resultados foram expressos em µmol de equivalentes de cloramina T/L/mg proteína. A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford³⁷.

3.14. *Ensaio de superóxido dismutase – SOD*

A determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi realizada em amostra do fígado pelo método de Misra e Fradovich (1972). O meio de reação foi composto de 1,0 ml de tampão de carbonato (0,2 M, pH 10,2), KCl 0,8 ml (0,015 M), 0,1 ml de homogenato e água de modo a atingir o volume final de 3,0 ml. A reação iniciou-se pela adição de 0,2 ml de epinefrina (0,025 M). A alteração na absorvância foi registrada a 480 nm em intervalos de 15 segundos durante um minuto a 25 °C ⁴¹. A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford ³⁷. A reação consiste na inibição da autooxidação da epinefrina em adenocromo, na presença de SOD. Uma atividade da enzima é definida como a quantidade de enzima que provoca 50% de inibição da auto-oxidação de epinefrina. Os resultados foram expressos como Unidade de SOD/mg de proteína.

3.15. *Ensaio de catalase – CAT*

A determinação da atividade da enzima catalase (CAT) foi realizada em amostras do fígado, de acordo com o descrito por Aebi (1984) com modificações. De maneira geral, as amostras foram preparadas e acondicionadas em banho de gelo até o momento do ensaio. Numa cubeta de quartzo foram adicionados 3 mL de tampão fosfato (0,050 M, pH 7,4) e 60 µL da amostra, e a reação iniciou-se pela ação de 40 µL de H₂O₂ (0,066 M em tampão de fosfato). As absorvâncias em 240 nm foram registradas a cada 15 segundos, pelo intervalo de 1 minuto ⁴². A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford ³⁷. A unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome metade do peróxido de oxigênio H₂O₂ em um minuto a 25 ° C. Os resultados foram expressos como Coeficiente de extinção do peróxido por minuto (ΔE.min/mg proteína).

3.16. *Análise estatística*

Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M.). A avaliação da diferença entre os grupos foi determinada usando ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey (Prism 6.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. A associação entre kefir e o JI diminui a glicose na corrente sanguínea

Na Figura 1 (A) podem ser observados os efeitos da associação entre o Kefir e o JI, assim como a intervenção isolada sobre o teste de glicose nos animais. Pode-se observar que o grupo Controle (C) apresentou concentrações elevadas de glicose no sangue e as intervenções e associação promoveram redução da glicose na corrente sanguínea (SK: $90,07 \pm 9,736$; SJI: $103,6 \pm 22,34$; SJK: $113,5 \pm 22,61$ vs. C: $158 \pm 17,54$; $p < 0,05$). Na figura 1 B pode-se observar que a associação e os tratamentos promoveram redução no teste de tolerância à glicose em relação ao grupo C, mas sem diferenças entre os demais. (SK: 16713 ± 1062 ; SJI: $14675 \pm 845,9$; SJK: $15023 \pm 486,0$ vs. C: 21438 ± 2420 , $p < 0,05$). Na figura 1 C, é possível notar que o teste de tolerância à insulina não demonstrou diferença entre os grupos (SK: $6495 \pm 147,7$; SJI: $7499 \pm 977,3$; SJK: $7566 \pm 617,0$ vs. C: $6691 \pm 373,2$, $p > 0,05$).

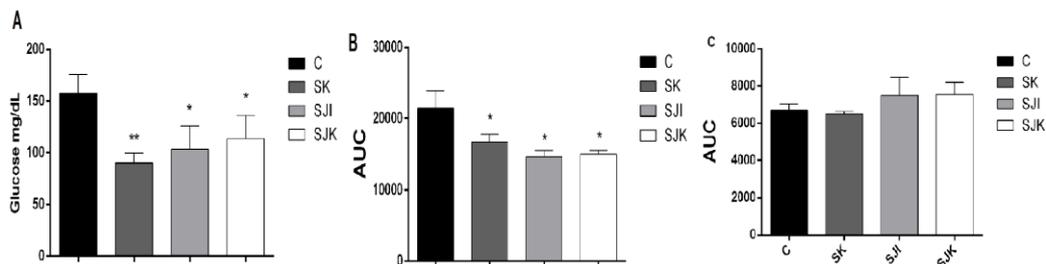


Figura 1. Efeitos do tratamento com o kefir e/ou JI sobre concentração de glicose (A), TTG (B) e TTI (C) na corrente sanguínea dos animais.

4.2. A associação entre kefir e o JI promove a perda de gordura corporal

A Figura 2 mostra o percentual de gordura corporal após os tratamentos. A associação entre Kefir e JI, além dos demais tratamentos, promoveu perda de gordura corporal quando comparado ao grupo C, sem diferença entre os outros grupos (SK: $17,73 \pm 4,132$; SJI: $15,84 \pm 1,781$; SJK: $11,35 \pm 0,6137$ vs. C: $21,78 \pm 1,627$, $p < 0,01$). Além disso, comprova-se a eficácia da DC na indução do sobrepeso, uma vez o grupo C apresentou concentrações superiores de gordura corporal.

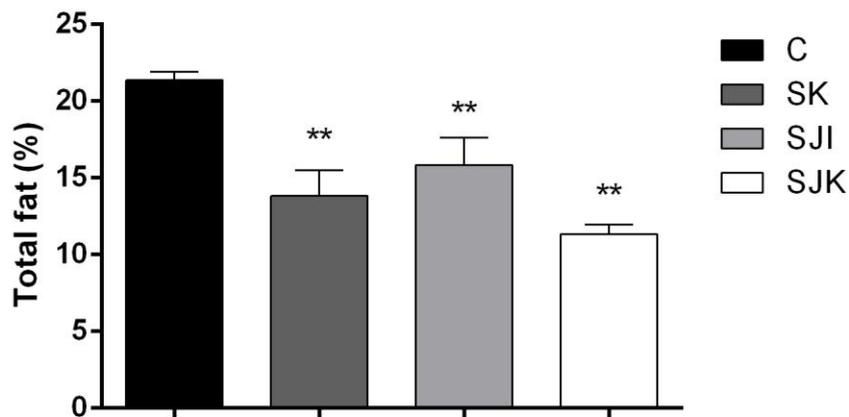


Figura 2. Percentual de gordura após indução do sobrepeso com DC. O gráfico de barras apresenta a média do percentual de gordura corporal total nos grupos estudados. Os valores estão representados como média \pm erro padrão da média. ** $p < 0,01$ quando comparado a C.

