

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

**OS IMPACTOS DA ADMINISTRAÇÃO DE KEFIR DE LEITE SOBRE
O DANO HEPÁTICO INDUZIDO PELA DIETA DE CAFETERIA: UM
ESTUDO EXPERIMENTAL**

HELENA LUIZA DA ROCHA LOPES

VILA VELHA-ES
JUNHO/2022

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

**OS IMPACTOS DA ADMINISTRAÇÃO DE KEFIR DE LEITE SOBRE
O DANO HEPÁTICO INDUZIDO PELA DIETA DE CAFETERIA: UM
ESTUDO EXPERIMENTAL**

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

HELENA LUIZA DA ROCHA LOPES

VILA VELHA-ES
JUNHO/2022

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

L864i

Lopes, Helena Luiza da Rocha.

Os impactos da administração de kefir de leite sobre o dano hepático induzido pela dieta de cafeteria : um estudo experimental / Helena Luiza da Rocha Lopes. – 2022.

59 f. : il.

Orientadora: Bianca Prandi Campagnaro.

Coorientadora: Rafaela Aires.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Vila Velha, 2022.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Probióticos. 3. Obesidade.
I. Campagnaro, Bianca Prandi. II. Aires, Rafaela. III. Universidade Vila Velha. IV. Título.

CDD 615

HELENA LUIZA DA ROCHA LOPES

**OS IMPACTOS DA ADMINISTRAÇÃO DE KEFIR DE LEITE SOBRE
O DANO HEPÁTICO INDUZIDO PELA DIETA DE CAFETERIA: UM
ESTUDO EXPERIMENTAL**

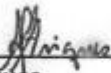
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 30 de junho de 2022.

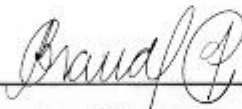
Banca examinadora:



Prof.ª. Drª. Girlandia Alexandre Brasil Amorim



Drª. Andreia Friques



Prof.ª. Drª. Bianca Prandi Campagnaro – UVV
Orientadora



Drª. Rafaela Aires
Co-Orientadora

Projeto financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) sobre o número N. 118/2020.

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado não poderia chegar a um bom porto sem o precioso apoio de várias pessoas.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus por sempre estar em minha vida, por me guiar em cada escolha e por me ensinar sobre o grande poder da resiliência durante toda essa trajetória.

Agradecer a minha família por acreditarem no meu sonho e embarcarem junto comigo, me dando apoio incondicional em todo os momentos, queridos pais sem vocês eu não teria conseguido. Agradeço a minha querida e amada Tia Iraci e ao meu primo amado Alexandre que sempre serão meu porto seguro em Vitória.

Gratidão também a minhas Tias Bel e Edina que sempre me orientaram com suas palavras acolhedoras e sempre me incentivaram a prosseguir.

Ao meu querido e amado companheiro Hugo que se fez presente durante todo o processo desse estudo, obrigada pelas incansáveis ajudas, pelo ombro amigo, pelas palavras que sempre me confortaram e incentivaram. Esse título também é seu! Sem você com certeza eu não teria conseguido terminar. Obrigada, meu amor! Você é um grande companheiro.

Desejo igualmente agradecer ao meu querido sogro Prof^o Dr. Helder Mauad e sua querida esposa Prof^a Dra. Márcia de Holanda pelas sugestões e todo apoio nos momentos em que os procurei, obrigada por acreditarem em mim e pelos inúmeros ensinamentos nos finais de semana regados de um bom som ao violão, vocês me ensinaram o quão é possível ir em busca dos nossos sonhos e nunca desistir, a vocês minha eterna gratidão.

A prof^a Bianca Prandi Campagnaro, pela oportunidade de ser sua aluna. Muito obrigada, professora!! Pelas orientações neste trabalho, pelos incentivos, atenção e ensinamentos durante toda a trajetória, obrigada por me acolher!

A Dr^a Rafaela Aires, por toda ajuda e co-orientação vinda através de palavras calmas e confortáveis, aprendi com você que tudo dá certo no final, obrigada!

Agradeço ainda CAPES, que tornou possível a realização do meu sonho, o mestrado. Muito obrigada!

Minha gratidão as alunas de Iniciação Científica, Amanda e Júlia, por todo amor, carinho e dedicação. Gratidão por abraçarem esse sonho junto comigo e não me

deixarem fraquejar nos momentos difíceis e desafiadores; por me apoiarem e acompanharem na realização dos experimentos. Obrigada pela preocupação e apreço!

Agradeço aos meus amigos, que durante todo o processo souberam compreender a minha ausência e sempre tiveram na torcida para que esse dia chegasse e, Marcelle, Cris, Nath, Henrique, enfim chegou!

Gostaria de agradecer também aos amigos que fiz durante a trajetória do mestrado em especial a Ana Claudia e Karla Lírio minha nutri pesquisadora mais competente! Gostaria de registrar também, minha eterna gratidão pela minha querida amiga Sthephany de Castro, minha farmacêutica preciosa, você sem dúvida foi meu ombro direito e esquerdo nessa caminhada, obrigada por me orientar, ensinar, me segurar nos dias difíceis e a me abraçar nos dias de glórias e conquistas. Obrigada pela paciência e pelo carinho. Gratidão por abdicar seu tempo aos finais de semana e ir junto comigo ao biopráticas, obrigada pelos cafés, pelas caronas e marmitas trocadas. Enfim, obrigada por estender a mão, gratidão eterna, minha querida amiga!

Aos professores Dr^o Elizardo Corral Vasquez e Dr^o Thiago de Melo, pelos ensinamentos.

A minha querida amiga Dr^a Kelly por me apresentar o mestrado, por ser minha maior motivação e por acreditar que eu conseguiria, Obrigada!

Minha gratidão também a professora Dr^a Girlandia e a Dr^a Andreia Friques por aceitarem ser minha banca avaliadora, é uma honra compartilhar esse projeto com vocês.

Obrigada ainda a todos os colegas do Lab.33, Lari, Duda, Glauci, aos IC's que de uma forma ou de outra contribuíram para que esse trabalho existisse. Gratidão também aos queridos colegas Maria Eduarda e Edgar do laboratório de Fisiologia Translacional – UFES.

Agradeço aos queridos colegas e profissionais ímpares do Biotério, Daniel e Roberta que me acolheram de uma forma sem igual, obrigada queridos! Gratidão a todos os profissionais do Biopráticas, os nossos porteiros, os técnicos, em especial a Ana Claudia e Bia e as nossas queridas amigas da limpeza Débora e Dona Zenaide!

Finalizo com o sentimento que saio após esses dois anos e três meses de mestrado, dever cumprido e com uma breve reflexão. Como já dizia nosso querido Chico Xavier, “Crê em ti mesmo, age e verá resultados. Quando te esforças, a vida também se esforça para te ajudar. “

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 SINDROMES METABÓLICAS E SUA RELAÇÃO COM OS HÁBITOS ALIMENTARES	14
1.2 KEFIR E SEUS EFEITOS.	15
1.3 DIETA DE CAFETERIA UM MODELO EXPERIMENTAL QUE MIMETIZA A DIETA OCIDENTAL E SUA RELAÇÃO COM O ORGANISMO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS	20
3.2 GRUPOS E TRATAMENTO EXPERIMENTAIS	20
3.3 DIETA DE CAFETERIA	21
3.4 PREPARAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DO KEFIR	24
3.5 ANÁLISE DE MARCADORES BIOQUÍMICOS	24
3.6 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR, HÍDRICO E CALÓRICO	26
3.7 PARÂMETROS DE PESAGEM E COLETA DA GORDURA RETROPERITONEAL	27
3.8 MEDIDAS BIOMÉTRICAS DO FÍGADO	27
3.9 INDICE HEPATOSSOMÁTICO	28
3.10 ANÁLISE DA MOTILIDADE INTESTINAL	28
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
4. DISCUSSÃO	30
4.1. EFEITO DO KEFIR NO METABOLISMO LIPÍDICO, GLICOSE EM JEJUM E OUTROS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	30
4.1.1. PERFIL LIPÍDICO SÉRICO	30
4.1.2. GLICEMIA DE JEJUM	31
4.1.3 ANÁLISE BIOQUÍMICA DOS NÍVEIS DE TRANSAMINASE OXALACÉTICA-GLUTÂMICA (AST) E TRANSAMINASE GLUTÂMICO-PIRÚVICA (ALT)	31
4.2 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, INGESTÃO DE LÍQUIDOS E CALÓRICA	32
4.2.1 GORDURA RETROPERITONEAL	34
4.2.2 PESO SECO DO FÍGADO	35

4.2.3. ÍNDICE HEPATOSSÓMATICO	36
4.4. KEFIR E SUA AÇÃO NO INTESTINO DELGADO	36
4.4.1. MOTILIDADE INTESTINAL	37
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	45
7 REFERÊNCIA	46

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Mecanismo e fisiopatologia da Síndrome Metabólica. Adaptado de: Fahed G et al.,2022.....	16
Figura 2: Propriedades biológicas e composição de macro e micronutrientes do kefir. Adaptado de: Farag, M.A, et. al.2020)-----	18
Figura 3: Ratos Wistar do biotério da Universidade de Vila Velha (UVV)-----	22
Figura 4: Desenho experimental dos grupos.-----	23
Figura 5: A) Imagem representativa da composição das dietas B) Disposição dos alimentos na gaiola para os animais C) Desgaseificação do refrigerante de cola D) Sobra dos alimentos após 24 horas disponíveis.-----	25
Figura 6: Etapas de preparação do Kefir.-----	2
Figura 7: Análise da glicose em jejum via cauda do animal.-----	27
Figura 8: Planilha utilizada para coletar dados de peso, sobras alimentares e quantidade de kefir ofertado diariamente.-----	28
Figura 9: Representação da incisão para retirada da gordura retroperitoneal.-----	29
Figura 10: Processo de remoção do fígado. A) Incisão cirúrgica para retirada do fígado, B) fígado úmido sendo preparado para desidratação em estufa a 40°C por 48 horas, c) fígado seco após o processo de desidratação em estufa.-----	30
Figura 11: Análise da motilidade intestinal.-----	31
Figura 12: Perfil lipídico sérico após 4 semanas de uso da dieta de cafeteria em ratos Wistar (mg/dl) de A) Colesterol total (mg/dl), B) Triglicerídeos (mg/dl), C) Lipoproteína	

de baixa densidade (LDL) (mg/dl), D) Lipoproteína de alta densidade (HDL). Os valores representam média \pm EPM para cada grupo com n= 8-10 animais----- 33

Figura 13: Efeito anti-hiperglicêmico do Kefir após tratamento de 4 semanas. * $p < 0,05$ vs. Controle e # $p < 0,05$ vs. Caf (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).34

Figura 14: Níveis séricos das enzimas AST e ALT após tratamento com kefir durante 4 semanas. A: Níveis de transaminase oxalacética-glutâmica (AST) (U/ml) n= 8-10 animais por grupo; B: Níveis de transaminase glutâmico-pirúvica (ALT) (U/ml) n= 8-10 animais por grupo.----- 35

Figura 15: Variação na ingestão de nutrientes e peso corporal em ratos Wistar após dieta de cafeteria por 4 semanas consecutivas. A) Média do consumo de água (* $p < 0,05$). B) Ingestão de refrigerante de cola (# $p < 0,05$). C) Ingestão calórica dos animais (* $p < 0,05$; # $p < 0,05$). D) Peso dos animais (* $p < 0,05$) (ANOVA duas vias com medidas repetidas).B)----- 36

Figura 16: A) Efeitos do Kefir na deposição da gordura retroperitoneal e B) fotografias da cavidade abdominal aberta de ratos Wistar. Os dados representam a média \pm EPM para cada grupo com n= 10-13 animais. * $p < 0,05$ vs. Controle e # $p < 0,05$ vs. Caf (ANOVA uma via, seguida de *post-hoc* de Tukey).A)----- 37

Figura 17: Ação do Kefir no peso seco do fígado. Os valores são expressos em média \pm EPM para cada grupo com n= 11 animais. * $p < 0,05$ vs. Controle (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).----- 38

Figura 18: Ação do Kefir no índice hepatossômico. Os valores são expressos em média \pm EPM para cada grupo com n= 11 animais. * $p < 0,05$ vs. Controle (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).----- 39

Figura 19: Ação do Kefir na motilidade intestinal. Os valores são expressos em média \pm EPM para cada grupo com n= 11 a 12 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs. Controle (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).----- 40

Tabela 1: Composição da dieta de cafeteria. Fonte: Sthafat e colaboradores 2009 adaptado.----- 2

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
Caf+ K	Grupo cafeteria+ kefir
Caf+L	Grupo cafeteria + leite
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CON	Grupo controle
CT	Colesterol Total
DCNT	Doença Crônica Não Transmissível
HDL	High-density lipoprotein
IHS	Índice Hepatossômatico
IVC	Individually Ventilated Caged
Kcal/g	Quilocaloria por grama
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
RPM	Rotação por minuto
TG	Triglicerídeos
UVV	Universidade Vila Velha

RESUMO

LOPES, Helena Luiza Da Rocha. M.Sc., Universidade Vila Velha-ES, junho de 2022. **Os impactos da administração de kefir de leite sobre o dano hepático induzido pela dieta de cafeteria: um estudo experimental.** Orientadora: Profa. Dra. Bianca Prandi Campagnaro.

Os novos hábitos alimentares de produtos processados, ricos em carboidratos refinados, gorduras e proteínas animais, é a base alimentar de muitos indivíduos. Buscando investigar melhor os efeitos do consumo desses alimentos em nosso organismo, a ciência inseriu nos estudos uma dieta que retrata a alimentação humana, chamada de *dieta de cafeteria*. No entanto, sabe-se que consumo excessivo de uma alimentação não nutritiva gera a desregulação do metabolismo levando ao desenvolvimento da Síndrome metabólica. O uso de probióticos, prebióticos e simbióticos vem sendo analisado como possíveis coadjuvantes em busca de novos caminhos que possam auxiliar o tratamento de indivíduos cuja base da dieta é composta por alimentos processados e ultraprocessados e que estão sujeitos ao desenvolvimento de doenças geradas a partir da ingestão desses alimentos. O kefir sendo um probiótico, apresenta em sua composição uma diversificação de bactérias e leveduras que através do seu leite fermentado consumido regularmente apresenta melhorias no corpo, especialmente nos processos inflamatórios. Esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos metabólicos e nutricionais do kefir de leite em animais experimentais submetidos à dieta de cafeteria, para isso, ratos Wistar macho foram separados em três grupos controle (n=16) Cafeteria (n=16) Cafeteria+kefir (n=16) recebendo as dietas experimentais: ração padrão (padrão histológico de roedor), Dieta de cafeteria e dieta de cafeteria concomitante com kefir 4% (0,3ml/100 g) durante 4 semanas. Foram avaliados após a eutanásia os seguintes parâmetros: consumo alimentar, deposição de gordura retroperitoneal, marcadores bioquímicos como perfil lipídico, glicemia de jejum e enzimas hepáticas e fatores envolvidos na motilidade intestinal. Os animais que receberam a dieta de cafeteria em conjunto com o kefir apresentaram redução nos níveis de colesterol total, além de redução na deposição de gordura retroperitoneal bem como a melhora na motilidade intestinal. O uso do kefir promoveu a redução dos níveis de colesterol total, triglicerídeos e LDL- colesterol,

apresentando um aumento nos níveis séricos de HDL além de proporcionar melhoria nos níveis de TGO confirmando que, o kefir promove a ação antiobesidade, anti-inflamatória e antioxidante mesmo estando sobre o uso de uma dieta rica em carboidrato e lipídio.