4.3. O JI prejudica a melhora do perfil lipídico promovido pelo kefir.

Em relação ao perfil lipídico (Figura 3), os resultados demonstram que o tratamento com Kefir isoladamente resultou em aumento nos níveis de HDL (Figura 3 C) (SK: $29,99 \pm 4,638$ vs. C: $18,95 \pm 0,8055$; $p < 0,05$) e diminuição significativa sobre os valores de LDL (Figura 3 B) (SK: $36,97 \pm 6,814$ vs. C: $52,84 \pm 1,826$; $p < 0,05$). Por outro lado, o JI e sua associação com o Kefir não foi capaz de aumentar e diminuir respectivamente as quantidades de HDL (Figura 3C) (SJI: $16,83 \pm 3,18$; SJK: $24,09 \pm 1,883$ vs. C: $18,95 \pm 0,8055$; $p > 0,05$) e LDL (Figura 3B) (SJI: $46,39 \pm 4,969$; SJK: $48,48 \pm 3,767$ vs. C: $52,84 \pm 1,826$; $p > 0,05$), demonstrando menor potencial de “ajuste” LDL-HDL do JI frente aos benefícios isolados do Kefir em relação ao perfil lipídico no organismo. Entretanto o colesterol total (Figura 3 A) não apresentou diferenças entre os grupos (SK: $69,56 \pm 3,814$; SJI: $58,66 \pm 3,529$; SJK: $65,36 \pm 2,167$ vs. C: $64,76 \pm 1,973$, $p > 0,05$).

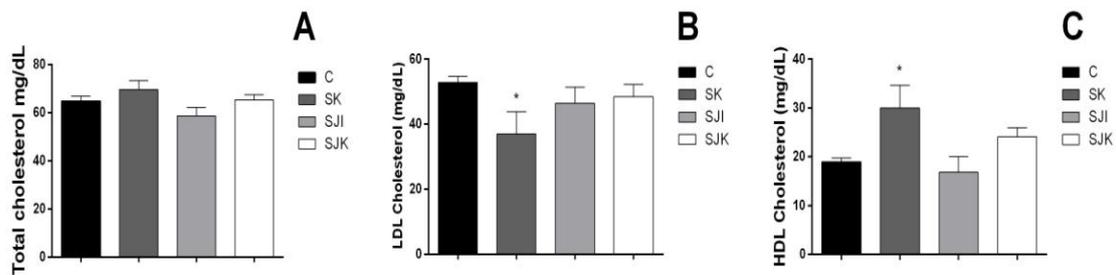


Figura 3. Perfil lipídico dos respectivos grupos. A: Colesterol total (mg/dL); B: LDL Colesterol (mg/dL); C: HDL Colesterol (mg/dL). Os valores foram apresentados como as médias \pm E.P.M. para $n = 10$ animais por grupo. * $p < 0,05$ vs. C.

4.4. O JI promove distensão gástrica

Na figura 4 é possível observar que os grupos submetidos ao protocolo de JI apresentaram distensão gástrica através da relação entre o peso do órgão e o tamanho da tíbia (g/cm). Os animais dos grupos JII e SJK apresentaram aumento na área total do estômago dos animais (C: $0,4789 \pm 0,0172$; SK: $0,433 \pm 0,0092$; SJI: $0,5391 \pm 0,0143$; SJK: $0,5316 \pm 0,0246$; $p < 0,05$) quando comparado aos grupos C e SK. Os demais órgãos avaliados não apresentaram hipertrofia significativa ($p > 0,05$).

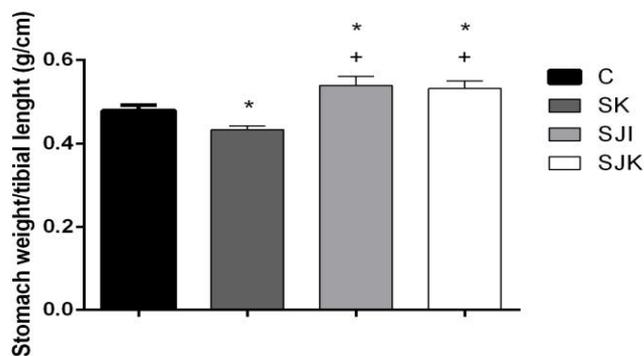


Figura 4. Os efeitos do JI na distensão gástrica. O gráfico de barras mostra a relação do peso do estômago e o tamanho da tíbia (g/cm). Os valores são apresentados como as médias \pm E.P.M. para $n = 10$ animais por grupo. * $p \leq 0,05$ vs. C e $p \leq 0,05$ vs. SK.

4.5. A associação entre kefir e o JI diminui a oxidação proteica e apenas ji diminui os níveis de TBARS

A Figura 5 demonstra os resultados de produtos oxidativos no fígado. Houve redução ($p \leq 0,01$) da oxidação de proteínas (A) em todos os grupos tratados quando comparado ao grupo controle (SK: $0,01116 \pm 0,0008533$; SJI: $0,01004 \pm 0,0006054$; SJK: $0,01160 \pm 0,001640$ vs. C: $0,01518 \pm 0,001018$ cloramina T/mg de proteína, $p < 0,01$). Por outro lado, em relação à oxidação de lipídios (B) observa-se que apenas o grupo submetido somente ao JI apresentou valores diminuídos de peroxidação lipídica (SK: $14,67 \pm 4,482$; SJI: $6,050 \pm 2,281$; SJK: $11,19 \pm 4,560$ vs. C: $13,25 \pm 3,448$ nmol MDA/mg proteína, $p < 0,01$).

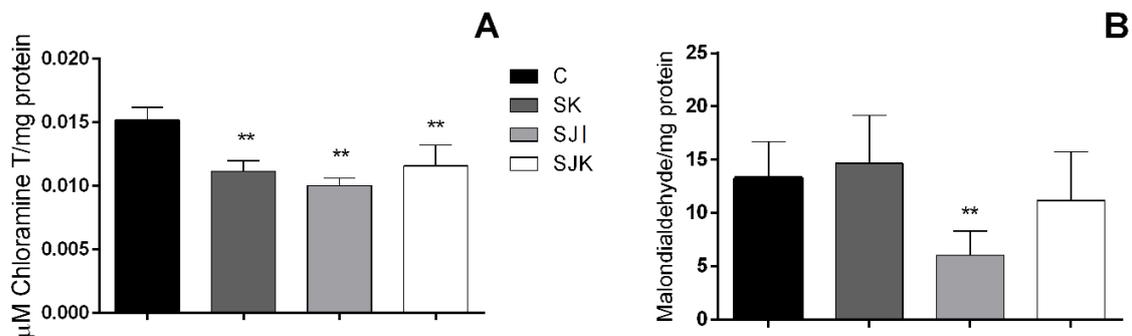


Figura 5. Níveis dos produtos oxidativos no fígado por AOPP (Plano A) e TBARS (Plano B) após os tratamentos e indução de sobrepeso por DC. Os valores são apresentados como as médias \pm E.P. M para $n = 10$ animais por grupo. ** $p < 0,01$ vs. C.

4.6. O JI reduz a atividade da enzima antioxidante CAT

A Figura 6 apresenta os resultados da atividade das enzimas antioxidantes no fígado. A atividade da CAT (A) diminuiu após intervenção com JI isoladamente (SJI: $5,244 \pm 1,028$ vs. C: $7,5 \pm 1,064$, $\Delta E \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$), mas não foi capaz de influenciar os benefícios do kefir na associação, ou seja, todos os animais que receberam o Kefir não apresentaram redução da enzima (SK: $8,828 \pm 0,4069$; SK: $9,085 \pm 1,454$ vs. C: $7,5 \pm 1,064$, $\Delta E \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$). Por outro lado, não houve modificação da atividade da SOD (B) em nenhum dos grupos (SK: $4,777 \pm 0,6039$; SJI: $4,589 \pm 0,2546$; SJK: $4,289 \pm 0,5973$ vs. C: $5,302 \pm 1,098$, UI SOD mg proteína^{-1}).

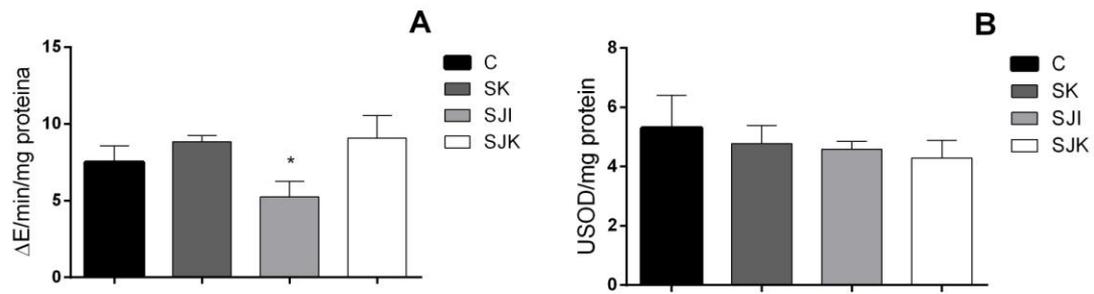


Figura 6. Atividade das enzimas antioxidantes no fígado após os tratamentos e indução de sobrepeso. Os gráficos representam a atividade de SOD (B) e CAT (A) nos respectivos grupos. Os valores foram apresentados como as médias \pm E.P.M. para $n = 10$ animais por grupo. * $p \leq 0,05$ vs. grupo C.

5. DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo foram que a associação entre kefir e JI foi capaz de promover melhora no perfil metabólico, por meio da redução de gordura, glicose e oxidação proteica no fígado. Adicionalmente, foi possível observar que apesar dos efeitos positivos na gordura corporal, o JI promoveu distensão gástrica, redução da atividade da enzima catalase e influenciou os resultados referentes à intervenção com kefir sobre o padrão lipídico dos animais submetidos à dieta de cafeteria por oito semanas.

O Diabetes Mellitus do tipo 2 (DM2) resultante da obesidade, trata-se de uma doença desenvolvida à longo prazo no organismo a partir da hiperglicemia, resistência à insulina e falência progressiva de células beta ⁴³. Sua prevenção envolve a prática de exercícios físicos, mudanças dietéticas e, mais recentemente a prática do JI, que tem sido descrito em ensaios com animais ^{44,45} e humanos ⁴⁶⁻⁴⁸ por resultar em benefícios metabólicos para o organismo ⁴⁶.

Nossos resultados demonstram que a intervenção com Kefir, a prática do JI e associação entre os dois promoveram redução da glicose na corrente sanguínea. Por outro lado, não houve alteração na concentração de insulina plasmática em nenhum dos grupos.

Liu *et al.* (2017) analisaram as células beta do pâncreas que são responsáveis por sintetizar e secretar a insulina, em camundongos submetidos ao JI e alimentados com dieta hiperlipídica por seis semanas, e observaram que o JI normalizou os níveis de glicose, porém não foi capaz de diminuir as concentrações de insulina. Semelhante aos nossos resultados, mostram que uma vez que o JI não melhora a resistência à insulina, é improvável que a diminuição nas concentrações de glicose sanguínea tenha ocorrido por uma melhora da sensibilidade à insulina. Contudo sugerem que o JI pode aumentar a formação de células beta pancreáticas e assim reduzir a apoptose dessas células por meio da produção de marcadores de regeneração específicos, ou seja, o JI melhora a tolerância à glicose, afetando diretamente a saúde das células beta pancreáticas, de forma independente da resistência à insulina ⁴⁸. Portanto, nossos resultados corroboram esse estudo, sugerindo que provavelmente o JI melhora a tolerância à glicose por meio de outros mecanismos que não envolvem a ação da insulina.