Palavras-chaves: Probiótico, obesidade, dieta ocidental, síndrome metabólica, processos inflamatórios.

ABSTRACT

LOPES, Helena Luiza Da Rocha. M.Sc., Vila Velha University-ES, June de 2022. **The impacts of milk kefir administration on liver damage induced by cafeteria diet: an experimental study.** Advisor: Profa. Dra. Bianca Prandi Campagnaro.

The new eating habits of processed products, rich in refined carbohydrates, fats and animal proteins, is the food base of many individuals. Seeking to investigate better the effects of the consumption of these foods in our organism, science inserted in the studies a diet that portrays human food, called the cafeteria diet. However, it is known that excessive consumption of a non-nutritive diet generates the dysregulation of metabolism leading to the development of metabolic syndrome. The use of probiotics, prebiotics and symbiotics has been analyzed as possible adjuvants in search of new ways that can help the treatment of individuals whose diet base is composed of processed and ultra-processed foods and who are subject to the development of diseases generated from the intake of these foods. Kefir being a probiotic, presents in its composition a diversification of bacteria and yeasts that through its regularly consumed fermented milk presents improvements in the body, especially in inflammatory processes. This study aimed to evaluate the metabolic and nutritional effects of milk kefir in experimental animals submitted to cafeteria diet, for this, male Wistar rats were separated into three control groups (n=16) Cafeteria (n=16) Cafeteria+kefir (n=16) receiving experimental diets: standard diet (histological rodent pattern), Cafeteria diet and cafeteria diet concomitant with kefir 4% (0.3ml/100 g) for 4 weeks. The following parameters were evaluated after euthanasia: food intake, retroperitoneal fat deposition, biochemical markers such as lipid profile, fasting glycemia and liver enzymes and factors involved in intestinal motility. The animals that received the cafeteria diet in conjunction with kefir showed a reduction in total cholesterol levels, in addition to a reduction in retroperitoneal fat deposition as well as an improvement in intestinal motility. The use of kefir promoted the reduction of levels of total cholesterol, triglycerides and LDL-cholesterol, presenting an increase in serum HDL levels in addition to providing improvement in TGO levels confirming that kefir promotes anti-obesity, anti-inflammatory and antioxidant action even being on the use of a diet rich in carbohydrate and lipid.

Keywords: Probiotic, obesity, Western diet, metabolic syndrome, inflammatory

processes

INTRODUÇÃO

1.1. SÍNDROMES METABÓLICAS E SUA RELAÇÃO COM OS HÁBITOS ALIMENTARES

A Síndrome Metabólica (SM) é composta por um conjunto de fatores com origem na desregulação metabólica que promove o desenvolvimento de dois acometimentos sendo eles, a diabetes Mellitus e as doenças cardiovasculares (Sirtori,C.R et al; 2017). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS,1999), a SM tem como característica a resistência a ação da insulina, resultando no aumento da glicemia, alterações no metabolismo dos lipídeos e hormonais, que levam ao ganho de peso dos indivíduos favorecendo o desenvolvimento das doenças cardiovasculares conforme descrito na figura 1.

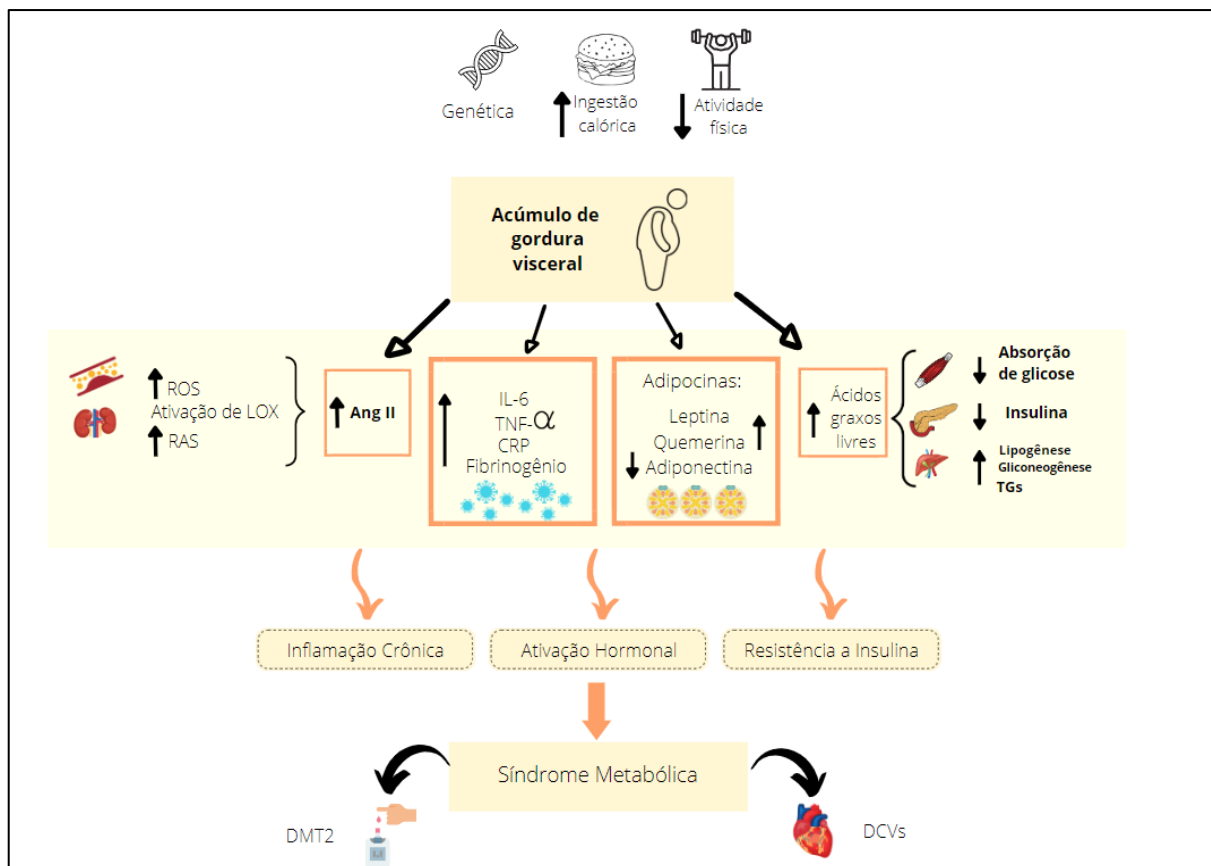


Figura 1: Mecanismo e fisiopatologia da Síndrome Metabólica. Adaptado de: Fahed G et al.,2022.

Atualmente, sabe-se que o desenvolvimento de anormalidades metabólicas está diretamente ligado aos hábitos alimentares. O uso constante de uma dieta rica

em gordura, açúcares, carboidratos refinados e com baixo teor de vitaminas e minerais tem sido apresentado como uma grande causa de desequilíbrios nutricionais, além de alterações metabólicas e fisiológicas (OMS, 2013).

Nesse contexto, o desenvolvimento da obesidade advinda principalmente pelos hábitos alimentares, tornou-se um dos mais relevantes problemas de saúde pública devido a sua alta prevalência em todo o mundo e a sua contribuição para o desenvolvimento da síndrome metabólica (Fahed, et al., 2022). Essa condição patológica compreende a presença de resistência à insulina, obesidade abdominal, hipertensão, hiperlipidemia além de outra anormalidade metabólicas, sendo considerado como uma das principais causas de mortalidade e morbidade mundialmente (James, A. M et al., 2012). Levando em consideração esses fatores, a perda de peso induzida pela dieta equilibrada e saudável é importante para a redução desses marcadores (Hermsdorf, H.H et al., 2010; Dlundla, P.V et al.,2018). Além da redução do peso corporal, e a modificação dos hábitos alimentares, visando uma alimentação composta por um equilíbrio nutricional entre os macros e micronutrientes a fim de atender todas as necessidades nutricionais do organismo (Fahed, G et al., 2022).

Nos últimos anos, estudos apontam os benefícios do uso de alimentos funcionais como sendo capazes de desempenhar um papel importante na redução de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT's) e infecções advindas de alterações microbianas (Moraes; Colla,2006; Brown,et al.,2015, Papathanasopoulos, et al., 2009). Segundo Kapka-Skrzypczak, et al., (2012), os alimentos funcionais influenciam de forma positiva a saúde humana não apenas por apresentar nutrientes essenciais, mas por conter em sua formulação ingredientes fisiologicamente saudáveis, como por exemplo, os produtos que apresentam e sua composição microrganismos e polissacarídeos sendo esses conhecido como produtos probióticos e prebióticos.

Os Probióticos, são microrganismos vivos que podem ser incluídos na preparação de diversos produtos, incluindo alimentos, medicamentos e suplementos dietéticos capazes de melhorar o equilíbrio intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (FAO/OMS, 2001; Khoder et al., 2016). Dentre os produtos

probióticos, tem destaque os leites fermentados, que são originados da fermentação microbiológica do leite (Ebner, et al.,2015).

1.1.2. KEFIR E SEUS EFEITOS

Dentre as variedades de alimentos e produtos funcionais cientificamente validados, destaque -se o kefir, sendo descrito como um probiótico por exercer importantes atividade biológicas no organismo, tais como antioxidantes (Rosa, et. al.; 2016)., imunoreguladora (Kim, et. al., 2015), melhora na saúde intestinal (Bifari, Nisoli, 2017), regulação do peso corporal (Bifari, Nisoli, 2017), anti-inflamatória (Kim, et. al., 2015), anti-hipertensiva (Amorim, et. al., 2019), controle da glicose sérica (Bifari, Nisoli, 2017) conforme descrito na figura 2.

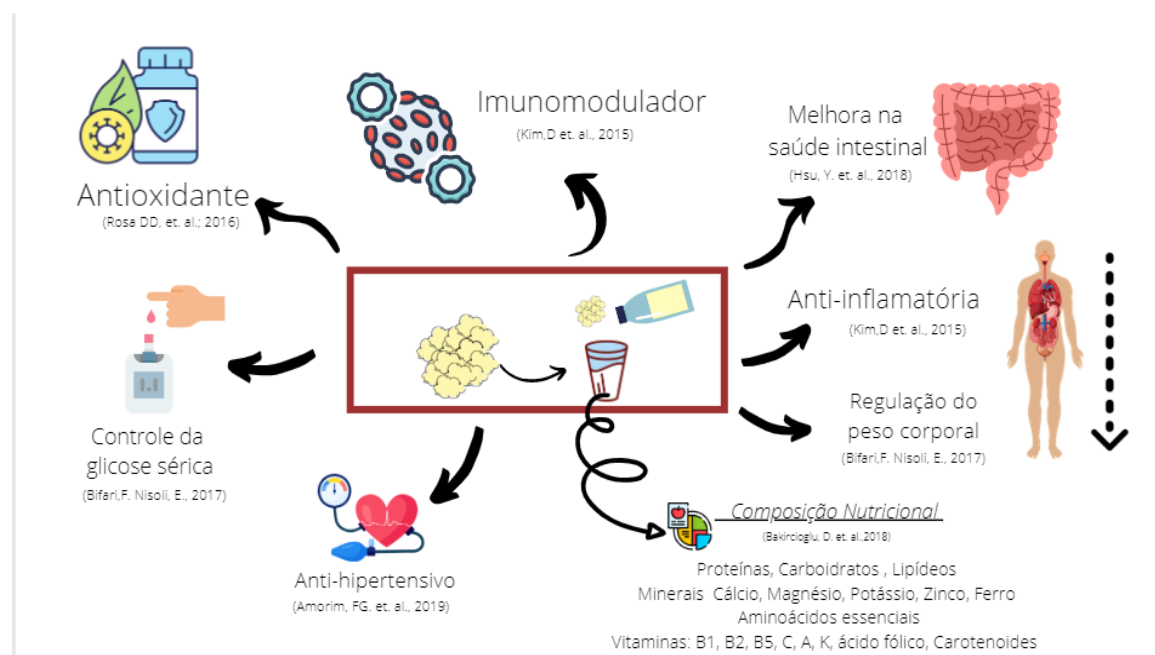


Figura 2: Propriedades biológicas e composição de macro e micronutrientes do kefir. Adaptado de: Farag, et al.,2020)

O kefir tem sua origem das montanhas do Cáucaso, Mongólia e Tibete, tendo seu nome originado a partir da palavra *Keyif* que tem como significado “bem-viver”, “bem-estar” e que faz alusão ao sentimento externado quando consumido. Essa bebida fermentada é produzida a partir da inoculação dos grãos de kefir no leite para a obtenção de um “iogurte de kefir” denominado dessa forma, pois sua consistência é semelhante à de um iogurte (Baschali, et. al., 2015).

Os grãos de kefir apresentam uma mistura complexa e específica de bactéria

e leveduras que convivem de forma simbiótica em uma matriz de polissacarídeos (Jascolka TL et al.,2013); os produtos originados pelos grãos de kefir são dióxido de carbono, ácidos lácticos, produtos de degradação de proteínas, acetaldeídos e diacetil, sendo o teor de ácido láctico de 0,6 a 1 ml por 100 mL do produto fermentado, gorduras de 1,5 a 2,0 g e 3,5 g de lactose e teor de proteína em sua composição de 3-4 g. Sua composição pode variar de acordo com o tempo e temperatura de fermentação, suas condições de armazenamento, a composição microbiológica dos grãos utilizados e a composição do leite (Baschali ,et al., 2015).

O Kefir desperta o interesse no meio científico por apresentar inúmeros efeitos benéficos para o organismo, tendo como base histórica um grande potencial de promoção da saúde, além de ser facilmente produzido, economicamente acessível e de fácil produção em domicílio (Walsh et al., 2016; Farag, et al., 2020; Rosa, et al., 2016; Amorim,et al.,2019).

O uso do kefir tem sido associado à melhoria de diversos processos fisiológicos, gerados pelos seus mecanismos de ação probiótico que inclui os efeitos nutricionais, remoção e inativação de substâncias tóxicas ao organismo, produção de vitaminas, modulação da resposta imune e estimulação de excreção de enzimas através da diminuição da geração excessiva de espécies reativas de oxigênio, perfil de citocinas anti-inflamatórias e alteração da microbiota intestinal (Pimenta, et al.,2018).

Essas melhorias são vistas pois uma das características dos probióticos é a capacidade de um microrganismo manter-se vivo no trato gastrointestinal, resistindo ao trânsito gástrico em especial ao pH ácido do estômago (Amund, 2016, Bengoa et al., 2017).

Essa resistência faz com que as bactérias se aloquem no intestino colonizando-o, gerando uma espécie de barreira contra patógenos através de diversos mecanismos de ação dentre eles antimicrobiana, competição por nichos, competição por nutrientes (Balzaretto et al., 2016; Zhong et al., 2017). Em busca de ferramentas que possam auxiliar no tratamento da síndrome metabólica, evidências sugerem que a ingestão de kefir possa ser utilizado como um coadjuvante na melhoria do quadro da síndrome metabólica (Rosa DD, et. al.; 2016) advindo originalmente de uma alimentação inadequada nutricionalmente, sendo essa intitulada atualmente como uma dieta ocidentalizada ou ocidental (Lalanza, Snoeren

2021).

1.2. DIETA DE CAFETERIA: UM MODELO EXPERIMENTAL DA DIETA OCIDENTAL

Visando compreender melhor o perfil nutricional da dieta atual e seus efeitos na saúde, diversos estudos têm sido realizados utilizando o modelo experimental de alimentação desenvolvida com o intuito de mimetizar a dieta ocidental sendo descrita, como uma dieta que apresenta em sua composição alimentos altamente palatáveis e com altos valores calóricos denominada de dieta de cafeteria (Vanzela et al.,2010; Lanza, Snoeren,2021; Basu et al., 2013 ;Mozaffarian et al., 2011 ; Rosenheck, 2008) Com isso, a utilização de modelos experimentais da dieta de cafeteria em pesquisas afirma, que esse tipo de alimentação é responsável por provocar hiperfagia persistente e um aumento significativo da ingestão calórica (Castro et al., 2015). Relacionado a isso, Castro et al, (2015) em um estudo que utilizou a dieta de cafeteria em ratos Wistar durante os primeiros meses de vida e na fase adulta, observou um aumento de peso bem como o acúmulo de gordura corporal e alterações metabólicas.

Assim, o modelo de dieta de cafeteria tem sido utilizado em pesquisas de animais a fim de avaliar diversas alterações metabólicas que a sua ingestão pode causar além de ser um modelo mais completo para analisar o consumo excessivo de alimentos industrializados e processados que fazem parte do contexto da alimentação da sociedade ocidental (Castro et. al., 2015 e Bortolin, et. al., 2018).

1. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito metabólico do kefir de leite em animais experimentais submetidos à dieta de cafeteria.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar possíveis benefícios da administração de kefir de leite sobre:

- Os marcadores bioquímicos, como perfil lipídico, glicemia de jejum e enzimas hepáticas;
- O consumo alimentar e evolução ponderal;
- A deposição de gordura retroperitoneal;
- A motilidade intestinal.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Este estudo foi realizado em ratos machos da linhagem *Wistar* (Figura 2) pesando entre 210-300g, com 7-8 semanas de idade, originados e tratados no biotério da Universidade Vila Velha. Os animais foram mantidos individualmente em caixas IVC (Individually Ventilated Caged) Alesco® forrado com maravalha, apresentando temperatura (23°C) e umidade controlada respeitando o ciclo claro / escuro de 12 / 12h com acesso *ad libitum* a alimentos e água durante o período de adaptação (três dias). O alojamento individual de cada rato teve como finalidade, avaliar de forma mais precisa a ingestão de alimentos e evitar possíveis efeitos cruzados na microbiota por conta da coprofagia, comum nestes animais (Bas et al., 2017).

Os protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de ética no Uso de Animais (CEUA-UVV, nº580-2020). Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes de cuidado e uso de animais de laboratório, como recomendado pelo *National Institutes of Health* (NIH).



Figura 3: Ratos Wistar do biotério da Universidade de Vila Velha (UVV)

3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTO

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais e alojados em gaiolas individuais, ficando por 3 dias em aclimatação. Após esse período os grupos foram identificados como: grupo controle (n=16) que recebeu água e ração padrão, grupo Cafeteria (Caf) (n=16) recebeu via gavagem leite integral com pH ajustado para 4,5 (3 mL/100 g de peso corporal), ração planejada de acordo com

os parâmetros de modelo para dieta de cafeteria (Adaptado de Shafat et al, 2009). Além disso, receberam água e refrigerante de cola desgaseificado. Grupo Cafeteria kefir (Caf+K) (n=16) que recebeu via gavagem kefir (3 mL/100 g de peso corporal), tendo como disponibilidade de ingestão alimentar os modelos de dieta de cafeteria citado acima, com disponibilidade alternada por dia, além da disponibilidade de água e refrigerante de cola desgaseificado.

Os animais de todos os grupos foram pesados diariamente e o consumo de comida foi analisado para verificação da aceitabilidade da dieta. Essa quantificação foi feita através da cota de ração ofertada menos o rejeito da ração no dia subsequente. Além disso, a água ofertada assim como o refrigerante de cola também passou pelo mesmo processo afim de avaliarmos a quantidade ingerida bem como a aceitabilidade desses alimentos. Após 4 semanas de tratamento, os animais foram postos em jejum de sólidos por 12 horas com livre acesso à água e em seguida, foi realizado a eutanásia (tiopental 60 mg/Kg, via intraperitoneal).

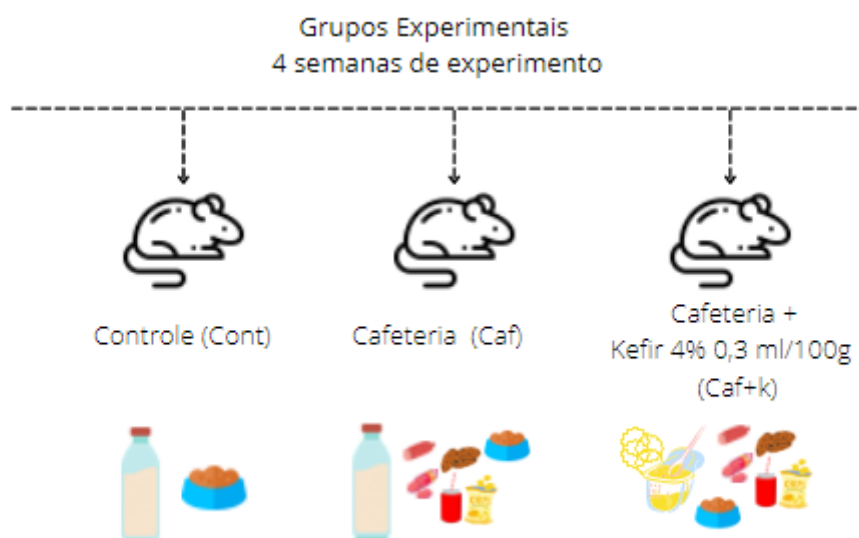


Figura 4: Desenho experimental dos grupos.

3.3. DIETA DE CAFETERIA

O protocolo foi baseado na pesquisa de Sthafat e colaboradores (2009) com algumas modificações, onde foram ofertados aos animais 3 tipos de dieta (Tabela 1), sendo essas constituídas por alimentos industrializados, frescos, refrigerante de cola sem gás, ração padrão e água, ofertadas sequencialmente e substituídas

diariamente. O intuito de oferecer três tipos de dieta de forma alternada é para que os animais durante o período de tratamento não fizessem opções de alimentos bem como se acostumassem com os alimentos oferecidos. As porções de cada alimento bem como a ingesta de líquidos foram estabelecidas com base na ingestão média dos animais pela sua idade (Nistiar,2012).

Os alimentos embutidos foram cortados em pedaços de aproximadamente 5 cm de espessuras e os demais foram ofertados no tamanho normal (figura A3). A disponibilidade da dieta foi feita na grade da gaiola (figura B3), junto à água e ao refrigerante de cola desgaseificado (figura C3). Cada item foi pesado previamente e disponibilizados diariamente durante 24 horas após esse período, os excedentes foram recolhidos, pesados e anotado a quantidade de sobra realizando o desconto da umidade perdida pela evaporação.

O consumo calórico médio foi determinado seguindo os parâmetros nutricionais clássicos: carboidratos (4 kcal/g), proteína (4 kcal/g) e gordura (9 kcal/g) proporcionalmente à ingestão alimentar e de acordo com as informações nutricionais obtidas através dos rótulos nutricionais dos alimentos e da tabela brasileira de composição de alimentos (TACO, 2004).

Alimento	Quantidade (g)	Kcal (g)	Carboidratos	Proteínas	Lipídios	Fibras	Sódio
Modelo dieta A							
Ração Padrão	1	2,95	0,55	0,22	0,04	0	0
Salsicha Hot dog	1	2	0,032	0,132	0,15	0	14,62
Bisnaga de pão	1	2,95	0,53	0,09	0,04	0	4,7
Salgadinho sabor queijo	1	4,8	0,6	0,06	0,24	0	11,04
Bis	1	5,2	0,63	0,05	0,27	0	1,13
Refrigerante de cola	1	0,43	0,11	0	0	0	0,05
Total		18,33	9,808	2,208	6,66	0	31,54
Modelo dieta B							
Ração Padrão	1	2,95	0,55	0,22	0,04	0	0
Bolo de chocolate	1	3,25	0,5	0,05	0,12	0,01	6,18
Bolacha Maria	1	4,3	0,73	0,07	0,12	0	4,33
Linguíça Calabresa fina	1	3,18	0,01	0,18	0,32	0	15,73
Refrigerante de cola	1	0,43	0,11	0	0	0	0,05
Total		14,11	7,6	2,08	5,4	0,01	26,29
Modelo dieta C							
Ração Padrão	1	2,95	0,55	0,22	0,04	0	0
Mortadela	1	2,6	0,04	0,12	0,22	0,04	1,48
Salgadinho Gulão presunto	1	4,6	0,6	0,05	0,438	0	0,568
Biscoito de chocolate	1	5,2	0,63	0,05	0,27	0	1,13
Nugget's	1	1,86	0,13	0,15	0,07	0	4,25
Refrigerante de cola	1	0,43	0,11	0	0	0	0,05
Total		17,64	8,24	2,36	9,342	0,04	7,478

Tabela 1: Composição da dieta de cafeteria. Fonte: Sthafat e colaboradores 2009

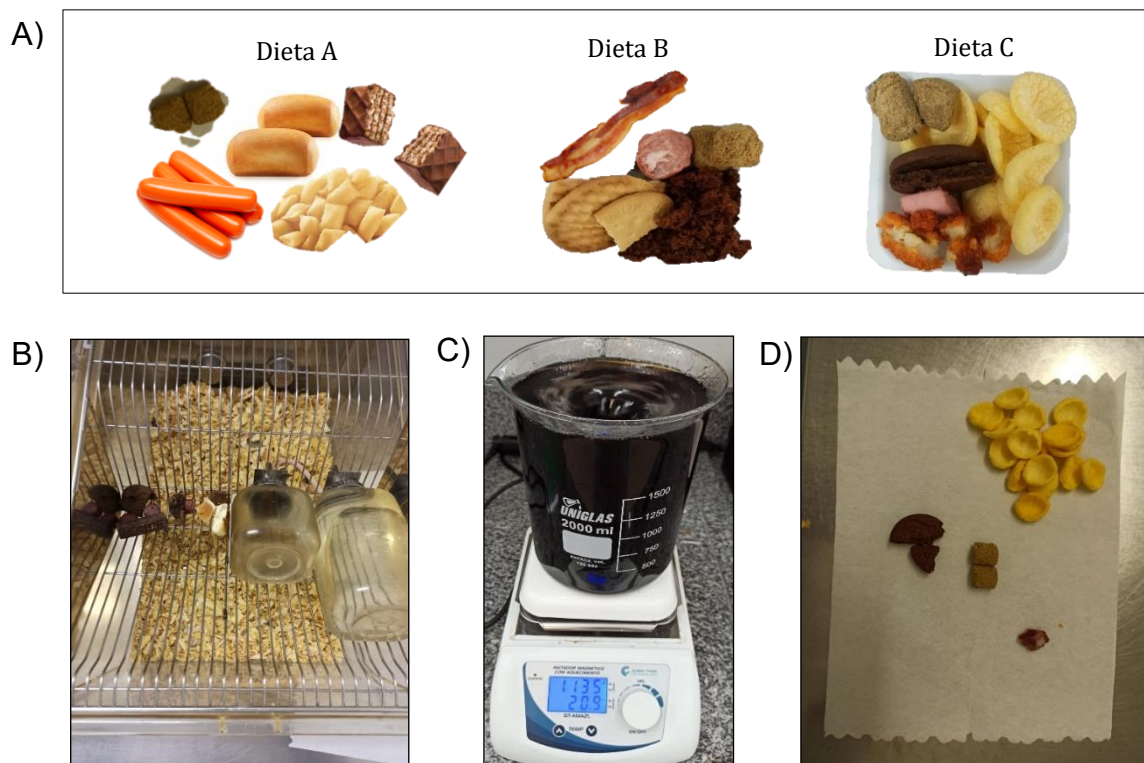


Figura 5: A) Imagem representativa da composição das dietas B) Disposição dos alimentos na gaiola para os animais C) Desgaseificação do refrigerante de cola D) Sobra dos alimentos após 24 horas disponíveis.

3.4. PREPARAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DO KEFIR

A identificação e a preparação do Kefir de leite foram realizadas no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Translacional da Universidade Vila Velha onde o leite foi inoculado com os grãos de kefir e foram mantidos em temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, esses grãos foram filtrados através de peneira de plástico e o produto resultante foi então refrigerado entre 5°C a 15 °C, permitindo assim o crescimento e multiplicação de leveduras no período de 24 horas. Após esse período, foram feitas alíquotas de kefir em tubos de poliestireno estéreis identificados e armazenados a -20°C até a sua utilização, esse protocolo foi realizado conforme descrito por Friques et al., 2015.