É importante salientar a importância do tempo em relação à insulina. Barnosk *et al.* (2014) em ensaio clínico, avaliaram indivíduos submetidos ao JI ou RC e a predisposição ao diabetes, e constataram que em geral, as concentrações de insulina foram reduzidas em 20-31% somente entre 8-12 semanas de JI, além disso, a redução na concentração de insulina, segundo os autores, parece estar mais fortemente relacionada com o grau de restrição alimentar e o percentual de perda de peso ⁴⁹. Assim, no presente estudo, o resultado obtido com relação à insulina pode ser atribuído ao tempo de tratamento, que seria insuficiente para promover esse tipo de mudança e à perda de peso dos animais.

Os animais que receberam Kefir em associação com JI apresentaram redução da glicemia. Já é demonstrado na literatura os benefícios do consumo desse probiótico em relação à glicemia ⁵⁰. Verificou-se que o Kefir estimula a captação de glicose nas células do músculo esquelético e ativa a via de sinalização da insulina. Essas características auxiliam no aumento da captação de glicose e na redução da resistência à insulina ⁸. Apesar dos estudos prévios é a primeira vez que é demonstrado os efeitos da associação entre kefir e JI sobre a glicemia em animais submetidos a dieta de cafeteria.

Em relação à perda de gordura, tanto os animais alimentados com Kefir quanto aqueles que fizeram a associação com JI tiveram redução do percentual de gordura quando comparado ao grupo C. Contudo, apesar do JI estar envolvido na perda de tecido adiposo, o protocolo não alterou o perfil lipídico dos animais, contrariamente, inibiu os efeitos benéficos do Kefir nesse parâmetro no grupo SJK. Esse resultado indica que o JI mesmo apresentando impacto benéfico na redução da gordura, não promoveu redução de LDL nem aumento de HDL, parâmetros importantes nas doenças cardiovasculares crônicas, como a aterosclerose ⁵¹.

A obesidade induzida pela dieta associa-se fortemente com o desenvolvimento de dislipidemia ⁵². Além disso, concentrações elevadas de colesterol sérico influenciam diretamente o desenvolvimento de doenças cardiovasculares ⁵². Observamos que o tratamento com Kefir reduziu o percentual de gordura corporal, colesterol LDL e aumentou o colesterol HDL.

É conhecido que cepas específicas de leveduras no Kefir apresentam altos níveis de atividade de certas enzimas, que desconjugam os ácidos biliares e

umentm sua excreção nas fezes, ajudando a reduzir o colesterol ⁸. Com a crescente excreção de sais biliares, menos deles são transportados de volta ao fígado, o que aumenta a demanda de colesterol para a síntese de novos sais. Assim, o fígado aumenta a captação hepática de LDL da circulação ⁵³, ocasionando redução das concentrações séricas de colesterol LDL.

Apesar de não haver diferenças entre os grupos em relação ao colesterol total, a relação entre suas frações sofreram alterações, com redução do LDL e aumento do HDL, que pode explicar os resultados em relação aos valores totais de colesterol.

Entretanto, no estudo de Ostadrahimi e colaboradores (2015), onde indivíduos adultos hipercolesterolêmicos ingeriram kefir por quatro semanas, não houve diferenças nas concentrações de colesterol total, HDL, LDL e TAG, apesar de ser constatado aumento na eliminação de AGCC pelas fezes ⁵⁴. Da mesma forma, em outro trabalho realizado dessa vez em pacientes diabéticos por oito semanas, o consumo de kefir não foi capaz de influenciar nos níveis séricos de TAG, colesterol total, LDL e HDL em comparação com o controle, sugerindo que o kefir não foi eficaz na redução dos lipídios plasmáticos em pacientes diabéticos ⁵⁵.

Contudo, os conflitos entre resultados podem advir dos diferentes protocolos utilizados, origem dos grãos e condições de fermentação do kefir, resultando em alterações na composição e variedades de microrganismos presentes ⁵⁰. O efeito benéfico do Kefir, por meio do aumento no colesterol HDL, e redução do colesterol LDL, evidenciou os benefícios do consumo desse probiótico após um tratamento de oito semanas de dieta de cafeteria.

Cerqueira *et al.* (2011), avaliaram ratos *Sprague–Dawley* submetidos ao JI ou apenas à RC por um curto e longo período (4 e 32 semanas, respectivamente) e demonstraram que apesar da redução dos pesos corporais nos grupos do JI, os animais apresentaram alta adiposidade intra-abdominal, chegando a níveis semelhantes ao grupo que recebeu ração *ad libitum*, enquanto os animais com RC apresentaram baixos níveis de adiposidade abdominal. Os autores concluíram que embora todas as estratégias de alimentação tenham levado a reduções de peso em comparação ao grupo C, o JI difere significativamente ($p \leq 0,05$) da RC em relação aos índices de gordura abdominal, sinalizando que a perda de peso em uma dieta

restrita pode ser enganosa e ocorrer na presença de altos níveis de gordura abdominal, fator de risco para doenças metabólicas ²³.

De fato, os resultados obtidos chamam atenção para o perfil lipídico dos animais submetidos ao protocolo de JI, já que mesmo exibindo perda de gordura, não houve melhora no perfil de lipoproteínas nos animais ($p > 0,05$), indicado que diferentemente do grupo Kefir, os animais não melhoraram parâmetros envolvidos com o desenvolvimento de síndrome metabólica. Park e colaboradores (2007) apresentaram resultados semelhantes, e demonstraram que ratos desenvolveram piora no perfil lipídico mesmo exibindo redução na porcentagem de gordura corporal ³⁰. Dorighello *et al.* (2014) comprovaram que o tratamento de 3 meses com JI pode resultar em aumento do colesterol total, colesterol VLDL e colesterol LDL na circulação de camundongos *knockout* para receptores de LDL, embora tenham apresentado redução de 20% na ingestão de alimentos ⁵⁶.

Ademais, a combinação entre JI e Kefir alterou o resultado benéfico do kefir sobre as lipoproteínas, indicando que o JI não foi capaz de melhorar o perfil lipídico e também impediu o efeito benéfico do kefir.

O Kefir e o JI, isoladamente, foram capazes de diminuir a oxidação de proteínas, por meio da análise de AOPP, contudo, apenas o JI promoveu a diminuição da peroxidação lipídica. O JI parece estar envolvido no aumento da produção de ERO em um primeiro momento e posteriormente pode ser capaz de diminuir o estresse oxidativo através da eliminação dessas espécies ⁵⁷. Essa resposta tem demonstrado ser um mecanismo importante subjacente aos efeitos benéficos desse protocolo ^{58,59}. Existem evidências de que o JI aumenta a expressão de sirtuínas, uma classe de enzimas que processa a desacetilase e parece estar relacionada com a regulação dos genes que têm efeitos diretos sobre a eliminação de ERO endógenos, sugerindo que o JI pode mediar respostas protetoras ao organismo ⁵⁷.

Além disso, Walsh, Shi & Van (2014) constataram que três mecanismos principais podem ser responsáveis pelos efeitos antioxidantes do JI. Especificamente, o JI pode reduzir a produção de ERO, aumentar a atividade das enzimas antioxidantes e/ou aumentar o turnover de oxidação de macromoléculas ⁶⁰.

Da mesma forma, apesar de não apresentar resultados significativos em relação à peroxidação lipídica, o Kefir foi capaz de diminuir a oxidação proteica nos animais ($p \leq 0,05$). De fato, já foi demonstrado que os lactobacilos isolados do kefir têm a capacidade de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias enquanto promovem o desenvolvimento de citocinas anti-inflamatórias, regulando de maneira direta a produção de ERO endógeno⁶¹.

O JI diminuiu a expressão da enzima antioxidante CAT e o probiótico, entretanto, não foi capaz de modificar a atividade de ambas as enzimas, SOD e CAT.

Por outro lado, Walsh, Shi & Van (2014) relataram que a atividades de SOD e CAT foram aumentados entre 20 e 30% após o JI nos trabalhos analisados. Apesar disso, achamos importante salientar que em geral, nenhuma enzima específica se destaca por ser consistentemente afetada pelo JI⁶⁰.

O Kefir, por sua vez, é comprovadamente benéfico para o sistema antioxidante do organismo. A literatura demonstra que esse efeito pode ser derivado da atividade biológica da microflora presente no probiótico¹³. No estudo de Güven & Gülmez (2003), foi comparado os efeitos antioxidantes do Kefir com a vitamina E em camundongos tratados por sete semanas; os autores observaram que a CAT aumentou ligeiramente no grupo que recebeu o Kefir, em quantidades inclusive superiores àquelas exibidas pela vitamina E¹³. Esses resultados corroboram com os nossos, onde, apesar de não ter apresentado significância ($p > 0,05$), a concentração de CAT foi tendencialmente superior àquela exibida pelo JI.

Adicionalmente, ao analisar os resultados referentes à hipertrofia gástrica, constatamos que todos os grupos submetidos ao JI apresentaram hipertrofia gástrica. Essa é a primeira vez que esse dado é demonstrado em animais submetidos a DC e JI. Nossos dados, portanto, evidenciam a necessidade de estudos que analisem melhor esse protocolo, uma vez que a prática do JI pode resultar no maior tamanho do estômago e conseqüentemente, maior ingestão calórica a longo prazo. Por outro lado, a intervenção com Kefir não promoveu hipertrofia gástrica, pelo contrario, levou a redução do peso do estômago, o que foi abolido pela associação com o JI, novamente destaca-se o efeito deletério do JI quando associado ao kefir. Além disso, o consumo desse probiótico já foi associado

com a proteção do tecido estomacal a úlceras, indicado outros efeitos benéficos do kefir⁶².

Diante do exposto, podemos inferir que o JI, isoladamente, pode resultar em perda de tecido adiposo, com redução do percentual de gordura corporal e do estresse oxidativo nos animais, entretanto, há aumento do peso gástrico e nenhum impacto sobre o perfil lipídico. O Kefir, por outro lado, promove melhora significativa no perfil lipídico, com redução do peso gástrico nos animais. A associação não promoveu melhora nesses resultados e inibiu os efeitos positivos do Kefir. Nossos resultados indicam que há a necessidade de maiores estudos, avaliando o impacto metabólico do JI no organismo.

6. CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados chamam a atenção para os efeitos variáveis desses protocolos e ainda, indicam que apenas a redução da gordura observada após o JI pode não indicar proteção ao desenvolvimento de outras doenças, advindas de alterações bioquímicas não revertidas pelo JI. Além disso, foi constatado que a perda de tecido adiposo nesses grupos deve-se à conseqüente restrição calórica pelo qual os animais foram submetidos, e não ao JI propriamente dito. Deste modo, o consumo de probióticos, como o kefir parece ter efeitos mais relevantes sobre o perfil bioquímico, sendo considerada alternativa melhor do que o JI nesses pacientes com sobrepeso.

7. REFERÊNCIAS

- [1] Hermsdorf HH, Puchau B, Zulet MA, Martínez JA, Association of body fat distribution with proinflammatory gene expression in peripheral blood mononuclear cells from young adult subjects, *OMICS*, 2010, 14, 297-307.
- [2] Dludla PV, Nkambule BB, Jack B, Mkandla Z, Mutize T, Silvestri S, Orlando P, Tiano L, Louw J, Mazibuko-Mbeje SE, Inflammation and Oxidative Stress in an Obese State and the Protective Effects of Gallic Acid, *Nutrients*, 2018, 11, pii: E23.
- [3] Hermsdorff HH, Zulet MA, Puchau B, Martínez JA, Central adiposity rather than total adiposity measurements are specifically involved in the inflammatory status from healthy young adults, *Inflammation*, 2011, 34, 161-170.
- [4] Herieka M, Erridge C, High-fat meal induced postprandial inflammation, *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58, 136-146.
- [5] López-Domènech S, Abad-Jiménez Z, Iannantuoni F, de Marañón AM, Rovira-Llopis S, Morillas C, Bañuls C, Víctor VM, Rocha M, Moderate weight loss attenuates chronic endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in human obesity, *Mol Metab*, 2019, 19, 24-33.
- [6] Astrup A, Yogurt and dairy product consumption to prevent cardiometabolic diseases: epidemiologic and experimental studies, *Am J Clin Nutr*, 2014, 99, 1235S-1245S.
- [7] Calder PC, Bosco N, Bourdet-Sicard R, Capuron L, Delzenne N, Doré J, Franceschi C, Lehtinen MJ, Recker T, Salvioli S, Visioli F, Health relevance of the modification of low grade inflammation in ageing (inflammageing) and the role of nutrition, *Ageing Res Rev*, 2017, 40, 95-119.
- [8] Liu JR, Wang SY, Chen MJ, Chen HL, Yueh PY, Lin CW, Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soyamilk-kefir in cholesterol-fed hamsters, *Br J Nutr*, 2006, 95, 939-646.