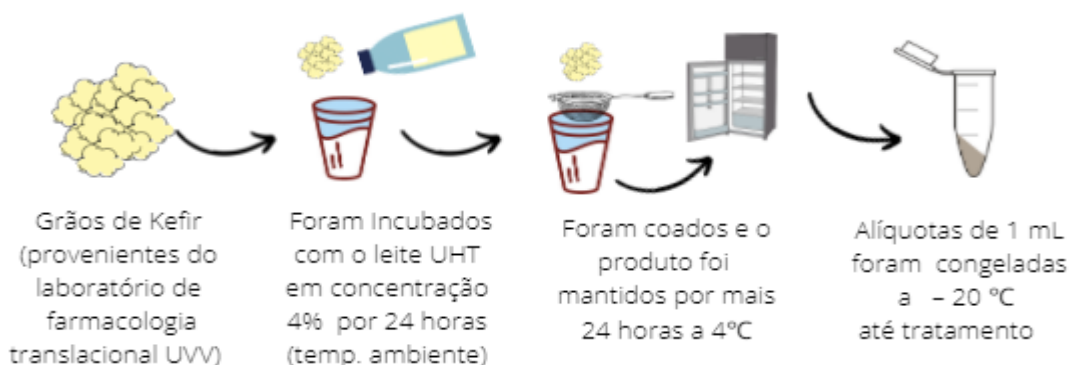


Figura 6: Etapas de preparação do Kefir.

3.5. ANÁLISE DE MARCADORES BIOQUÍMICOS

No momento da eutanásia, foi coletado 1 ml de sangue por punção cardíaca. Após a coleta, as amostras foram transferidas para um tubo de poliestireno contendo EDTA 0,33 mol/l e homogeneizadas vagarosamente. O plasma foi separado do sangue através de centrifugação durante 10 min a 4000rpm, sendo posteriormente armazenado à -80 °C até análise.

Para realização das dosagens bioquímicas foi utilizado o equipamento automático Humanstar 80 do laboratório de análise clínica veterinária da Universidade de Vila Velha (UVV), sendo este utilizado para dosagem de metabolitos e analitos presentes no plasma animal em sistema experimental.

As concentrações séricas de colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL), triglicerídeos (TG), aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT), foram realizadas com reagentes da BIOCLIN® e em todas as dosagens foi realizado uma curva de calibração com as amostras fornecidas pelo fabricante. Dosagem de amilase, AST e ALT: foi realizada com Kit diagnóstico laboratorial, empregando o método cinético, segundo as indicações do fabricante. Dosagens de colesterol total e frações: foi realizada com Kit diagnóstico laboratorial, utilizando o sistema enzimático colorimétrico, segundo indicações do fabricante.

O LDL- colesterol foi determinado pela fórmula de Friedwald: $LDL = (COT - HDL) - (TG/5)$. A glicemia de jejum foi analisada por meio de glicosímetro comercial On Call Plus II® da marca ACON, os animais em jejum de 12 horas, foram submetidos ao um pequeno corte na ponta da cauda sendo retirado uma gota de

sangue para a verificação da glicose em jejum (figura 6).



Figura 7: Análise da glicose em jejum via cauda do animal.

3.6. Avaliação do consumo alimentar, hídrico e calórico

A ingesta dietética dos animais foi acompanhada, utilizando o método de resto ingesta. A dieta, era ofertada diariamente tendo disponível água *ad libitum* e refrigerante de cola. A cada nova oferta era realizada a higienização do recipiente de água e de refrigerante, bem como das grades onde era disposta a dieta. Foi registrado com auxílio de uma planilha de controle o resto de dieta e líquidos não consumidos. A soma dessas sobras era descontada na quantidade ofertada gerando o resto ingesta. A pesagem das sobras foi feita com auxílio de uma mini balança digital portátil de precisão MH-Series.

último grupo de tratamento							
Data:				oferta de:		sobra de:	
Grupo CAF+ Leite	Peso	Total ingesta	Quantidade de Leite	Grupo CAF+ Kefir	Peso	Total ingesta	Quantidade de Kefir
Animal 11				Animal 12			
Animal 12				Animal 13			
Animal 13				Animal 14			
Animal 14				Animal 15			
Animal 15				Animal 16			
Animal 16				Animal 17			
Grupo controle+ leite	Peso	Total ingesta	Quantidade de Leite	Grupo controle+ Kefir	Peso	Total ingesta	Quantidade de Kefir
Animal 11				Animal 9			
Animal 12				Animal 10			
Animal 13				Animal 11			
Animal 14				Animal 12			
Animal 15				Animal 13			
observação total ingesta : quantidade ofertada - quantidade de sobra							

Figura 8: Planilha utilizada para coletar dados de peso, sobras alimentares e quantidade de kefir ofertado diariamente.

3.7. PARÂMETROS DE PESAGEM E COLETA DA GORDURA RETROPERITONEAL

A avaliação corporal foi determinada pela análise do peso e gordura abdominal (retroperitoneal). O peso corporal dos animais foi aferido diariamente, utilizando-se balança Filizola® platina 15 kg sendo registrado em uma planilha de controle. Para a ressecção da gordura retroperitoneal, foi realizado uma incisão mediana xifopúbica (figura 04) sendo a mesma retirada, lavada com solução salina fosfato (PBS) e pesada em balança de precisão Bel® modelo Mark M, o resultado da massa de tecido adiposo extraído foi expresso como grama de gordura por 100g de peso



Figura 9: Representação da incisão para retirada da gordura retroperitoneal. corporal (g/100g) (TAYLOR; PHILLIPS, 1996).

3.8. MEDIDAS BIOMÉTRICAS DO FÍGADO

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados com sobredose intraperitoneal de tiopental sódico e tiveram os fígados removidos. O órgão foi retirado, lavado com solução salina fosfato (PBS) e pesado em balança de precisão Bel® modelo Mark M, sendo levado para desidratar em estufa á 40 C° por 48 horas (Britto, et. al.1999) e pesados posteriormente em balança de precisão Bel® modelo Mark M para verificação de alteração da massa do órgão em relação ao peso dos animais. O peso do órgão utilizado nas análises foi o obtido após o período de 48 horas na estufa, (portanto o peso seco) e apresentado em gramas (g), sendo

expresso em g/100g do peso corporal dos animais para verificar a existência de hipertrofia hepática conforme descrito por Britto, et. al.1999.

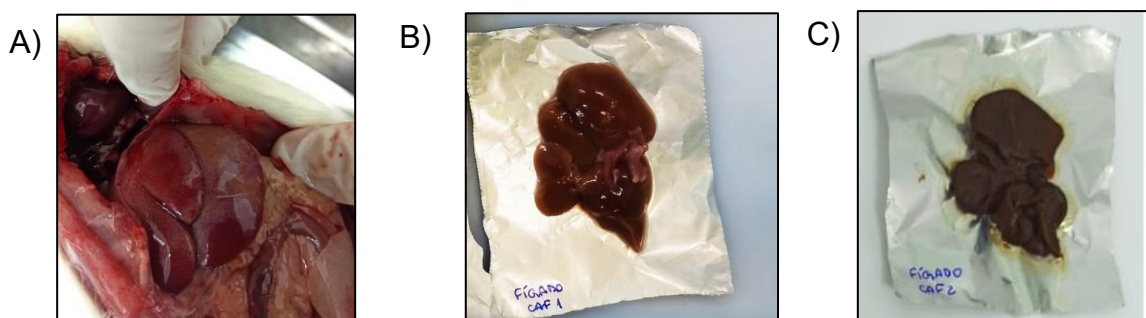


Figura 10: Processo de remoção do fígado. A) Incisão cirúrgica para retirada do fígado, B) fígado úmido sendo preparado para desidratação em estufa a 40°C por 48 horas, c) fígado seco após o processo de desidratação em estufa.

3.9. INDICE HEPATOSSOMÁTICO

Após excisão, o peso dos fígados dos animais foram registrados e utilizados para calcular o índice hepatossômico (IHS) que representa a proporção do peso corporal alocado no fígado. Com base no peso corporal e hepático obtidos após a morte do animal foi calculado o IHS através da fórmula: $IHS = (\text{peso fresco do fígado} / \text{peso corporal}) \times 100$ (Yu J et al; 2017).

3.10. ANÁLISE DA MOTILIDADE INTESTINAL

Os ratos foram mantidos em jejum de 12 horas após esse período, foi administrado via gavagem 0,5 ml da solução de carvão ativado a 10% diluído em goma arábica a 5% por 100 g de peso do animal; após 30 minutos da administração, os animais foram eutanasiados e o intestino delgado foi removido do piloro até o ceco para análise do comprimento total do intestino. As imagens foram registradas com o auxílio da câmera AI super câmera 64 MP, Xiaomi, as análises do comprimento intestinal contendo o marcador, foi feita através do programa ImageJ (figura 11). A motilidade do intestino delgado foi calculada da seguinte forma: $(\%) = (\text{Comprimento do intestino delgado contendo o marcador} / \text{total do comprimento intestinal}) \times 100\%$. (Sato et al.,2021; Jiang et al.,2016).

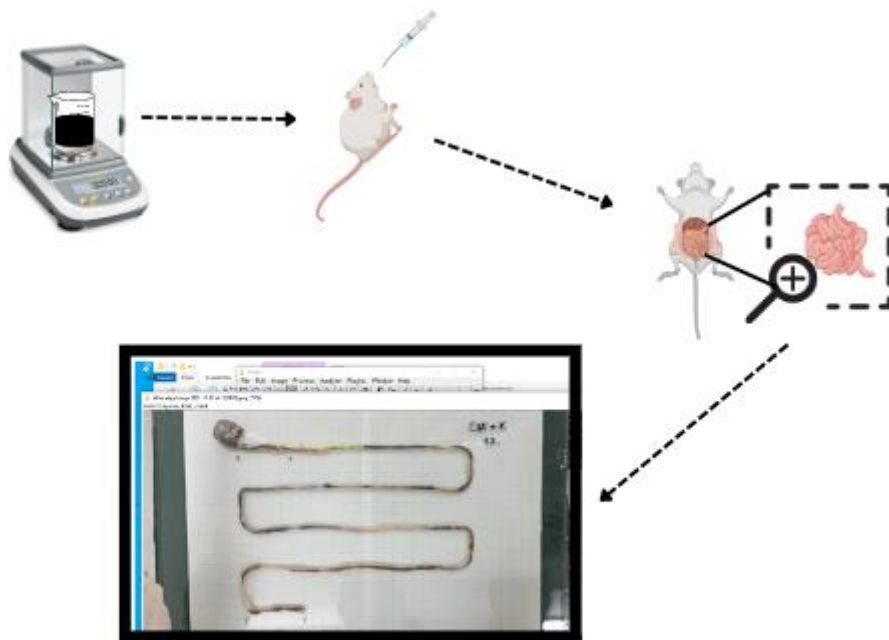


Figura 11: Análise da motilidade intestinal.

3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos como média \pm EPM (erro padrão da média). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) uma via, para a análise do consumo dietético foram utilizados ANOVA duas vias, seguido do teste *post hoc* de Tukey, e usando o *software* Prisma (Prism 6.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

4.1. EFEITO DO KEFIR NO METABOLISMO LIPÍDICO, GLICOSE EM JEJUM E OUTROS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

4.1.1. PERFIL LIPÍDICO SÉRICO

Foi observado aumento dos níveis de colesterol total Caf: $49 \pm 1,864$ vs cont: $43 \pm 0,78$ mg/dl) (figura A12), triglicerídeos (caf: $48,4 \pm 3,172$ vs cont: $28,2 \pm 5,580$ mg/dl) (figura B12) e LDL colesterol (caf: $20,95 \pm 3,180$ vs con: $10,67 \pm 1,561$ mg/dl) (figura D12) nos animais que consumiram apenas a dieta de cafeteria (Caf) quando comparado aos animais do grupo controle. Ainda pode-se observar, que a associação do kefir com a dieta de cafeteria (Caf+K) promoveu a redução dos valores de colesterol total (Caf+K: $36,8 \pm 1,641$), triglicerídeos (Caf+K: $28,40 \pm 1,208$ vs Caf: $48,4 \pm 3,172$ mg/dl) e LDL colesterol (Caf+K: $10,95 \pm 0,744$ vs Caf: $20,95 \pm 3,180$ mg/dl), aumentando os valores de HDL colesterol (Caf+K: $24,75 \pm 2,807$ vs Caf: $13,60 \pm 1,071$ mg/dl) quando comparado ao grupo Caf (figura 12).

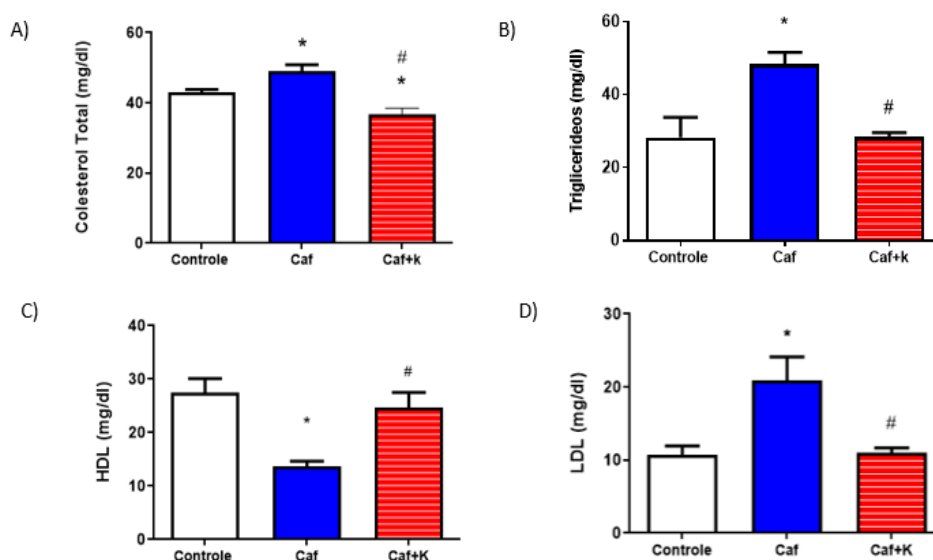


Figura 12: Perfil lipídico sérico após 4 semanas de uso da dieta de cafeteria em ratos Wistar de A) Colesterol total (mg/dl), B) Triglicerídeos (mg/dl), C) Lipoproteína de baixa densidade (LDL) (mg/dl), D) Lipoproteína de alta densidade (HDL). Os valores representam a média \pm EPM para cada grupo com n= 8-10 animais.

4.1.2. GLICEMIA DE JEJUM

Observando os valores de glicose em jejum conforme apresentado na figura 13, foi possível identificar aumento desse parâmetro no grupo Caf quando comparado ao grupo controle (~19,80%, $p < 0,05$) (Caf: $90,25 \pm 3,189$ vs Cont: $75,33 \pm 4,264$ mg/dl). Já no grupo com associação do kefir à dieta (caf+kefir), houve redução desse parâmetro quando comparada com o grupo que consumiu apenas a dieta de cafeteria (Caf) (~21%, $p < 0,05$) (Caf+K: $74,0 \pm 4,550$). Não foi observada diferença estatística quando comparado o grupo controle ao grupo Caf +K.