- [9] St-Onge MP, Farnworth ER, Savard T, Chabot D, Mafu A, Jones PJ, Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial [ISRCTN10820810], *BMC Complement Altern Med*, 2002, 2-1.
- [10] Ebner J, Arslan A, Fedorova M, Hoffmann R, Küçükçetin A, Pischetsrieder M, Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains, *J Proteomics*, 2015, 117, 41-57.
- [11] Jасolka TL, Aguilar EC, Teixeira LG, Lages PC, de Cássia Raimundo I, Beltrão NRM, Matoso RO, Carneiro RP, Nicoli JR, Alvarez-Leite I, Kefir supplementation improves lipid profile and oxidative stress but does not reduce atherosclerotic lesion in apoE deficient Mice, *J Food Nutr Disor*, 2013, 2,1-7.
- [12] Diniz RO, Garla LK, Schneedorf JM, Carvalho JC, Study of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix, *Pharmacol Res*, 2003, 47, 49-52.
- [13] Guven A, Gulmez M, The Effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues, *J Vet Med*, 2003, 50, 363-416.
- [14] Prado MR, Blandón LM, Vandenberghe LP, Rodrigues C, Castro GR, Thomaz-Soccol V, Soccol CR, Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products, *Front Microbiol*, 2015, 6-1177.
- [15] Friques AG, Arpini CM, Kalil IC, Gava AL, Leal MA, Porto ML, Nogueira BV, Dias AT, Andrade TU, Pereira TM, Meyrelles SS, Campagnaro BP, Vasquez EC, Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats, *J Transl Med*, 2015, 13:390.
- [16] Klippel BF, Duemke LB, Leal MA, Friques AG, Dantas EM, Dalvi RF, Gava AL, Pereira TM, Andrade TU, Meyrelles SS, Campagnaro BP, Vasquez EC, Effects of

Kefir on the Cardiac Autonomic Tones and Baroreflex Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats, *Front Physiol*, 2016, 7-211.

[17] Kim DH, Kim H, Jeong D, Kang IB, Chon JW, Kim HS, Song KY, Seo KH, Kefir alleviates obesity and hepatic steatosis in high-fat diet-fed mice by modulation of gut microbiota and mycobiota: targeted and untargeted community analysis with correlation of biomarkers, *J Nutr Biochem*, 2017, 44, 35-43.

[18] Tinsley GM, La Bounty PM, Effects of intermittent fasting on body composition and clinical health markers in humans, *Nutr Rev*, 2015, 73, 661-74.

[19] Carlson AJ, Hoebel F, Apparent prolongation of the life span of rats by intermittent fasting, *The Journal of Nutrition*, 1946, 31, 363-375.

[20] Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N, Swindell WR, Kamara D, Minor RK, Perez E, Jamieson HA, Zhang Y, Dunn SR, Sharma K, Pleshko N, Woollett LA, Csiszar A, Ikeno Y, Le Couteur D, Elliott PJ, Becker KG, Navas P, Ingram DK, Wolf NS, Ungvari Z, Sinclair DA, de Cabo R, Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span, *Cell Metab*, 2008, 8, 157-68.

[21] Wan R, Camandola S, Mattson MP, Intermittent food deprivation improves cardiovascular and neuroendocrine responses to stress in rats, *J Nutr*, 2003, 133, 1921-9.

[22] Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO, Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS, *Science*, 2005, 310, 314-7.

[23] Cerqueira FM, da Cunha FM, Caldeira da Silva CC, Chausse B, Romano RL, Garcia CC, Colepicolo P, Medeiros MH, Kowaltowski AJ et al., Long-term intermittent feeding, but not caloric restriction, leads to redox imbalance, insulin receptor nitration and glucose intolerance, *Free Radic Biol Med*, 2011, 51, 1454-1460.

- [24] Fann DY, Ng GY, Poh L, Arumugam T, Positive effects of intermittent fasting in ischemic stroke, *Exp Gerontol*, 2017, 89, 93-102.
- [25] Trepanowski JF, Kroeger CM, Barnosky A, Klempel MC, Bhutani S, Hoddy KK, Gabel K, Freels S, Rigdon J, Rood J, Ravussin E, Varady KA, Effect of Alternate-Day Fasting on Weight Loss, Weight Maintenance, and Cardioprotection Among Metabolically Healthy Obese Adults: A Randomized Clinical Trial, *JAMA Intern Med*, 2017,177, 930-938.
- [26] Tschöp M, Heiman ML, Rodent obesity models: an overview, *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2001, 109, 307-19.
- [27] Langbein H, Hofmann A, Brunssen C, Goettsch W, Morawietz H, Impact of high-fat diet and voluntary running on body weight and endothelial function in LDL receptor knockout mice, *Atheroscler Suppl*, 2015, 18, 59-66.
- [28] Sclafani A, Springer D, Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes, *Physiol Behav*, 1976, 17, 461-71.
- [29] Rothwell NJ, Stock MJ, Regulation of energy balance in two models of reversible obesity in the rat, *J Comp Physiol Psychol*, 1979, 93, 1024-34.
- [30] Park S, Yoo KM, Hyun JS, Kang S, Intermittent fasting reduces body fat but exacerbates hepatic insulin resistance in young rats regardless of high protein and fat diets, *J Nutr Biochem*, 2017, 40, 14-22.
- [31] Shafat A, Murray B, Rumsey D, Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat, *Appetite*, 2009, 52, 34-8.
- [32] Jørgensen MS, Tornqvist KS, Hvid H, Calculation of Glucose Dose for Intraperitoneal Glucose Tolerance Tests in Lean and Obese Mice, *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2017, 56, 95-97.
- [33] Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA, Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension, *Am J Physiol*, 2004, 287, R943-R949.