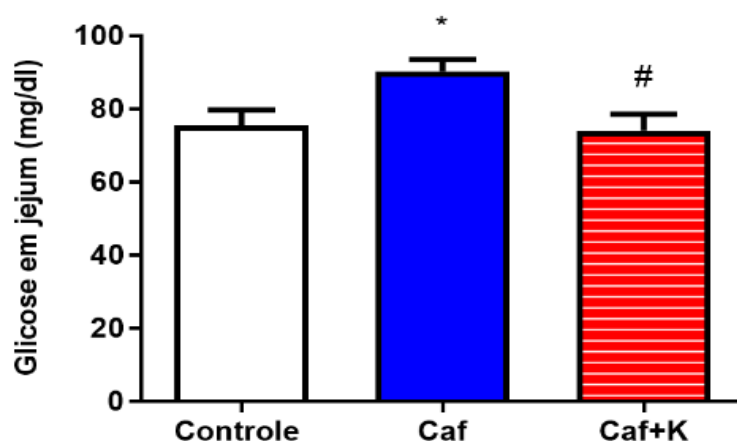


Figura 13: Efeito anti-hiperglicêmico do Kefir após tratamento de 4 semanas. * $p < 0,05$ vs. Controle e # $p < 0,05$ vs. Caf (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).

4.1.3. ANÁLISE BIOQUÍMICA DOS NÍVEIS DE TRANSAMINASE OXALACÉTICA-GLUTÂMICA (AST) E TRANSAMINASE GLUTÂMICO-PIRÚVICA (ALT)

Como forma de avaliar possíveis alterações do funcionamento hepático e de outros órgãos (coração, pulmão, rins), foram realizadas as análises dos níveis séricos de AST E ALT. Ao avaliarmos (figura A14) os dados obtidos na enzima AST é possível identificar um aumento dessa fração nos animais que consumiram apenas a dieta de cafeteria (grupo Caf) quando comparado ao grupo controle (~52,38%, $p < 0,05$) (Caf: $160 \pm 10,91$ vs Cont: $105 \pm 12,49$ U/ml). No entanto, ao analisarmos o grupo que recebeu kefir em conjunto com a dieta (grupo dieta Caf+K) durante o período de tratamento, identificamos uma redução dos níveis de AST comparado

aos animais que consumiram apenas a dieta (~18,52%, $p < 0,05$) ($120 \pm 7,494$ U/ml). Não houve diferença entre o grupo controle quando comparado ao grupo Caf+K. Curiosamente, os níveis de ALT (figura B14) não apresentaram diferenças entre os grupos após o tratamento o que reforça a existência de possíveis lesões em outros órgãos causadas pela dieta de cafeteria.

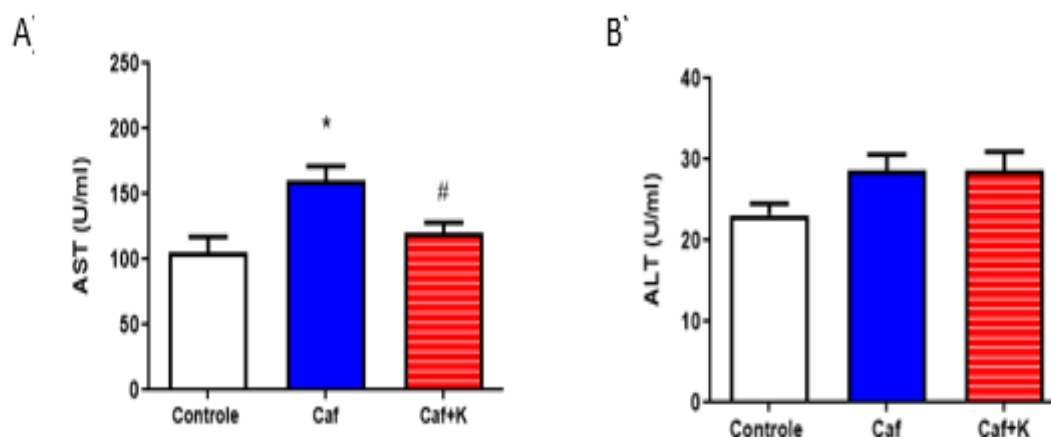


Figura 14: Níveis séricos das enzimas AST e ALT após tratamento com kefir durante 4 semanas. A: Níveis de transaminase oxalacética-glutâmica (AST) (U/ml) $n = 8-10$ animais por grupo; B: Níveis de transaminase glutâmico-pirúvica (ALT) (U/ml) $n = 8-10$ animais por grupo.

4.2. PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, INGESTÃO DE LÍQUIDOS E CALÓRICA

A figura 15 resume os parâmetros gerais de consumo de líquidos, calorias e peso corporal, durante 4 semanas de dieta dos três grupos estudados. Entre eles, observamos redução no consumo de água nos grupos Caf e Caf+K em comparação ao grupo controle, apresentando diferença estatística entre Caf e Caf+K apenas na 4 semana de tratamento (figura 15A). Na figura 15B estão representados os resultados de ingestão do refrigerante de cola onde, analisando o consumo dos animais alimentados com a dieta de cafeteria em conjunto com o kefir identificamos, redução da ingestão da bebida em relação ao grupo Caf. Ao examinamos a ingesta calórica dos grupos (figura 15C), é possível notar aumento da média de consumo calórico dos animais que consumiram Caf e Caf+K em relação ao controle, sendo que houve redução do consumo calórico dos animais do grupo Caf+K em relação

ao grupo Caf na segunda semana de tratamento. Para acompanhar o desenvolvimento da obesidade induzida pela dieta de cafeteria medimos o peso corporal dos animais diariamente durante todo o experimento. Conforme demonstrado na figura 15D, identificamos que os animais do grupo Caf e Caf+K apresentaram um aumento do peso a partir da segunda semana de tratamento quando comparado ao grupo controle.

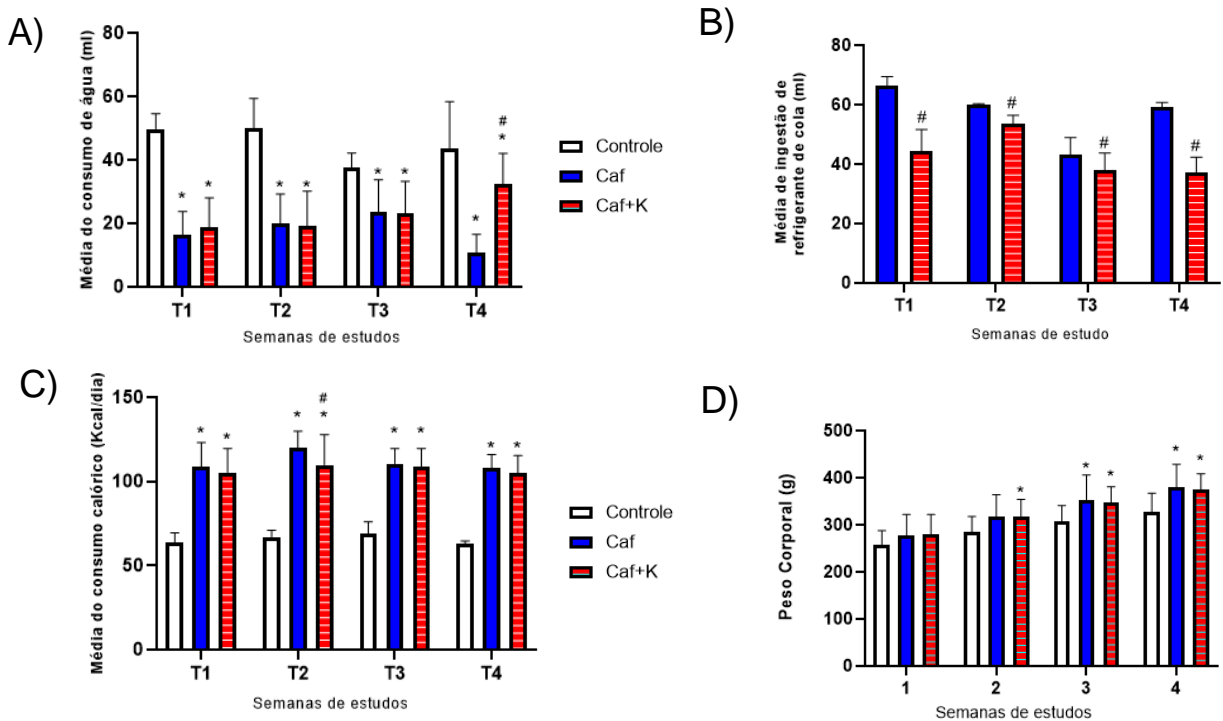


Figura 15: Variação na ingestão de nutrientes e peso corporal em ratos Wistar após dieta de cafeteria por 4 semanas consecutivas. A) Média do consumo de água (* $p < 0,05$). B) Ingestão de refrigerante de cola (# $p < 0,05$). C) Ingestão calórica dos animais (* $p < 0,05$; # $p < 0,05$). D) Peso dos animais (* $p < 0,05$) (ANOVA duas vias com medidas repetidas).

4.2.1. GORDURA RETROPERITONEAL

A análise de deposição de gordura retroperitoneal tem como objetivo demonstrar os efeitos do uso do kefir nos tecidos adiposos. Conforme ilustrado na figura 16A, mostramos que os animais que utilizaram somente a dieta de cafeteria (Caf), apresentaram níveis elevados de acúmulo de gordura retroperitoneal quando comparado ao grupo controle (Caf: $2,764 \pm 0,1444$ vs Cont: $1,301 \pm 0,1528$ g), no entanto ao compararmos o grupo que recebeu apenas a cafeteria (grupo Caf) versus o grupo Caf+kefir (Caf: $2,764 \pm 0,1444$ vs Caf+K: $2,179 \pm 0,1572$), temos uma redução nos níveis de gordura retroperitoneal, confirmando que o kefir pode atuar como um agente anti-obesidade para prevenir o acúmulo de gordura corporal conforme observado na figura 16B. Por outro lado, os animais do grupo Caf+K apresentaram um maior acúmulo de gordura retroperitoneal.

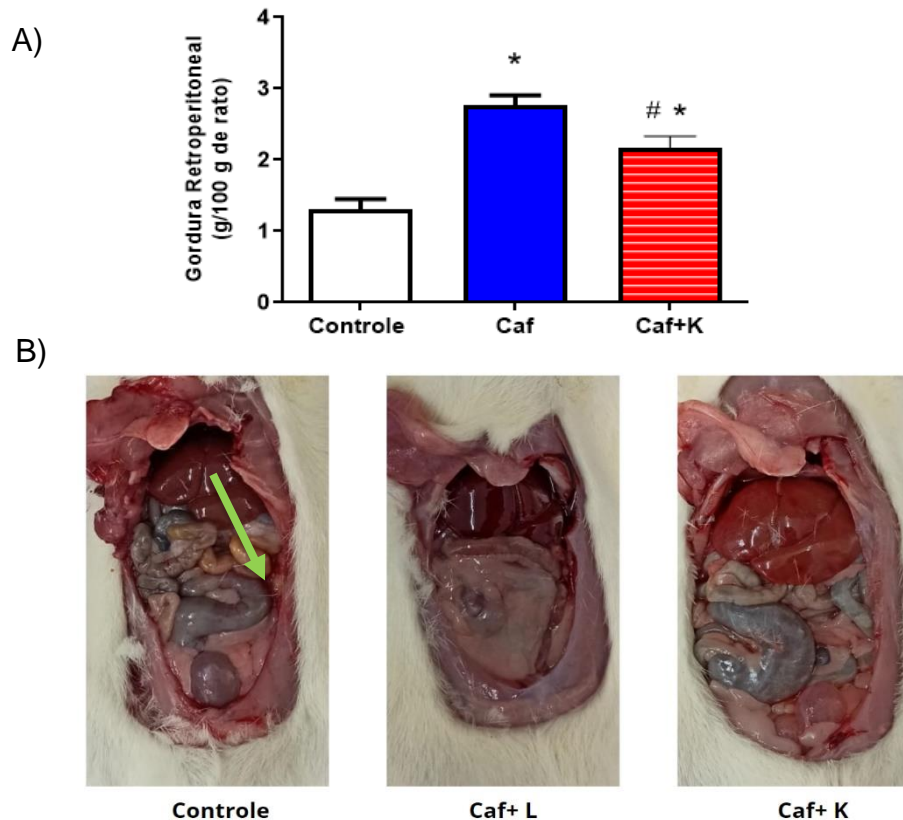


Figura 16: A) Efeitos do Kefir na deposição da gordura retroperitoneal e B) fotografias da cavidade abdominal aberta de ratos Wistar. Os dados representam a média \pm EPM para cada grupo com $n= 10-13$ animais. * $p<0,05$ vs. Controle e # $p<0,05$ vs. Caf (ANOVA uma via, seguida de *post-hoc* de 38 Tukey).

4.2.2. PESO SECO DO FÍGADO

A relação entre a massa do fígado comparada com massa corporal total é demonstrada na Fig. 17. Observamos que os animais que consumiram a dieta de cafeteria juntamente com o kefir apresentaram redução no peso do fígado quando comparado ao grupo Caf (Caf+K: $15,38 \pm 0,46$ vs Caf: $17,55 \pm 0,56$ g) no entanto, os dois grupos apresentaram um aumento significativo no tamanho do órgão quando comprado ao grupo controle ($10,01 \pm 0,3541$).

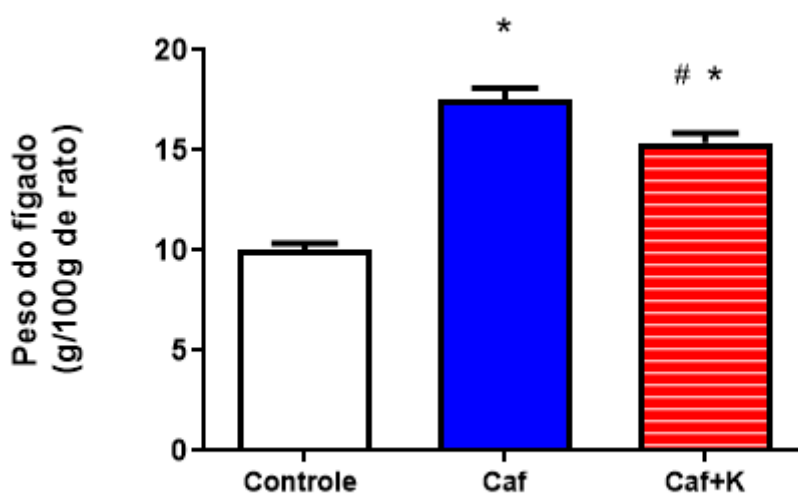


Figura 17: Ação do Kefir no peso seco do fígado. Os valores são expressos em média \pm EPM para cada grupo com $n= 11$ animais. * $p < 0,05$ vs. Controle (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).

3.2.3. ÍNDICE HEPATOSSÓMATICO

Conforme representado na figura 18, os ratos tratados com a dieta de cafeteria em conjunto com kefir (Caf+K) por 4 semana tiveram o índice hepatossômatico reduzido (~21,3% $p < 0,05$) em comparação com o grupo cafeteria (Caf) (Caf+K: $13,94 \pm 1,038$ vs Caf: $16,91 \pm 0,679$ %) no entanto, quando comparado ao grupo controle (cont.) (Cont: $9,934 \pm 0,294$) o índice apresentou-se maior.

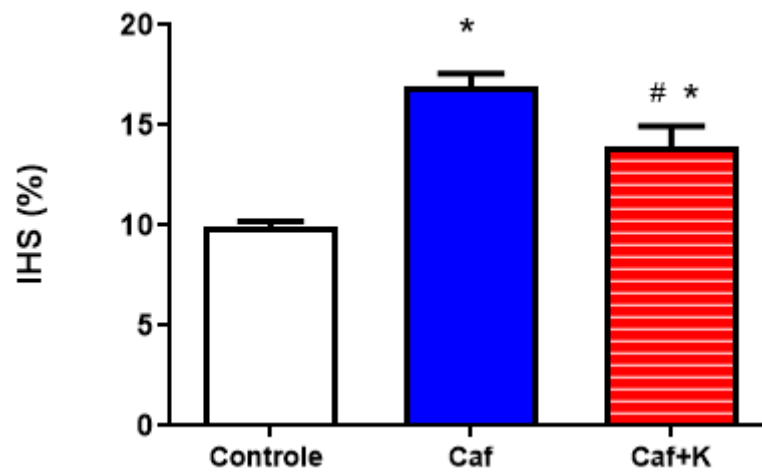


Figura 18: Ação do Kefir no índice hepatossômatico. Os valores são expressos em média \pm EPM para cada grupo com $n = 11$ animais. * $p < 0,05$ vs. Controle (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).

4.3. MOTILIDADE INTESTINAL

Como observado na figura 19, a administração da dieta de cafeteria aumentou significativamente a distância percorrida pelo marcador (carvão ativo) no intestino delgado de ratos Wistar que consumiram a dieta de Cafeteria e Cafeteria+Kefir quando comparado aos valores do grupo controle (Caf:64,03±5,223, Caf+K: 80,83±4,474 vs Cont: 80,83±4,474 %). O grupo Caf+Kefir apresentou também um aumento da motilidade intestinal quando comparado ao grupo Caf.

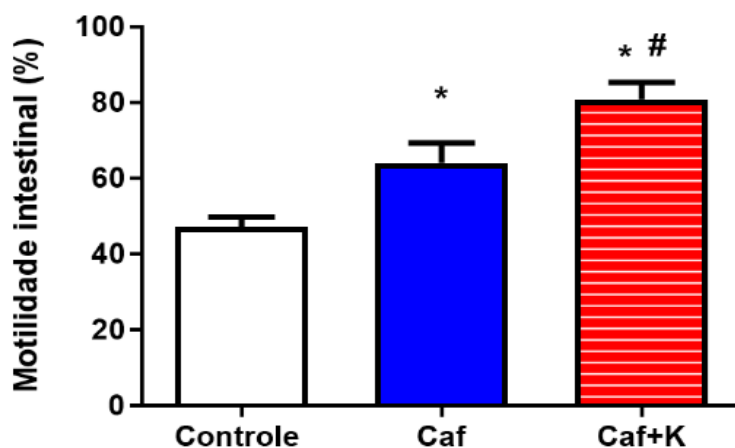


Figura 19: Ação do Kefir na motilidade intestinal. Os valores são expressos em média \pm EPM para cada grupo com n= 11 a 12 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs. Controle (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos que a administração do kefir durante 4 semanas (30 dias) em ratos Wistar alimentados com a dieta de cafeteria foi capaz de reduzir os níveis sistêmicos de colesterol total, triglicerídeos, LDL colesterol sérico, glicose em jejum e transaminase oxalacética- glutâmica (TGO). O tratamento com o kefir também promoveu a redução do tecido adiposo retroperitoneal e do fígado, além disso, apresentou melhoria na motilidade intestinal dos animais. Sendo o kefir potencial promotor da ação antiobesidade, anti-inflamatória e antioxidante mesmo estando sobre o uso de uma dieta rica em carboidrato e lipídio.

Em busca de novas alternativas terapêuticas que possam auxiliar o combate a crescente prevalência de comorbidades associadas a obesidade, o kefir de leite tem sido mais profundamente estudado (Cerdó, et al; 2019; Huseini et al., 2012; Wang et al., 2016), devido ao seu efeito probiótico capaz de auxiliar no tratamento e prevenção de várias condições interligadas aos distúrbios metabólicos que fazem parte do conjunto de doenças não transmissíveis crônicas (DNCT) (Walsh et al., 2016; Farag, et. al.2020; Rosa, et. al., 2016; Amorim, et. al.,2019). A obesidade desenvolvida pelo consumo da dieta associa-se fortemente com o desenvolvimento de dislipidemia, gerando um quadro promissor para o aparecimento de problemas cardiovasculares (*World Health Organization,2013*).

Nossos resultados evidenciaram que o grupo Caf+K apresentou redução dos níveis de LDL colesterol, colesterol total e triglicerídeos com aumento dos níveis de HDL quando comparados ao grupo que consumiu apenas a dieta (grupo dieta). Diversos estudos evidenciam a eficiência dos leites fermentados em reduzir LDL e Colesterol Total. Nos estudos de Ahn, et. al, 2003 e Choi, et. al; 2015 foi possível observar que alguns mecanismos de ação dos probióticos têm sido propostos como a desconjugação dos sais biliares pela enzima sal biliar hidrolase (BSH) que libera ácidos biliares; que, por serem menos solúveis serão menos reabsorvidos, determinando assim maior utilização do colesterol para composição biliar. Outra hipótese fundamenta-se na conversão do colesterol a coprostanol, que assim como os ácidos biliares são facilmente excretados nas fezes (Ettinger, et. al., 2014); além da captação do colesterol no intestino para incorporação na membrana celular bacteriana (Ettinger, et. al., 2014; Ishimwe, et. al., 2015).

Em um estudo realizado por Liu et al. 2006 foi observado que o uso do kefir de leite em hamsters machos provocou redução sérica de triglicerídeos e do colesterol total. Esses dados corroboram os resultados obtidos na nossa pesquisa sugerindo, que o kefir de leite pode ser considerado um dos componentes alimentares mais promissores em termos de prevenção de doenças cardiovasculares por meio de sua ação hipocolesterolêmica.

Os animais que receberam Kefir em associação com a dieta de cafeteria (Caf+K) apresentaram redução da glicose em jejum quando comparado com o grupo que recebeu apenas a dieta. Já é demonstrado na literatura os benefícios do consumo desse probiótico em relação à glicemia (Rosa, et.al, 2016). No estudo desenvolvido por Liu et al, 2006, 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.

Os resultados obtidos por Nurliyani et al, 2015 sobre o potencial antidiabético da combinação de Kefir de leite de cabra e leite de soja em ratos induzidos com estreptozotocina-nicotinamida, demonstra que os ratos diabéticos alimentados com a combinação de kefir apresentaram menor glicose plasmática do que os ratos alimentados com leite de cabra ou kefir de leite de soja sozinho. Em um ensaio clínico sobre o efeito do kefir na glicose e no controle do perfil lipídico de 60 pacientes diabéticos com idade entre 35 e 65 anos, realizado por Ostadrahimi, et al,2015 demonstra que o kefir reduziu a glicemia de jejum e HbA1C (hemoglobina glicada) sendo sugerido o uso do kefir como uma terapia complementar ou coadjuvante no tratamento de prevenção da diabetes. Essas evidências demonstram que os efeitos antidiabéticos do kefir que encontramos na nossa pesquisa são relevantes destacando o seu uso como um potencial medicamento terapêutico de baixo custo.

Os dados obtidos através das análises de AST e ALT demonstram que o kefir foi capaz de inibir as atividades séricas de glutamato oxalacetato transaminase (AST) em animais que consumiram a dieta de cafeteria em conjunto com o Kefir (Caf+Kefir) quando comparado aos animais que consumiram somente a dieta de cafeteria (Caf). Sabe-se que a alteração desse marcador é um indicativo de lesões não sendo exclusivo somente a níveis hepáticos pois essa enzima, pode ser encontrada em outros órgãos tais como, coração, rins, músculo esquelético e hemácias (Gultekin,

et. al.,2021). Considerando essa informação e observando os níveis de ALT identificamos, que não houve diferenças estatística entre os grupos experimentais correlacionando as informações, é importante ressaltar que a Transaminase Glutâmica Pirúvica (ALT) é um marcador exclusivamente citoplasmático e encontrado em maior quantidade no fígado (Maeda Júnior AS, et. al.,2018).

Dessa forma podemos inferir que outros órgãos que possuam a atividade enzimática de AST possam ter sido lesionados pela ação da dieta de cafeteria e que, o kefir foi capaz de realizar a proteção desses órgãos não sendo visto essa capacidade a nível hepático quando observamos o resultado de AST. No entanto, em um estudo feito por Chen H.L.et. al., 2013 demonstrou que camundongos *ob/ob* tratados com Kefir durante 4 semanas apresentaram uma melhora no quadro de fígado gorduroso não alcoólico após redução dos níveis de AST e ALT; Ainda sobre os benefícios do kefir em nível hepático, Chen et al., (2016), avaliou os efeitos dos peptídeos de kefir na esteatose hepática induzida por alta frutose e o possível mecanismo celular em camundongos deficientes em receptores de leptina como modelo de NAFLD (Doença Hepática gordurosa não alcoólica) tendo o kefir auxiliado na inibição das atividades séricas de transaminase glutâmico oxalacética (AST) e glutamato piruvato transaminase (ALT).

Analisou-se ainda, a ingesta de líquido dos animais, sendo essa representada pela ingestão de água e refrigerante de cola (figura 15A e 15B) identificamos uma redução da ingesta de água pelos animais dos grupos Caf e Caf+K nas 3 primeiras semanas do tratamento. Observa-se que na 4 semana, houve umaumento da ingesta de água do grupo Caf+K quando comprado ao grupo Caf (figura 12A). Como esperado, os animais que consumiram a dieta de cafeteria em conjunto com o kefir apresentaram, uma redução na ingesta do refrigerante de cola quando comprado ao grupo Caf. É importante enfatizar, que todos os animais que receberam o refrigerante de cola como parte da dieta de cafeteria tinham disponível água, observando que a preferência era o consumo do refrigerante.

A qualidade da alimentação pode estar associada ao consumo de refrigerante sendo um dos alimentos listados como um dos principais causadores para o desenvolvimento de diversas doenças (Yoong et al,2016), apesar de existir poucos estudos que descrevem o efeito do kefir sobre a redução da ingesta de refrigerantes, sabe-se que o kefir é um alimento potencialmente probiótico por possuir uma série

de benefícios, como a alteração do perfil glicêmico e lipídico, sendo esses mecanismos interligados ao consumo de alimentos ricos desses macronutrientes (Menestrina et al.2016).

Em relação ao ganho de peso dos animais, não houve diferença estatística entre os grupos CAF e CAF+K sendo visto desses grupos com o grupo controle a partir da segunda semana de tratamento. Diante desses dados, confirmamos que a dieta de cafeteria foi capaz de induzir o aumento de peso dos animais sendo eficaz para o desenvolvimento da obesidade, conforme já descrito por diversos estudos (Scoaris et, al.2010; Trindade et al, 2006; Zinocker et; al. 2018).

Apesar dos resultados obtidos em nosso estudo não ter apresentado alteração no peso corporal dos animais que consumiram a dieta de cafeteria em conjunto com o uso do kefir durante o experimento, Bourrie et al. 2018 descreve em sua pesquisa que camundongos C57BL/6J alimentando com uma dieta rica em gordura em conjunto com o kefir durante 8 semanas, apresentaram ao final do tratamento uma redução significativa do peso além, da melhoria no perfil lipídico e hepático, em um estudo feito por Choi et. al, 2017 confirma a atuação do kefir sobre a redução do peso corporal de camundongos C57BL/6J que ingeriram durante 8 semanas uma dieta rica em gordura e consumiram kefir, diante dos dados encontrados na literatura, concluímos com os resultados obtidos pelo nosso estudo que para que haja um efetividade do kefir sobre a ação da redução do peso é necessário um maior tempo de uso do probiótico.

Sabe-se que o acúmulo de gordura na região abdominal é um dos principais fatores para o desenvolvimento da síndrome metabólica. Analisando os resultados obtidos pela nossa pesquisa sobre o acúmulo de gordura retroperitoneal nos animais do experimento, observamos que houve uma redução significativa do acúmulo de gordura no grupo que consumiu a dieta de cafeteria em conjunto com o kefir, quando comparado ao grupo que consumiu somente a CAF (~78,8%, $p < 0,05$). Corroborando com os dados encontrados, Seo et.al.,2020 relata que o uso do kefir em camundongos C57BL/6J durante 8 semanas de tratamento foi capaz de promover uma redução no ganho de peso corporal, diminuição dos tecidos adiposos visceral além de reduzir as concentrações plasmáticas de triacilglicerol. Em um estudo realizado por Lim et al,2017, foi demonstrado que camundongos C57BL/6J alimentados com dieta rica em gordura durante 4 semanas apresentaram níveis

elevados de peso e excesso do tecido adiposo, no entanto, o grupo tratado com composto expolissacarídeos isolados de grão de kefir foi capaz de reduzir significativamente o ganho de peso corporal e o peso do tecido adiposo. Portanto, nossos dados preliminares abrem novas oportunidades para investigar mecanismos pelos quais o kefir possa contribuir para a redução desse acúmulo de gordura visceral.

O presente estudo demonstrou que a administração da dieta de cafeteria durante 4 semanas induziu ao aumento do peso do fígado, quando comparado ao grupo controle, essa alteração está claramente ligada a mudanças metabólicas adaptativas a uma nova condição nutricional devido ao consumo da dieta de cafeteria.

MacQueen, HA. et. al.2007, descreve que o aumento do peso do órgão se dá principalmente pela alteração de vias metabólicas ligadas a síntese de lipídeos e o armazenamento de glicogênio. Sampey, BP et. Al, 2011, demonstra através de análise histologia de fígado dos ratos tratados com a dieta de durante 15 semanas um acúmulo de gotículas lipídicas no fígado caracterizando esteatose, sendo este um dos fatores para o desenvolvimento da síndrome metabólica.