- [34] Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P, A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats, *J Nutr*, 2003, 133, 1081-7.
- [35] Xu KZ, Zhu C, Kim MS, Yamahara J, Li Y, Pomegranate flower ameliorates fatty liver in an animal model of type 2 diabetes and obesity, *J Ethnopharmacol*, 2009, 123, 280-7.
- [36] Daleprane JB, Freitas Vda S, Pacheco A, Rudnicki M, Faine LA, Dörr FA, Ikegaki M, Salazar LA, Ong TP, Abdalla DS, Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from própolis, *J Nutr Biochem*, 2012, 23, 557-66.
- [37] Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 1976, 72, 248–254.
- [38] Compton SJ, Jones CG, Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay, *Anal Biochem*, 1985, 151, 369-74.
- [39] Patocková J, Krsiak M, Marhol P, Tůmová E, Cerebrolysin inhibits lipid peroxidation induced by insulin hypoglycemia in the brain and heart of mice, *Physiol Res*, 2003, 52, 455-60.
- [40] Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B, Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia, *Kidney Int*, 1996, 49, 1304-13.
- [41] Misra HP, Fridovich I, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *J Biol Chem*, 1972, 247, 3170-5.
- [42] Aebi H, Catalase: In *Methods in Enzymol.* Academic Press: Orlando, 1984, 125–126.
- [43] Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM, Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes, *Nature*, 2006, 444, 840-6

- [44] Pedersen CR, Hagemann I, Bock T, Buschard K. Intermittent feeding and fasting reduces diabetes incidence in BB rats, *Autoimmunity*, 1999, 30, 243-50.
- [45] Baumeier C, Kaiser D, Heeren J, Scheja L, John C, Weise C, Eravci M, Lagerpusch M, Schulze G, Joost HG, Schwenk RW, Schürmann A, Caloric restriction and intermittent fasting alter hepatic lipid droplet proteome and diacylglycerol species and prevent diabetes in NZO mice, *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1851, 566-76.
- [46] Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M, Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance, *N Engl J Med*, 2001, 344, 1343-50.
- [47] Harvie MN, Pegington M, Mattson MP, Frystyk J, Dillon B, Evans G, Cuzick J, Jebb SA, Martin B, Cutler RG, Son TG, Maudsley S, Carlson OD, Egan JM, Flyvbjerg A, Howell A, The effects of intermittent or continuous energy restriction on weight loss and metabolic disease risk markers: a randomized trial in young overweight women, *Int J Obes*, 2011, 35, 714-727.
- [48] Liu H, Javaheri A, Godar RJ, Murphy J, Ma X, Rohatgi N, Mahadevan J, Hyrc K, Saftig P, Marshall C, McDaniel ML, Remedi MS, Razani B, Urano F, Diwan A, Intermittent fasting preserves beta-cell mass in obesity-induced diabetes via the autophagy-lysosome pathway, *Autophagy*, 2017, 13, 1952-1968.
- [49] Barnosky AR, Hoddy KK, Unterman TG, Varady KA, Intermittent fasting vs daily calorie restriction for type 2 diabetes prevention: a review of human findings, *Transl Res*, 2014, 164, 302-11.
- [50] Rosa DD, Grześkowiak ŁM, Ferreira CL, Fonseca AC, Reis SA, Dias MM, Siqueira NP, Silva LL, Neves CA, Oliveira LL, Machado AB, Peluzio Mdo C, Kefir reduces insulin resistance and inflammatory cytokine expression in an animal model of metabolic syndrome, *Food Funct*, 2016, 7, 3390-401.

- [51] Ahotupa M, Oxidized lipoprotein lipids and atherosclerosis, *Free Radic Res*, 2017, 51, 439-447.
- [52] WHO, Prevention of coronary heart disease, World Health Organ, *Tech. Rep. Ser.* 1982, 678, 1–53.
- [53] Toral M, Gómez-Guzmán M, Jiménez R, Romero M, Sánchez M, Utrilla MP, Garrido-Mesa N, Rodríguez-Cabezas ME, Olivares M, Gálvez J, Duarte J, The probiotic *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 reduces the vascular pro-oxidant and pro-inflammatory status in obese mice, *Clin Sci*, 2014, 127, 33-45.
- [54] Ostadrahimi A, Taghizadeh A, Mobasser M, Farrin N, Payahoo L, Beyramalipour Gheshlaghi Z, Vahedjabbari M, Effect of probiotic fermented milk (kefir) on glycemic control and lipid profile in type 2 diabetic patients: a randomized double-blind placebo-controlled clinical Trial, *Iran J Public Health*, 2015, 44, 228-37.
- [55] St-Onge MP, Farnworth ER, Savard T, Chabot D, Mafu A, Jones PJ, Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial [ISRCTN10820810], *BMC Complement Altern Med*, 2002, 2-1.
- [56] Dorighello GG, Rovani JC, Luhman CJ, Paim BA, Raposo HF, Vercesi AE, Oliveira HC, Food restriction by intermittent fasting induces diabetes and obesity and aggravates spontaneous atherosclerosis development in hypercholesterolaemic mice, *Br J Nutr*, 2014, 111, 979-86.
- [57] Chaudhary N, Pfluger PT, Metabolic benefits from Sirt1 and Sirt1 activators, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2009, 12, 431-7.
- [58] Ristow M, Zarse K, How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis), *Exp Gerontol*, 2010, 45, 410-8.
- [59] Ristow M, Schmeisser S, Extending life span by increasing oxidative stress, *Free Radic Biol Med*, 2011, 51, 327-36.

[60] Walsh ME, Shi Y, Van Remmen H, The effects of dietary restriction on oxidative stress in rodents, *Free Radic Biol Med*, 2014, 66, 88-99.

[61] Hong WS, Chen YP, Chen MJ, The antiallergic effect of kefir Lactobacilli, *J Food Sci*, 2010, 75, H244-53.

[62] Barboza KRM, Coco LZ, Alves GM, Peters B, Vasquez EC, Pereira TMC, Meyrelles SS, Campagnaro BP, Gastroprotective effect of oral kefir on indomethacin-induced acute gastric lesions in mice: Impact on oxidative stress, *Life Sci*, 2018, 209, 370-376.

* Modelo de referências da revista "Food and Function".

8. APÊNDICE

Tabela1. Cardápio diário A e relação de peso dos diversos grupos de animais.

CARDÁPIO A					
Data: / /					
GRAMAS/ML OFERTADOS					
Ração Padrão					
Salame					
Bisnaga de Pão					
Salgadinho de Queijo					
Balas					
Refrigerante de Cola					
TOTAL					
RESTO INGESTA					
Ração Padrão					
Salame					
Bisnaga de Pão					
Salgadinho de Queijo					
Balas					
Refrigerante de Cola					
TOTAL					
CONSUMO					
PREFERENCIA ALIMENTAR					
PESO ATUAL DOS ANIMAIS					
C	SV	SK	SJV	SJK	SJI
Observações:					

*C: Controle; SV: Veículo (leite); SK: Kefir; SJV: Jejum e Kefir; SJK: Jejum e Kefir; SJI: Somente Jejum.

Tabela 2. Cardápio diário B e relação de peso dos diversos grupos de animais.

CARDÁPIO B					
Data: / /					
GRAMAS/ML OFERTADOS					
Ração Padrão					
Linguiça					
Bolo de Chocolate					
Bolacha Maria					
Marshmallow					
Refrigerante de Cola					
TOTAL					
RESTO INGESTA					
Ração Padrão					
Linguiça					
Bolo de Chocolate					
Bolacha Maria					
Marshmallow					
Refrigerante de Cola					
TOTAL					
CONSUMO					
PREFERENCIA ALIMENTAR					
PESO ATUAL DOS ANIMAIS					
C	SV	SK	SJV	SJK	SJI
Observações:					

*C: Controle; SV: Veículo (leite); SK: Kefir; SJV: Jejum e Kefir; SJK: Somente Jejum e Kefir; SJI: Somente Jejum

Tabela 3. Cardápio diário C e relação de peso dos diversos grupos de animais.

<u>CARDÁPIO C</u>					
Data: / /					
GRAMAS/ML OFERTADOS					
Ração Padrão					
Presunto	c/				
Gordura					
Salgadinho (Doritos)					
Biscoito Chocolate					
Bala de Goma					
Refrigerante	de				
Cola					
TOTAL					
RESTO INGESTA					
Ração Padrão					
Presunto	c/				
Gordura					
Salgadinho (Doritos)					
Biscoito Chocolate					
Bala de Goma					
Refrigerante	de				
Cola					
TOTAL					
CONSUMO					
PREFERENCIA ALIMENTAR					
PESO ATUAL DOS ANIMAIS					
C	SV	SK	SJV	SJK	SJI
Observações:					

*C: Controle; SV: Veículo (leite); SK: Kefir; SJV: Jejum e Kefir; SJK: Somente Jejum e Kefir; SJI: Somente Jejum.

Tabela 4. Relação calórica e distribuição de macronutrientes e sódio sobre os alimentos ofertados no cardápio A.

Alimento	Quantidade (g)	Kcal (g)	Carboidrato (g)	Proteína (g)	Lipídios (g)	Sódio (g)
Ração Padrão	1	2,95	0,55	0,22	0,04	0,00
Salame	1	3,38	0,00	0,32	0,24	12,48
Bisnaga de pão	1	2,95	0,53	0,09	0,04	4,70
Salgadinho sabor Queijo	1	4,80	0,60	0,06	0,24	11,04
Bala	3,80	0,95	0,00	0,00	0,00	0,20
Refrigerante de Cola	1	0,43	0,11	0,00	0,00	0,05

Tabela 5. Relação calórica e distribuição de macronutrientes e sódio sobre os alimentos ofertados no cardápio B.

Alimento	Quantidade (g)	Kcal (g)	Carboidrato (g)	Proteína (g)	Lipídios (g)	Sódio (g)
Ração Padrão	1	2,95	0,55	0,22	0,04	0,00
Lingüiça	1	3,18	0,01	0,18	0,32	15,73
Bolo de Chocolate	1	3,25	0,50	0,05	0,12	6,18
Bolacha Maria	1	4,30	0,73	0,07	0,12	4,33

Marshmallow	3,80	3,30	0,80	0,04	0,00	0,31
Refrigerante de Cola	1	0,43	0,11	0,00	0,00	0,05

Tabela 6: Relação calórica e distribuição de macronutrientes e sódio sobre os alimentos ofertados no cardápio C.

Alimento	Quantidade (g)	Kcal (g)	Carboidrato (g)	Proteína (g)	Lipídios (g)	Sódio (g)
Ração Padrão	1	2,95	0,55	0,22	0,04	0,00
Presunto	1	1,55	0,52	0,17	0,09	8,33
Salgadinho Fritello	1	5,08	0,52	0,08	0,29	6,40
Biscoito Wafer de Chocolate	1	5,20	0,63	0,05	0,27	1,13
Bala de Goma	3,80	3,60	0,90	0,00	0,00	0,50
Refrigerante de Cola	1	0,43	0,11	0,00	0,00	0,05

9. ANEXO



Universidade Vila Velha
Comissão de Ética, Bioética e Bem Estar Animal (CEUA-UVV)

PARECER DO RELATOR

Parecer Nº. 445-2017

Pesquisadora Responsável: Ewelyne Miranda de Lima

Título da Pesquisa: Avaliação cardiovascular e metabólica do tratamento crônico com kefir em ratos com sobrepeso submetidos ao jejum intermitente

Instituição onde será desenvolvido: Universidade Vila Velha

Situação: APROVADO

Ao analisar o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação cardiovascular e metabólica do tratamento crônico com kefir em ratos com sobrepeso submetidos ao jejum intermitente", que tem como pesquisadora responsável Ewelyne Miranda de Lima, considero que o mesmo se encontra adequado e satisfatoriamente de acordo com as exigências das Resoluções que regem esse Comitê.

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, bem como sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, sou de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como APROVADO. Serão utilizados no projeto 60 ratos isogênicos Wistar Kyoto (machos).

Vila Velha, 27 de novembro de 2017.

Prof. Ana Carolina Srbek de Araujo
Relatora da CEUA-UVV

Universidade Vila Velha

Rua Comissário José Dantas de Melo, nº 21, Bairro Boa Vista
Vila Velha / ES - CEP: 29.102-770
E-mail: ceua@uvv.br