Nossos dados indicam que os animais que consumiram a dieta de cafeteria em conjunto ao kefir apresentaram redução no tamanho do órgão, Chen et al., 2014, investigaram os efeitos do kefir no metabolismo de lipídeos hepáticos, em ratos induzidos à esteatose hepática e observou, que o grupo que recebeu kefir mostrou uma melhora no quadro de esteatose hepática, devido à diminuição dos níveis de triglicerídeos e colesterol no fígado, assim como dos níveis de AST e ALT, tendo também uma redução na quantidade de gordura macrovesicular no fígado, possuindo um potencial para uso clínico na prevenção e tratamento de esteatose.

Em um outro estudo feito por Kim et al. (2017) mostrou a efetividade na obesidade e a esteatose hepática. Os efeitos da doença do fígado gorduroso anti-obesidade e anti-alcoólicas (NAFLD) do kefir, foram abordados de forma abrangente juntamente com a análise comunitária e direta da microbiota fecal em uma dieta rica em gordura (HFD), nesse estudo foi identificado que os ratos no grupo kefir tratados durante 12 semanas exibiram um peso corporal significativamente menor assim como a pontuação histopatológica da lesão hepática, comprovando que o consumo de kefir, modula microbiota intestinal em camundongos alimentados com HFD, o que

evita a obesidade e NAFLD através da promoção da oxidação de ácidos graxos.

Como critério para avaliar os efeitos da nutrição na fisiologia hepática, utilizamos o índice hepatossomático em busca de quantificar o estoque de energia (glicogênio) no fígado, e é possível observar que os animais que consumiram a dieta de cafeteria em conjunto com o kefir apresentaram, uma redução no percentual de massa do fígado em relação ao peso corporal quando comparado ao grupo que consumiu apenas a dieta de cafeteria. Essas pesquisas, portanto, confirmam os dados encontrados pelo nosso estudo de que o kefir é um promissor probiótico para a regulação do funcionamento do fígado.

Visando avaliar os efeitos do Kefir no intestino, analisamos o trânsito intestinal dos ratos que consumiram a dieta de cafeteria, onde foi possível observar que os animais que consumiram apenas a dieta de Cafeteria e dieta de Cafeteria+Kefir apresentaram níveis de motilidade aumentada quando comparado ao grupo controle, no entanto, o grupo Caf+K quando comparado ao grupo Caf obteve uma maior motilidade intestinal.

O intestino é considerado um ambiente com amplo número de espécies de bactérias distintas, sendo encontradas em toda região gastrointestinal formando a microbiota intestinal (Guarner, 2007), essa quando saudável forma uma barreira contra os micro-organismos invasores, que potencializa os mecanismos de defesa do hospedeiro contra os patógenos, melhorando a imunidade intestinal pela aderência à mucosa e estimulando as respostas imunes locais. Além disso, ela também compete por combustíveis intraluminais, prevenindo o estabelecimento das bactérias patogênicas.

Dessa forma, o comprometimento da integridade intestinal, situação conhecida como disbiose intestinal, pode acarretar inúmeros problemas e o desenvolvimento de diversas doenças que acometem o Trato Gastrointestinal (TGI), como a síndrome do intestino irritável (SII), doença inflamatória intestinal (DII) e a doença de Chron (Lee et. al., 2014) entre outras já descritas como o desenvolvimento da obesidade, tendo em vista o eixo cérebro-intestino como uma legítima interligação em suas funções, essa doença influencia negativamente para o aumento de colonizações bacterianas patogênicas, contribuindo para o surgimento de outras doenças (Jumpertz et al., 2011).

A dieta de cafeteria é caracterizada por alto teor de gordura e baixo consumo

de fibras esse modelo de alimentação é considerado um dos principais fatores que contribuem para a disbiose ou alteração da microbiota intestinal, afetando as proporções e tipos de metabólitos produzidos (De Filippo et al., 2010; Requena et al., 2013). Correlacionando uma alimentação rica em carboidrato e lipídios com o desenvolvimento da obesidade e a microbiota intestinal, um dos fatores observados é que pacientes obesos apresentam maior incidência de supercrescimento bacteriano no intestino delgado gerando um aumento da motilidade intestinal (R. L. Bertrand et al. 2011).

Manter a integridade intestinal é fundamental para evitar o surgimento de doenças, a inserção de probióticos ou a suplementação de prebióticos e probióticos na alimentação, tem sido apontada como estratégias que repercutem benéficamente nessa manutenção do intestino. Como característica dos probióticos sabe-se que os mesmos resistem ao processo de digestão e chegam intactos ao intestino, onde atuam de maneira positiva reduzindo os gases, auxiliando o intestino preguiçoso e as diarreias. Estudos indicam os probióticos ainda podem beneficiar em dores musculares, problemas no estômago e doenças crônicas, entre outros (Amar J. et al, 2011).

Mesmo tendo poucas informações científicas que relacione o uso do kefir e seus efeitos junto a dieta de cafeteria, consideramos que os resultados obtidos na nossa pesquisa confirmam a eficácia da ação positiva do kefir a nível intestinal sendo necessário mais análises quanto a efetividade de suas ações protetoras nas doenças ligadas ao intestino e ao desenvolvimento da obesidade.

5. CONCLUSÃO

No presente estudo, ficou evidente que a administração do kefir por um período de 4 semanas foi capaz de promover a redução dos níveis de colesterol total, triglicerídeos e LDL, apresentando um aumento nos níveis séricos de HDL além de proporcionar uma melhoria nos níveis de TGO.

Também ficou demonstrado que apesar do peso corpóreo dos animais que consumiram a dieta de cafeteria e cafeteria+Kefir não apresentar diferenças estatística, foi observado uma redução da gordura retroperitoneal e do peso seco do fígado confirmando que, o kefir promove a ação antiobesidade, anti-inflamatória e antioxidante mesmo estando sobre o uso de uma dieta rica em carboidrato e lipídio.

Além disso, foi constatado um aumento da motilidade intestinal dos animais que consumiram a dieta de cafeteria em conjunto com o Kefir sendo que para tal efeito, se faz necessário mais pesquisas sobre essa ação visto que, o aumento da motilidade pode estar ligado ao desencadeamento de outras doenças.

Deste modo, o consumo de probióticos, como o kefir parece ter efeitos relevantes sobre o perfil bioquímico e metabólico sendo considerada uma boa alternativa nutricional e de baixo custo para o tratamento de pacientes que apresentam o estado de obesidade e síndromes metabólicas advindos principalmente de uma alimentação desequilibrada nutricionalmente.

6. REFERÊNCIAS

AHMED Z., WANG Y., AHMAD A., KHAN ST, NISA M., AHMAD H., AFREEN A. Kefir e a saúde: Uma perspectiva contemporânea. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2013; 53 : 422–434. doi: 10.1080 / 10408398.2010.540360.

AHN, Young Tae, et al. "Deconjugation of bile salts by *Lactobacillus acidophilus* isolates." *International Dairy Journal* 13.4 (2003): 303-311.

AMAR J, CHABO C, WAGET A. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Mol Med.* 2011; 3:559-572.

AMORIM, F.G.; COITINHO, L.B.; DIAS, A.T.; GOMES, A.; FRIQUES, F.; MONTEIRO, B.L.; DIAS, L.C.; REZENDE, D.; DE MELO, T.; PEREIRA, C.; et al. Identification of new bioactive peptides from kefir milk through proteopeptidomics: Bioprospection of antihypertensive molecules. *Food Chem.* 2019, 282, 109–119.

AMUND OD. Exploring the relationship between exposure to technological and gastrointestinal stress and probiotic functional properties of lactobacilli and bifidobacteria. *Can J Microbiol.* 2016 Sep;62(9):715-25. doi: 10.1139/cjm-2016-0186. Epub 2016 Jun 14. PubMed PMID:2746506.

ASGHAR A, SHEIKH N. Role of immune cells in obesity induced low grade inflammation and insulin resistance. *Cell Immunol.* 2017;315: 18–26. doi: 10.1016/j.cellimm.2017.03.001

BÄCKHED F, LEY RE, SONNENBURG JL, PETERSON DA, GORDON JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science.* 2005;307(5717):1915-1920. doi:10.1126/science.1104816.

BAKIRCIOGLU, D.; TOPRAKSEVER, N.; YURTSEVER, S.; KIZILDERE, M.; KURTULUS, Y.B. Investigation of macro, micro and toxic element concentrations of milk and fermented milks products by using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer, to improve food safety in Turkey. *Microchem. J.* 2018, 136,

133–138.

BALZARETTI S, TAVERNITI V, GUGLIELMETTI S, FIORE W, MINUZZO M, NGO HN, NGERE JB, SADIQ S, HUMPHREYS PN, LAWS AP. A Novel Rhamnose-Rich Heteroexopolysaccharide Isolated from *Lactobacillus paracasei* DG Activates THP-1 Human Monocytic Cells. *Appl Environ Microbiol.* 2017 Jan 17;83(3). pii: e02702-16. doi: 10.1128/AEM.02702-16. Print 2017 Feb 1. PubMed PMID:27913418; PubMed Central PMCID: PMC5244303.

BASCHALI A, TSAKALIDOU E, KYRIACOU A, KARAVASILOGLOU N, MATALAS AL. Traditional lowalcoholic and non-alcoholic fermented beverages consumed in European countries: a neglected food group. *Nutr Res Rev.* 2017 Jun;30(1):1-24. doi: 10.1017/S0954422416000202. Epub 2017 Jan 24. PubMed PMID: 28115036.

BENGOA AA, LLAMAS MG, IRAPORDA C, DUEÑAS MT, ABRAHAM AG, GARROTE GL. Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains. *Food Microbiol.* 2018 Feb;69:212-218. doi: 10.1016/j.fm.2017.08.012. Epub 2017 Aug 19. PubMed PMID: 28941904.

BIFARI, F.; NISOLI, E. Branched-chain amino acids differently modulate catabolic and anabolic states in mammals: A pharmacological point of view. *Br. J. Pharmacol.* 2017, 174, 1366–1377.

BORTOLIN RC, VARGAS AR, GASPAROTTO J, et al. A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. *Int J Obes (Lond).* 2018;42(3):525-534. doi:10.1038/ijo.2017.225

BRITO, MARCUS VINICIUS HENRIQUES; EPAMINONDAS, WELLINGTON ALVES; REIS, JOSÉ MACIEL CALDAS DOS; NOGUCHI, AKI; ARIAS, ADRIANA JARDIM. Technique to obtain the rat liver dry weight *Rev. para. med ; 13(3): 29-34, set.-dez. 1999. tab, graf*

BROWN L, POU DYAL H, PANCHAL SK. Functional foods as potential therapeutic

options for metabolic syndrome. *Obes Rev.* 2015 Nov;16(11):914-41. doi: 10.1111/obr.12313. Epub 2015 Sep 8. PMID: 26345360.

CANI PD, VAN HUL M. Novas oportunidades para probióticos de próxima geração visando a síndrome metabólica. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2015; 32 : 21–27. doi: 10.1016 / j.copbio.2014.10.006.

CASTRO, H., POMAR, C., PICÓ, C. *et al.* Cafeteria diet overfeeding in young male rats impairs the adaptive response to fed/fasted conditions and increases adiposity independent of body weight. *Int J Obes* **39**, 430–437 (2015). <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.125>

CERDÓ T, GARCÍA-SANTOS JA, G BERMÚDEZ M, CAMPOY C. The Role of Probiotics and Prebiotics in the Prevention and Treatment of Obesity. *Nutrients.* 2019 Mar 15;11(3):635. doi: 10.3390/nu11030635. PMID: 30875987; PMCID: PMC6470608.

CHEN, H. L. *et al.* Kefir peptides prevent high – fructose corn syrup – induced non - alcoholic fatty liver disease in a murine model by modulation of inflammation and the JAK2 signaling pathway. *Nutrition & Diabetes.* England, v.06(12), p.01-09, dez. 2016.

CHEN, P. *et al.* Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and a-glucosidase inhibitory activity. **Food Control**, v. 35, p. 65-72, 2014.

CHOI SB, Lew LC, Yeo SK, Nair Parvathy S, Liong MT. Probiotics and the BSH-related cholesterol lowering mechanism: a Jekyll and Hyde scenario. *Crit Rev Biotechnol.* 2015;35(3):392-401. doi: 10.3109/07388551.2014.889077. PMID: 24575869.

CIGARROA I, LALANZA JF, CAIMARI A, *et al.* Treadmill Intervention Attenuates the Cafeteria Diet-Induced Impairment of Stress-Coping Strategies in Young Adult Female Rats. *PLoS One.* 2016;11(4):e0153687. Published 2016 Apr 21. doi:10.1371/journal.pone.0153687.

D. MOZAFFARIAN, T. HAO, E.B. RIMM, W.C. WILLETT, F.B. Hu Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men *N. Engl. J. Med.*, 364

(2011), pp. 2392-2404, 10.1056/NEJMoa1014296.

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

EBNER J, ARSLAN A, FEDOROVA M, HOFFMANN R, KÜÇÜKÇETİN 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.

EBRINGER L, FERENCÍK M, KRAJCOVIC J. Beneficial health effects of milk and fermented dairy products--review. *Folia Microbiol (Praha)*. 2008;53(5):378-394. doi:10.1007/s12223-008-0059-1

FAHED, G.; AOUN, L.; BOU ZERDAN, M.; ALLAM, S.; BOU ZERDAN, M.; BOUFERRAA, Y.; ASSI, HI. Síndrome Metabólica: Atualizações em Fisiopatologia e Manejo em 2021. *Int. J. Mol. Sci.* 2022 , 23 , 786. <https://doi.org/10.3390/ijms23020786>

FARAG, M.A.; JOMAA, S.A.; ABD EL-WAHED, A.; R. EL-SEEDI, H. The Many Faces of Kefir Fermented Dairy Products: Quality Characteristics, Flavour Chemistry, Nutritional Value, Health Benefits, and Safety. *Nutrients* 2020, 12, 346. <https://doi.org/10.3390/nu12020346>

FESTI D., SCHIUMERINI R., EUSEBI L.H., MARASCO G., TADDIA M., COLECCHIA A. Gut microbiota and metabolic syndrome. *World J. Gastroenterol.* 2014;20:16079–16094. doi: 10.3748/wjg.v20.i43.16079.

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 Dec 30;13:390. doi: 10.1186/s12967-015-0759-7. PMID: 26715471; PMCID: PMC4696190

GOMES AC, HOFFMANN C, MOTA JF. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut Microbes* 2018;9:308-25

GOMEZ-SMITH, M., KARTHIKEYAN, S., JEFFERS, M.S., JANIK, R., THOMASON, L.A., STEFANOVIC, B., CORBETT, D., 2016. A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. *Physiol. Behav.* 167, 382–391. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.09.029>

GOULARTE, J.F., FERREIRA, M.B.C., SANVITTO, G.L., 2012. Effects of food pattern change and physical exercise on cafeteria diet-induced obesity in female rats. *Br. J. Nutr.* 108, 1511–1518. <<https://doi.org/10.1017/S0007114511006933>>

GULTEKIN Y, BOLAT A, HATICE K, TEKELI KUNT A. Does Aspartate Aminotransferase to Alanine Aminotransferase Ratio Predict Acute Kidney Injury After Cardiac Surgery? *Heart Surg Forum.* 2021 Jun 10;24(3):E506-E511. doi: 10.1532/hsf.3849. PMID: 34173741.

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

HOOPER LV. Do symbiotic bacteria subvert host immunity?. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(5):367-374. doi:10.1038/nrmicro2114.

HUSEINI, H. F., RAHIMZADEHB, G., FAZELI, M. R., MEHRAZMAD, M., SALEHI, M. Evaluation of wound healing activities of kefir products. *Burns*, v. 38, n. 5, p. 719-23, 2012;

HSU, Y.; HUANG, W.; LIN, J.; CHEN, Y.; HUANG, C.; TUNG, Y. Kefir supplementation modifies gut microbiota composition, reduces physical fatigue, and improves exercise performance in mice. *Nutrients* 2018, 10, 862.

J M DEL BAS, M GUIRRO, N BOQUE, A CERETO, R RAS, A CRESCENTI, A CAIMARI, N CANELA, L AROLA. Alterations in gut microbiota associated with a cafeteria diet and the physiological consequences in the host, *International Journal of Obesity* accepted article preview 23 November 2017; doi: 10.1038/ijo.2017.284.

J M DEL BAS, M GUIRRO, N BOQUE´, A CERETO, R RAS, A CRESCENTI, A CAIMARI, N CANELA, L AROLA. Alterations in gut microbiota associated with a cafeteria diet and the physiological consequences in the host, *International Journal of Obesity* accepted article preview 23 November 2017; doi: 10.1038/ijo.2017.284.

JAE-WOO CHOI, HYE WON KANG, WON-CHUL LIM, MI-KYOUNG KIM, IN-YOUNG LEE, HONG-YON CHO. Kefir prevented excess fat accumulation in diet-induced obese mice, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Volume 81, Issue 5, 4 May 2017, Pages 958–965, <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1258984>

JAMES, A. M., COLLINS, Y., LOGAN, A. & MURPHY, M. P. Mitochondrial oxidative stress and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol. Metab.* 23, 429–434 (2012)

JASCOLKA 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

JUMPERTZ, R.; LE, D. S.; TURNBAUGH, P. J.; TRINIDAD, C.; BOGARDUS, C.; GORDON, J. I.; KRAKOFF, J. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. Bethesda, v. 94, n. 1, p. 58-65, 2011

KABAK B, DOBSON AD. An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2011;51(3):248-260. doi:10.1080/10408390903569640

KADOOKA Y, SATO M, OGAWA A, MIYOSHI M, UENISHI H, OGAWA H, IKUYAMA K, KAGOSHIMA M, TSUCHIDA T. Effect of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in fermented milk on abdominal adiposity in adults in a randomised controlled trial. *Br J Nutr.* 2013 Nov 14;110(9):1696-703. doi: 10.1017/S0007114513001037. Epub 2013 Apr 25. PMID: 23614897.

KIM, D. H. et al. Kefir alleviates obesity and hepatic steatosis in high-fat diet-fed mice by modulation of gut microbiota and mycobiota: targeted and untargeted community

analysis with correlation of biomarkers. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 44, p. 35-43, 2014.

KIM, D.; CHON, J.; KIM, H.; SEO, K. Modulation of intestinal microbiota in mice by kefir administration. *Food Sci. Biotechnol.* 2015, 24, 1397–1403.

KIVANÇ, M.; YAPICI, E. kefir as a probiotic dairy beverage: Determination lactic acid bacteria and yeast. *ETP Int. J. Food Eng.* 2016, 1, 55–60.

KOYU EB, BUYUKTUNCER DEMIREL Z. Um alimento funcional: Kefir. *J. Nutr. Dieta.* 2018; 46 : 166–175. doi: 10.33076 / 2018.BDD.301.

LALANZA JF, SNOEREN EMS. The cafeteria diet: A standardized protocol and its effects on behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 2021 Mar;122:92-119. doi: 10.1016/j.neubiorev.2020.11.003. Epub 2020 Dec 10. PMID: 33309818.

LE BARZ M., ANHE FF, VARIN TV, DESJARDINS Y., LEVY E., ROY D., URDACI MC, MARETTE A. Probiotics as Complementary Treatment for Metabolic Disorders. *Diabetes Metab. J.* 2015; 39 : 291–303. doi: 10.4093 / dmj.2015.39.4.291

LEIGH, S.J., MORRIS, M.J., 2018. The role of reward circuitry and food addiction in the obesity epidemic: an update. *Biol. Psychol.* 131, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2016.12.013>.

LEY RE, BACKHED F, TURNBAUGH P, LOZUPONE CA, CAVALEIRO RD, GORDON JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, USA*, 2005; 102 (31):11070–11075.

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.

MACKOWIAK, P. A. Recycling Metchnikoff probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. *Frontiers in public health*, v. 1, n. 52, p. 1-9, nov. 2013.

MAEDA JÚNIOR AS, CONSTANTIN J, UTSUNOMIYA KS, GILGLIONI EH, GASPARIN FRS, CARREÑO FO, DE MORAES SMF, ROCHA M, NATALI MRM, GHIZONI CVC, BRACHT A, ISHII-IWAMOTO EL, CONSTANTIN RP. Cafeteria Diet Feeding in Young Rats Leads to Hepatic Steatosis and Increased Gluconeogenesis under Fatty Acids and Glucagon Influence. *Nutrients*. 2018 Oct 23;10(11):1571. doi: 10.3390/nu10111571. PMID: 30360555; PMCID: PMC6266290.

MENESTRINA, F., GRISALES, J. O. & CASTELLS, C. B. (2016). Chiral analysis of derivatized amino acids from kefir by gas chromatography. *Microchemical Journal*, 128, 267-273, 2016.

MORAES, F. P. ALIMENTOS FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS: DEFINIÇÕES, LEGISLAÇÃO E BENEFÍCIOS À SAÚDE. *Revista Eletrônica de Farmácia, Goiânia*, v. 3, n. 2, 2007. DOI: 10.5216/ref.v3i2.2082.

NATIVIDAD JM, VERDU EF. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. *Pharmacol Res*. 2013;69(1):42-51. doi:10.1016/j.phrs.2012.10.007

NEJATI F, JUNNE S, NEUBAUER P. A Big World in Small Grain: A Review of Natural Milk Kefir Starters. *Microorganisms*. 2020;8(2):192. Published 2020 Jan 30. doi:10.3390/microorganisms8020192

NG M, FLEMING T, ROBINSON M, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2014;384(9945):766-8.

NURLIYANI; HARMAYANI, E. Sunarti Antidiabetic Potential of Kefir Combination from Goat Milk and Soy Milk in Rats Induced with Streptozotocin-Nicotinamide. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour*. 2015, 35, 847–858. [PubMed]

OSTADRAHIMI, A.; TAGHIZADEH, A.; MOBASSERI, M.; FARRIN, N.; PAYAHOO, L.; BEYRAMALIPOOR 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, 228–237

OUCHI N, PARKER JL, LUGUS JJ, WALSH K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):85-97. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2921>. PMID:21252989

PAPATHANASOPOULOS A, CAMILLERI M. Dietary fiber supplements: effects in obesity and metabolic syndrome and relationship to gastrointestinal functions. *Gastroenterology.* 2010 Jan;138(1):65-72.e1-2. doi: 10.1053/j.gastro.2009.11.045. Epub 2009 Nov 18. PMID: 19931537; PMCID: PMC2903728.

PRADO M.R., BLANDÓN L.M., VANDENBERGHE L.P.S. Milk kefir: Composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Front. Microbiol.* 2015;6:1177–1186. doi: 10.3389/fmicb.2015.01177.

QIN J, LI R, RAES J, ARUMUGAM M, BURGDORF KS, MANICHANH C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010;464:59-65

R. L. BERTRAND, S. SENADHEERA, I. MARKUS, L. LIU, L. HOWITT, H. CHEN, T. V. MURPHY, S. L. SANDOW, P. P. BERTRAND. A Western Diet Increases Serotonin Availability in Rat Small Intestine, *Endocrinology*, Volume 152, Issue 1, 1 January 2011, Pages 36–47, <<https://doi.org/10.1210/en.2010-0377>>

R. ROSENHECK Fast food consumption and increased caloric intake: a systematic review of a trajectory towards weight gain and obesity risk *Obes. Rev.*, 9 (2008), pp. 535-547, 10.1111/j.1467-789X.2008.00477.x

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.

S. BASU, M. MCKEE, G. GALEA, D. Stuckler Relationship of soft drink consumption to global overweight, obesity, and diabetes: a cross-national analysis of 75 countries *Am. J. Public Health*, 103 (2013), pp. 2071-2077, 10.2105/AJPH.2012.300974

SABET SARVESTANI F, RAHMANIFAR F, TAMADON A. Histomorphometric changes of small intestine in pregnant rat. *Vet Res Forum*. 2015;6(1):69-73

SAMPEY, B.P., VANHOOSE, A.M., WINFIELD, H.M., FREEMERMAN, A.J., MUEHLBAUER, M.J., FUEGER, P.T., NEWGARD, C.B., MAKOWSKI, L., 2011. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity* 19, 1109–1117. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.18>.

SCOARIS CR, RIZO GV, ROLDI LP, DE MORAES SM, DE PROENÇA AR, PERALTA RM, NATALI MR. Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats. *Nutrition*. 2010 Mar;26(3):312-20. doi: 10.1016/j.nut.2009.04.012. Epub 2009 Aug 8. PMID: 19665869.

SHAFAT, A., MURRAY, B., RUMSEY, D., 2009. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. *Appetite* 52, 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.07.004>.

SIRTORI CR, PAVANELLO C, CALABRESI L, RUSCICA M. Nutraceutical approaches to metabolic syndrome. *Ann Med*. 2017 Dec;49(8):678-697. doi: 10.1080/07853890.2017.1366042. Epub 2017 Aug 22. PMID: 28786719.

SONNENBURG, JUSTIN L.; BÄCKHED, FREDRIK. Diet–microbiot interactions as moderators of human metabolism. *Nature*, v. 535, n. 7610, p.56-64, jul. 2016. Springer Science and Business Media LLC <http://dx.doi.org/10.1038/nature18846>

SOUTH, T., WESTBROOK, F., MORRIS, M.J., 2012. Neurological and stress related effects of shifting obese rats from a palatable diet to chow and lean rats from chow to a palatable diet. *Physiol. Behav.* 105, 1052–1057. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.11.019>.

STANISLAWSKI MA, DABELEA D, WAGNER BD, ISZATT N, DAHL C, SONTAG MK, et al. Gut Microbiota in the First 2 Years of Life and the Association with Body Mass Index at Age 12 in a Norwegian Birth Cohort. *mBio* 2018;9:e01751-18.

SUGIMURA N, OTANI K, WATANABE T, et al. High-fat diet-mediated dysbiosis

exacerbates NSAID-induced small intestinal damage through the induction of interleukin-17A. *Sci Rep.* 2019;9(1):16796. Published 2019 Nov 14. doi:10.1038/s41598-019-52980-2

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS (TACO) 1ª ed. Campinas: NEPA – UNICAMP, 2004. 42 p. [14] PHILIPPI, Sonia Tucunduva.

TAYLOR, B. A.; PHILLIPS, S. J. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. *Genomics*, v. 34, n. 3, p. 389-398, 1996.

TON AMM, CAMPAGNARO BP, ALVES GA, AIRES R, CÔCO LZ, ARPINI CM, GUERRA E OLIVEIRA T, CAMPOS-TOIMIL M, MEYRELLES SS, PEREIRA TMC, VASQUEZ EC. Oxidative Stress and Dementia in Alzheimer's Patients: Effects of Synbiotic Supplementation. *Oxid Med Cell Longev.* 2020 Jan 13;2020:2638703. doi: 10.1155/2020/2638703. PMID: 32411323; PMCID: PMC7201593.

VON DIEMEN V, TRINDADE EN, TRINDADE MR. Modelo experimental para induzir obesidade em ratos [Experimental model to induce obesity in rats]. *Acta Cir Bras.* 2006 Nov-Dec;21(6):425-9. Portuguese. doi: 10.1590/s0102-86502006000600013. PMID: 17160257.

WALSH AM, CRISPIE F, KILCAWLEY K, O'SULLIVAN O, O'SULLIVAN MG, CLAESSION MJ, COTTER PD. Microbial Succession and Flavor Production in the Fermented Dairy Beverage Kefir. 2017 Feb 21;2(1). pii: e00003-17. doi: 10.1128/mSystems.00003-17. eCollection 2017 Jan-Feb. PubMed PMID: 28251185; PubMed Central PMCID:5320000.

WANG, L.; ZHONG, H.; LIU, K.; GUO, A.; QI, X, CAI, M. The evaluation of kefir pure culture starter: Liquid-core capsule entrapping microorganisms isolated from kefir grains. 2016;

WEISS GA, HENNET T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(16):2959-2977. doi:10.1007/s00018-017-2509-x

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases report of a joint who/fao expert consultation. Geneva: World Health Organ

Tech Rep Ser, 2013

World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1999.

WU GD, CHEN J, HOFFMANN C, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 2011;334(6052):105-108. doi:10.1126/science.1208344

YILMAZ İ, DOLAR ME, ÖZPINAR H. Effect of administering kefir on the changes in fecal microbiota and symptoms of inflammatory bowel disease: A randomized controlled trial. *Turk J Gastroenterol*. 2019;30(3):242-253. doi:10.5152/tjg.2018.18227

YU J, YANG X, LUO Y, YANG X, YANG M, YANG J, ZHOU J, GAO F, HE L, XU J. Adverse effects of chronic exposure to nonylphenol on non-alcoholic fatty liver disease in male rats. *PLoS One*. 2017 Jul 7;12(7):e0180218. doi: 10.1371/journal.pone.0180218. PMID: 28686624; PMCID: PMC5501508.

ZHONGHUA NEI KE ZA ZHI. Recommendation for the prevention and treatment of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal ulcers and its complications. Chinese Rheumatism Data Center; Chinese Systemic Lupus Erythematosus Treatment and Research Group. 2017 Jan 1;56(1):81-85. doi: 10.3760/cma.j.issn.0578-1426.2017.01.021. PubMed PMID:28056333.